

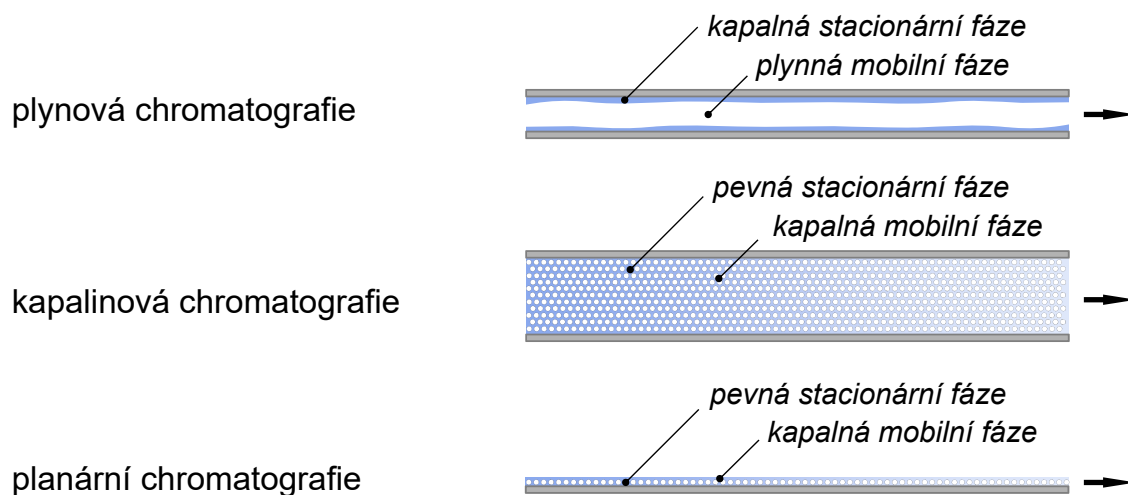
# Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Josef Cvačka, 3. 10. 2023

## Chromatografie

**Chromatografie** (z řečtiny χρώμα – *barva*, γραφειν – *psát*)

- souhrnné označení pro techniky oddělování (separace) látek, které jsou založené na odlišné distribuci jednotlivých látek mezi pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární) fází



## Chromatografické techniky

mobilní fáze	stacionární fáze	mechanismus dělení	metoda	
plyn	kapalina	rozdělování	plynová rozdělovací chromatografie (GLC)	
	pevná látka	adsorpce	plynová adsorpční chromatografie (GSC)	
		sítový efekt	plynová chromatografie na molekulových sítích (GSC)	
kapalina	kapalina	rozdělování	kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)	
		sítový efekt	gelová permeační chromatografie (GPC)	
	pevná látka	adsorpce	kapalinová adsorpční chromatografie (LSC)	
		iontová výměna	iontově výměnná chromatografie (IEC)	
		biospecifická reakce	afinitní chromatografie (AC)	
	planární	kapalina	rozdělování	tenkovrstvá rozdělovací chromatografie (TLC)
		pevná látka	rozdělování	papírová rozdělovací chromatografie (PC)
adsorpce			tenkovrstvá adsorpční chromatografie (TLC)	

*převzato z M.Klusáčková: Chromatografie „Královna analýz“*

## Vysokoučinná kapalinová chromatografie

**Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC):**

- separační metoda založená na rovnovážné distribuci analytů mezi nepohyblivou stacionární fází a kapalnou mobilní fází, která je protlačována pod vysokým tlakem.

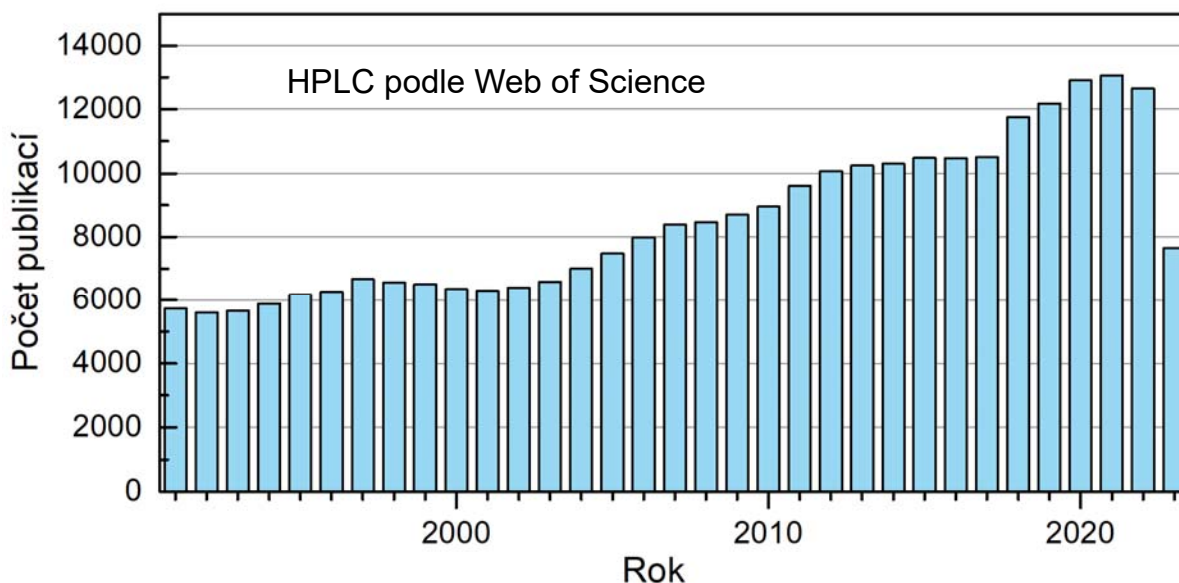


*foto M. Hoskovec*

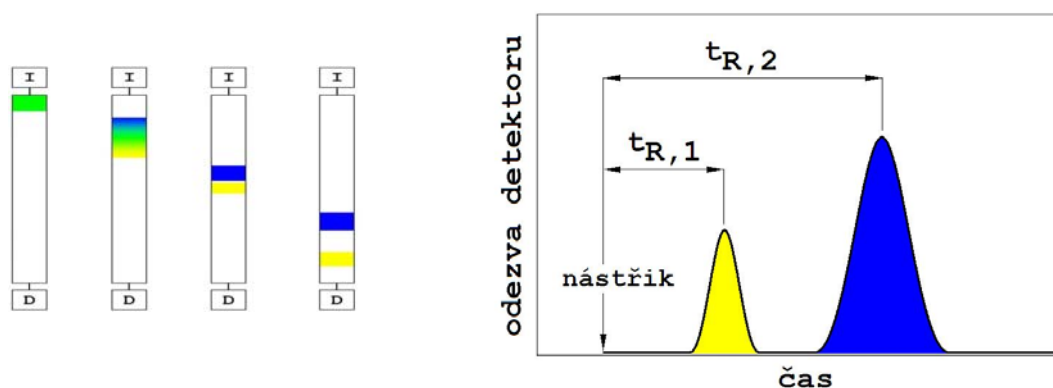
## Vysokoučinná kapalinová chromatografie

HPLC: téměř univerzální metoda (nelze analyzovat pouze některé typy vzorků)

- jedna z nejčastěji používaných analytických metod



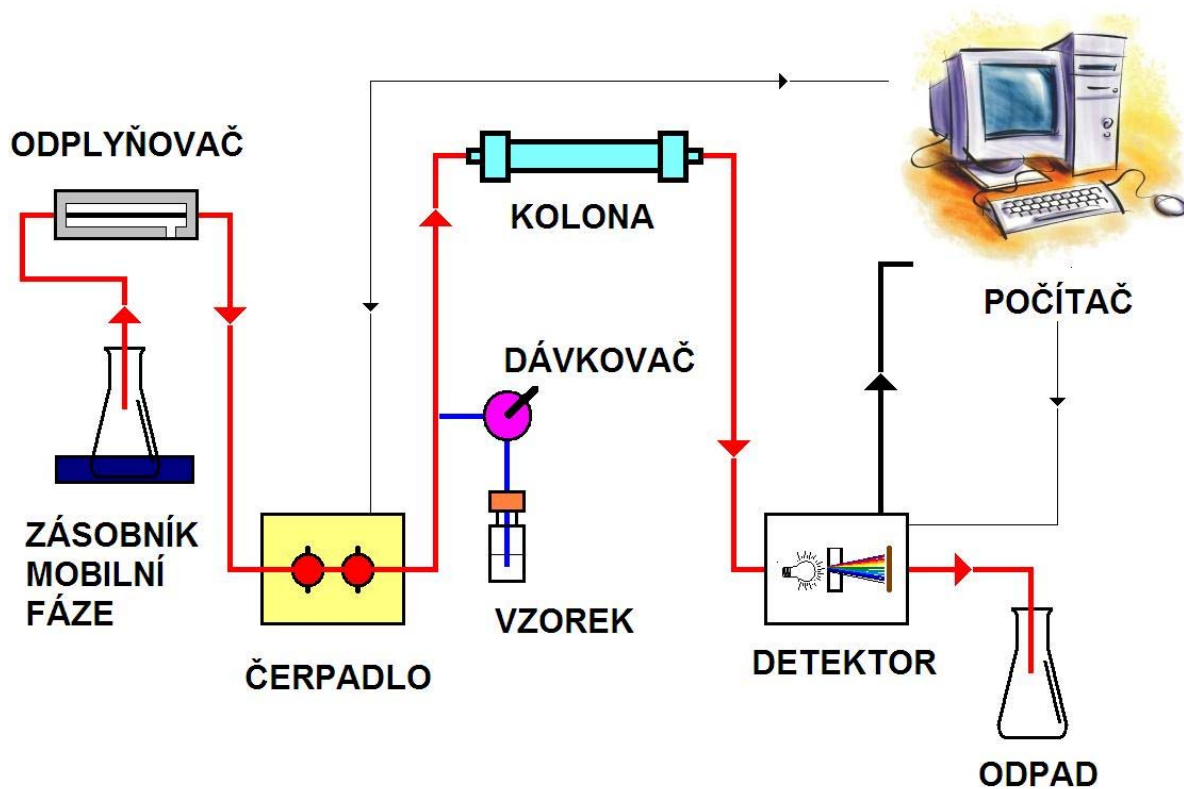
## Vysokoučinná kapalinová chromatografie



K dělení dochází v separační koloně, která obsahuje stacionární fázi (**sorbent**) a mobilní fázi (**eluent**).

Rozdílné analyty (dělené látky) mají rozdílnou **afinitu** ke stacionární fázi. Různé analyty podléhají různé distribuci (**rozdělování**) mezi mobilní a stacionární fází. Rozdílné analyty jsou rozdílně **zadržovány** a rozdílně **zpoždovány** (retardovány).

## Kapalinový chromatograf



## Kapalinový chromatograf: komerční přístroje








*První komerční HPLC:  
Model 820, DuPont Comp.  
(~1970)*



## Historie kapalinové chromatografie

- **19 století:** první separace na principu adsorpce
- **1901:** dělení chlorofylů, zavedení termínu chromatografie (Cvět)
- **1930:** znovuobjevení chromatografie, separace karotenoidů (Kuhn)
- **1938:** iontově-výměnná chromatografie na zeolitech (Urey, Taylor)
- **1940 – 1950:** rozvoj rozdělovací chromatografie; instr. vývoj (Martin, Synge)
- **1961:** gelová chromatografie (Moore)
- **1964:** využití malých částic stacionární fáze – počátky HPLC (Giddings)
- **1968:** afinitní chromatografie (Cuatrecasas)
- **1979:** chirální chromatografie (Okamoto)
- **1980 – 2000:** další vývoj stacionárních fází pro HPLC
- **2004:** zavedení UHPLC (Waters Corp.)
- **2009:** zavedení 3- a 5- $\mu\text{m}$  kolon s pevným jádrem (Phenomenex)

## Historie kapalinové chromatografie

1960s	1970s	1980s	1990s	Now
				
>10 $\mu\text{m}$ irregular	10 $\mu\text{m}$ spherical	5 $\mu\text{m}$ spherical	3–4 $\mu\text{m}$ spherical	<3 $\mu\text{m}$ spherical
Low pressure	1000 psi	3000 psi	6000 psi	9000– 15,000 psi

**Figure 2:** Development of HPLC particles; instrument pressure requirements increase dramatically as particle size decreases.

70 bar      200 bar      400 bar      600 – 1000 bar\*

1 bar = 14.5 psi (pounds per square inch)

\* komerčně dostupné UHPLC  
1 500 bar (22,000 psi)

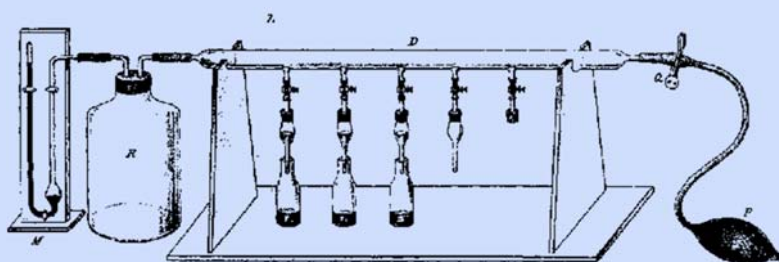
## MICHAIL SEMJONVIČ CVĚT

- rusko-italský botanik, vynálezce chromatografie
- ~1900: separace rostlinných pigmentů (chlorofyly, xantofyly, karotenoidy)

(*M. Tswett, Trav. Soc. Nat. Varsovie, 6 (1903), 14*)



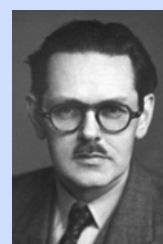
**MICHAIL SEMJONVIČ CVĚT**  
(1872–1919)



*Cvětův chromatograf pro dělení rostlinných pigmentů: adsorpční chromatografie na  $\text{CaCO}_3$ , mobilní fáze petrolether/ethanol*

## MARTIN & SYNGE: ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE

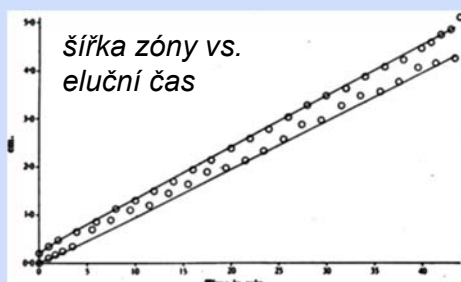
- Britští chemici, nositelé Nobelovy ceny za chemii (1952 "for their invention of partition chromatography")
- Objevitelé rozdělovací chromatografie (nápad vznikl spojením protiproudé extrakce a chromatografie)



**ARCHER.  
MARTIN**  
(1910–2002)



**RICHARD  
SYNGE**  
(1914–1994)



*Separace aminokyselin*

*Rozdělování mezi vodou na povrchu silikagelu a chloroformem*

*Vizuální detekce ve skleněné koloně (1 x 30 cm) pomocí methyloranže sorbované na silikagelu*



*Martin, Synge, Biochem J. 35, 1358–1368 (1941)*

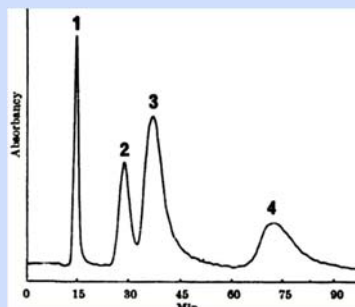
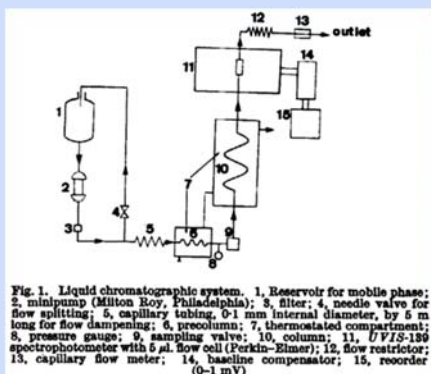
## CSABA HORVÁTH: PRVNÍ HPLC

Maďarský chemický inženýr, označován jako **otec HPLC**

- působil v USA
- vyvinul kapalinový chromatograf s kontrolou parametrů
- zavedl pelikulární částice
- přispěl k pochopení retence v RP-HPLC



**C. HORVÁTH**  
(1930–2004)



1, tyrosin; 2, 3-monodtyrosin;  
3, 3,5-dijlodtyrosin; 4, thyronin

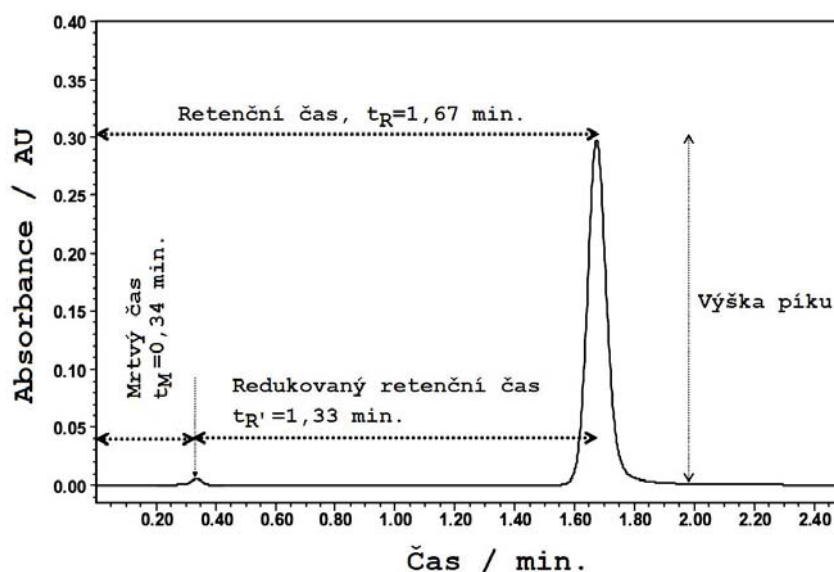
**SF:** trioktylmethylammonium chlorid na Chromosorbu P  
**MF:** 0.2 M KCl v 0.04 M HCl

70° C, tlak 14 bar,  
průtok 23  $\mu$ l/min

*G. Horvath, R. Lipsky, Nature 211, 748–749 (1966)*

## Retence v HPLC

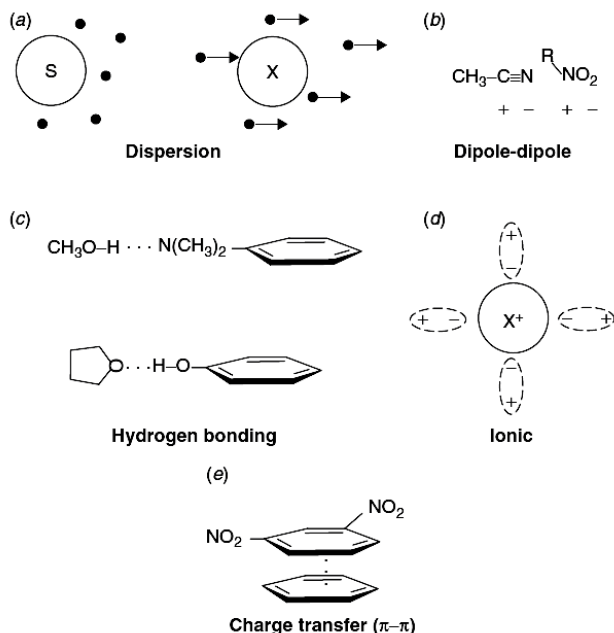
**Retenční čas  $t_R$** : celkový čas od nástřiku vzorku do zaznamenání píku detektorem.



Retence závisí na povaze analytu, mobilní fáze i stacionární fáze.

- uplatňují se různé mezimolekulové interakce
- znalost interakcí umožňuje ovlivňovat separaci (retenci, selektivitu)

## Retence v HPLC – typy interakcí



**Disperzní interakce** – velmi slabé síly mezi nepolárními molekulami vyvolané změnami rozložení elektronů  
- přispívají k interakci hydrofobních látek

**Interakce dipól-dipól** – interakce skupin s dipólovým momentem, velikost interakce úměrná dipól. momentům.

**Vodíková vazba** – slabá kovalentní vazba

**Iontové interakce (coulombické)** – interakce iontu analytu s polarizovatelnou molekulou

**Interakce  $\pi$ - $\pi$**  – interakce mezi elektronově bohatými a elektronově chudými  $\pi$  systémy

*Snyder, Kirkland, Dolan, Introduction to Modern Liquid Chromatography*

## Retence v HPLC – separační mechanismy

Separace v HPLC na základě vratných rovnováh (separačních mechanismů) na fázovém rozhraní:

- **fyzikální adsorpce**: zvyšování koncentrace látky na povrchu stacionární fáze vlivem mezimolekulových přitažlivých sil
- **chemisorpce**: tvorba chemických vazeb s povrchem stacionární fáze
- **iontová výměna**: výměnu iontů mezi mobilní fází a stacionární fází s permanentním nábojem
- **rozdělování mezi dvě nemísitelné kapaliny**: separace na základě různé rozpustnosti látek ve stacionární a mobilní fázi
- **síťový efekt**: pronikání látky z volné mobilní fáze do stejné mobilní fáze uzavřené v pórech stacionární fáze. Filtrace podle velikosti molekul.



## Separční systémy v HPLC

### **Chromatografie s obrácenými fázemi**

(Reversed-phase chromatography, RPC)

- Kolona je nepolární (např. C18), mobilní fáze je polární směs vody a organického rozpouštědla (například acetonitrilu nebo methanolu)
- RPC je nejčastěji používaným systémem HPLC

### **Chromatografie s normálními fázemi**

(Normal-phase chromatography, NPC)

- Kolona je polární (např. silikagel), mobilní fází je směs méně polárních organických rozpouštědel (například hexanu a dichlormethanu)
- NPC se používá zejména pro látky nerozpustné ve vodě, pro preparativní HPLC a na oddělení izomerů

## Separční systémy v HPLC

### **Chromatografie s obrácenými fázemi v nevodném prostředí**

(Non-aqueous reversed-phase chromatography, NARP)

- Kolona je nepolární (např. C18), mobilní fází je směs organických rozpouštědel (např. acetonitril a 2-propanolu)
- NARP se používá pro velmi hydrofobní analyty nerozpustné ve vodě

### **Chromatografie hydrofilních interakcí**

(Hydrophilic interaction chromatography, HILIC)

- Kolona je polární (například silikagel nebo amidová fáze), mobilní fází je směs vody a organického rozpouštědla (např. acetonitrilu)
- HILIC je užitečná pro látky vysoce polární, které jsou málo zadržovány v RPC.

## Separáčn

### **Iontově-vým**

(Ion-exchange chromatography, IEC)

- Kolona obsahuje nabit
- IEC je vhodná pro ionizovatelné analyty, jako jsou kyseliny, báze nebo biomakromolekuly (např. proteiny, nukleové kyseliny).

### **Iontově-párová chromatografie**

(Ion-pair chromatography, IPC)

- Podmínky obdobné jako v RPC, do mobilní fáze se navíc přidává iontově párové činidlo, které interaguje s ionty opačného náboje
- IPC je vhodná pro kyseliny a báze, které jsou slabě zadržovány v RPC, nebo pro biomolekuly (např. peptidy).

## Separáčn

### **Vylučovací chromatografie**

(Size-exclusion chromatography, SEC)

- Kolona je inertní, mobilní fáze jsou buď vodné nebo organické.
- SEC dělí na základě velikosti molekul. Používá se pro velké biomolekuly a syntetické polymery.

-----  
*Speciální případy:*

### **Argentační chromatografie**

(Silver ion chromatography, Ag-LC)

- Kolona na bázi silikagelu nebo katexu obsahuje ionty stříbra ( $\text{Ag}^+$ )
- Ag-LC dělí na základě počtu (a geometrie) dvojných vazeb v alifatických řetězcích. Využití pro separace lipidů.

## Stacionární fáze v HPLC

### **Silikagel ( $\text{SiO}_2$ ):**

nejběžnější materiál stacionárních fází. Vysoká porozita, velký měrný povrch, stabilita v rozsahu pH 2 – 8. Funkční silanolové ( $-\text{SiOH}$ ; specifické interakce s analytem), siloxanové ( $\text{Si-O-Si}$  nesespecifické interakce). Nosič pro chemicky vázané fáze.

### **Oxid hlinitý, alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ):**

silně polární porézní materiál. Stabilita pH 2 – 12, selektivně zadržuje donory elektronů (halogenové deriváty, nenasycené sloučeniny).

### **Oxid zirkoničitý ( $\text{ZrO}_2$ ):**

Stabilní v celém rozsahu pH, vysoká teplotní stabilita. Vhodný i k chemické modifikaci.

### **Grafitizovaný uhlík**

Porézní materiál, stabilní v celém rozsahu pH, stabilní vůči agresivním složkám mobilních fází, separace izomerů, pro hydrofilní látky málo interagující s C8 a C18

## Stacionární fáze v HPLC

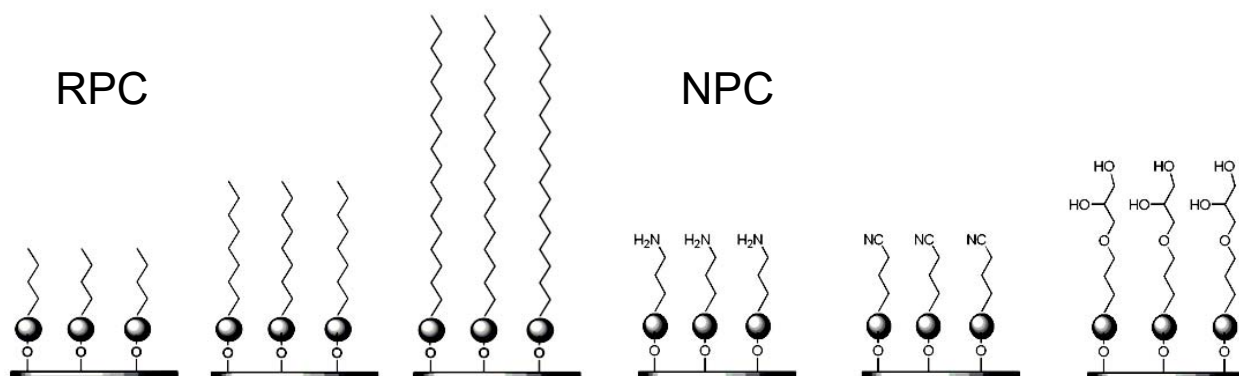
### **Polymerní fáze**

částice zesítěného organického polymerního materiálu, např. polystyrénové divinylbenzenové kopolymery (PS-DVB) a modifikované PS-DVB materiály. Vysoká pH stabilita, často ale nižší účinnost než silikagelové materiály.

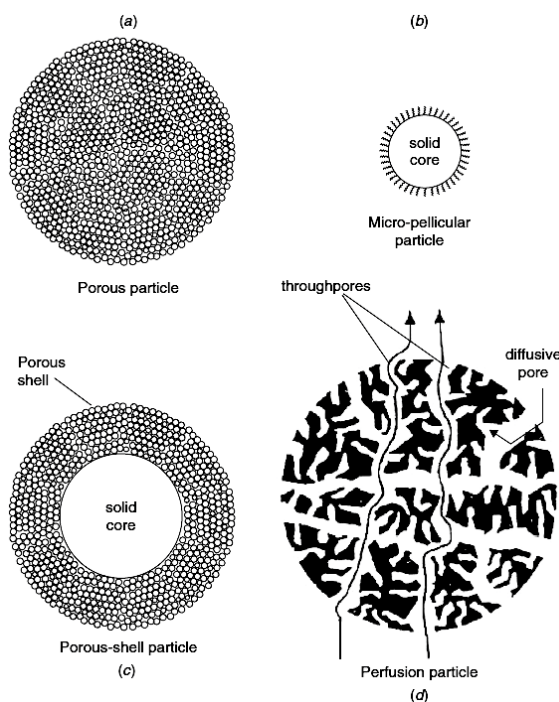
-----

### **Chemicky modifikované fáze**

Stacionární fáze s kovalentně navázanými funkčními skupinami (nosič bývá silikagel)



## Stacionární fáze v HPLC



### Nepravidelné vs. sférické částice

#### **Plně porézní částice**

– nejběžnější, vysoká kapacita

#### **Pelikulární částice**

– pevné jádro, velmi tenká vrstva porézního materiálu, vhodné pro makromolekuly

#### **Povrchově porézní částice**

– pevné jádro, porézní obal, pro rychlejší separace a vyšší účinnost

#### **Perfuzní částice**

– difuzivní póry a velké průchozí póry pro rychlé separace biomakromolekul

*Snyder, Kirkland, Dolan, Introduction to Modern Liquid Chromatography*

## Mobilní fáze v HPLC

Složení mobilní fáze ovlivňuje: retenci analytu, chromatografické rozlišení, účinnost systému, dobu analýzy, citlivost detekce

- *složení mobilní fáze - hlavní způsob ovlivnění separace v HPLC*

### Požadavky na mobilní fáze:

- rozpustnost vzorku
- kompatibilita s detektorem (absorbční hrana pro UV, těkavost pro MS)
- čistota (pro HPLC, případně pro HPLC/MS)
- nízká viskozita (rychlejší chromatografie)
- inertnost (nesmí chemicky reagovat se vzorkem)
- nízká toxicita

### Běžná rozpouštědla:

hexan, benzen, chloroform, aceton, acetonitril, ethanol, methanol, voda (dle rostoucí polarity)

## Rozměry HPLC kolon

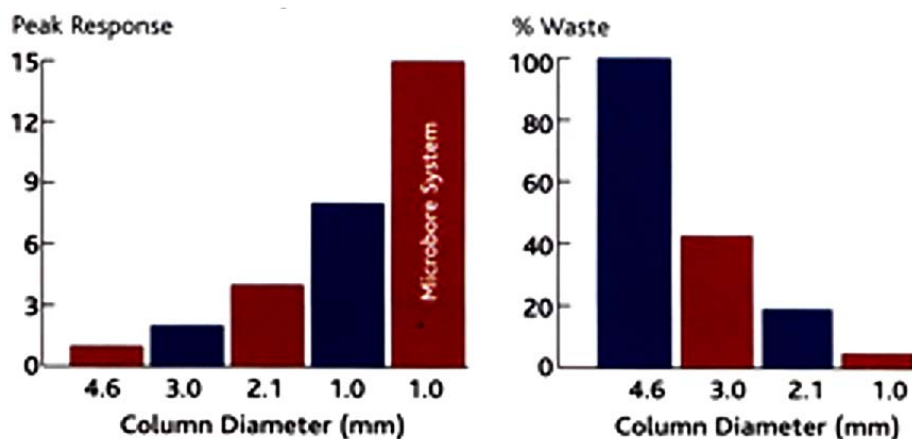
Chromatografie	Vnitřní průměr kolony	Průtok
Open Tubular LC	<25 $\mu\text{m}$	<25 nL/min
Nano HPLC	25-100 $\mu\text{m}$	24-4000 nL/min
Kapilární HPLC	100-100 $\mu\text{m}$	0.4-200 $\mu\text{L}/\text{min}$
Mikro HPLC	1.0-2.1 mm	50-1000 $\mu\text{L}/\text{min}$
Klasická HPLC	4.0-5.0 mm	1.0 -10.0 mL/min
Preparativní HPLC	>10 mm	> 20 mL/min



## Rozměry HPLC kolon

*Zmenšování průměru kolony:*

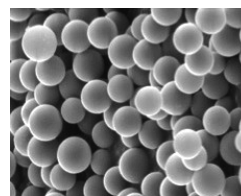
- snížení spotřeby rozpouštědel, stacionární fáze a vzorku
- vyšší citlivost detekce



## Formáty HPLC kolon

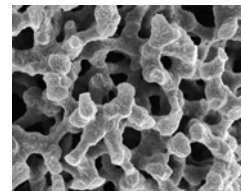
### Náplňová kolona:

- plněná částicemi stacionární fáze (průměr částic ~2-10  $\mu\text{m}$ )



### Monolitická kolona:

- plněná porézním polymerem



### Trubice:

- klasický formát kolony, trubice kruhového průřezu



### Mikrofabrikovaný kanál:

- kolony ve formátu mikrofluidního čipu (snadná a rychlá výměna kolon)



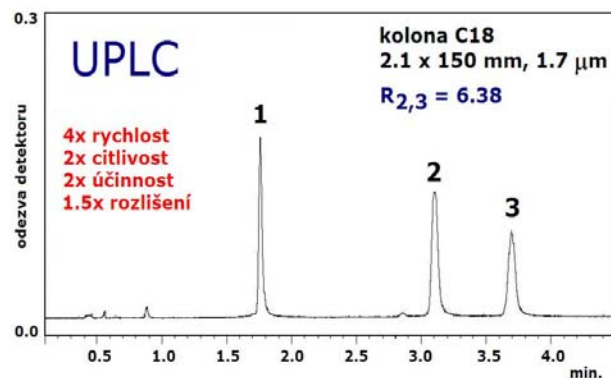
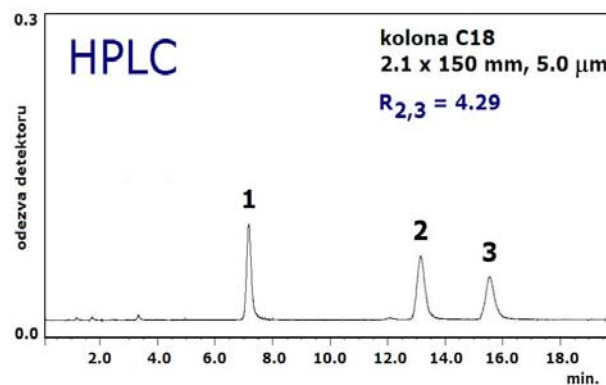
foto Merck, Kromasil, Phenomenex, Eksigent

## HPLC vs. UHPLC

### **UHPLC = Ultra High Performance Liquid Chromatography**

Vysokoučinná kapalinová chromatografie s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$  a velmi vysokým provozním tlakem (do ~ 1000 bar).

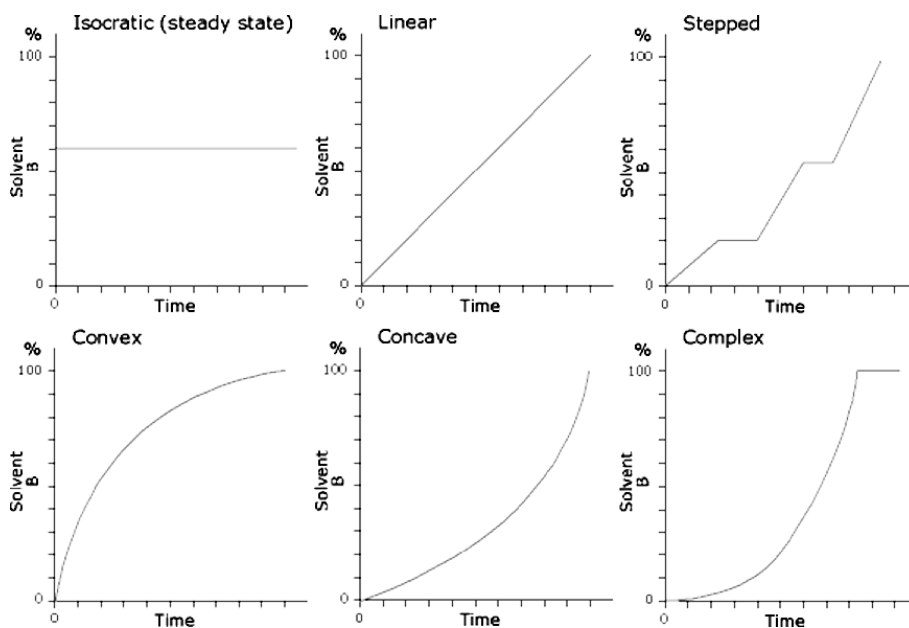
Dosahuje se vyšších účinností separace a velmi krátkých retenčních časů.



## Isokratická a gradientová eluce

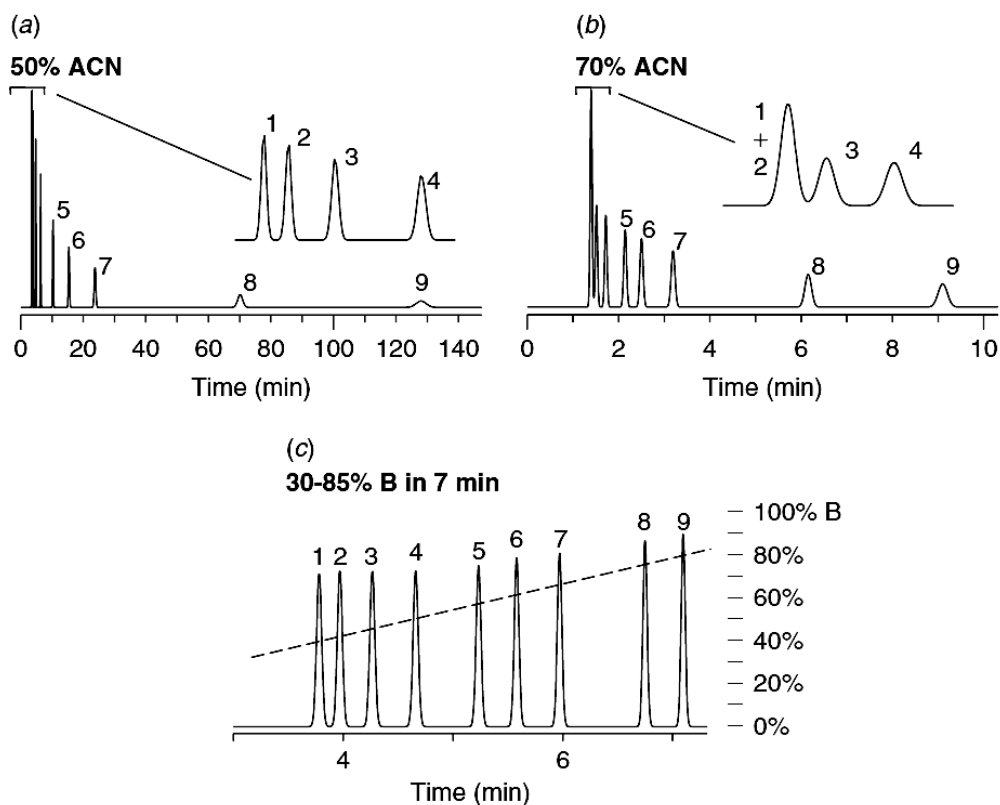
**Izokratická eluce:** Složení mobilní fáze (eluční síla) se během analýzy nemění.

**Gradientová eluce:** Eluční síla mobilní fáze vzrůstá během analýzy.



<https://nationalvetcontent.edu.au/>

## Isokratická a gradientová eluce

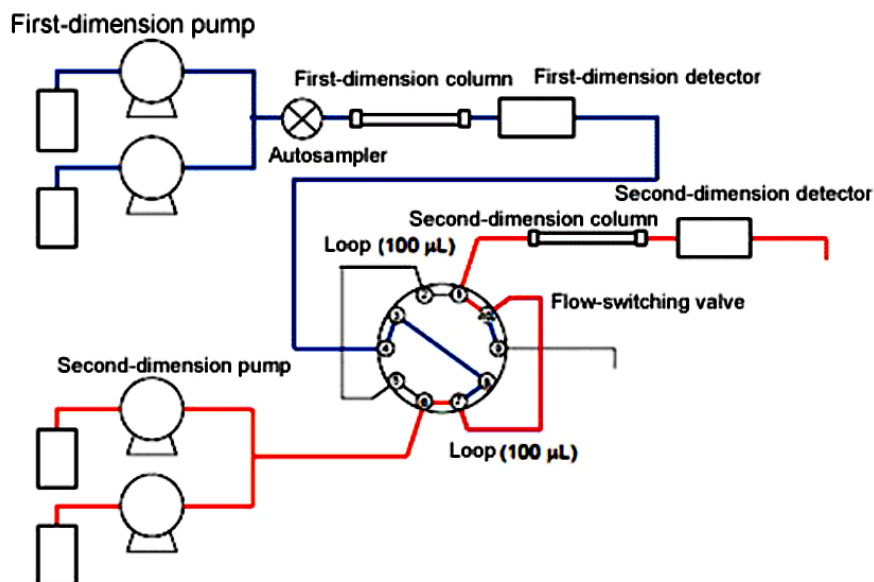


Snyder, Kirkland, Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*

## Dvourozměrné separační systémy

**Dvourozměrná HPLC:** separace na 2 kolonách, převod frakce (frakcí) z jedné chromatografické kolony na sekundární kolonu pro další separaci. V první dimenzi většinou pomalý gradient, ve druhé sérii rychlých gradientů.

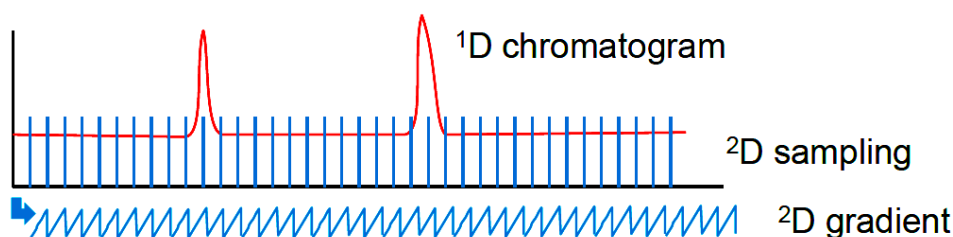
- různé kolony zajišťují dělení dle různých mechanismů (ortogonalita)
- separace komplexních směsí



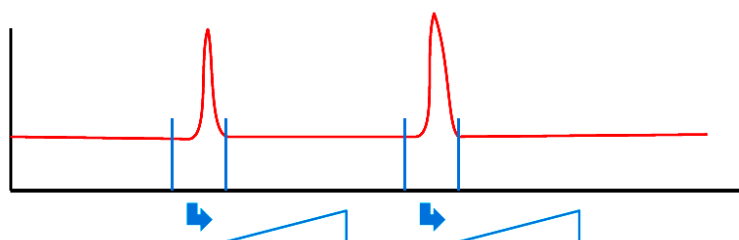
Agilent Technologies

## Dvourozměrné separační systémy

**Komprehensivní (celková):** všechny látky z první kolony jsou vzorkovány pro separaci na druhé koloně



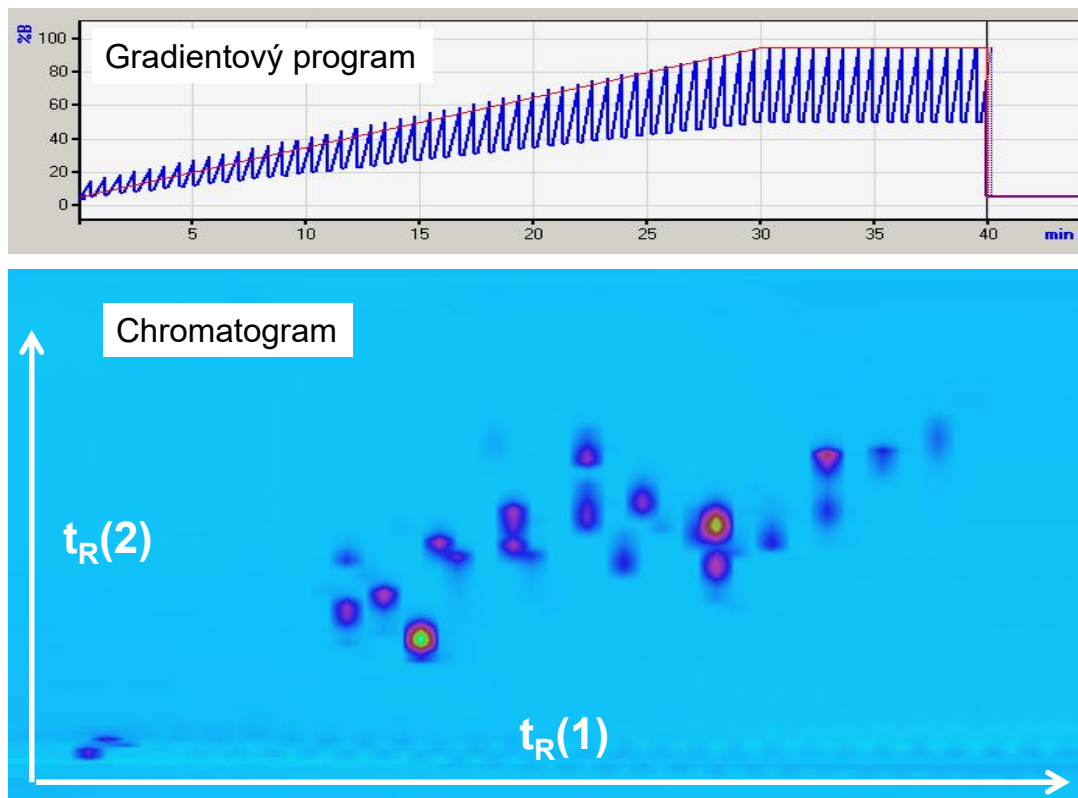
**“Heart-cutting” (částečná):** Pro separaci na druhé koloně jsou vybírány pouze některé látky (píky).



Agilent Technologies



## Dvourozměrné separační systémy

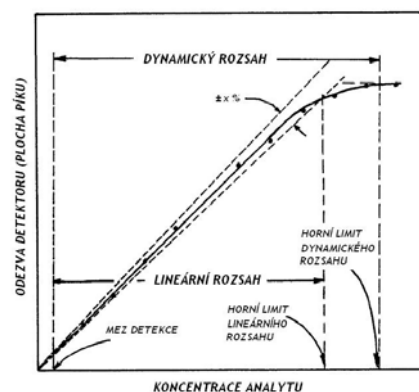


Agilent Technologies

## Kvantitativní a kvalitativní analýza

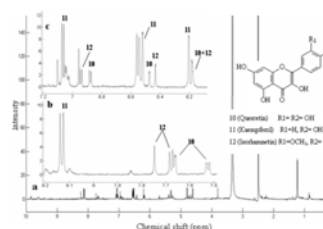
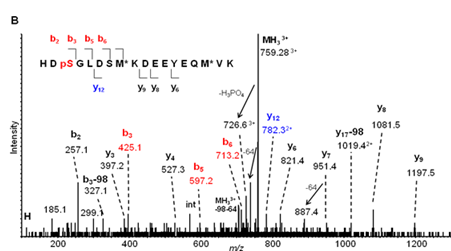
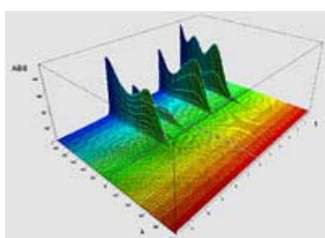
### HPLC: Kvantitativní analýza

- odezva detektoru (plocha, výška píku) závislá na koncentraci látky
- citlivost závisí na typu detektoru a způsobu měření
- metoda kalibrační přímky, vnitřního standardu, standardního přídávku



### HPLC: Kvalitativní analýza

- detektor poskytuje informace o struktuře látky (měření spekter)
- HPLC/UV(DAD), HPLC/MS, HPLC/NMR ...



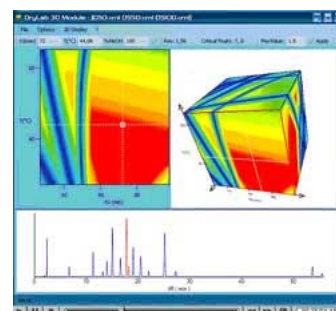
## Vývoj HPLC metody

- posouzení složení vzorku a cílů HPLC analýzy
- úprava vzorku
- výběr separačního systému
- výběr detektoru
- volba podmínek separace
- identifikace a řešení potenciálních problémů
- validace metody

*Optimalizace separačních podmínek:*

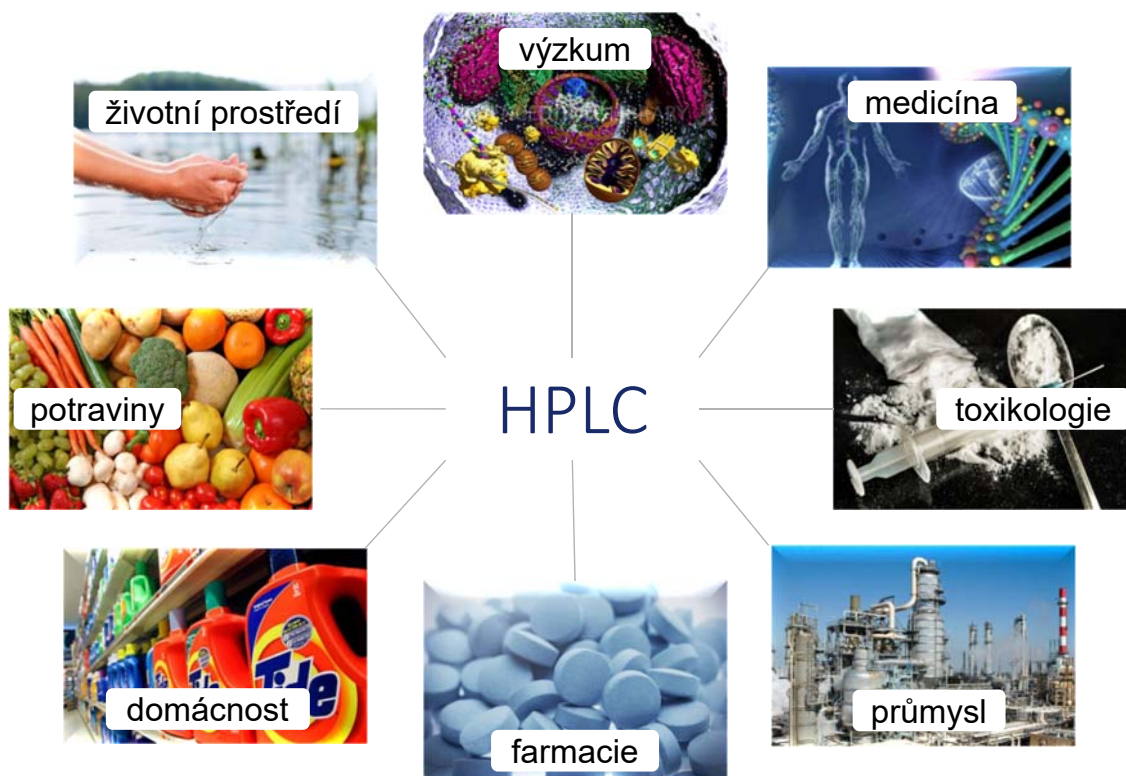
- manuální optimalizace, výběr podmínek separace podle zkušeností operátora

- optimalizace s využitím počítačových programů, výpočet optimálních podmínek na základě dat z několika vstupních měření



<http://molnar-institute.com/drylab/>

## Aplikace HPLC

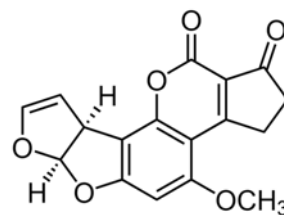


## Příklad využití HPLC: mykotoxiny v potravinách



### Příprava vzorku

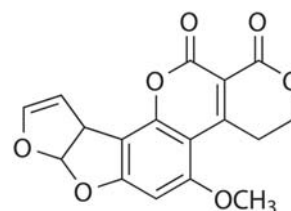
- přidavek vnitřního standardu
- extrakce v acetonitrilu/vodě/k. octové
- centrifugace, naředění mobilní fází



Aflatoxin B1

### HPLC/MS:

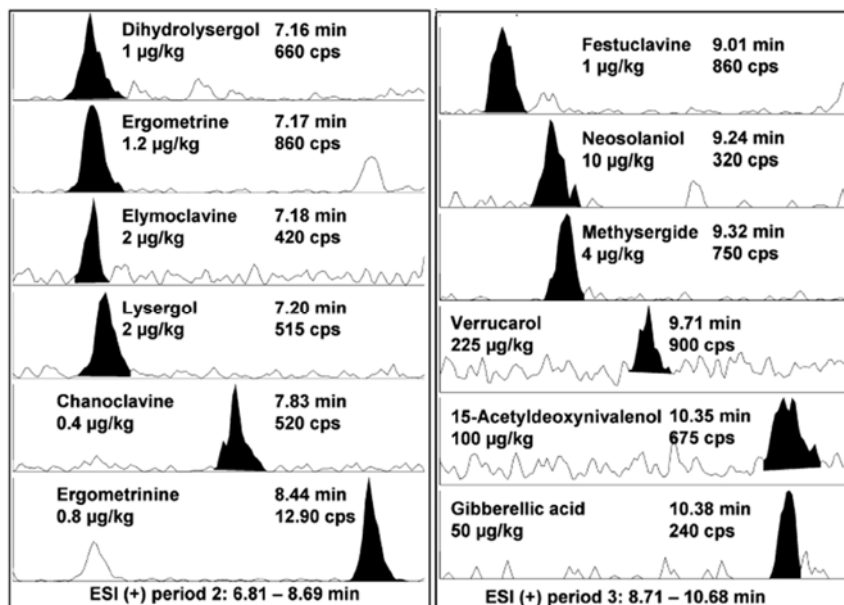
- kolona Gemini® C18 150×4.6 mm, 5- $\mu$ m částice, 25 °C
- předkolona C18 4×3 m.
- gradientová eluce, 1 ml/min
- A: methanol/voda/k. octová 10:89:1, 5 mM octan amonný
- B: methanol/voda/k. octová 97:2:1, 5 mM octan amonný
- detekce ESI-MS/MS (MRM) na Q-trap 4000



Aflatoxin G1

Sulyok et al., *Anal Bioanal Chem* (2007) 389:1505–1523

## Příklad využití HPLC: mykotoxiny v potravinách



- metoda pro 87 analytů v plesnivých potravinách
- limity detekce 0.02 - 225  $\mu$ g/kg
- nalezeno 37 fungálních metabolitů

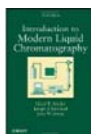
**koncentrace:**  
až 33 mg/kg potravin

Sulyok et al., *Anal Bioanal Chem* (2007) 389:1505–1523

## Doporučená literatura



Practical HPLC Method Development 2nd Edition by Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, Joseph L. Glajch, ISBN-13: 978-0471007036



Introduction to Modern Liquid Chromatography 3rd Edition, by Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, John W. Dolan, ISBN-13: 978-0470167540



Moderní HPLC separace v teorii a praxi (I, II), autoři Lucie Nováková, Michal Douša, ISBN 978-80-260-4243-3; ISBN 978-80-260-4244-0

LC|GC's **CHROM**academy

powered by **crawford scientific**

<http://www.chromacademy.com/>



<http://www.chromedia.org/>

