

Kapalinová chromatografie s různými typy detekce pro analýzu biologicky významných látek

Teoretická část: vysvětlení základů kapalinové chromatografie, různé typy detektorů.

Praktická část: ukázka analýzy na elektrochemickém, UV/VIS a hmotnostním detektoru.

I. ÚVOD

1. Chromatografické metody

1.1 Princip chromatografie

Chromatografie je separační metoda, tedy metoda, při které se oddělují - separují složky obsažené ve vzorku. Svým určením je to především metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku.

Chceme-li od sebe oddělit dvě látky přítomné ve vodném roztoku, z nichž jedna je rozpustná v organickém rozpouštědle nemísitelném s vodou a druhá látka v něm rozpustná není, můžeme rozpustnou látku do tohoto rozpouštědla vyextrahovat. Pokud jsou však rozpustnosti těchto dvou látek podobné, dosáhneme extrakcí pouze toho, že se obě látky rozdělí mezi vodnou a organickou fázi, přičemž jejich poměr se v obou fázích poněkud změní: v organické fázi bude více rozpustnější látky, zatímco ve vodné fázi zůstane více látky méně rozpustné. Po dostatečném počtu těchto kroků se dvě látky zcela oddělí. Takovýto postup je ovšem prakticky neproveditelný, těžkopádný a zdoluhavý, s rostoucím objemem spojených podílů vodné a organické fáze bychom dělené látky taky neúnosně zředili. Daleko elegantnějším řešením je imobilizovat jednu z fází na vhodném inertním nosiči, a nechat druhou fázi, obsahující dvě oddělované látky, zvolna protékat podél této imobilizované fáze. Dvě látky, které chceme oddělit a které unáší tekoucí fáze, budou střídavě přecházet z jedné fáze do druhé, jednotlivé extrakční kroky však již nebudou odděleně definovány. Tak se postupně látky od sebe prostorově oddělí, v důsledku výše popsaného děje, který se nazývá diferenční migrace. Toto je základním principem chromatografie [67].

Na tomto základě fungují veškeré chromatografické metody, i když mechanismy dělení jsou rozmanité - různé afinity dělených látek ke dvěma fázím mohou být založeny nejen na rozpustnosti, ale i na adsorpci, chemisorpci, síťových efektech, iontové výměně a na kombinaci uvedených mechanismů. Imobilizované tuhé či kapalné fázi se říká fáze stacionární či zakotvená, tekoucí fázi, kterou může být kapalina, plyn či nadkritická tekutina, se říká fáze mobilní. Dělené látky rozpuštěné v mobilní fázi se běžně nazývají soluty. Záznamu závislosti koncentrace solutů na objemu proteklé mobilní fáze nebo na čase se říká chromatogram [67].

Princip chromatografického dělení si můžeme přiblížit pomocí následujícího příkladu ze života. Představme si, že skupina vodáků na kanoích sjíždí řeku, jde o volně proudící tok, který zde představuje mobilní fázi. Je pozdní letní odpoledne, vodáci jsou unaveni a nepádlují, jejich maximální rychlost je tedy dána rychlostí toku řeky. Tu na břehu uvidí skupinu sluníčích se, nepřilíš oděných krasavic, v naší analogii je můžeme považovat za stacionární fázi. Jak budou reagovat naši vodáci? Někteří, především dámské osádky a příslušníci 4% mužské menšiny, se v klidu nechají unášet dále, neboť jejich afinita ke stacionární fázi je nulová. Ostatní posádky začnou brzdit, aby alespoň prodloužili dobu své vizuální interakce se stacionární fázi. Některé lodě pravděpodobně zastaví a posádky vystoupí na břeh, došlo k adsorpci, kdy pevná interakce může být zrušena až změnou vnějších podmínek (útěk krasavic, průtrž mračen apod.). Můžeme tedy očekávat, že původně jednotně se pohybující skupina částic (plavidel) se rozdělí na podskupiny a to podle své afinity vůči stacionární fázi, svou roli může hrát i afinita k mobilní fázi, reprezentovaná zde například potřebou být včas na tábořišti, na nádraží či v restauraci. (VŠCHT, Laboratorní techniky biochemie).

1.2 Retenční charakteristiky

Zadržování rozpuštěné látky stacionární fází způsobuje, že migruje menší rychlostí, než je průměrná rychlost mobilní fáze. Molekula složky stráví v koloně určitou dobu, která se nazývá **retenční čas** t_R . Tato doba se dělí na čas, který molekula setrvává v mobilní fázi – **mrtvý retenční čas** t_M a čas strávený ve stacionární fázi – **redukovaný retenční čas** t'_R . Tyto časy splňují retenční rovnici:

$$t_R = t_M + t'_R$$

Pro inert, který se nepoutá na stacionární fázi a putuje stejnou rychlostí jako mobilní fáze, je retenční čas totožný s mrtvým retenčním časem. Tyto charakteristiky se používají ke kvalitativní analýze, protože v daných podmínkách můžeme konkrétní složku charakterizovat jejím retenčním nebo redukovaným retenčním časem.

Relativní zadržení složky v koloně vyjádříme **retenčním faktorem** R . Je-li retenční čas složky t_R a kolona má délku L , je průměrná rychlost migrace této zóny složky $v = L/t_R$. Průměrná rychlost inerty $u = L/t_M$. Retenční faktor je roven poměru těchto rychlostí. Po dosažení za rychlosti se délka kolony vykrátí.

$$R = \frac{v}{u} = \frac{t_M}{t_R}$$

Nosná mobilní fáze proudící kolonou má určitý objemový průtok F_m . Vynásobíme-li jím retenční čas složky, dostaneme objem potřebný k eluci složky – **retenční objem** V_R .

$$V_R = t_R F_m$$

Vynásobíme-li retenční rovnici objemovým průtokem, dostaneme:

$$V_R = t_R F_m = t_M F_m + t'_R F_m = V_M + V'_R$$

kde V_M je **mrtvý retenční objem**, V'_R **redukovaný retenční objem**.

Složka má při ustavení rovnováhy ve stacionární fázi koncentraci c_s a v mobilní fázi c_m . Poměr mezi těmito koncentracemi je v ideálním případě konstantní a nazývá se **distribuční konstanta** K_D , protože charakterizuje distribuci – rozdělení složky mezi obě fáze:

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}$$

Zadržení složky v koloně vyjadřujeme retenčními charakteristikami, které můžeme uvádět buď absolutně pomocí časů nebo objemů a nebo relativně srovnáním se standardy nebo inertem. Látková koncentrace složky ve stacionární fázi c_s je definována jako poměr látkového množství kolony složky ve stacionární fázi a objemu stacionární fáze. Obdobně je koncentrace složky v mobilní fázi c_m definována jako poměr látkového množství složky v mobilní fázi a volného objemu kolony:

$$c_s = \frac{n_s}{V_s} \quad c_m = \frac{n_m}{V_m}$$

Během pohybu kolonou molekula složky část retenčního času setrvává ve stacionární fázi (redukovaný retenční čas) a část v mobilní fázi (mrtvý retenční čas). S rostoucí dobou pobytu molekul ve stacionární fázi roste i jejich látkové zastoupení ve stacionární fázi. Tuto úvahu lze rovněž vyjádřit tak, že poměr látkového množství složky ve stacionární fázi ku látkovému množství složky v mobilní fázi je stejný jako poměr redukovaného retenčního a mrtvého retenčního času složky:

$$\frac{n_s}{n_m} = \frac{t'_R}{t_M} \Rightarrow t'_R = t_M \frac{n_s}{n_m}$$

Ve vztahu pro distribuční konstantu dosadíme za koncentrace z jejich definičních výrazů:

$$K_D = \frac{c_s}{c_m} = \frac{n_s V_m}{n_m V_s}$$

Pro retenční čas bude s využitím obou výše uvedených vztahů platit:

$$t_R = t_M + t'_R = t_M + t_M \frac{n_s}{n_m} = t_M \left(1 + \frac{n_s}{n_m} \right) = t_M \left(1 + K_D \frac{V_s}{V_m} \right)$$

Vynásobíme-li tuto rovnici objemovým průtokem F_m , dostaneme výraz pro retenční objem:

$$V_R = F_m t_R = F_m t_M + F_m t'_R = F_m t_M + F_m t_M K_D \frac{V_s}{V_m}, \text{ tedy}$$

$$V_R = V_M + V_M K_D \frac{V_s}{V_m}$$

Čím je separace účinnější, tím lépe dokážeme od sebe složky směsi oddělit. Účinnost separace v kolonové chromatografii charakterizujeme **počtem teoretických pater** n . Teoretické patro je pomyslná část kolony, ve které dochází k ustavení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Délka této části kolony se nazývá **výškový ekvivalent teoretického patra** H . Pro kolonu o délce L je výškový ekvivalent teoretického patra $H = L/n$.

Počet teoretických pater n lze určit z chromatogramu z šířky píku v jeho základně Y nebo z šířky píku v polovině jeho výšky $Y_{1/2}$ a retenčního času t_R podle vztahů:

$$n = 16 \left(\frac{t_R}{Y} \right)^2 \quad n = 5,54 \left(\frac{t_R}{Y_{1/2}} \right)^2$$

Podle **van Deemterovy teorie** vedou k rozšiřování zóny v koloně, a tím k růstu výškového ekvivalentu teoretického patra, tři děje: **turbulentní difúze** H_A , **molekulární difúze** H_B a **odpor proti převodu hmoty** H_C . Výsledný výškový ekvivalent je podle této teorie dán součtem těchto příspěvků:

$$H = H_A + H_B + H_C$$

1.3 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografických metod je velké množství. Proto je účelné jejich rozdělení do určitých skupin. Vzhledem ke značné různorodosti se dělí podle několika hledisek [67]:

1) Podle skupenství mobilní fáze

- * Kapalinová chromatografie (*Liquid Chromatography* - LC) - mobilní fází je kapalina
- * Plynová chromatografie (*Gas Chromatography* - GC) - mobilní fází je plyn.

2) Podle uspořádání stacionární fáze

- * Kolonová chromatografie - stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně).
- * Plošné techniky:

Papírová chromatografie (*Paper Chromatography* - PC) - stacionární fáze je součástí chromatografického papíru.

Tenkvrstvá chromatografie (*Thin Layer Chromatography* - TLC) – stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu (např. skleněné desce nebo hliníkové fólii).

3) Podle povahy děje, který převládá při separaci

Obvykle se při separaci uplatňuje několik fyzikálně-chemických dějů současně, ale jeden z nich převládá.

* Rozdělovací chromatografie - o separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi (kapalina) a mobilní fází (kapalina a plyn)

* Adsorpční chromatografie - o separaci rozhoduje různá schopnost složek poutat se (adsorbovat se) na povrch stacionární fáze (tuhá látka).

* Iontově-výměnná chromatografie - o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty vzorku.

* Gelová chromatografie - složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fázi (gelu); menší molekuly vzorku se v pórech gelu zdržují déle (molekulově síťový efekt).

* Afinitní chromatografie - stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah (afinitu).

1.4 Kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci složek vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fází. Čas, jaký stráví v jedné nebo druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace - adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii [67].

Protože je možno pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti převádět vzorek na plyn, je kapalinová chromatografie vhodná i pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin.

Srovnáme-li kapalinovou a plynovou chromatografii z hlediska účinnosti, je v kapalinové chromatografii nižší příspěvek molekulární difúze složky, protože kapalina má o hodně vyšší

viskozitu než plyn. Ve van Deemterově rovnici je tento příspěvek možno zanedbat. naopak, v plynové chromatografii je zanedbatelný příspěvek odporu převodu hmoty v mobilní fázi, ale v kapalinové chromatografii se projevuje a sčítá se s příspěvkem odporu proti převodu hmoty ve stacionární fázi [67].

Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou a tenkovrstvou či papírovou kapalinovou chromatografii.

U planárních technik kapalinové chromatografie je stacionární fáze umístěna v ploše. Je součástí chromatografického papíru (PC) nebo tenké vrstvy na vhodné podložce ze skla, hliníku nebo polyesteru (TLC). Stacionární fázi v papírové chromatografii je voda jako vlhkost poutaná na celulózu, proto jde o chromatografii LLC. V tenkovrstvé chromatografii se podle použité tenké vrstvy, která je obvykle na bázi silikagelu nebo oxidu hlinitého, uplatňuje adsorpce (LSC), případně konkuruje rozdělování. Pro velmi snadnou práci, nenáročnou na laboratorní vybavení, jsou tyto metody hojně využívány. Moderní modifikací TLC je HPTLC (*High performance TLC* – vysoce účinná tenkovrstvá chromatografie), kde se používá vrstva tříděného mikropórovitého sorbentu (silikagelu). HPTLC dovoluje zpracovávat i 20 vzorků na jedné desce současně. K dávkování a vyhodnocování se využívá instrumentálních metod. Vzorek se nanáší pomocí kapiláry nebo mikropipety na start, který je blízko jednomu konci plochy. U vysoce účinných tenkých vrstev se nanášení provádí automatickými dávkovači. Tímto koncem se po vyschnutí rozpouštědla ponoří papír nebo podložka s tenkou vrstvou do mobilní fáze. Systém se umístí v prostoru nasyceném parami mobilní fáze. Mobilní fáze vzlíná papírem nebo tenkou vrstvou pomocí kapilárních sil, pohybuje se přes start a unáší s sebou složky vzorku tím rychleji, čím méně se poutají na stacionární fázi a čím jsou lépe rozpustné v mobilní fázi. Proto se vzorek rozdělí na zóny obsahující jednotlivé složky. Vyvíjení se ukončí před dosažením konce plochy. Čelo se ihned označí, po odpaření rozpouštědla již nemusí být rozeznatelné[67].

V klasické kolonové chromatografii je stacionární fázi zrnitý sorbent s velkým průměrem částic (např. oxidem hlinitým) a je umístěn ve skleněné trubici dlouhé asi 0,5 m a průměru cca 2 cm dole zakončenou fritou a kohoutem. Na horní vrstvu náplně dávkujeme malé množství

vzorku a pak přidáváme mobilní kapalnou fázi. Působením gravitační síly mobilní fáze postupuje kolonou, složky vzorku se od sebe separují a v různých časech opouštějí spodní část kolony[67].

Klasické kolonové provedení nemá potřebnou účinnost, ale stalo se základem vysoce účinné kapalinové chromatografie.

1.5 Vysoce účinná kapalinová chromatografie

V principu je tato metoda shodná s klasickou kolonovou chromatografií. HPLC se vyvinula z plynové chromatografie v počátcích 70. let. Vysokých účinností se dosahuje použitím stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Tím se dosahuje účinností řádově desítek tisíc pater na metr kolony. Průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem (jednotky až desítky MPa) – proto také bývá tato metoda někdy nazývána vysokotlaká kapalinová chromatografie (*high-pressure liquid chromatography*). Dávkuje se malá množství vzorku (řádově mikrolitry). K detekci jsou nutné citlivé detektory, které umožňují kontinuální monitorování látek na výstupu z kolony. Signál detektoru se zpracovává počítačem. Z výše uvedeného je zřejmé, že HPLC vyžaduje poměrně náročnou instrumentaci [67].

Mezi výhody HPLC patří zejména široká oblast použitelnosti: lze analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární (cca 80% veškerých známých látek je možné analyzovat metodou HPLC). Další výhodou je možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze, která na rozdíl od GC není inertní, ale významně se podílí na separaci. Kromě analytických aplikací se HPLC často používá k preparacím. Nevýhodou ve srovnání s GC je náročnější instrumentace a složitější mechanismus separace.

Teorie HPLC je již vypracována, rovněž aplikace HPLC jsou dostatečně popsány. Instrumentální vývoj HPLC stále probíhá a směřuje zejména k miniaturizaci kolon (mikronáplňové a kapilární kolony) i celkového zařízení [67].

Obecné teoretické pojmy uvedené výše platí také pro HPLC. Retence se téměř vždy vyjadřuje pomocí retenčního faktoru k , popř. retenčním objemem V_R . Na rozdíl od retence (zadržování látek) se jejich vymývání z kolony nazývá **eluce**. Mobilní fáze je proto nazývána též

eluční činidlo či eluent a schopnost vymývat látky z kolony **eluční silou**. Čím rychleji jsou vymývány látky z kolony, tím má mobilní fáze vyšší eluční sílu. Rozpouštědla seřazená podle eluční síly tvoří eluotropickou řadu. Látky lze eluovat:

- a) mobilní fázi o konstantním složení (konstantní eluční síla) - **izokratická eluce**,
- b) eluční sílu lze změnit skokem,
- c) eluční sílu je možné měnit kontinuálně podle určitého programu (lineárního či nelineárního) - **gradientová eluce**.

Při gradientové eluci měníme během analýzy složení mobilní fáze. Gradientová eluce se používá pro látky s velkými rozdíly v retenčních faktorech ($10 < k < 1$). Mezi její hlavní výhody patří kratší doba analýzy a zvýšení citlivosti detekce pro později eluující látky. Gradienty mohou mít různý tvar: lineární, konvexní, konkávní atd. Nejběžnější je lineární gradient - kontinuální zvyšování koncentrace silnějšího eluentu B v rozpouštědle A [67].

Gradient je charakterizován:

- počáteční a koncovou koncentrací,
- tvarem,
- směrnici v případě lineárního gradientu.

Retenční faktor k_i při gradientové eluci lze odhadnout z retenčního faktoru k_0 v čistém rozpouštědle A, z doby od začátku gradientu t , ze směrnice gradientu b a mrtvého času t_M :

$$\log k_i = \log k_0 - b (t/t_M) \square$$

Při lineární gradientové eluci mají všechny píky stejnou šířku.

1.6 Stacionární fáze v HPLC

Z teorie chromatografie vyplývá, že rozhodující vliv na separaci při použití náplňových kolon má velikost a uspořádanost částic (členy A a C van Deemterovy rovnice). Je zřejmé, že čím jsou částice menší, tím je H nižší a separace účinnější. Běžně se používají částice velikosti 5 až 10 μm , ale v současnosti jsou komerční náplně s velikostí 2 μm i menšími. Dále vyplývá z teorie,

že separace je účinnější tehdy, pokud mají částice pravidelný (kulový) tvar, jednotnou velikost a kolona je jimi homogenně naplněna. Tyto stacionární fáze však mají i některé nevýhody: I při nejdokonalejším naplnění kolony zaujmají částice jen asi 75% jejího objemu a v průběhu používání se působením vysokých tlaků náplň sesedá a kolony se znehodnocují [67].

Kompaktnější zaplnění prostoru v koloně nabízejí monolitické stacionární fáze. Kolona je zcela vyplněna polymerem o definované pórovitosti, buď organického nebo anorganického původu, který se uvnitř kolony vytvoří vhodnou polymerační reakcí v roztoku. Kvalita kolon se tak zlepšuje ve srovnání s kolonami náplňovými. Monolitické kolony se vyznačují velkou mechanickou stabilitou a odolností vůči změnám pH a velkou účinností separace i při velkých průtocích mobilní fáze. V praxi jsou však stále nejpoužívanější tradiční náplňové kolony [67].

Při analytických aplikacích bývá délka kolony mezi 5 a 25 cm, průměr kolon několik milimetrů, objem vzorku 1-20 μl a průtok mobilní fáze většinou kolem 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Při preparacích, kde je hlavním požadavkem maximální výtěžek a produktivita při nejnižších finančních nákladech a v nejkratší době, se průměr kolon pohybuje v centimetrech, objem vzorku v mililitrech a průtok v desítkách $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Zcela nový typ stacionární fáze představují vtištěné polymery (*imprinted polymers*). Jsou obdobou monolitických kolon, ale navíc je do náplně zabudován „obtisk“ analytu, který chceme oddělit. Při přípravě polymeru *in situ* v koloně se přidá analyzovaná látka (např. jeden izomer valinu, L-valin) a po ukončení polymerace se tento analyt vymyje z kolony. Po jeho molekule zůstane v náplni charakteristická dutina, přístupná pouze pro L-valin. D-valin se touto stacionární fází nezadrží. Vtištěné polymery jsou vhodné především pro obtížné separace, jako jsou např. chirální separace léčiv [67].

1.7 Mobilní fáze v HPLC

Mobilní fáze v kapalinové chromatografii není inertní, ale na rozdíl od plynové chromatografie se významně podílí na separačním procesu. Možnosti změny složení mobilní fáze jsou prakticky neomezené a je vždy jednodušší změnit složení mobilní fáze než použít jinou stacionární fázi. Mobilní fáze je především charakterizována polaritou a selektivitou [67].

Polarita je schopnost rozpouštědla podílet se na polárních interakcích. Parametr polarity P'_{tot} je definován jako suma příspěvků interakcí proton-akceptorových, x_e , proton-donorových, x_d , a dipól-dipólových, x_n :

$$P'_{tot} = x_e P' + x_d P' + x_n P'$$

Selektivita je definována jako relativní retence dvou sousedních látek:

$$r_{1,2} = \alpha_{1,2} = t'_{R2} / t'_{R1} = k_2 / k_1$$

Vlastnosti mobilní fáze jsou důležité z hlediska separace i detekce. Mobilní fáze by měla dávat v detektoru minimální signál, a tím umožňovat co nejcitlivější detekci solutů. Viskozita, stlačitelnost, toxicita a absorpce ultrafialového záření by měly být co nejnižší.

V kapalinové chromatografii se pro separace využívá adsorpce, rozdělování mezi dvě fáze na základě různé rozpustnosti (sem patří separace na chemicky vázaných fázích), iontová výměna, biospecifické interakce (molekulové rozpoznávání) a síťový efekt. S výjimkou síťového efektu jde o princip termodynamické rovnováhy. Termodynamické rovnováhy je dosaženo, když jsou chemické potenciály analyzované látky v obou fázích stejné. V reálném chromatografickém systému se obvykle uplatňuje více typů interakcí současně, např. na chemicky vázaných fázích je rozpouštění kombinováno s adsorpcí, případně s iontovou výměnou [67].

Adsorpční chromatografie s polárními adsorbenty jako stacionárními fázemi historicky předchází chromatografii s nepolárními stacionárními fázemi, která se začala rozvíjet až s rozvojem přípravy chemicky modifikovaných fází. Aby se tyto dva základní typy kapalinové chromatografie odlišily, začalo se klasické adsorpční chromatografii s polární stacionární a nepolární mobilní fází často říkat **chromatografie s normálními fázemi**, a obrácenému typu s nepolární stacionární a polární mobilní fází **chromatografie s obrácenými fázemi** či běžněji **reverzní chromatografie**. V dnešní analytické praxi je reverzní chromatografie mnohem běžnější, protože je aplikovatelná na podstatně širší okruh analytů a typů vzorku než chromatografie s normálními fázemi.

1.8 Instrumentace v HPLC

Přístroje v HPLC jsou mnohem složitější než pro klasickou sloupcovou LC, kde mobilní fáze se pohybuje gravitační silou. Odplyněná mobilní fáze se přivádí ze zásobníku mobilní fáze (při HPLC se používají toxická rozpouštědla, proto zásobníky mobilní fáze musí být uzavřené nádoby a každý HPLC přístroj by měl být připojen na odtah) přes filtr (zachycuje mechanické nečistoty eventuálně přítomné v mobilní fázi) do čerpadla. Odplynění je důležité proto, aby se v detektoru v důsledku velkého tlakového spádu v systému netvořily bubliny. K odplynění se používá podtlak, ultrazvuk či probublávání heliem, popř. kombinace těchto postupů [67].

Čerpadla musí být vysokotlaká, protože kolony s velikostí částic okolo 10 μm a menší kladou velký odpor a k dosažení optimálních průtoků jsou nutné vysoké vstupní tlaky, až desítky MPa. Průtok musí být konstantní, reprodukovatelný a bezpulzní. Jeho hodnoty se pohybují v $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$ pro kapilární kolony, v $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ pro mikronáplňové kolony, kolem $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ pro běžné náplňové kolony a v desítkách $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ pro preparativní kolony. Pro malé průtoky se používají pístová čerpadla, což jsou v podstatě injekční stříkačky. Jejich výhodou je bezpulsní chod. Pro běžné analytické kolony se nejčastěji používají pístová dvoučinná (reciprokační) čerpadla. Jejich nevýhoda, pulsní chod, se kompenzuje použitím dvou nebo více čerpadel současně, přičemž jejich písty se nepohybují rovnoměrně, ale parabolicky s časem a jejich činnost je fázově posunuta. Pro gradientovou eluci se používají v zásadě dva způsoby: směšování mobilních fází za nízkého tlaku a za vysokého tlaku. První způsob je levnější, neboť postačí jedno čerpadlo. Jeho nevýhodou je, že k míšení dochází daleko od kolony. Druhý způsob vyžaduje dvě čerpadla, složky se mísí těsně před kolonou, takže skutečné složení fáze v koloně odpovídá programovanému složení [67].

Z čerpadla se vede mobilní fáze do dávkovacího zařízení. Téměř výhradně se používají dávkovací ventily se smyčkou. Nejčastěji jsou to šesticestné ventily s vyměnitelnou smyčkou, která se plní injekční stříkačkou. Objem smyčky se pohybuje od desítek nanolitřů po mikrolitry. Dávkování je reprodukovatelné (opakovatelnost nástřiků se pohybuje kolem 0,2 %) a lze je snadno automatizovat. Dávkované vzorky jsou vedeny do kolony [67].

Kolony jsou obvykle vyrobeny z nerezové oceli, avšak mohou být i skleněné či plastové. Jejich vnitřní průměr se pohybuje řádově od desítek mikrometrů do cca 1 cm pro analytické kolony až po několik centimetrů pro preparativní kolony [67].

Z kolony je eluát veden do detektoru. Signál detektoru se vyhodnocuje počítačem nebo jiným vyhodnocovacím zařízením. Jednotlivé části kapalinového chromatografu jsou propojeny spojovacími kapilárami, obvykle z nerezové oceli nebo PTFE. Musí mít co nejmenší vnitřní objem, aby jejich příspěvek k rozmývání elučních křivek byl co nejmenší. Materiál používaný v HPLC musí být mechanicky i chemicky odolný a nesmí být povrchově aktivní. V úvahu přicházejí nerezová ocel, sklo a některé plasty [67].

2. Detektory v kapalinové chromatografii

Obecné požadavky na detektory v HPLC jsou prakticky shodné s GC. Detektor by měl mít malý vnitřní objem, aby co nejméně přispíval k rozmytí elučních křivek. Signál detektoru by měl být stabilní a reprodukovatelný, lineárně závislý na koncentraci v co nejširším rozsahu (měl by mít široký lineární dynamický rozsah), citlivost (směrnice závislosti odezvy na koncentraci) by měla být co největší, mez detekce (obvykle se vyjadřuje jako koncentrace analytu, která způsobí signál, jenž je určitým násobkem průměrné hodnoty šumu - dvoj- až čtyřnásobkem) co nejnižší. Signál by měl mít šum co nejmenší (jak vysokofrekvenční, tak nízkofrekvenční) a neobsahovat drift (pomalý únik nulové linie) [67].

K detekci se využívá analytická vlastnost systému, která je ve známém a reprodukovatelném vztahu ke koncentraci analytu. Podle toho rozlišujeme detektory buď univerzální (měří vlastnost systému jako celku, tj. index lomu, tepelnou vodivost, relativní permitivitu) nebo selektivní (měří absorbanci při určité vlnové délce, elektrolytický proud při určitém potenciálu atd.). Selektivní detekce je obvykle citlivější a vhodnější zejména při analýze složek přítomných v komplikovaných maticích.

Mezi běžné detektory používané v HPLC patří spektrofotometrické, fluorimetrické, refraktometrické, hmotnostní a elektrochemické.

Spektrofotometrické detektory patří k nejpoužívanějším v HPLC, neboť jsou poměrně jednoduché, provozně spolehlivé, lze jimi detekovat velký počet látek a jsou kompatibilní s gradientovou elucí. Základním požadavkem je nízká absorpance mobilní fáze při použité vlnové délce detekce. Nejčastěji se používají dvoupaprskové spektrofotometry s průtokovou detekční celou. Cella musí být dostatečně malá při dostatečně dlouhé optické dráze (pro zachování potřebné citlivosti detekce). Složitější systém představují rychlé skenovací spektrofotometrické detektory. Detektor s diodovým polem opakovaně zaznamenává celá spektra během průchodu látek kyvetou. Získají se tak trojrozměrné chromatogramy (retenční čas vs. absorpance vs. vlnová délka). Tyto detektory mají význam především při určení homogenity píku (stejné spektrum při skenování píku znamená, že nejde o jednu látku, změna spektra svědčí o sumě nerozlišených analytů).

Fluorimetrické detektory jsou velmi selektivní pro látky, které mají přirozenou fluorescenci nebo je lze na fluoreskující deriváty převést. Jsou rovněž velmi citlivé, zhruba o tři řády citlivější než UV spektrofotometrické (detekční limit v $\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Analyt je ozařován zářením o určité vlnové délce (excitující záření ze zdroje, tj. rtuťové výbojky, deuteriové, wolframové či xenonové lampy či laseru) a produkuje záření o větší vlnové délce (emitované záření). Tento detektor je využíván tehdy, je-li vyžadována současně vysoká selektivita a citlivost měření, tj. při stopových analýzách látek v komplikovaných maticích, např. při sledování metabolitů léčiv, při analýze aminokyselin, složek nukleových kyselin atd.

Refraktometrické detektory patří mezi univerzální detektory. Měří se rozdíl indexů lomu solutu v mobilní fázi proti mobilní fázi. Protože tyto rozdíly jsou malé, je refraktometrický detektor málo citlivý. Nevýhodou je i značná závislost indexu lomu na teplotě a nemožnost použít gradientovou eluci. Refraktometrické detektory se využívají zejména tehdy, pokud ostatní detektory neposkytují pro analyzované látky odezvu (např. při analýze cukrů).

Hmotnostní spektrometrie je všestranná, rychlá a citlivá analytická metoda, která je často využívána ke kvalitativní i kvantitativní chemické analýze, protože poskytuje velké množství informací o vzorku a jeho složení.

Vysoce účinná kapalinová chromatografie ve spojení s elektrochemickou detekcí

Podle toho, jakou fyzikálně-chemickou vlastnost analytu měříme a využíváme pro analytické stanovení, rozlišujeme ED na:

- ampérometrické či voltampérometrické (proud)
- potenciometrické (potenciál)
- konduktometrické (vodivost)
- vysokofrekvenčně impedanční (kapacita)
- coulometrické (náboj)

Mezi nejrozšířenější ED ve spojení s HPLC patří ty, které pracují s konstantním potenciálem (ampérometrické, voltampérometrické). Vykazují vysokou citlivost, vysokou selektivitu a široký lineární koncentrační rozsah. Nejčastěji se elektrochemická detekce v průtokových systémech realizuje tak, že se na pracovní elektrodě udržuje konstantní potenciál v oblasti limitního proudu pro daný analyt a sleduje se hodnota proudu jako funkce času. Tato technika se přímo označuje jako průtoková ampérometrie (flow amperometry). Proudová odpověď při průtokové ampérometrii přímo odpovídá koncentraci elektroaktivní látky procházející detektorem [69]. Referentní a pomocná elektroda musí být „po proudu“ (downstream) kapaliny vzhledem k pracovní elektrodě, aby reakční produkty difundující z pomocné a referentní elektrody nerušily stanovení na elektrodě pracovní [68-71]. Kromě vlastního umístění elektrody v průtokovém uspořádání hraje významnou roli také konstrukce vlastní elektrochemické nádoby (cely). V průběhu elektrochemické detekce je potřebné zajistit pokud možno laminární proudění. Při vyšším průtoku mobilní fáze dochází ke vzniku turbulencí a zhoršení detekce studovaného analytu.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3. Elektrochemický detektor – Detekce glutathionu

Systém vysoce účinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) je složen ze dvou chromatografických pump Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, MA, USA) (pracovní rozsah 0.001-9.999 ml/min), a chromatografické kolony s reverzní fází Polaris C18A (150 × 4,6; 3 μm velikost částic, Varian Inc., CA, USA) a dvanácti-kanálového CoulArray elektrochemického detektoru (Model 5600A, ESA, USA). Detektor je složen z dvanácti průtočných analytických komůrek (Model 6210, ESA, USA), přičemž každá obsahuje referentní (hydrogen paládiovou), pomocnou a porézní grafitovou elektrodu. V řídicím modulu je uložena chromatografická kolona, elektrochemický detektor, prostor je termostátován na 30 °C. Jednotlivé vzorky jsou injektovány autosamplermem (Model 542, ESA, USA) při teplotě 4 °C. Injektovaný objem je maximálně 10 μl.

Reálné vzorky rostlin (průměrně 0.2 g svěží hmotnosti) jsou zmrazeny kapalným dusíkem z důvodu destrukce buněk. Zmražené části rostlin jsou rozetřeny v třecí misce a poté je do misky přidáno 2 ml fosfátového pufru o pH 7.0. Vzniklý roztok je homogenizován pomocí třepání na Vortex–2 Genie po 45 min při 4 °C (Scientific Industries, USA). Homogenát byl centrifugován (3 000 g) 30 min při 4 °C pomocí Universal 32 R centrifugy (Hettich-Zentrifugen GmbH, Německo).

Standard redukovaného a oxidovaného glutathionu připravíme z ACS chemikálií a vody o ACS čistotě v koncentraci 100 μM. Pracovní roztoky připravíme podle pokynů vedoucího cvičení.

4. Elektrochemický detektor + UV detektor – Detekce flavonoidů

HPLC-ED systém je složen ze dvou chromatografických pump Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, MA) (pracovní rozsah 0.001-9.999 ml min⁻¹) a chromatografické kolony s reverzní fází Zorbax SB C18 (150 × 4.6; 5 μm velikost částic, Agilent Technologies, USA) a dvou detektorů v tandemu UV/ED. Byl použit UV detektor (Model 528, ESA, USA).

K elektrochemické detekci byl použit detektor Coulochem III (ESA, USA) s amperometrickou průtokovou detekční celou (Model 5040, ESA, USA). Průtočná cela obsahuje planární elektrodu ze skelného uhlíku, hydrogen-paládiovou jako referenční a a uhlíkovou jako pomocnou elektrodu. Vzorek (15 μ l) byl injektován automaticky pomocí autosampleru (Model 542, ESA, USA), který má v sobě zabudován i termostatovaný prostor pro kolonu. Kolona byla termostatována na 30°C. Průtok mobilní fáze byl 1 ml min⁻¹. Mobilní fáze se skládala z A: kyseliny octové (50 mM) a B: kyseliny octové (50mM) v čistém Acetonitrilu. Látky byly eluovány následujícím gradientem: 0-0.2 min (5% B), 0,2->1 min (10 %B), 1->5,5 min (13 % B), 5,5->8 min (20 % B), 8->9 min (20 % B), 9->13 min (50 % B), 13->15 min (100 % B), 15->19 min (100 % B). Detekce většiny separovaných látek probíhala na UV detektoru při 260nm. Detekce kyseliny Acetyl-Salicylové probíhala na Elektrochemickém detektoru při aplikovaném potenciálu 950mV.

Reálné vzorky ovoce (průměrně 0.5 g svěží hmotnosti) jsou zmrazeny kapalným dusíkem z důvodu destrukce buněk. Zmražené části rostlin jsou rozetřeny v třecí misce a poté je do misky přidáno 2 ml methanolu. Vzniklý roztok je homogenizován pomocí třepání na Vortex-2 Genie po 45 min při 4 °C (Scientific Industries, USA). Homogenát je následně centrifugován (3 000 g) 30 min při 4 °C pomocí Universal 32 R centrifugy (Hettich-Zentrifugen GmbH, Německo).

Standard flavonoidů připravíme z ACS chemikálií a vody, a methanolu o ACS čistotě v koncentraci 100 μ M. Pracovní roztoky připravíme podle pokynů vedoucího cvičení.

5. UV/VIS a hmotnostní detektor – Analýza fytohormonů

Rostlinné fytohormony budou analyzovány pomocí přístroje vysoce účinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detektorem SpectraSYSTEM UV 2000 (Thermo separation products Inc.) a hmotnostním detektorem Finnigan QA (ThermoQuest). Pro separaci fytohormonů budou využity chromatografické kolony s reverzní fází Phenomenex C18, 250 \times 2.1 mm, velikost částic 5 μ m, Polaris C18, 250 \times 2.1 mm, velikost částic 5 μ m and Aquasil C18 250 \times 2.1mm, velikost částic 5 μ m.



NanoBioMetalNet CZ.1.07/2.4.00/31.0023

Tento projekt je spolufinancován z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.