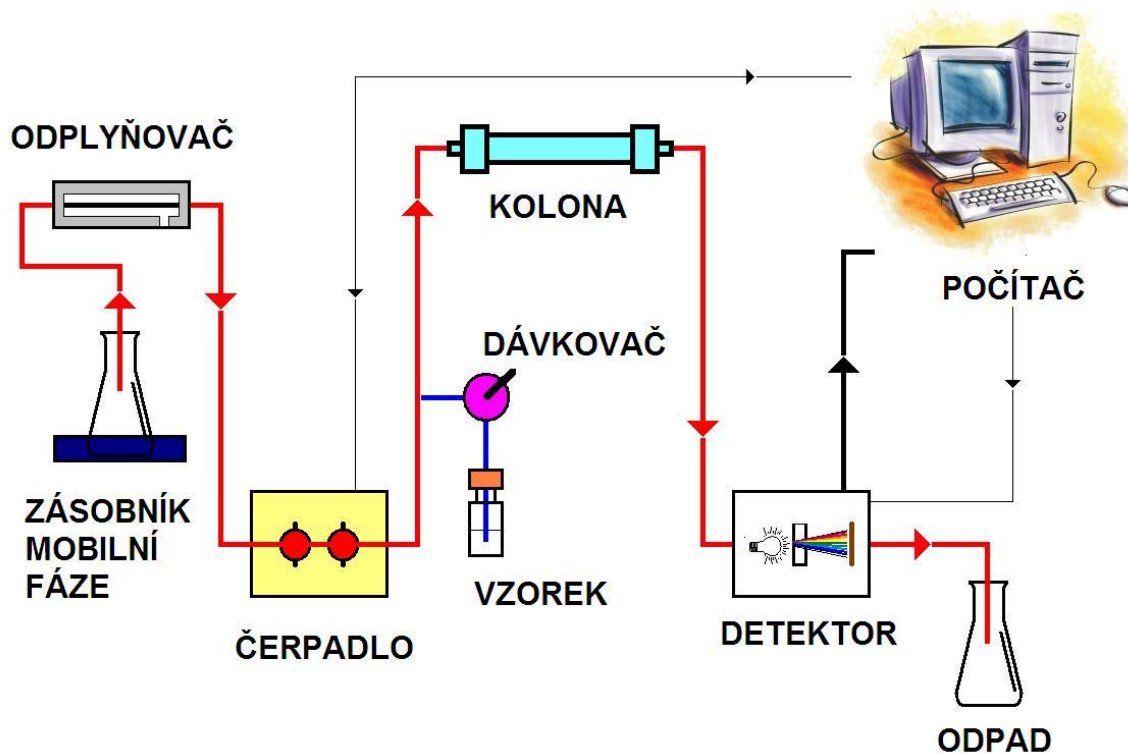


Vysokoučinná kapalinová chromatografie

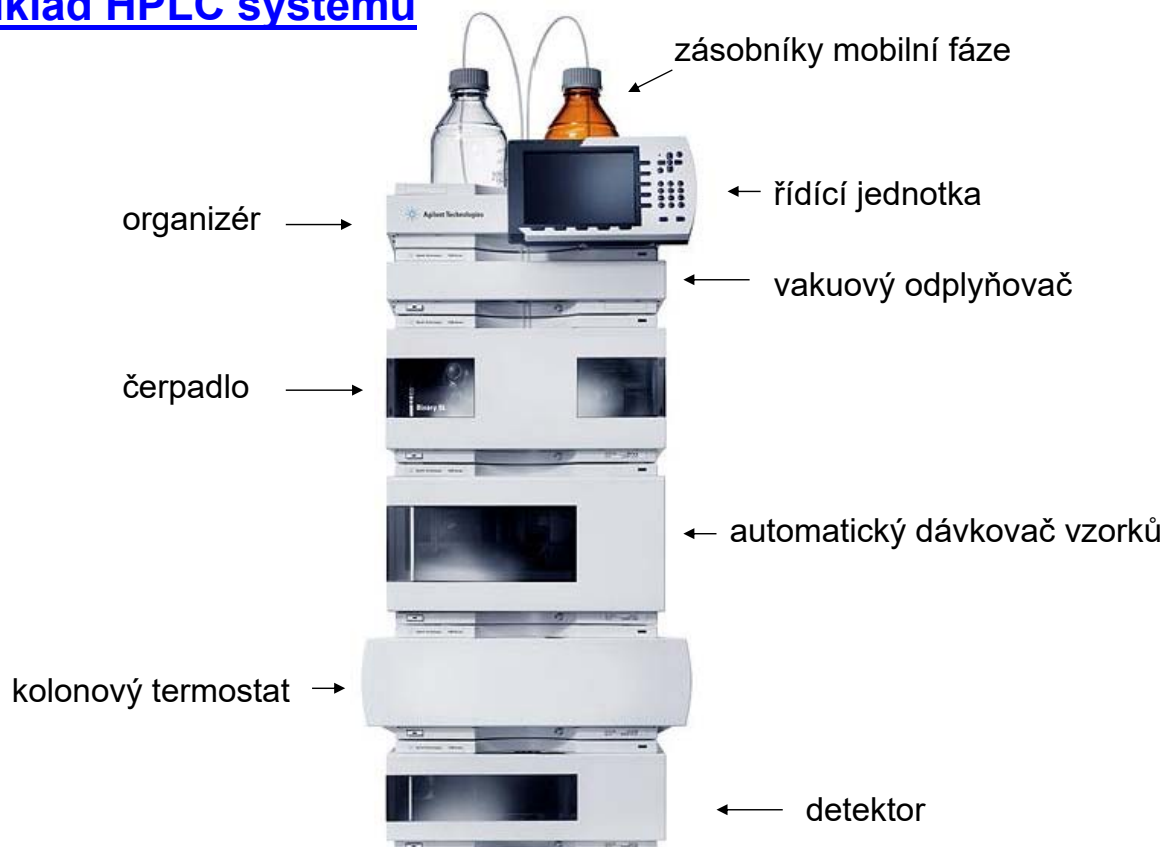
Instrumentace

Josef Cvačka, 17. 10. 2023

Schéma přístroje pro HPLC



Příklad HPLC systému



Zásobníky mobilní fáze

Nejčastěji skleněné nádoby objemu 0,1-2,5 l, opatřené ryskami a uzávěrem z inertního plastu s předvrtanými otvory pro teflonové hadičky 1/8".



Mobilní fáze se čerpá přes filtry odstraňující mechanické nečistoty. Velikost pórů 2-20 μm .

Plastový filtr pro biochromatografické aplikace.

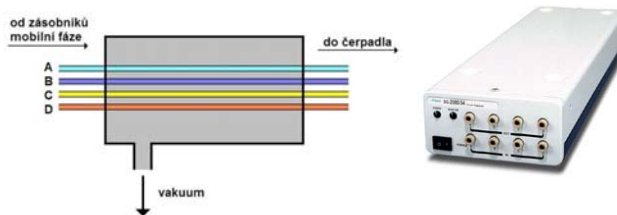


Nerezový (Hastalloy) filtr pro práci s halogenovanými rozpouštědly.

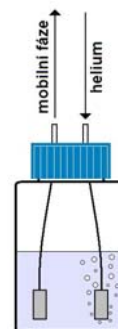


Odplyňovací zařízení

Membránové vakuové odplyňovače.
Mobilní fáze protéká semipermeabilní hadičkou umístěnou ve vakuu.



Héliové odplyňovače. Mobilní fáze se probublává heliem, které vytěsňuje rozpuštěné plyny. Rozpustnost He v rozpouštědlech je minimální.



Odplyňování filtrací za vakua nebo ultrazvukem.



Čerpadla mobilní fáze

HPLC (UHPLC) čerpadla pumpují mobilní fázi do systému. Umožňují programovat složení mobilní fáze v čase při gradientové eluci. Pracují při vysokých tlacích (HPLC do 400 bar, UHPLC do 1000 bar).

Pístová čerpadla: z principu pulsní tok, který je pomocí různých technických řešení převeden na bezpulzní. Využita ve většině HPLC systémů.

Stříkačková čerpadla: na bázi injekční stříkačky. Dokonale bezpulzní tok mobilní fáze. Pro speciální HPLC a UHPLC aplikace.

Jednotky tlaku v HPLC:

1 bar \approx 1atm

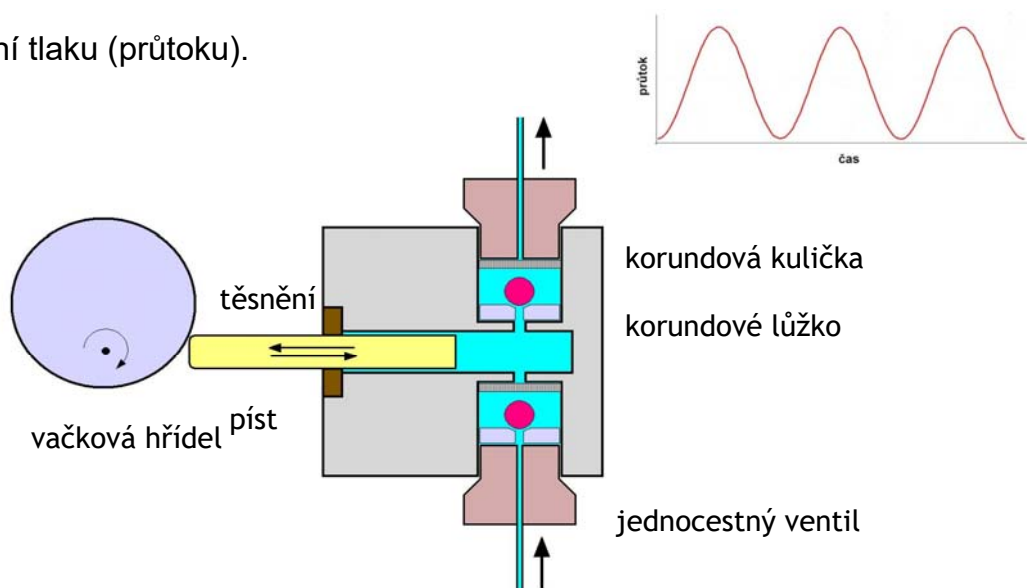
1 bar = 14,5 psi (pound per square inch)

Vysokotlaké pístové čerpadlo

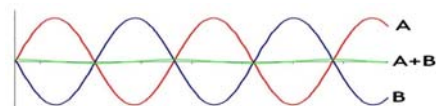
Sání: píst nasává kapalinu spodním jednocestným ventilem, horní ventil je uzavřen.

Výtlač: píst vytlačuje kapalinu, tím se spodní ventil uzavře a horní ventil otevře. Rychlost čerpání je dána rychlostí otáčení vačky.

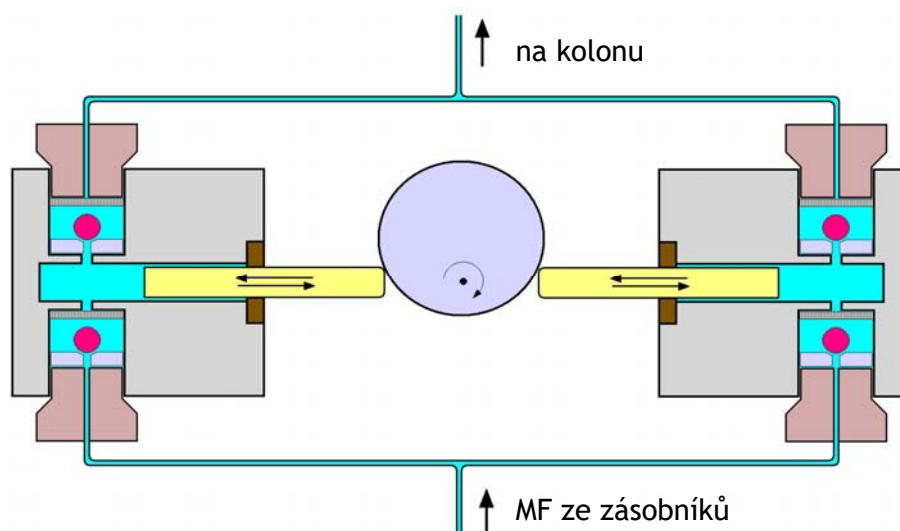
☹ Pulsování tlaku (průtoku).



Duální vysokotlaké pístové čerpadlo



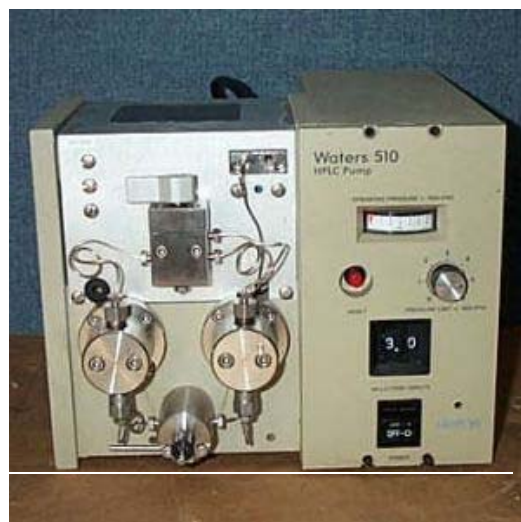
Duální čerpadlo pohání jeden motor. Zatímco se jedna část plní, druhá vytlačuje kapalinu do systému. Výsledkem je (téměř) bezpulsní čerpání. Ještě lepších výsledků je dosahováno elektronickou kontrolou pohybu pístů. Nejčastěji používané čerpadlo, pulsace tlaku je minimalizována.



Duální vysokotlaké pístové čerpadlo



Součásti jednocestného ventilu.

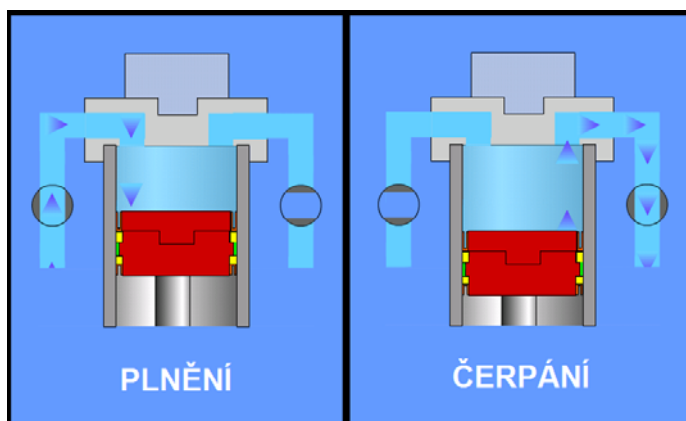


Příklad duálního čerpadla.

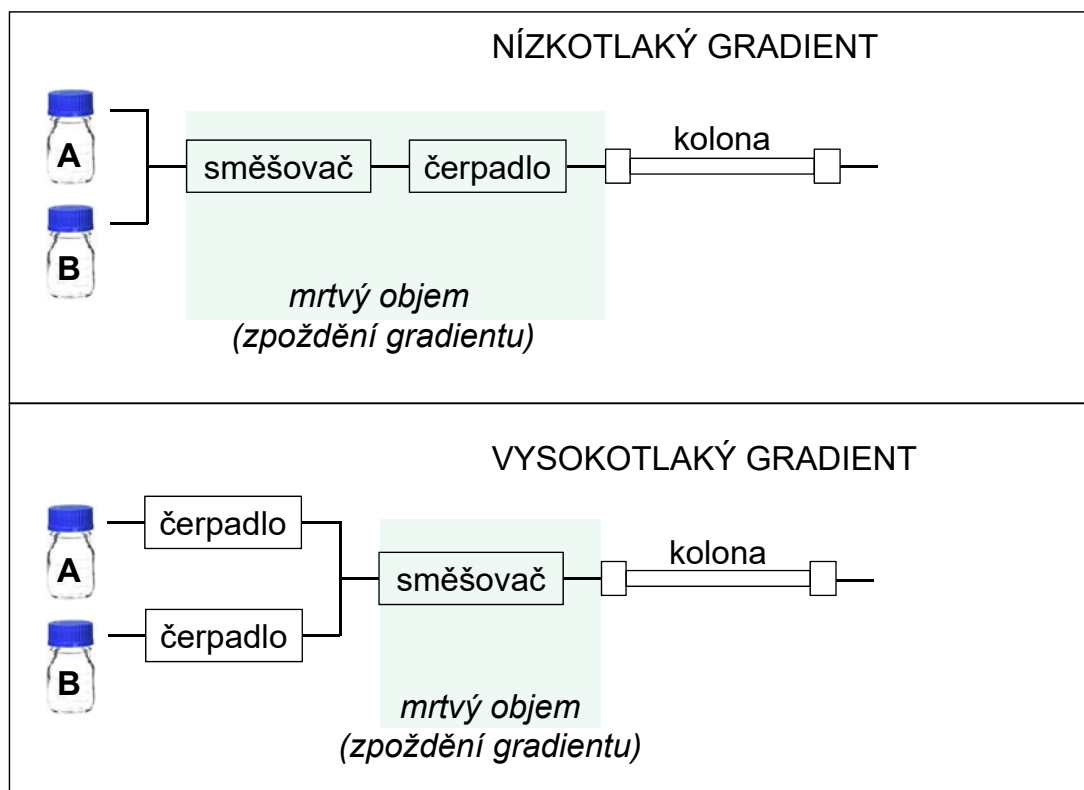
Vysokotlaké stříkačkové čerpadlo

Čerpadlo na bázi stříkačky. Mobilní fáze se nasaje do válce, ze kterého je pak vytlačována konstantním pohybem pístu. Výhodou je absolutně bezpulzní tok, nevýhodou omezený objem mobilní fáze (nelze doplňovat během měření). Zapojením dvou stříkačkových čerpadel lze provádět gradientovou eluci, nebo kontinuálně dodávat mobilní fázi (zatímco jedno čerpá, druhé se plní a naopak).

Běžně se v HPLC a UHPLC nepoužívá.



Gradientová eluce



Gradientová eluce

Dva způsoby mísení rozpouštědel pro gradientovou eluci:

1. Nízkotlaký gradient: rozpouštědla jsou mísená před vstupem do HPLC čerpadla (za nízkého tlaku).

☺ Stačí jen 1 čerpadlo, vyšší reprodukovatelnost tvorby gradientu.

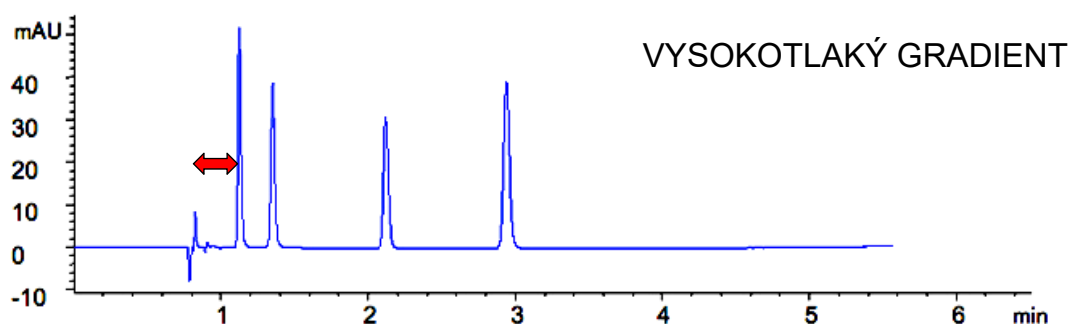
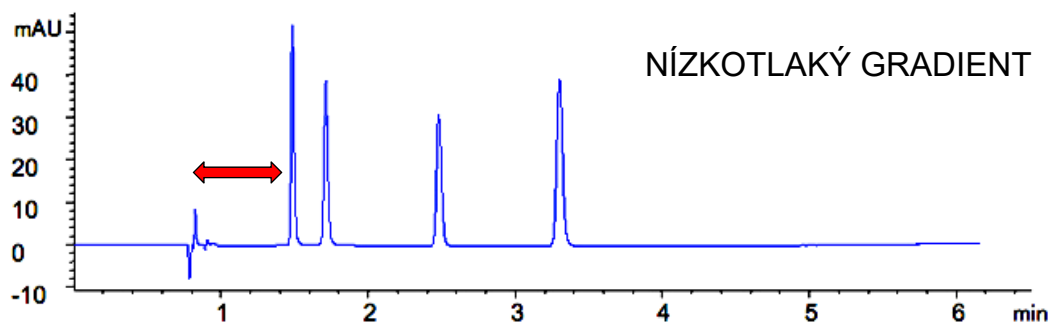
☹ Vadné proporční ventily mohou způsobit nepřesnosti při mísení rozpouštědel. Větší mrtvý objem systému.

2. Vysokotlaký gradient: pro každé rozpouštědlo je potřeba samostatné HPLC čerpadlo, k mísení dochází až za čerpadly (za vysokého tlaku).

☺ Malý mrtvý objem, menší zpoždění gradientu.

☹ Potřeba 2 (nebo více) čerpadel. Nižší reprodukovatelnost tvorby gradientu, zvláště při nízkých průtocích.

Gradientová eluce



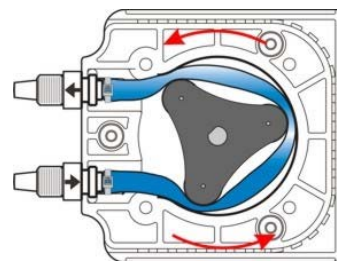
<https://mtc-usa.com/cp.aspx>

Nízkotlaká čerpadla

Nevhodná pro HPLC, mohou být využita pro pomocné čerpání za nízkého tlaku, např. kalibrace MS detektoru.

Peristaltické čerpadlo

Rotor periodicky stlačuje plastovou hadičku a tím vytlačuje kapalinu do systému.



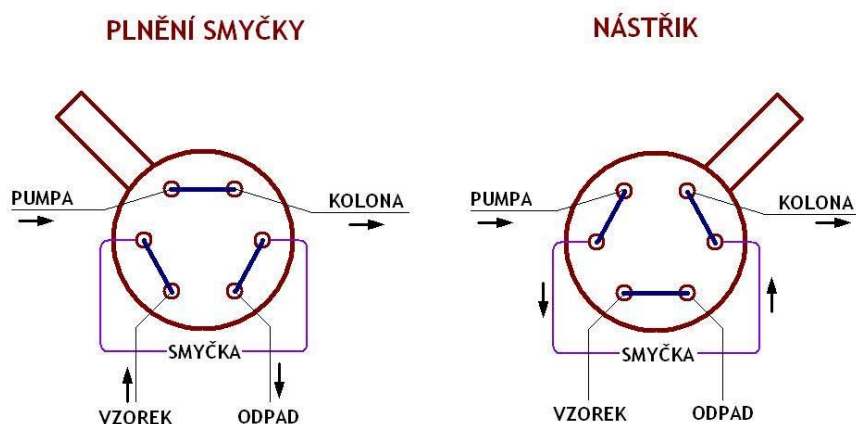
Nízkotlaké stříkačkové čerpadlo

MF je ve stříkačce, odkud je konstantní rychlostí vytlačována do systému. Bezpulsní. Vhodné pro velmi nízké průtoky.



Dávkovací smyčkový ventil pro HPLC

Do chromatografického systému je možno dávkovat ručně (manuální dávkovací ventil) nebo pomocí automatického dávkovače (autosampleru).



Dvě polohy dávkovače: v poloze plnění smyčky je propojen vstup MF od pumpy s výstupem na kolonu přímo, v nástřikové poloze je propojen přes dávkovací smyčku (vzorek se vyplachuje do systému).

Dávkovaný objem je dán velikostí smyčky – jednotky až desítky μl .

Automatické dávkovače pro HPLC

Přístroje pro automatické dávkování vzorků. Vzorky ve vialkách jsou umístěny v chlazeném prostoru. Robotický systém vybere požadovanou vialku a provede nástřik pomocí smyčkového ventilu.

Vialky – vzorkovnice (často 1,5 ml) na jedno použití se šroubovacím nebo namačkávacím víčkem (nutno použít speciální kleště). Ve víčku je septum, které se při nástřiku propíchne.

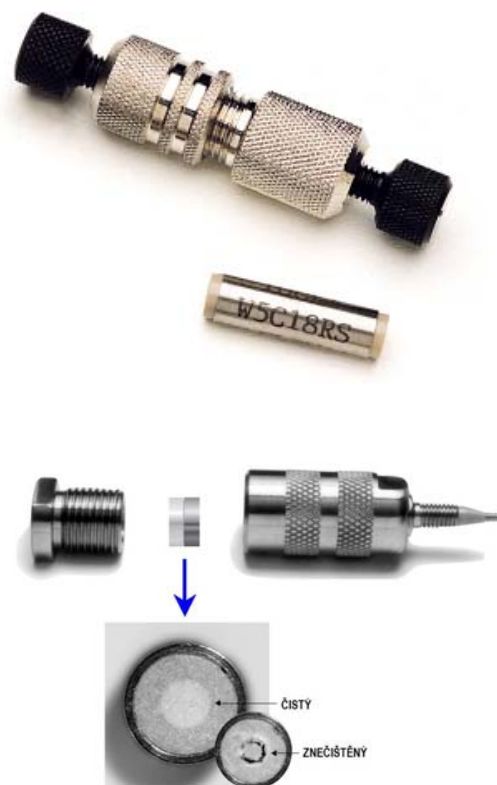


HPLC předkolony

Předkolony jsou krátké kolony zařazované těsně před analytickou kolonu.

Chrání kolonu tím, že zachytávají mechanické nečistoty a látky, které se ireverzibilně vážají na kolonu.

Obsahují stejnou stacionární fázi jako analytická kolona.



HPLC kolony

Kolona je trubice (kovová, skleněná, křemenná, nebo plastová) obsahující stacionární fázi (náplňové nebo monolitické).

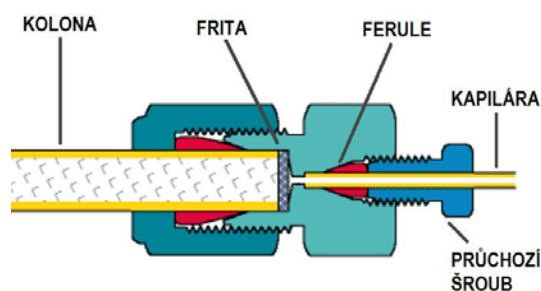
Specifikace kolony

C18; 4,6 × 250 mm; 5 μm; 100 Å

↑ typ fáze ↑ rozměry kolony ↑ velikost pórů

↑ velikost částic

Chromatografie	Vnitřní průměr kolony	Průtok
Open Tubular LC	<25 μm	<25 nL/min
Nano HPLC	25-100 μm	24-4000 nL/min
Kapilární HPLC	100-100 μm	0.4-200 μL/min
Mikro HPLC	1.0-2.1 mm	50-1000 μL/min
Klasická HPLC	4.0-5.0 mm	1.0 -10.0 mL/min
Preparativní HPLC	>10 mm	> 20 mL/min



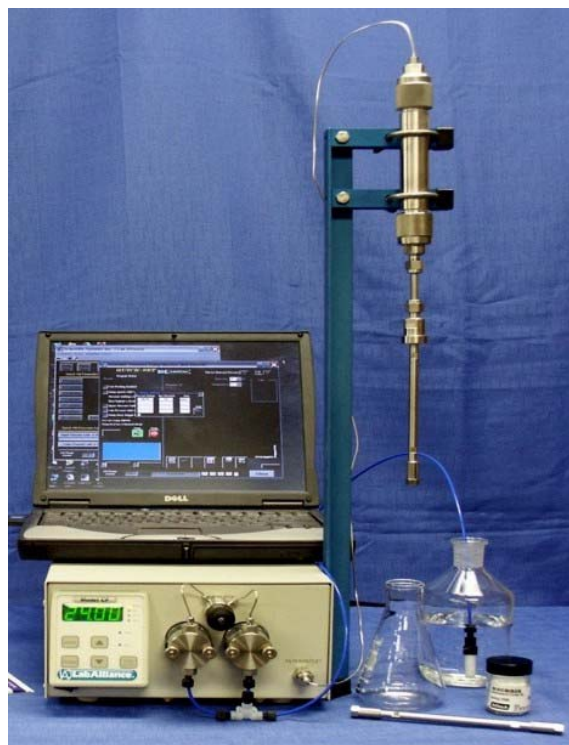
Kolony jsou uzpůsobeny pro připojení standardní 1/16" kapiláry.

Výroba kolon



Laboratorní plnička pro nanokolony.

Kolony lze plnit v laboratoři pomocí komerčně dodávaných plniček. Běžnou praxí je ale nákup naplněných kolon od výrobce.

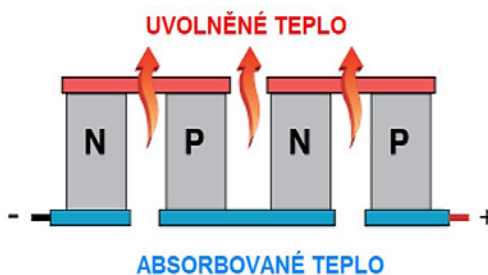


Plnění standardních HPLC a UHPLC kolon.

Kolonové termostaty

Teplota kolony ovlivňuje separaci analytů. Vyšší teplota většinou urychlí analýzu, dosahuje se vyšší účinnosti, ale může se snižovat rozlišení. Kontrolou teploty (použitím kolonového termostatu) se zlepšuje reprodukovatelnost retenčních časů.

- termostaty od laboratorní teploty výše
- termostaty pro vyšší i nižší teploty (s Peltierovým chlazením)



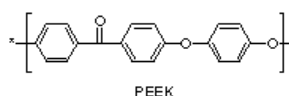
Termoelektrický chladič na bázi Peltierova efektu

Polovodiče typu p a n jsou vzájemně v kontaktu a zapojeny sériově do elektrického obvodu. Z jedné strany chladí, z druhé se odvádí teplo.



Spojovací prvky - kapiláry

PEEK (polyetheretherketon) – vysoce odolný termoplast kompatibilní téměř se všemi rozpouštědly v HPLC. Narušují jej silné kyseliny, v CH₂Cl₂, DMSO a THF může bobtnat. Barevné kódování vnitřních průměrů.



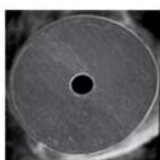
Nerez – Vysoká mechanická odolnost, vhodná pro UHPLC.

Teflon – pouze pro nízký tlak, použití jako odvod odpadu z dávkovačů.

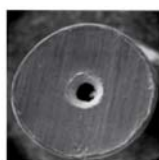


Vnější průměr: 1/16" (1,59 mm)

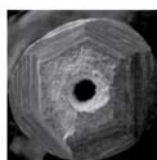
Vnitřní průměry: 0,005" až 0,007" (0,13-0,18 mm)



řez provedený výrobcem kapiláry



řez pomocí komerčně dodávané řezačky



řez pilníkem

Kvalitní seříznutí kapilár je **velmi** důležité aby se nesnižovala účinnost systému (mrtvé objemy).

Spojovací prvky - šroubení

Standardizované spojovací prvky, nejčastěji z **nerezu** nebo **PEEKu**, většinou palcové závity. Tvar ferulí se liší podle výrobce (např. Waters, Valco, Rheodyne), pro minimalizaci mrtvých objemů nutno použít doporučené ferule a šrouby.

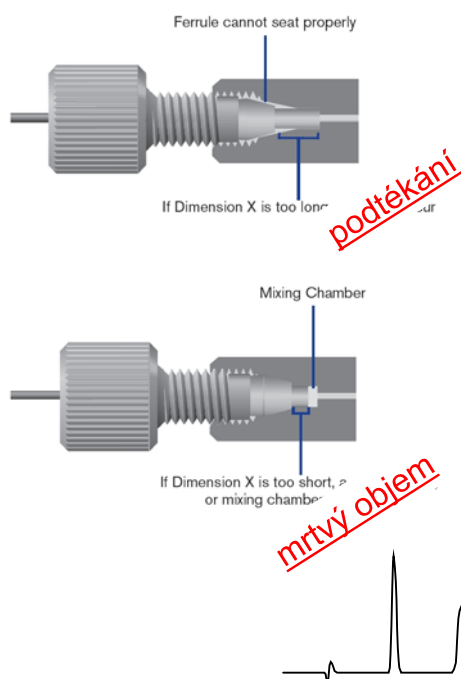
PEEKové šroubení se dotahuje rukou, nerezové s nerezovými ferulemi klíčem.

Specializované šroubení pro spojování kapilár (spojky), dělení toku (T-kusy), in-line filtry, pro kapilární HPLC nebo UHPLC...

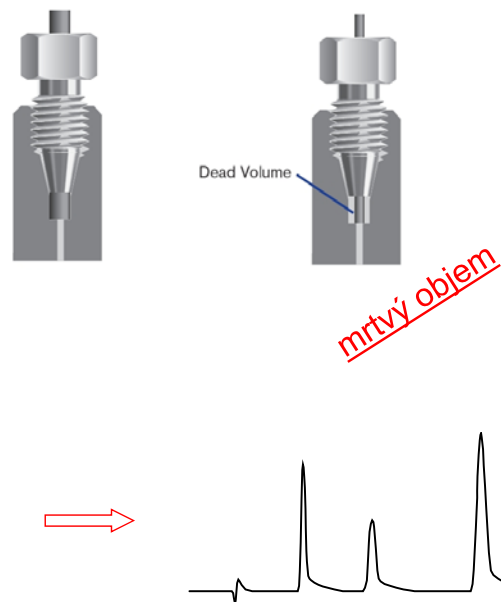


Minimalizace mrtvých objemů

Použití šroubu s pevně
"zakouslou" ferulí.



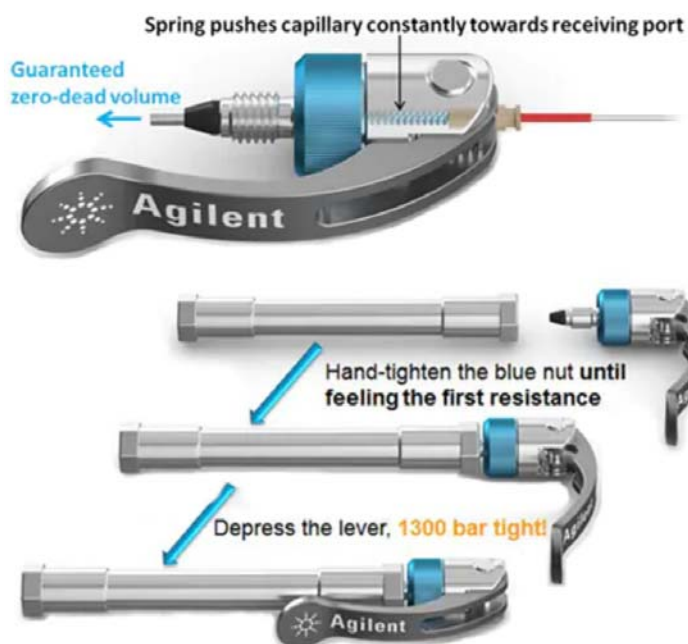
Použití standardního šroubení pro
kapiláry menších průměrů



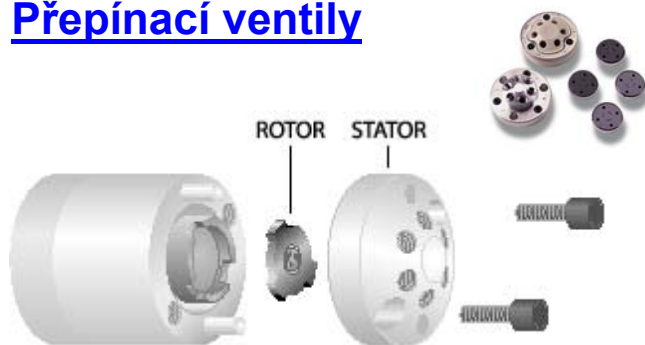
Minimalizace mrtvých objemů – systém s párkem

Dotažení šroubení rukou, pákový systém pro dotlačení kapiláry a tím minimalizaci mrtvého objemu.

- do 1300 bar
- varianta bez páky do míst, kde je málo prostoru



Přepínací ventily



Ventily s univerzálním použitím v HPLC (dávkování, přepínání kolon, vícerozměrná HPLC apod.)

K nepohyblivému statoru těsně přiléhá otočný rotor. Poloha rotoru vůči statoru určuje, které pozice jsou vzájemně propojené.

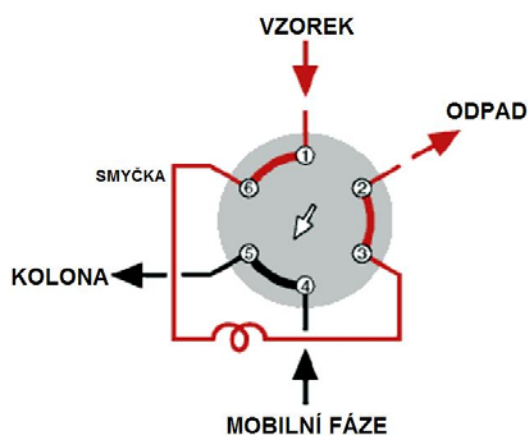
Mechanicky ovládané

Elektricky ovládané

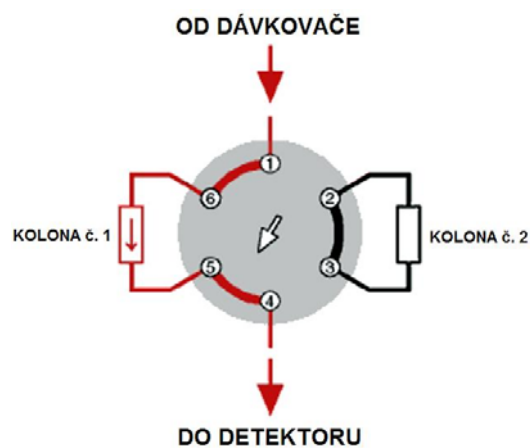


Přepínací dvoupozicové ventily - šesticečný

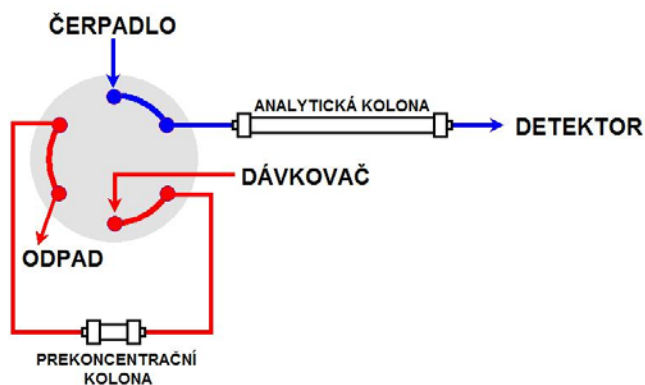
Dávkování vzorku z externí smyčky nejčastější aplikace



Přepínání mezi dvěma analytickými kolonami

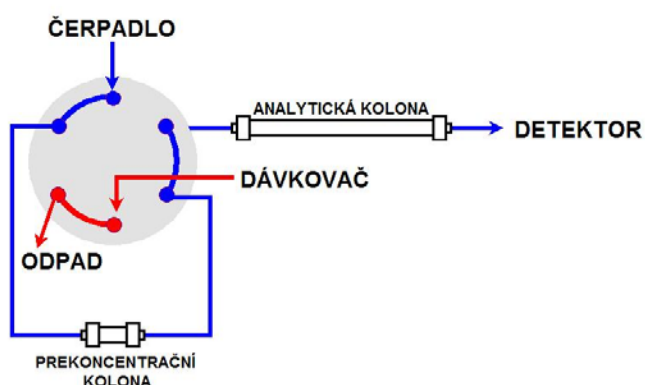


Přepínací dvoupozicové ventily - šesticečný



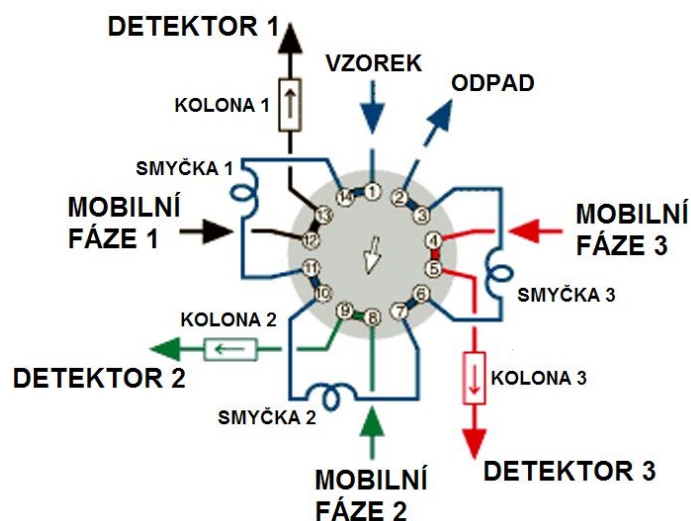
Dávkování s prekoncentrací vzorku na kolonce

Vzorek je dávkován na prekoncentrační kolonu (lze dávkovat velmi vysoké objemy). Po přepnutí ventilu jsou zachycené analyty vyplachovány mobilní fází na analytickou kolonu. Využití např. v kapilární HPLC při analýze bílkovinných hydrolyzátů.



Přepínací dvoupozicové ventily - čtrnácticečný

Současné dávkování vzorku na 3 různé kolony



Preparativní HPLC systémy

Slouží k izolaci větších (gramových) množství látek.

Kolony běžných délek (25 cm), ale větších průměrů (několik cm); velikost částic náplně 10 - 20 μm .

Často se volí normální HPLC systémy se silikagelem jako stacionární fází.

Používají se speciální čerpadla pro vyšší průtoky (do stovek ml/min).

Mobilní fáze se volí nejen podle chromatografických parametrů, ale i na základě ceny. Využívají se zařízení na recyklaci mobilních fází.

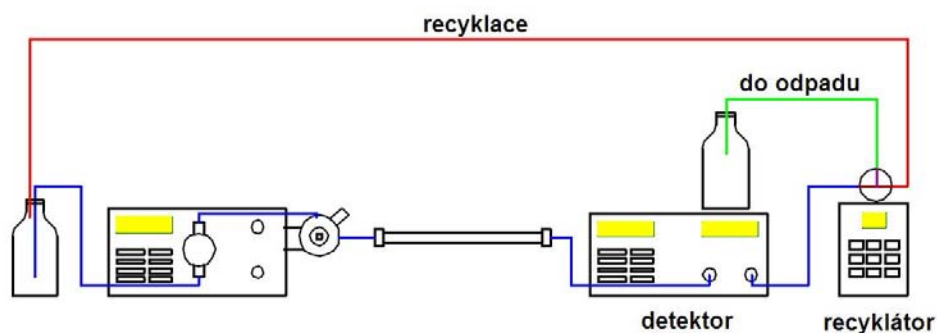
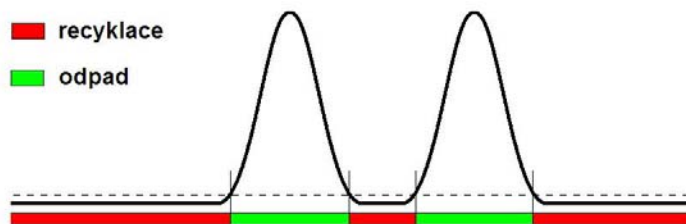


Automatické sběrače frakcí

Robotické programovatelné systémy, které sbírají eluát do určených nádob (zkumavek, vialek apod.). Programují se na pevné retenční časy nebo podle signálu detektoru.



Zařízení pro recyklaci mobilní fáze



Opětovné využití mobilní fáze při izokratické eluci.

Kapilární a nano- HPLC systémy

Speciální čerpadla umožňují spolehlivě pracovat s průtoky do $1 \mu\text{l}/\text{min}$. Pro nižší průtoky je nutné používat děliče toku.

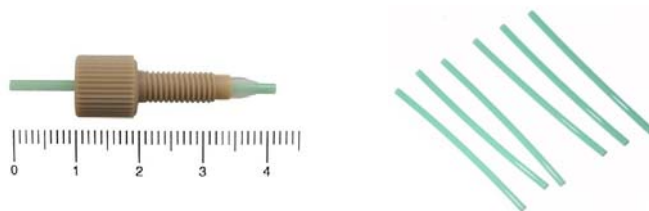
Používají se velmi úzké křemenné nebo PEEKové kapiláry a spojovací prvky s velmi malými vnitřními objemy. Nutno dbát, aby v systému nebyly žádné mrtvé objemy, které mají obrovský vliv na rozmývání píků.

Detektory mají miniaturizované detekční cely, příp. se detekuje přímo na kapiláře za kolonou.



Spojovací materiál pro kapilární a nano-HPLC

Použití 1/16" šroubení pro křemenné kapiláry: PEEKové rukávky (sleeves)
- nebezpečí mrtvých objemů, „přetažení“



Moderní typy šroubení: speciální spojovací prvky s nulovým mrtvým objemem pro ruční dotažení pro tlaky do 1000 bar. Snadné použití.



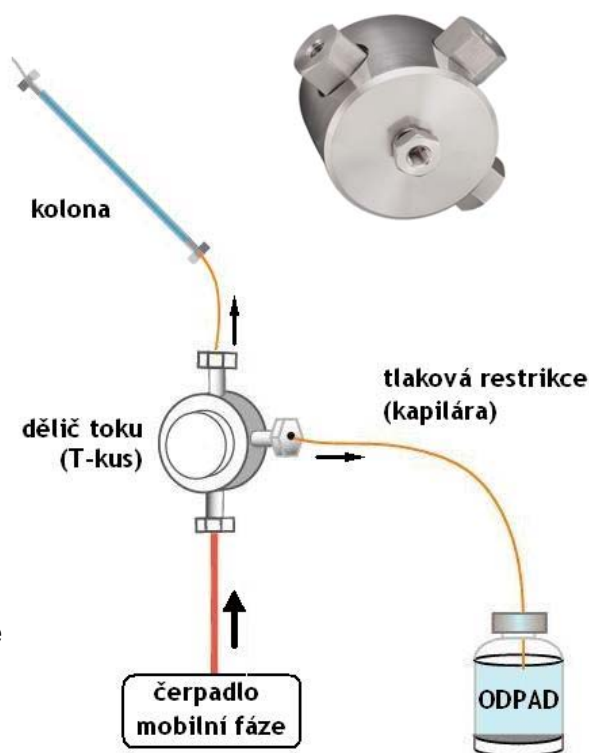
Děliče toku pro HPLC

Pokud je potřeba pracovat při nižších průtocích než umožňuje čerpadlo, je nutné použít děliče toku.

Dělicí poměr je dán rozdílem tlaků v obou větvích, tj. délkou a průměrem restriční kapiláry a tlakovým odporem kolony.



Komerčně jsou dodávány kalibrované děliče toku se sensory pro měření nízkých průtoků.

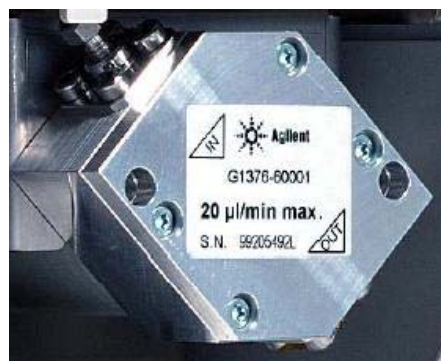
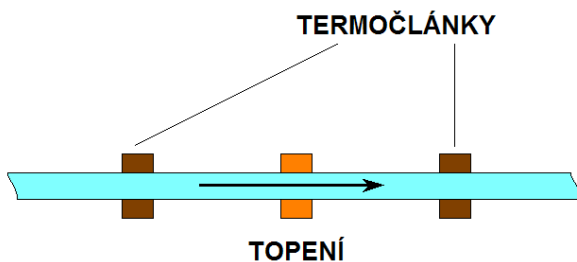


Měření nízkých průtoků

Bezkontaktní měření průtoku na základě tepelné vodivosti.

Pro nL a μL průtoky.

TEPLOTNÍ PRŮTOKOVÝ SENZOR



Materiály pro UHPLC

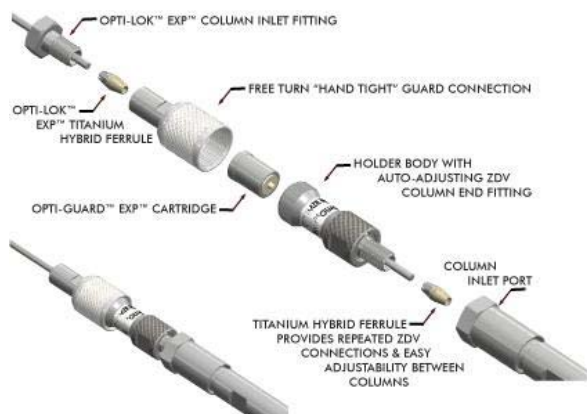


Moderní UHPLC systémy vyžadují vysoce odolné šroubení, které vydrží vysoké tlaky a teploty (do 1500-2000 bar, 150°C).

Materiály: ocel, pozlacená ocel, kombinace ocel-PEEK, vysoce odolný PEEK

Speciálně navržený spojovací materiál, předkolony a jejich držáky,

kapiláry – ocel, standardní PEEK do 500 bar, zapouzdřený v niklu 2500 bar



1/32" OD x .004" ID

Detekce v HPLC – základní pojmy

Detektor

Detektor je zařízení, které monitoruje změny složení mobilní fáze měřením fyzikálních nebo chemických veličin.

Univerzální detektor

Univerzální detektor reaguje na všechny analyty.

Selektivní detektor

Selektivní detektor reaguje pouze na určitou skupinu látek.

Specifický detektor

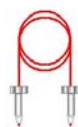
Specifický detektor reaguje pouze na jediný analyt, případně na velmi malou skupinu látek velmi podobných vlastností.

Detekce v HPLC – základní pojmy

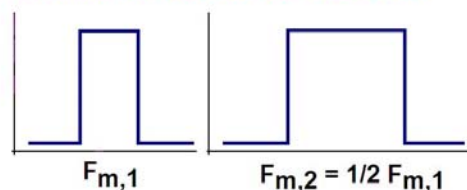
Koncentrační detektor

Koncentrační detektor reaguje na změnu koncentrace složky v efluentu nezávisle na rychlosti mobilní fáze.

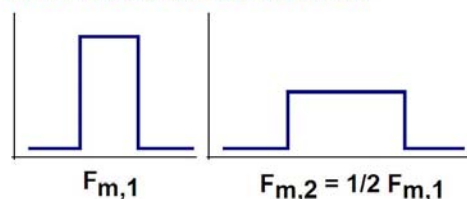
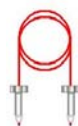
Příklad: spektrofotometrický detektor



KONCENTRAČNÍ DETEKTOR



HMOTNOSTNÍ DETEKTOR



Hmotnostní detektor

Hmotnostní detektor reaguje na změnu hmotnostního toku složky v efluentu do detektoru. Při změně rychlosti mobilní fáze se mění výška píku, ale plocha zůstává stejná.

Příklad: detektor rozptylu světla

Detekce v HPLC – základní pojmy

Nedestruktivní detektor

V nedestrukčním detektoru nedochází k chemické změně detekovaného analytu.

Příklad: spektrofotometrický detektor

Destruktivní detektor

V destruktivním detektoru se detekovaný analyt nevratně mění.

Příklad: hmotnostně-spektrometrický detektor

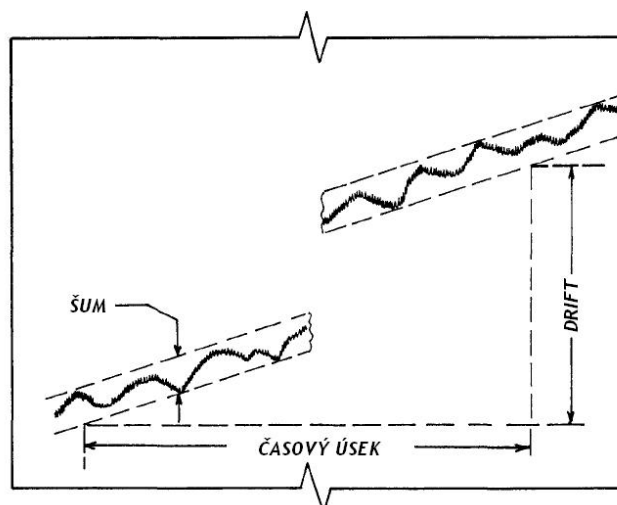
Detekce v HPLC – základní pojmy

Šum

Náhodné fluktuace signálu detektoru vyjádřené v jednotkách intenzity signálu.

Drift

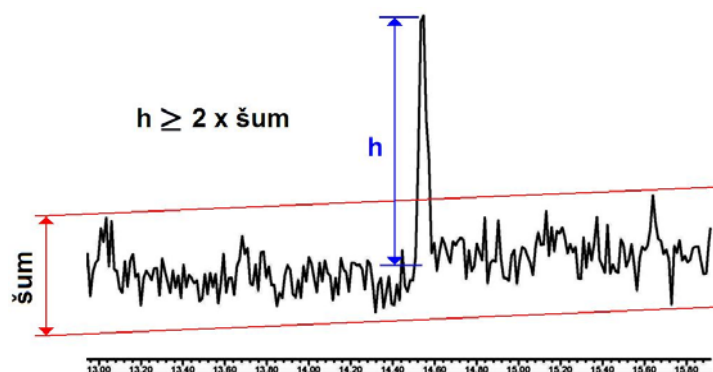
Postupná změna intenzity signálu s časem.



Detekce v HPLC – základní pojmy

Mez detekce

Koncentrace analytu, pro kterou detektor poskytne signál dvojnásobně intenzivní ve srovnání s úrovní šumu ($S/N=2$).

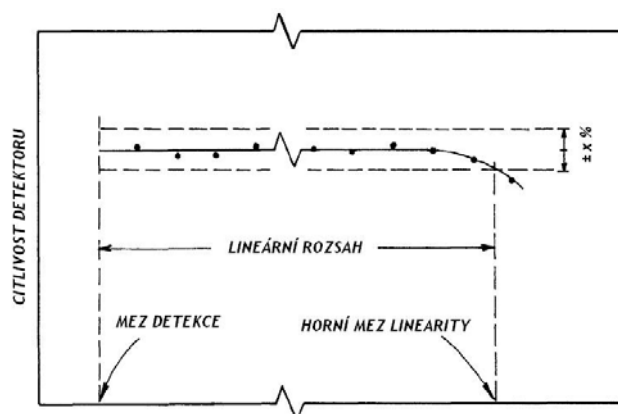
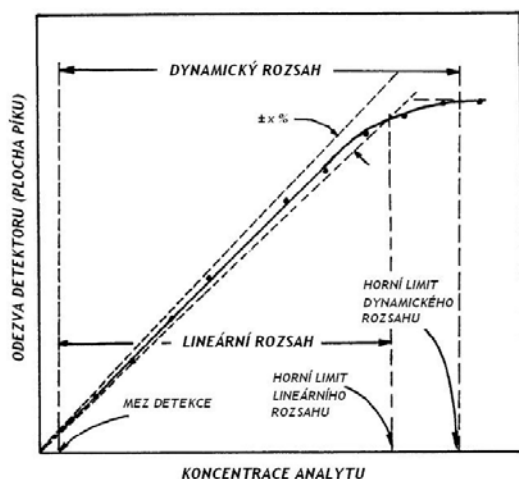


Citlivost detektoru

Velikost signálu vztažená na jednotku koncentrace. Směrnice kalibrační přímky.

$$\text{citlivost} = \text{výška píku} / \text{koncentrace analytu}$$

Detekce v HPLC – základní pojmy



Dynamický rozsah detektoru

Rozsah koncentrací, ve kterém změna koncentrace způsobí změnu intenzity signálu.

Lineární dynamický rozsah detektoru

Rozsah koncentrací, ve kterém je citlivost detektoru konstantní ($\pm 5\%$).

Vlastnosti ideálního detektoru

Ideální detektor

- ✓ možnost univerzální detekce všech přítomných analytů
- ✓ vysoká citlivost a nízkou úroveň šumu
- ✓ odezva detektoru je okamžitá a lineární v širokém koncentračním rozmezí
- ✓ robustní vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty
- ✓ vhodný pro gradientovou eluci
- ✓ nepřispívá k rozšiřování chromatografických zón

Vlastnosti detektorů

	RI	UV-VIS	IR	FLD	ECD	CONDUCT	CORONA	ELSD
typ detektoru	nedestruktivní	nedestruktivní	nedestruktivní	nedestruktivní	destruktivní	nedestruktivní	destruktivní	destruktivní
odezva	univerzální	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	univerzální
měřená veličina	index lomu	absorbance	absorbance	intenzita fluorescence	elektrický proud	vodivost	elektrický proud	rozptyl světla
typická citlivost (hmotnost/ml)	µg	ng	µg	pg	pg	ng	ng	µg
lineární rozsah	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ²
závislost odezvy na průtoku	ano	ne	ne	ne	ano	ano	ano	ano
teplotní závislost	vysoká (10 ⁻⁴ jed. ind. lomu)	nízká	nízká	nízká	vysoká (1,5%)	vysoká (2,0%)	nízká	vysoká
gradientová eluce	ne	ano	ne	ano	ne	ano	ano	ano (částečně)

- RI - detektor refraktometrický
- UV-VIS - detektor spektrofotometrický
- IR - detektor infračervený
- FLD - detektor fluorimetrický
- ECD - detektor elektrochemický
- CONDUCT - detektor vodivostní
- ELSD - Evaporative Light Scattering Detector

UV / VIS detektory

UV/VIS (spektrofotometrický) detektor měří absorpenci eluátu v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Velikost odezvy je dána Lambert-Beerovým zákonem, který vyjadřuje vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy (l), koncentrací absorbující složky (c) a velikostí absorpce, tj. absorpance (A). Nejčastější typ detektoru.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

ε - molární absorpční koeficient (l/mol/cm)

TABLE 1.1 Approximate Cutoff Ranges for Solvent Classes

Solvent or Solvent Class ^a	Cutoff (nm)
Acetonitrile and water	<190
Alkanes (hexane, iso-octane, etc.)	190–205
Alkyl alcohols (methanol, isopropyl alcohol, etc.)	205–220
Alkyl ethers (diethyl ether, methyl <i>t</i> -butyl ether, etc.)	210–220
Alkyl chlorides (dichloromethane, chloroform, etc.)	220–270
Freons	225–245
Alkyl acetates (ethyl and butyl acetate, etc.)	250–260
Alkyl amides (dimethylformamide, dimethylacetamide, etc.)	260–270
Benzene and alkyl benzenes (toluene, xylene, etc.)	270–290
Chlorobenzenes (chlorobenzene, 1,2-dichlorobenzene, etc.)	280–310
Alkyl ketones (acetone, methyl propyl ketone, etc.)	320–340

^a All solvents unpreserved.

Citlivost detektoru ($S = A/c = \varepsilon \cdot l$) závisí na délce optické dráhy !

Vlnovou délku je třeba volit s ohledem na absorpenci mobilní fáze.

Absorbance rozpouštědel způsobuje drift základní linie při gradientové eluci.

UV / VIS detektory

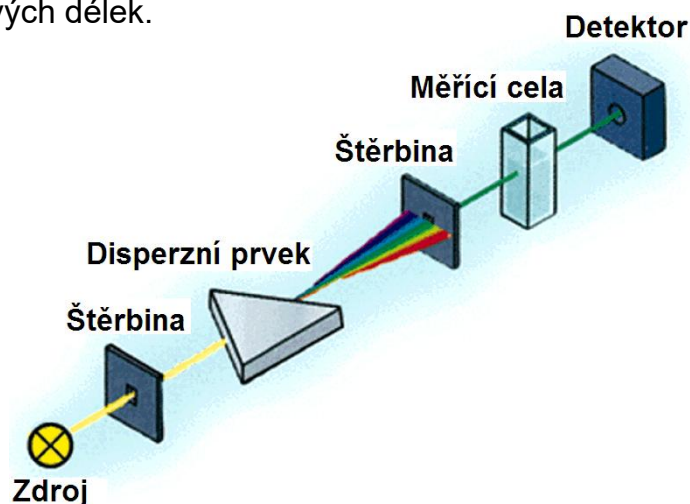
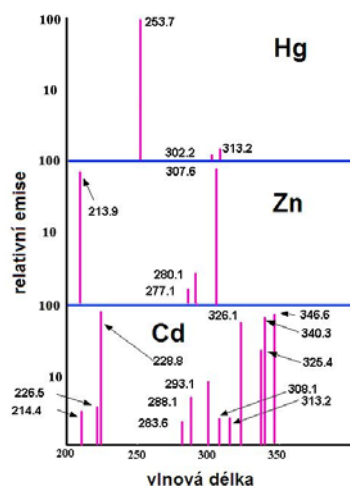
UV / VIS detektory s fixní vlnovou délkou

používají jako zdroje záření nízkotlakou rtuťovou (254 nm), kadmiovou (229 nm) nebo zinkovou (214 nm) výbojku. Žádná z nich neposkytuje absolutně monochromatické záření a proto se ještě používají filtry.



UV / VIS detektory s nastavitelnou vlnovou délkou

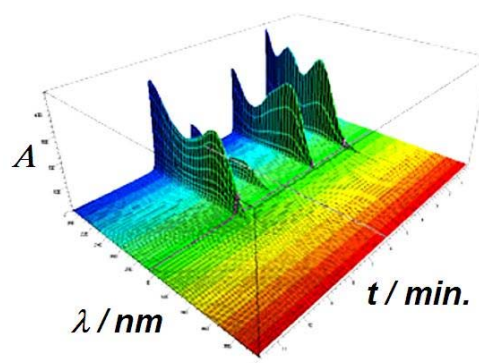
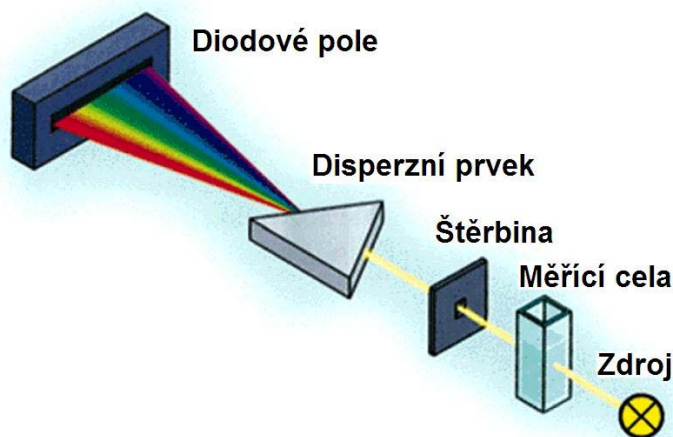
umožňují výběr z několika vlnových délek.



UV / VIS detektory

UV / VIS detektory s diodovým polem (PDA, DAD)

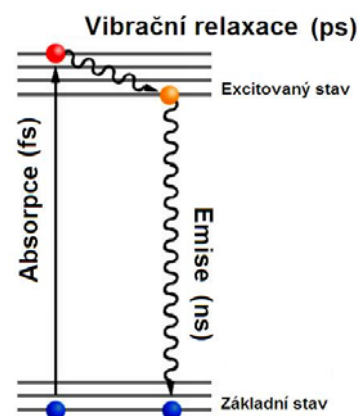
zaznamenávají celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Detektorem je pole fotodiód, jejich počet určuje spektrální rozlišení detektoru. Umožňují detekci analytu při jakékoliv zvolené vlnové délce, porovnávat spektra s knihovnou spekter, vypočítat čistotu píku.



Fluorescenční detektory

Fluorescenční (fluorimetrický) detektor

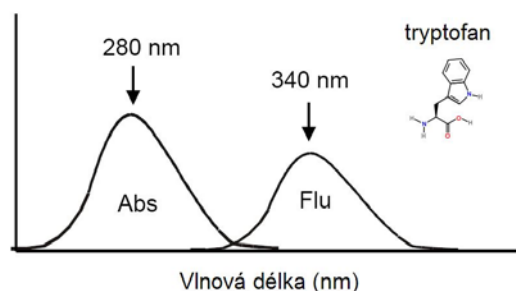
měří sekundární (emisní) záření, které látka vyzáří po absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření. Absorbací elektromagnetického záření přecházejí molekuly látek ze základního stavu do vyšších vibračních hladin. Absorbovanou energii analyt vyzáří jako fluorescenci (nebo se jí zbaví jinak). Vlnová délka emitovaného záření bývá větší než u excitačního v důsledku vibrační relaxace.



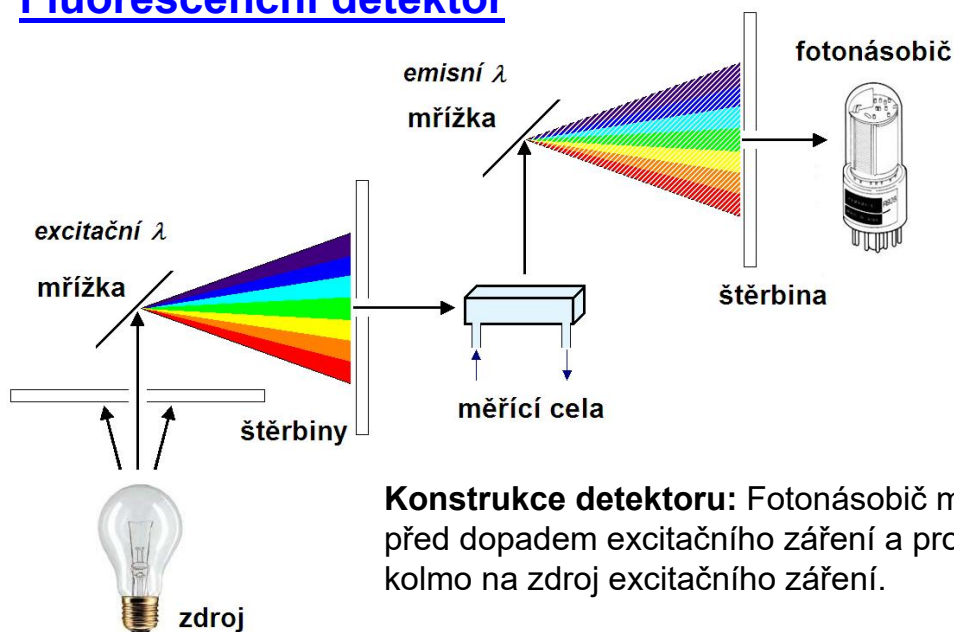
Závislost mezi intenzitou fluorescence a koncentrací analytu (platí pro nízké koncentrace a dostatečně malou tloušťku květy I):

$$\Phi_F = k \cdot \Phi_0 \cdot \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l$$

Φ_0 intenzita excitačního záření



Fluorescenční detektor



Jednoduché fluorescenční detektory používají jako zdroj excitačního záření rtuťovou výbojku s filtrem a detekují fluorescenční záření současně při všech vlnových délkách. Moderní detektory umožňují nastavit délku excitačního i emitovaného záření, lze programovat vlnové délky v průběhu analýzy pro každou látku zvlášť.

Fluorescenční detektor

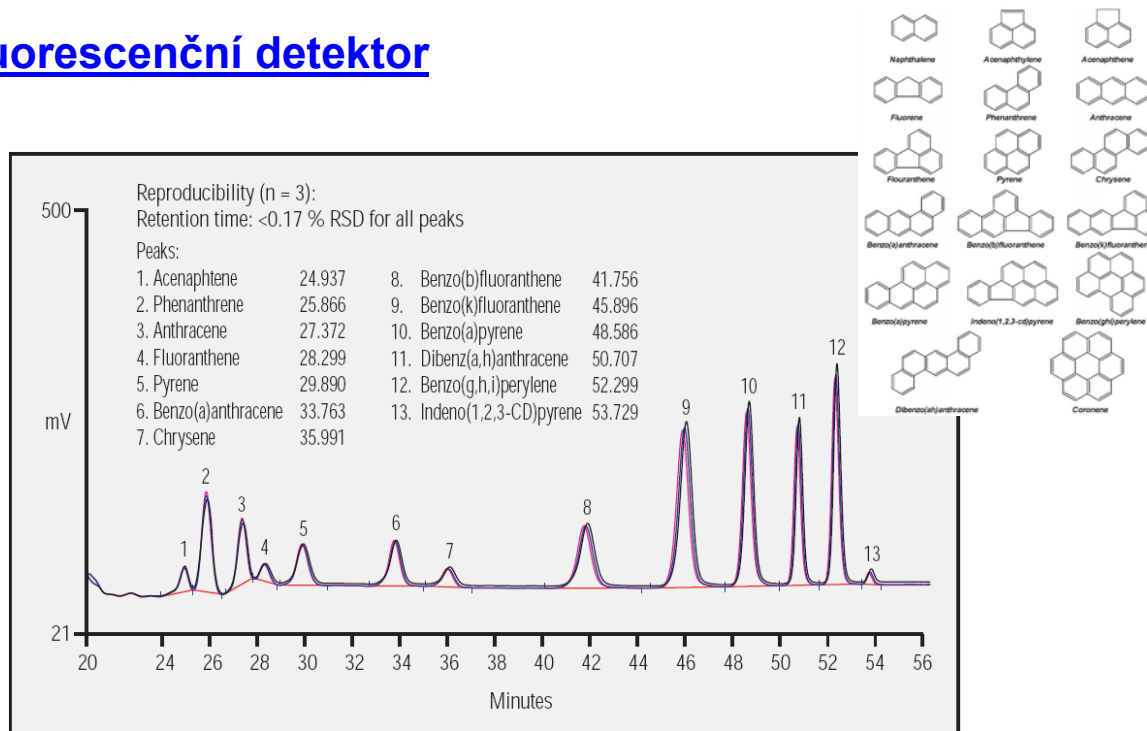


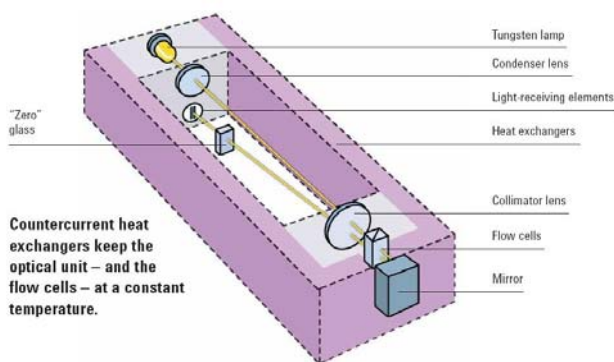
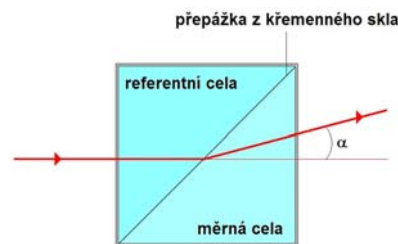
Figure 7. Overlay of three consecutive, directly injected cacao butter samples, spiked with PAH standard. Despite comprehensive switching technique, the retention times are very stable.

Aplikace: detekce polycyklických aromatických uhlovodíků

Refraktometrický detektor

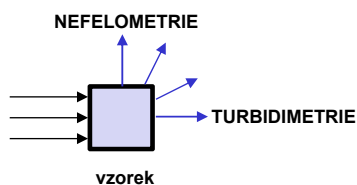
Refraktometrický detektor

Je založen na měření změn indexu lomu eluátu, který prochází měřicí celou. Citlivost je tím větší, čím je větší rozdíl v indexu lomu analytu a mobilní fáze. Odezva je závislá na teplotě, proto je nutné detekční celou temperovat. Měření je diferenční, tj. paprsek prochází měřenou a srovnávací celou, měří se rozdíl intenzity světla, které dopadá na detektor.



Univerzální detektor. Nevhodný pro gradientovou eluci. Píky mohou být pozitivní i negativní, nízká citlivost. Vhodný pro látky které neabsorbují, nefluoreskují (cukry, lipidy, polymery). Používá se v gelové chromatografii.

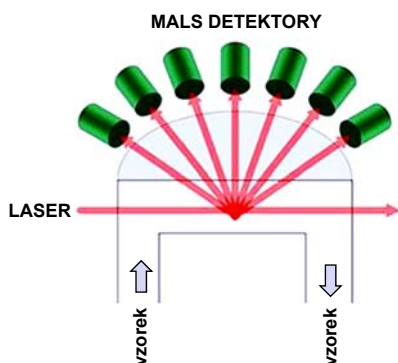
Detektor rozptylu světla - MALS



Turbidimetrie, nefelometrie – optické metody, které využívají rozptyl světla na koloidních částicích a mikrosuspencích.

- malé částice – rozptyl všemi směry (Tyndallův jev)
- větší částice ~10 nm a více - maximum rozptýleného světla ve směru dopadajícímu záření

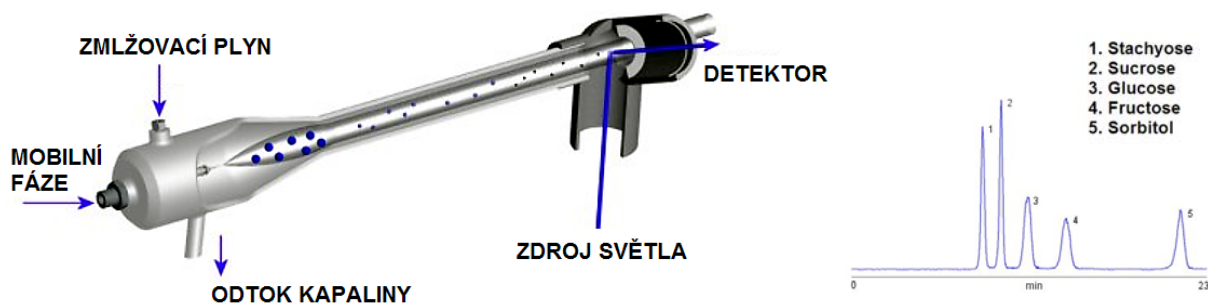
Detektor MALS (multi angle light scattering, víceúhlový detektor rozptýleného světla)



MALS: měření světla rozptýleného vzorkem do několika úhlů. Používá se pro určení molární hmotnosti a průměrné velikosti částic. K tomu je nutná extrapolace signálů z detektorů na signál při úhlu 0° (v ose laseru).

Využití – detekce v gelové chromatografii nebo RPC, studium proteinů, proteinových komplexů, nanočástic apod.

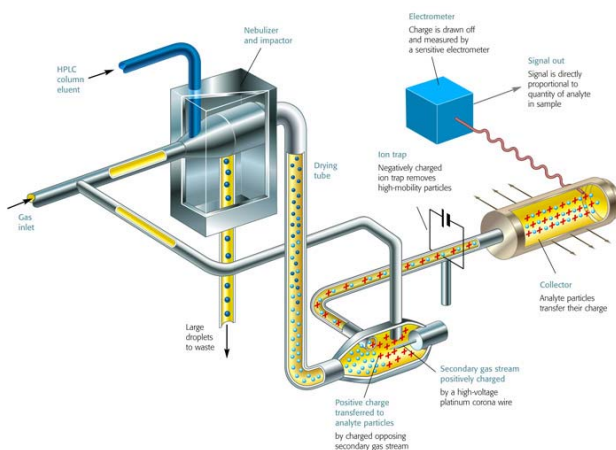
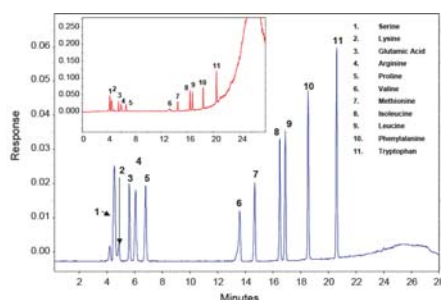
Odpařovací detektor rozptylu světla - Evaporative Light Scattering Detectors (ELSD)



Odpařovací detektor rozptylu světla

Zaznamenává rozptyl světla na částicích analytu, které vznikají po zmlžení eluentu a následném odpaření rozpouštědla. Citlivý a univerzální detektor, který může být použit (na rozdíl od refraktometrického detektoru) ke gradientové eluci. Vhodný pro řadu látek, výhodný pro ty, které nemají chromofor nebo fluorofor (některé lipidy, polymery, sacharidy apod), problematický pro těžké analyty. Nutno používat pouze těžká aditiva do mobilní fáze – octan nebo mravenčan amonný. Nižší linearita než v případě UV detekce.

Aerosolový detektor nabitých částic (Corona™ Charged Aerosol Detector (CAD))



Aerosolový detektor nabitých částic

Eluát je zmlžen a vzniklý aerosol vstupuje do evaporační komůrky kde dojde k odstranění mobilní fáze. V kolizní komůrce je elektroda na jejímž hrotu vlivem vysokého napětí vzniká koronový výboj. Do komůrky se zároveň dostává velké množství nosného plynu (dusíku), který se ionizuje. Kladně nabitý nosný plyn přenáší náboj na analyt. Kladně nabité částice analytu proudí do kolektoru, kterému předávají svůj náboj za vzniku proudu, který se měří citlivým elektrometrem. Signál je přímo úměrný množství analytu.

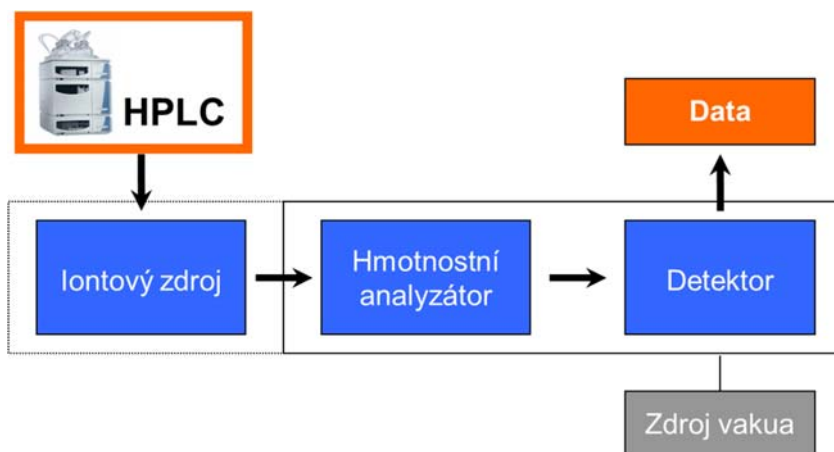
Detektor je velmi citlivý, lineárně dynamický rozsah je srovnatelný s UV detekcí.

Hmotnostně-spektrometrické detektory

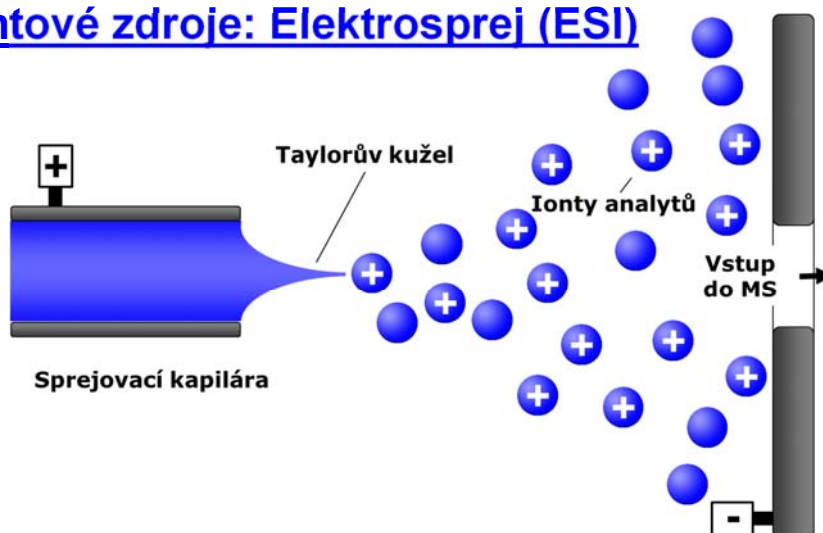
Hmotnostně-spektrometrický (hmotnostní) detektor

detekuje ionty, které vznikají ionizací analytů. Prvním krokem je převod analytů rozpuštěných v mobilní fázi na ionty v plynné fázi. V dalším kroku se ionty analyzují, tj. určuje se poměr hmotnosti ku náboji (m/z). Iontové zdroje pracují za atmosférického tlaku, analyzátoři za vakua.

Univerzální a zároveň vysoce selektivní, citlivý detektor. Umožňuje identifikaci analytů na základě jejich hmotnostních spekter.



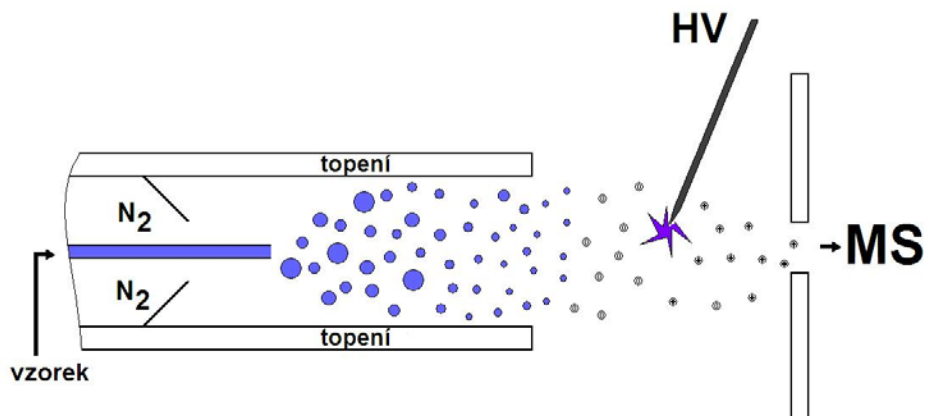
MS - iontové zdroje: Elektrosprej (ESI)



Eluát prochází kapilárou, na niž je vloženo vysoké napětí. Intenzivní pole na konci kapiláry tvoří kónický meniskus (Taylorův kužel), ze kterého se uvolňuje sprej vysoce nabitých kapiček. Následným postupným odpařením rozpouštědla vznikají ionty. Pokud je více ionizačních míst v molekule mohou vznikat vícenásobně nabitě ionty.

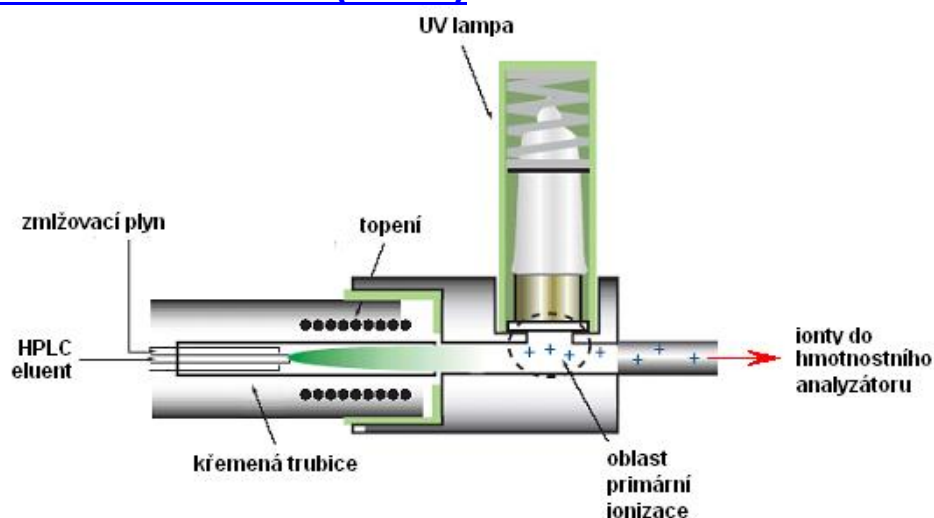
ESI – převod iontů z kapalně fáze do fáze plynné.

MS - iontové zdroje: Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)



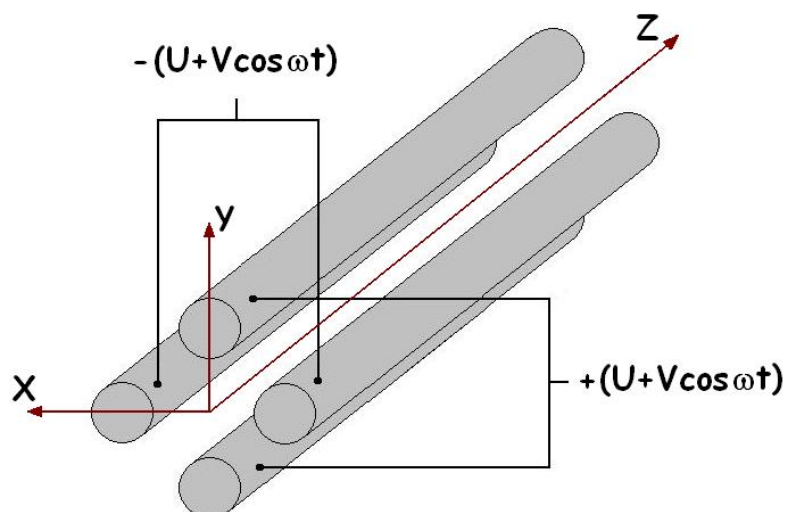
Eluát je rozprašován do vyhřívané komůrky (~400-500 °C). Koronový výboj je zdrojem elektronů, které ionizují plyny ve zdroji (zmlžovací plyn N₂, vzduch). Vzniklé ionty kolidují s molekulami rozpouštědla za tvorby sekundárních reakčních iontů (např. (H₂O)_nH⁺). Tyto ionty ionizují molekuly analytu (záleží na jejich protonové afinitě).

MS - iontové zdroje: Chemická fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)



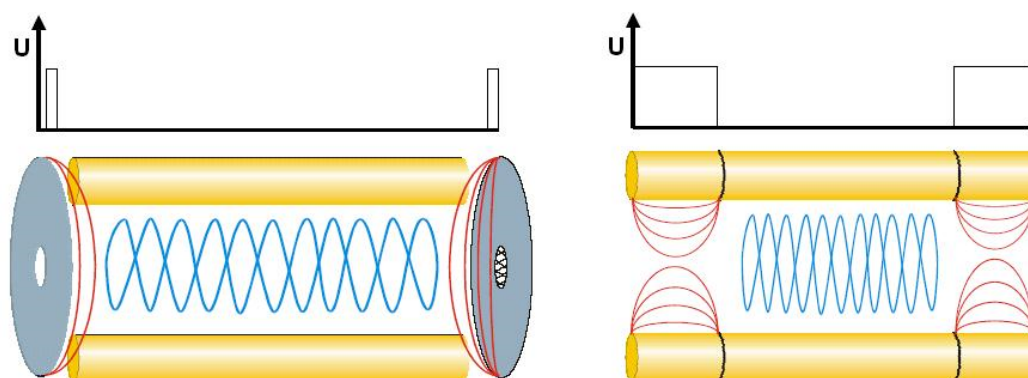
Eluát je rozprašován do vyhřívané komůrky. VUV lampy je zdrojem fotonů (energie ~10 eV), které jsou absorbovány molekulami analytu. Analyt ztrácí elektron a vznikají molekulární ionty M⁺. Do zdroje se může přivádět dopant s nízkou ionizační energií (toluen, aceton) ke zvýšení koncentrace ionizovaných molekul a tím i ke zvýšení účinnosti ionizace analytu.

MS - analyzátory: Kvadrupól (Q)



Analyzátor tvořen 4 paralelními tyčemi kruhového nebo hyperbolického průřezu, na něž je vkládáno napětí. Vstupující ionty začnou oscilovat. Oscilace jsou stabilní pouze pro ionty s určitým poměrem m/z a jen tyto ionty kvadrupólem projdou. Ostatní jsou zachyceny na tyčích. Skenováním jsou propouštěny postupně všechny ionty z požadovaného rozsahu spektra ("hmotnostní filtr").

MS - analyzátory: Lineární iontová past (LIT)



Lineární iontová past je v podstatě "RF only" multipól (kvadrupól), na jehož přední i zadní straně jsou umístěny elektrody na vyšším DC potenciálu. Uvnitř multipólu tak vzniká pole umožňující uchovávat a selektivně vypuzovat ionty. Ionty mohou být vypuzeny axiálně i radiálně.

MS - analyzátoři: Analyzátor doby letu (TOF)



TOF nalyzátor je založený na měření doby, za kterou ionty překonají určitou dráhu. Ionty jsou urychleny vysokonapěťovým pulsem a vstupují do oblasti bez elektrického pole (letové trubice). Ionty s různým m/z získají stejnou energii, ale různou rychlost. Čas, který je potřebný k překonání letové dráhy je rozdílný - těžší ionty potřebují delší čas než lehčí ionty. Na konci trubice je detektor.

Elektrochemické detektory

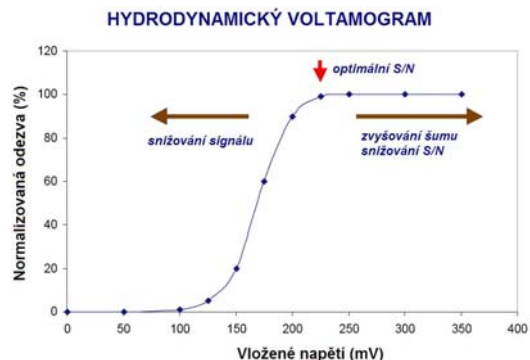
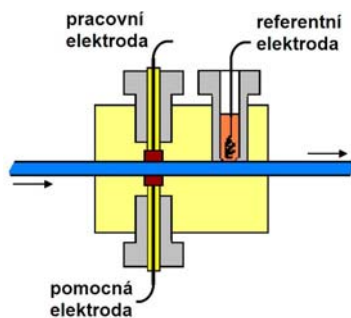
Elektrochemický detektor

měří proud, který vzniká při průchodu oxidovatelné nebo redukovatelné látky měrnou celou. Většinou se používá tříelektrodového zapojení s pracovní, pomocnou a referentní elektrodou. Pracovní elektroda může být ze skelného uhlíku, uhlíkových vláken, grafitové pasty, diamantu, Pt, Au, Cu, rtuti nebo amalgámů.

Výhodou je vysoká citlivost a rychlost odezvy. Jsou to specifické detektory. *Nevýhodou* je pasivace elektrod a následné čištění. Mobilní fáze musí být vodivá, tzn. není možné tyto detektory použít pro NP-HPLC.

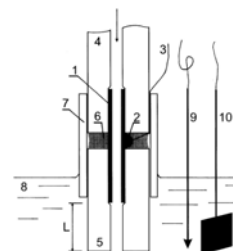
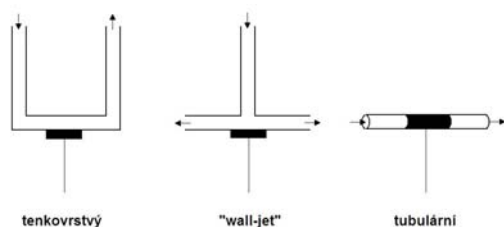
Detektory pracují buď amperometricky (měří se proud při konstantním elektrodovém potenciálu, který se volí v oblasti limitního proudu – koncentrační detektor) nebo coulometricky (dochází k úplné elektrolýze – hmotnostní detektor).

Elektrochemické detektory: amperometrický



Amperometrický detektor

Zaznamenává elektrický proud odpovídající oxidaci (redukci) látek v eluentu při vhodném vloženém napětí na elektrodu. Existuje řada geometrických uspořádání, např. tenkovrstvý, "wall-jet", tubulární

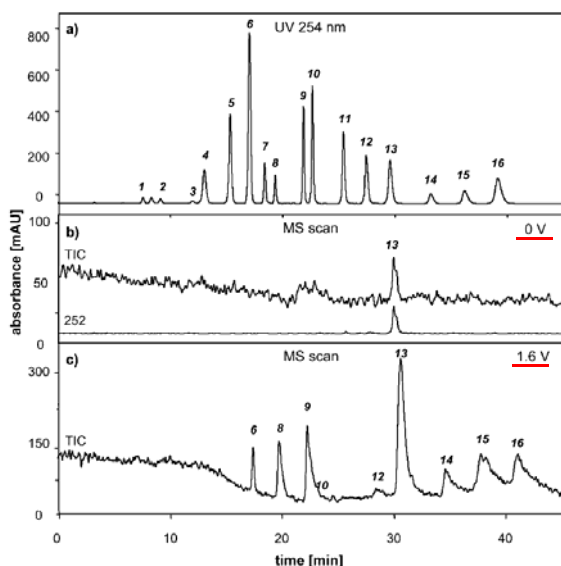


Elektrochemické detektory: coulometrický



Coulometrický detektor

V coulometrickém detektoru dochází k úplné elektrolýze analytu. Elektrody jsou velkoplošné, např. porézní uhlík. Využívají se i k elektrochemické derivatizaci před další detekcí (amperometrickou, fluorescenční, MS)



Příklad: analýza PAH, elektrochemická on-line oxidace, detekce MS

- vznik oxidovaných produktů detekovatelných v ESI

Vodivostní detektor

Vodivostní detektor

měří vodivost mobilní fáze mezi dvěma elektrodami (nerez, platina, zlato) v průtokové cele obvykle válcovitého tvaru. Na elektrody se vkládá střídavé napětí, aby se zabránilo polarizaci. Mobilní fáze musí mít nízkou vodivost, ideálně bez přídavku pufrů.

Využívají se v iontové výměnné chromatografii: za kolonou musí dojít ke snížení vodivosti složek mobilní fáze pomocí neutralizace nebo konverze na méně vodivé formy solí (uhličitanu).

Nespecifický (univerzální) detektor, nepříliš citlivý.

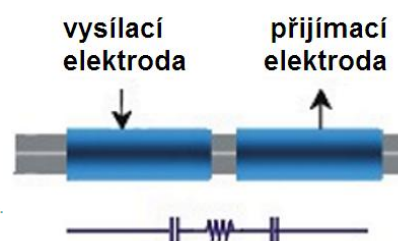
Bezkontaktní vodivostní detektor se uplatňuje v CE, čipové elektroforéze i HPLC.



Seven Anions on
100 x 4.1 mm PRP-X100 (P/N 79439)

1. Fluoride 1 ppm
2. Chloride 1 ppm
3. Nitrite 1 ppm
4. Bromide 1 ppm
5. Nitrate 1 ppm
6. Phosphate 1 ppm
7. Sulfate 1 ppm

Conditions: 2.0 mM L-Tyrosine Disodium Salt, 2 mM Phenol pH 10.1. Isocratic Ambient.
Flow: 2.0 mL/min
Injection: 100 µL
Detection: Dionex Fiber Suppressed Conductivity



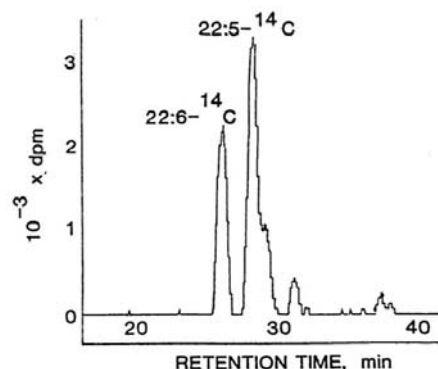
Radiometrický detektor

Radiometrický (radiochromatografický) detektor

Detektor obsahuje scintilátor, který může být pevný, nebo kapalný. Ionizující záření vyvolá luminiscenci, většinou ve viditelné oblasti. Ta je zaznamenána fotonásobičem. Citlivost závisí na době, kterou radioaktivní analyt stráví v detektoru (měří se většinou v segmentech).



Využívá se k detekci značených sloučenin při farmakologických studiích, environmentálních a klinických aplikacích.



RP-HPLC separace značených mastných kyselin