

Praxe HPLC

Josef Cvačka, 15.12.2010

Mobilní fáze – kvalita rozpouštědel a chemikálií

Katal. číslo	Popis
100003	Acetonitril GR pro analýzu ACS, Reag. Ph Eur
100016	Acetonitril pro spektroskopii Uvasol®
100017	Acetonitril pro plynovou chromatografii SupraSolv®
100029	Acetonitril hypergrade pro kapalinovou chromatografii (LC/MS) LiChrosolv®
100030	Acetonitril gradient grade pro kapalinovou chromatografii LiChrosolv® Reag. Ph Eur
113358	Acetonitril pro preparativní chromatografii Prepsolv®
114291	Acetonitril pro isokratickou eluci, pro kapalinovou chromatografii LiChrosolv®
100004	Acetonitril sušený (max. 0.005 % H₂O) SeccoSolv®
112636	Acetonitril pro syntézu DNA (max. 10 ppm H₂O)

Kvalita rozpouštědel a případných aditiv (množství nečistot) ovlivňuje velikost šumu a tím i citlivost a mez stanovení.

Mobilní fáze – odstranění mechanických nečistot

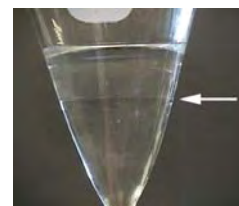
Filtrace mobilních fází

- odstranění mechanických nečistot filtrací mobilních fází
- filtry mobilních fází v zásobnících
- in-line filtry



Mobilní fáze - mísitelnost

Acetone (0.32)		Miscibility Chart Adapted from Paul Sadek.	
Acetonitrile (ACN) (0.37)		The HPLC Solvent Guide Wiley-Interscience, 2002.	
	Benzene (0.65)		
	Butanol (0.73)		Miscible (Viscosity in cP)
	Carbon tetrachloride (0.97)	■	Immiscible (Viscosity in cP)
	Chloroform (0.57)		
■	Cyclohexane (1.00)		
	1,2-Dichloroethane (0.79)		
	Dichloromethane (0.44)		
	Dimethyl formamide (DMF) (0.92)		
	Dimethyl sulfoxide (DMSO) (2.00)		
	Dioxane (1.54)		
	Ethanol (1.20)		
	Ethyl acetate (0.45)		
	Ethyl ether (0.32)		
■	Heptane (0.39)	■	
■	Hexane (0.33)	■	
	Iso-octane		
	Isopropyl alcohol (2.30)		
	Methanol (0.60)	■	
	Methyl-t-butyl ether (0.27)		
	Methyl ethyl ketone (0.45)		
■	Pentane (0.23)	■	
	Tetrahydrofuran (THF) (0.55)		
	Toluene (0.59)		
■	Water (1.00)	■	
	Xylene (0.61)	■	



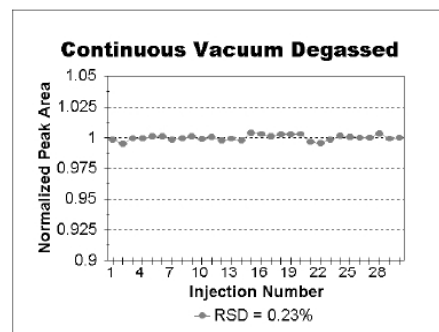
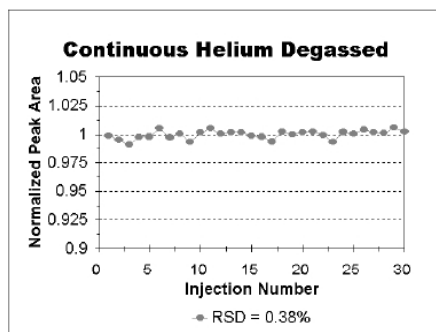
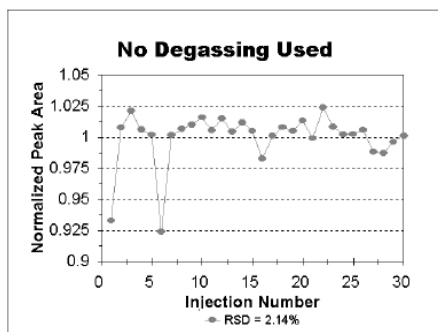
Nemísitelná rozpouštědla

- zvyšování tlaku v systému
- nereprodukovatelné analýzy

Výměna nemísitelných rozpouštědel na koloně nebo v zásobnících MF – postupně přes společné mísitelné rozpouštědlo:

z hexanu do methanolu: hexan → 2-propanol → methanol

Mobilní fáze – odplynění



Test reprodukovatelnosti plochy píku. Kolona Spherisorb ODS II 150 mm × 4.5 mm ID, 5 µm, mobilní fáze 70/30 MeOH/H₂O. Vzorek propylparaben, 0.015 g/L v mobilní fázi.

Reprodukovatelnost signálu v systémech s neodplyněnou mobilní fází je nižší!



vakuová filtrace



sonikace

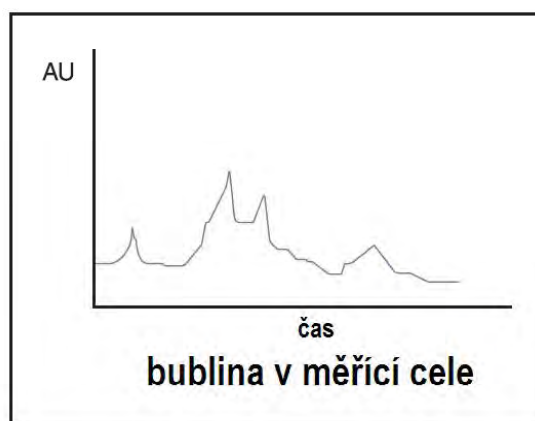
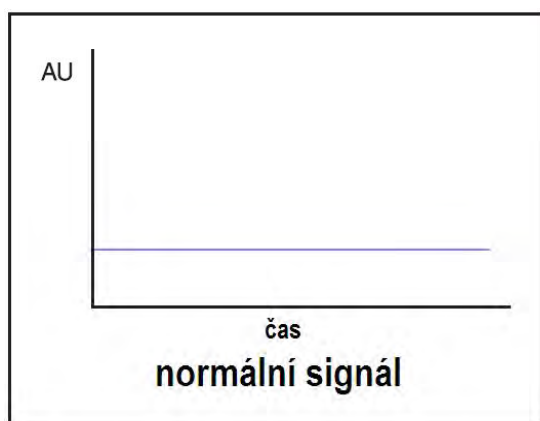


He odplyňovač



vakuový odplyňovač

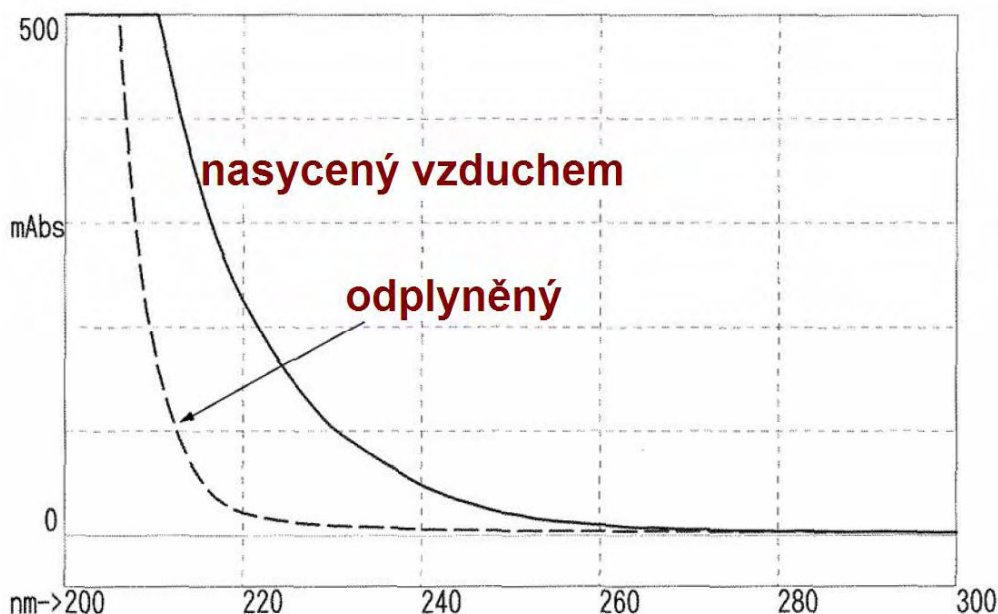
Mobilní fáze – odplynění



Šum se nepříjemně zvýší, pokud se v cele detektoru tvoří bublinky vzduchu. Řešení – odplynění mobilní fáze nebo zvýšení tlaku za kolonou.

Mobilní fáze – odplynění

ABSORČNÍ SPEKTRUM METHANOLU



U neodplyněných vzorků se posouvá absorpční hrana k vyšším vlnovým délkám.

Mobilní fáze – kompatibilita s detekcí

Při UV detekci je třeba brát ohled na absorpční hranu použitých rozpouštědel a aditiv.

TABLE 1.1 Approximate Cutoff Ranges for Solvent Classes

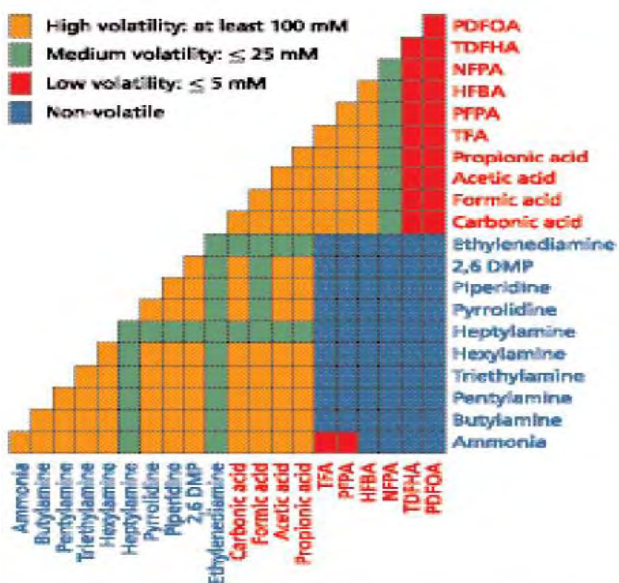
Solvent or Solvent Class ^a	Cutoff (nm)
Acetonitrile and water	<190
Alkanes (hexane, iso-octane, etc.)	190–205
Alkyl alcohols (methanol, isopropyl alcohol, etc.)	205–220
Alkyl ethers (diethyl ether, methyl <i>t</i> -butyl ether, etc.)	210–220
Alkyl chlorides (dichloromethane, chloroform, etc.)	220–270
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.

Při elektrochemické detekci je třeba zajistit dostatečnou vodivost mobilní fáze přidavkem solí a pufrů.

Mobilní fáze – kompatibilita s detekcí

ELSD, MS a CAD detektory vyžadují, aby mobilní fáze byla dostatečně těkává. Nutno používat jen těkávé pufrы.



TFA = trifluoroacetic acid, PFPA = pentafluoropropionic acid, HFBA = heptafluorobutyric acid, NFPA = nonafluoropentanoic acid, TDFHA = tridecafluoroheptanoic acid, PDFOA = pentadecafluorooctanoic acid, 2,6 DMP = 2,6 dimethyl piperidine.

Vhodná aditiva:

*kyselina mravenčí, kyselina octová
amoniak
octan amonný, mravenčan amonný
uhličitan amonný*

Nevhodná aditiva:

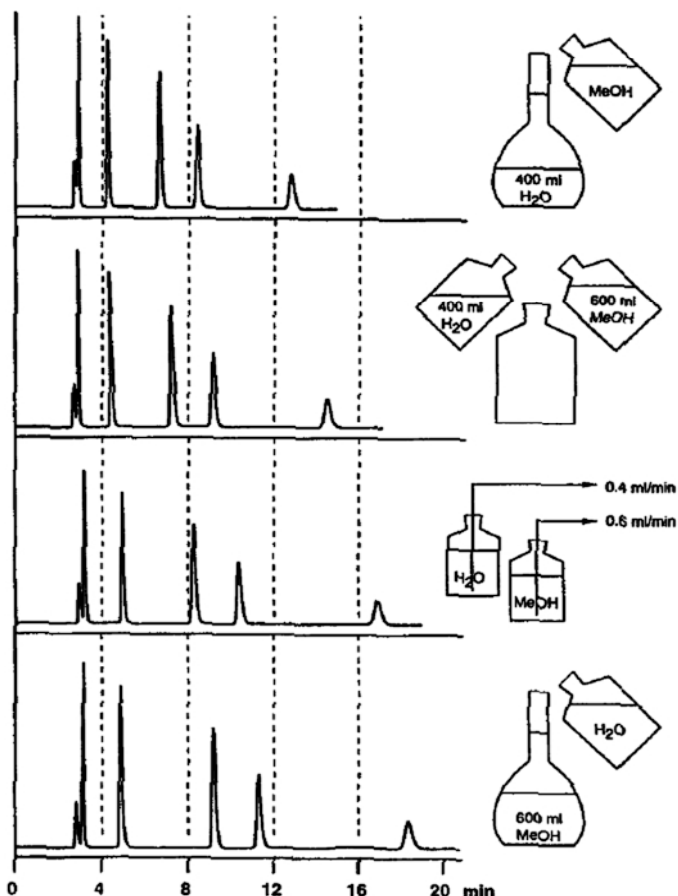
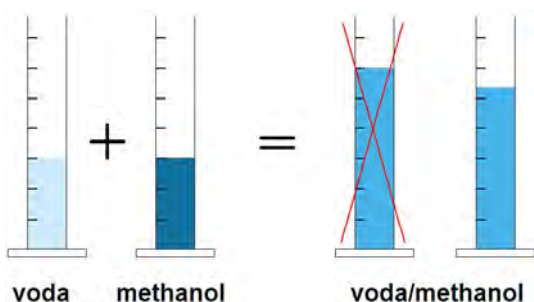
*minerální kyseliny (fosforečná, sírová)
alkalické hydroxidy, kvartérní amoniové
báze, fosfátové pufrы, TRIS pufrы
detergenty (např. SDS)*

Mobilní fáze – příprava

Způsoby přípravy mobilních fází

Pozor na objemové změny při mísení rozpouštědel!

Je nutné uvádět, jakým způsobem byla mobilní fáze připravena.



Separace výbušnin v mobilních fázích obsahujících 60% MeOH připravených různými způsoby.

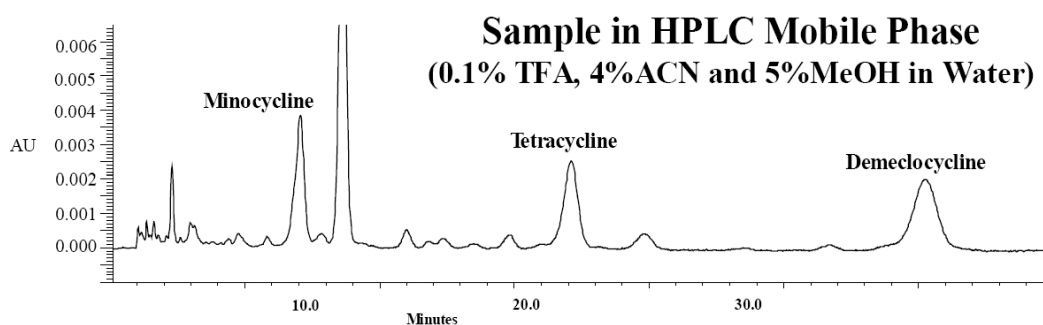
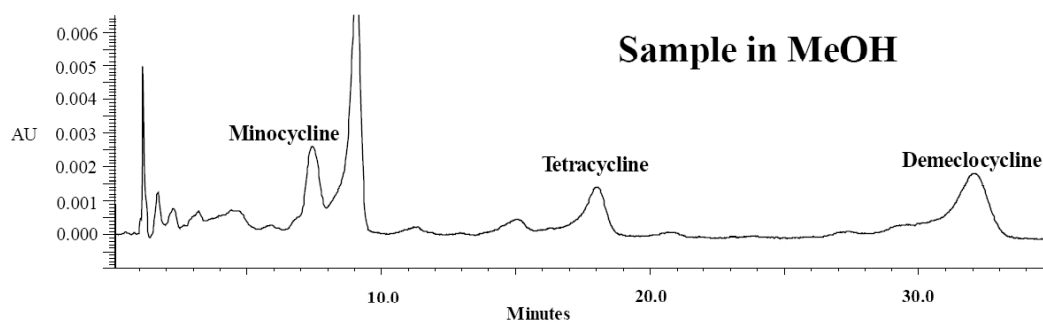
Vzorek – pevné nečistoty

Filtrace / centrifugace vzorků

Nerozpustných částice ve vzorcích mohou způsobit zanesení systému, zejména kolony. Vzorek je vhodné čistit filtrací nebo centrifugací.

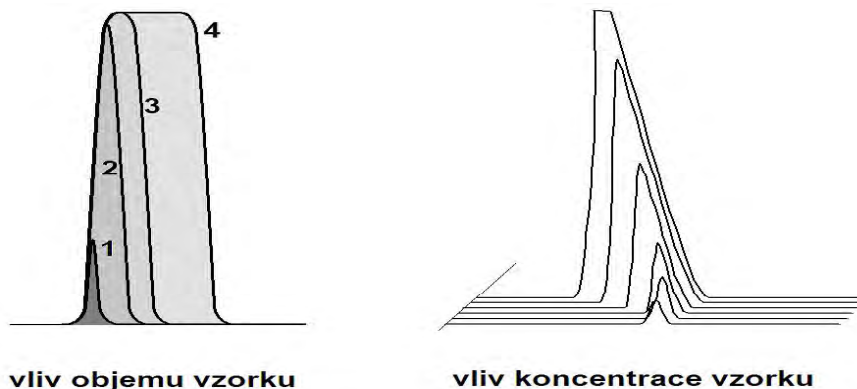


Vzorek – druh rozpouštědla



Vhodným rozpouštědlem pro vzorek je mobilní fáze. Nástřik vzorku rozpuštěného v silném solventu (zejména při větších dávkovaných objemech) rozmyje vzorek v koloně.

Vzorek – množství vzorku, objem vzorku



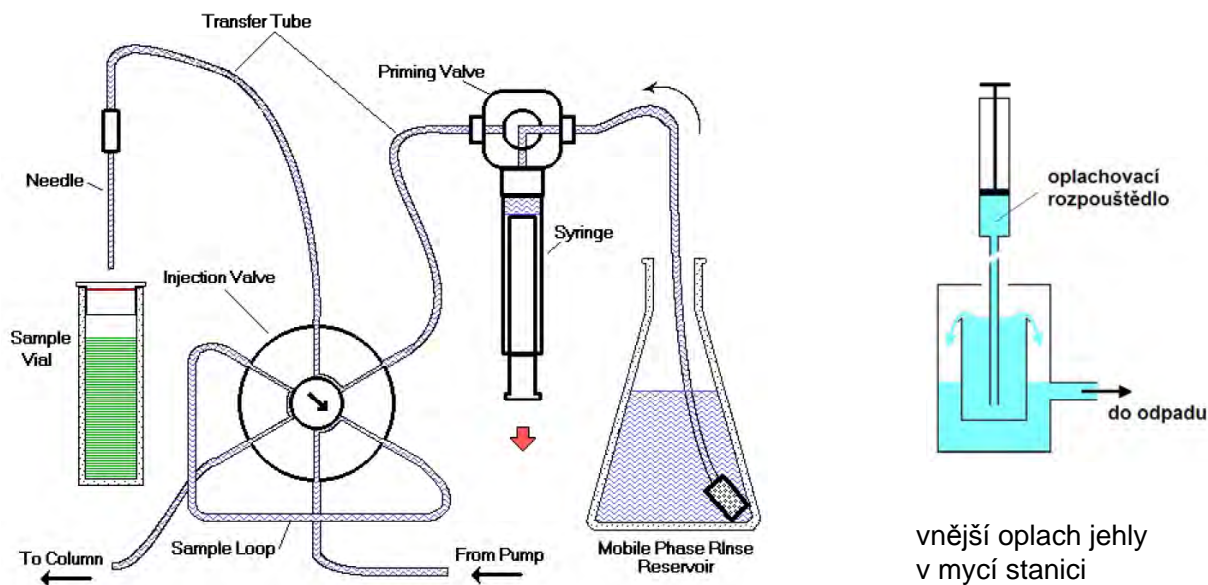
Uvažujme vzorek rozpuštěný v mobilní fázi. Při **vysokých nástřikových objemech** se jsou píky širší, v extrémních případech má pík plochý vrchol (nedojde k zaostření na koloně). Dávkované objemy v konvenční HPLC: 2-20 μL . Vzorek rozpuštěný ve slabším rozpouštědle než je MF lze dávkovat ve větších objemech (zaostření na koloně).

Uvažujme vzorek rozpuštěný v mobilní fázi a malý dávkovaný objem. Kolona má omezenou kapacitu zachytit vzorek (tj. stacionární fáze se může nasytit vzorkem). Při **vysokých koncentracích vzorků** se získá trojúhelníkový záznam, šířka roste s koncentrací, snižuje se retenční čas.

Dávkovače vzorků - proplachování

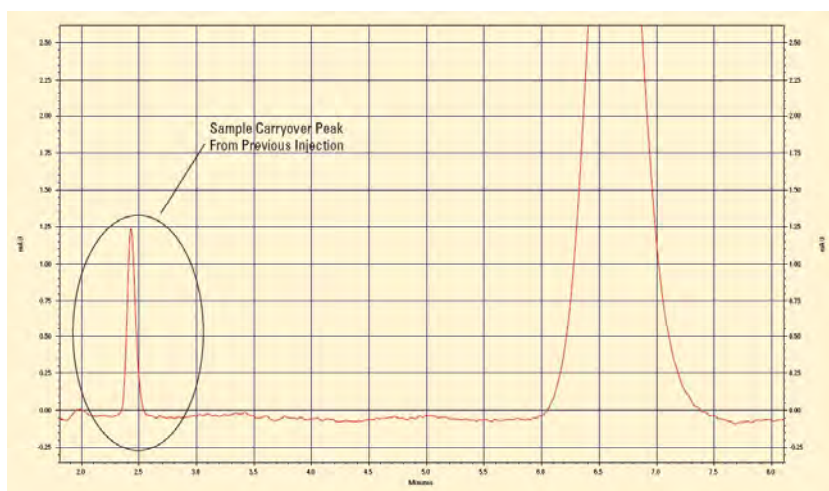
Dávkovače (smyčka, jehly, kapiláry) se proplachují dostatečným objemem vhodného rozpouštědla (nejlépe odplyněného).

Vhodné je rozpouštědlem s obdobnou eluční silou jako má MF (je třeba se vyhnout pufrům, které by mohly zakrystalovat) nebo s vyšší eluční silou – 100% organického rozpouštědla - methanol, 2-propanol, acetonitril.



vnější oplach jehly v mycí stanici

Dávkovače vzorků – proplachování, chlazení



Nesprávné proplachování může způsobit přenos vzorku mezi analýzami (“carryover”).

Chlazení vzorků: vyšší stabilita vzorků, nižší odpar těkavých rozpouštědel.

Pozor na precipitaci při nižších teplotách !



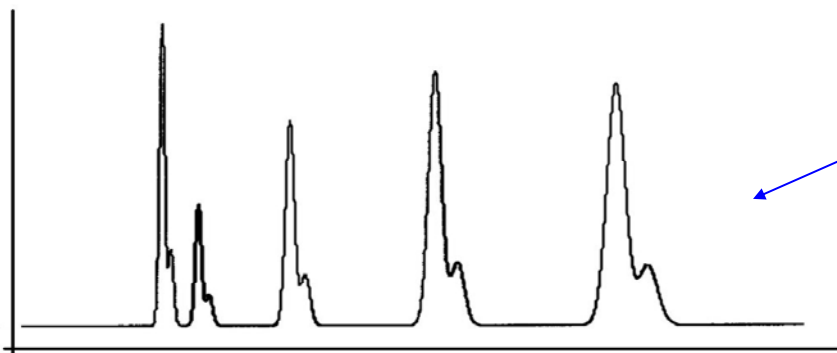
Tlak v HPLC systému

Jednotlivé části HPLC systému mají předepsaný maximální tlak, průtok mobilní fáze je nutné volit tak, aby nebyl překročen a nedošlo tak k jejich poškození.

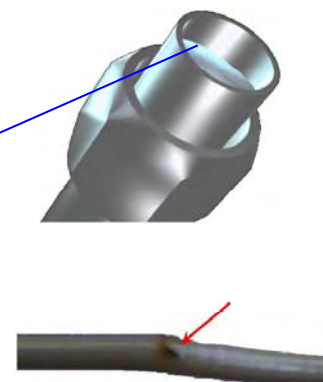
Klasická HPLC: tlakový limit přístroje ~400 bar, kolony ~200 bar

UHPLC: tlakový limit přístroje ~1000 bar, kolony ~600 bar

Ochrana před vysokým tlakem – nastavení limitu, po jehož překročení se čerpadlo zastaví.



Poškození kolony vysokým tlakem – vznik mrtvého objemu v koloně se projeví zdeformovanými nebo zdvojenými píky

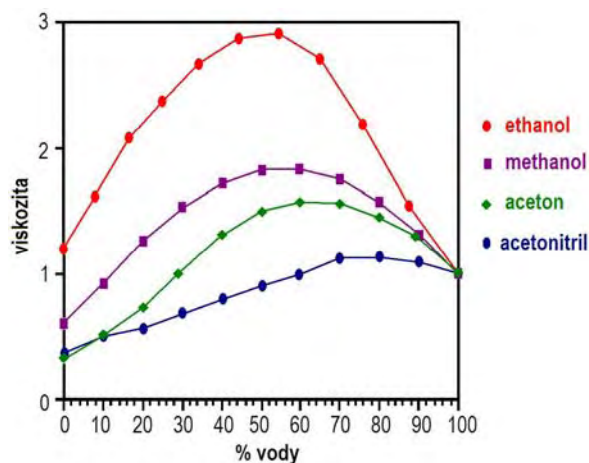


Poškození PEEKové trubice vysokým tlakem v místě ohybu.

Tlak v HPLC systému

Tlak je dán viskozitou a průtokem mobilní fáze, velikostí částic náplně kolony a tlakovými restrikcemi v systému (kapiláry, spojovací prvky, nečistoty na filtrech apod.)

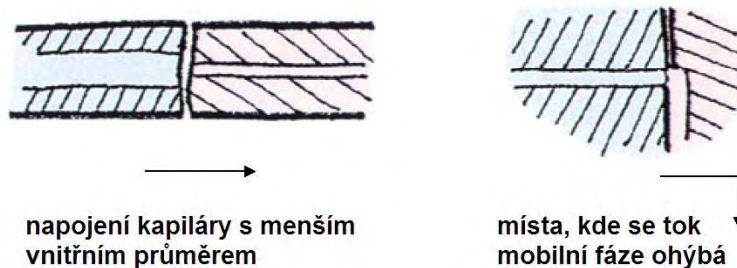
Rozpouštědlo	Viskozita (cP)
Hexan	0.29
Acetone	0.32
Acetonitril	0.34
Heptan	0.40
Dichlormethan	0.41
Ethylacetát	0.45
Tetrahydrofuran	0.46
Isooktan	0.47
Methanol	0.54
Toluen	0.55
Chloroform	0.57
m-Xylen	0.62
Dimethylformamid	0.80
Tetrachlormethan	0.90
Cyklohexan	0.90
Voda	1.00
Ethanol	1.08
2-Propanol	1.90
Dimethylsulfoxid	2.00



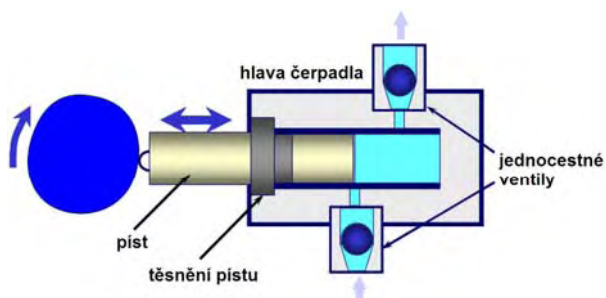
Viskozita směsí rozpouštědel s vodou je většinou vyšší než by odpovídalo průměru ! Pozor na změny tlaku při gradientové eluci.

Tlak v HPLC systému

Tlak zvyšují pevné nečistoty v kapilárách, spojkách, na koloně, předkoloně a v dalších částech systému.



Fluktuace tlaku jsou většinou spojeny s problémy čerpadla.



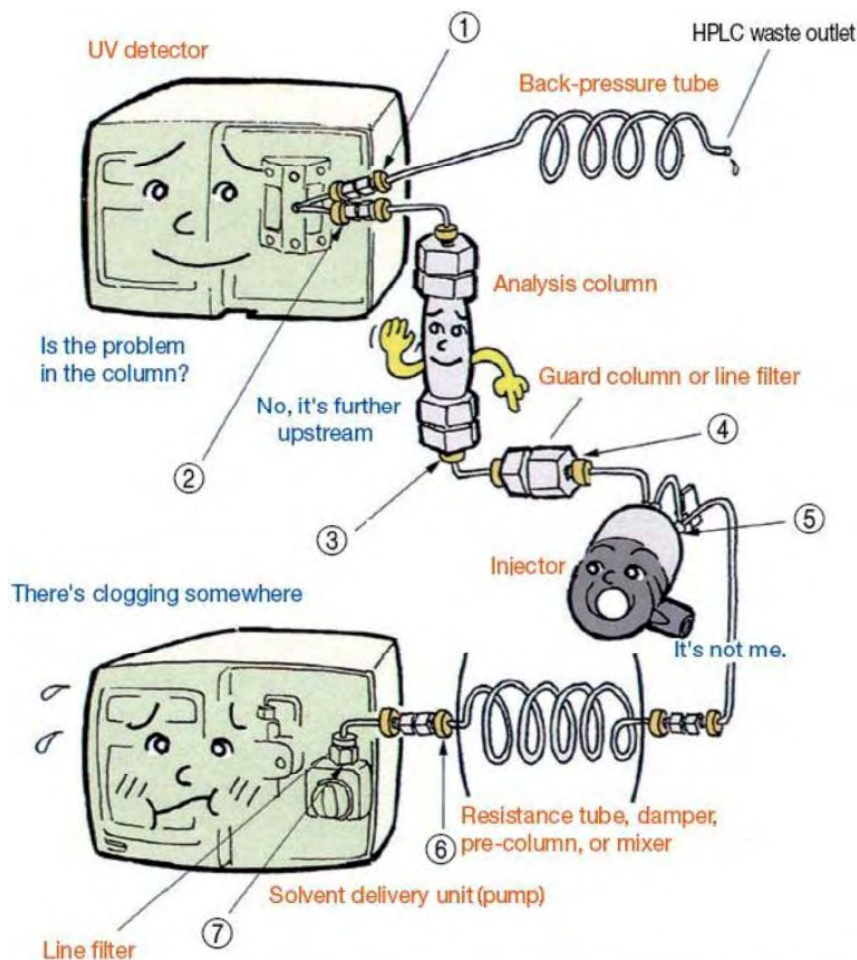
Příčinou může být:

- vzduch v čerpadle (→propláchnout pumpu při vysokém průtoku)
- zakrystalovaný pufr (→ propláchnout vodou, sonikace a vyčištění jednocestných ventilů)

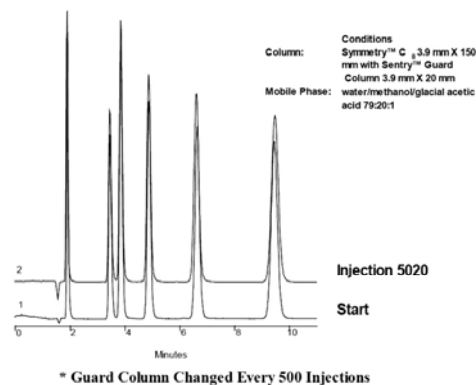
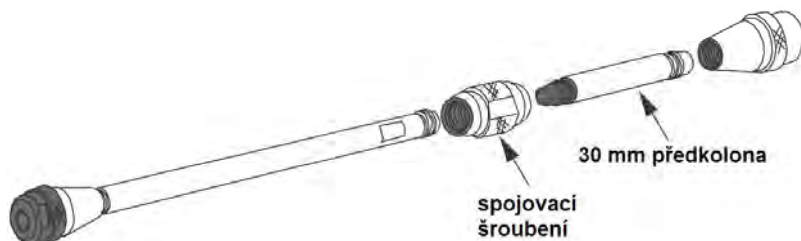
Tlak v HPLC systému

Hledání problematického místa, kde dochází ke zvyšování tlaku – od konce HPLC systému (postupně rozpojujeme systém a sledujeme tlak):

1. odpadní kapilára z detektoru, regulátor zpětného tlaku
2. cela detektoru
3. kolona
4. předkolona
5. dávkovač
6. čerpadlo



Kolona – použití předkolony



Předkolona velmi významně prodlužuje životnost kolony

směs standardů: bez předkolony 1500-2000 analýz, s předkolonou až 10 000

vzorky plazmy, mléka apod s minimální úpravou: bez předkolony nelze

Ekonomická rozvaha: pokud předkolona vydrží >100 analýz, tak není nutná další úprava vzorků

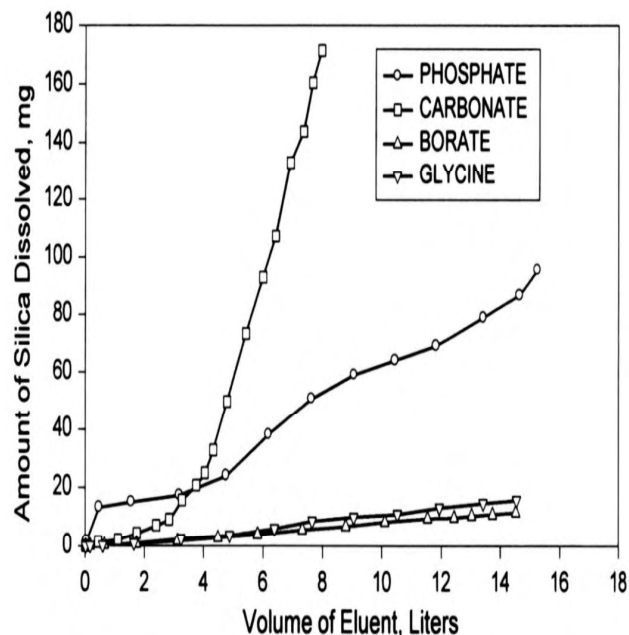
Materiál náplně předkolony musí být zcela identický s náplní kolony (i různé C₁₈ mohou vést ke zhoršení separace).

Kolona – kompatibilní rozpouštědla

Silkageové kolony: vazby Si-O-Si hydrolyzují při vyšších teplotách, vysokých koncentracích pufrů, $\text{pH} < 2$ a ve fázích s vysokým obsahem vody. Vznikají volné silanoly Si-OH, které způsobují chvostování píků.

Při vyšším pH ($\text{pH} > 8$) se silikagel rozpouští. Lepší stability se dosahuje u "endcapovaných" kolon.

Polymerní kolony: pH stabilita 2-1, v některých rozpouštědlech (THF, chloroform) mohou bobtnat, čímž se zvyšuje se tlak.



Dbát doporučení výrobce !

Rozpustnost silikagelu – Zorbax C18, methanol/0.1M pufr pH 10

Kolona – instalace, regenerace, skladování

Instalace kolony

Nová kolona se před měřením propláchne mobilní fází v objemu odpovídající cca 10x objemu kolony

(kolony 4.6x150mm = 25mL)

Stabilizace kolony je u RP rychlá, u NP kolon (silikagel, alumina) může trvat až několik dní při 1.0 ml/min.

Postup regenerace reverzních fází

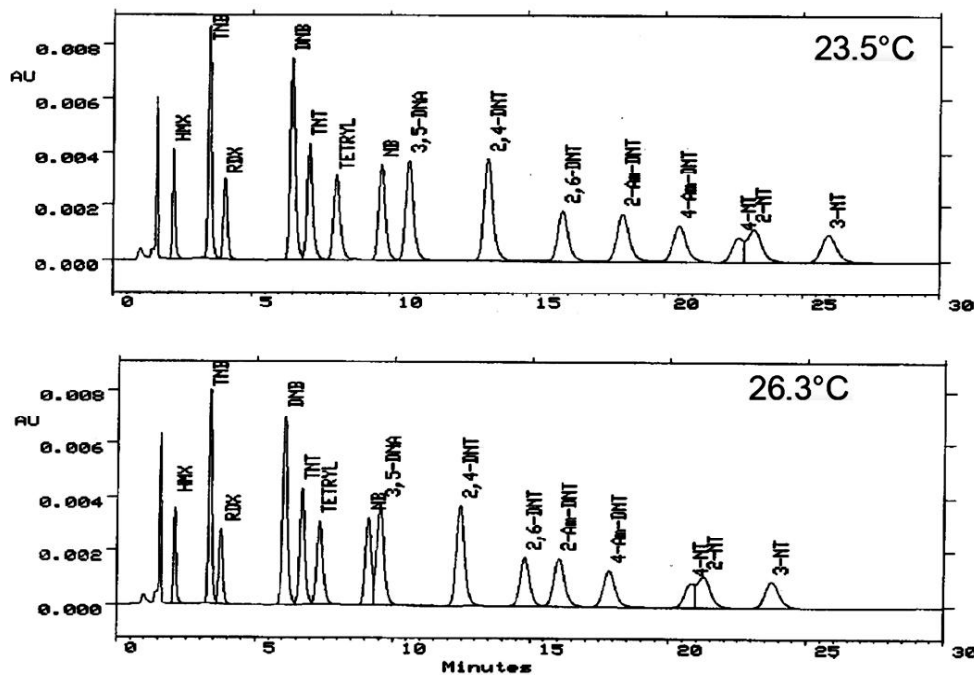
1. Wash with unbuffered mobile phase
2. Wash with 100% water
3. Wash with methanol (or ACN)
4. Wash with THF or IPA
5. Wash with methylene chloride
6. Wash with N-Heptane
7. Wash with methylene chloride
8. Wash with methanol (or ACN)
9. Wash with water
10. Return to solvent

Skladování kolon

Kolony na bázi silikagelu se skladují v aprotických rozpouštědlech, pro RP by neměl obsah vody přesáhnout 50%. Vhodným rozpouštědlem je acetonitril. Pozor na precipitaci zbytku pufrů v koloně při proplachování čistým acetonitrilem!

Kolona se musí skladovat uzavřená těsníci šrouby!

Kolonový termostat – vliv teploty na separaci

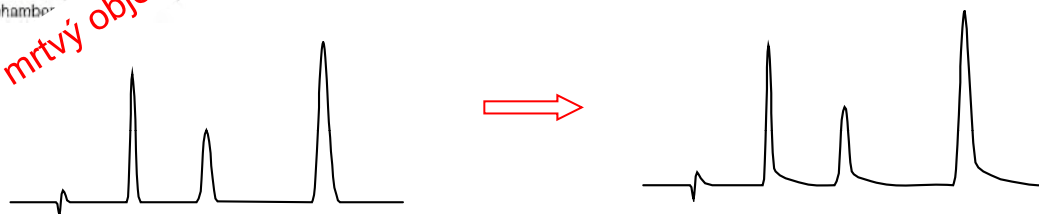
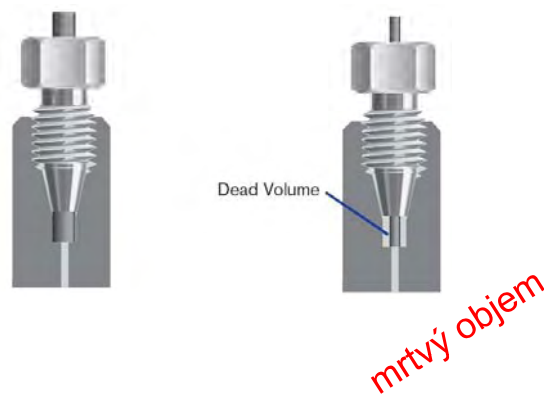
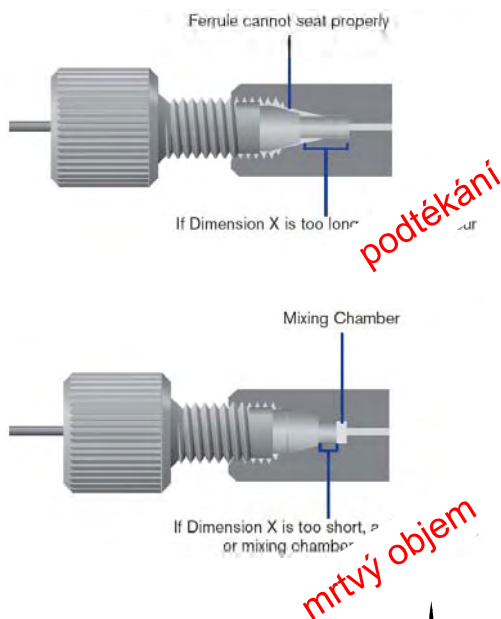


Teplota ovlivňuje retenci analytů na koloně. Stabilita teploty je důležitá pro reprodukovatelnost retenčních časů.

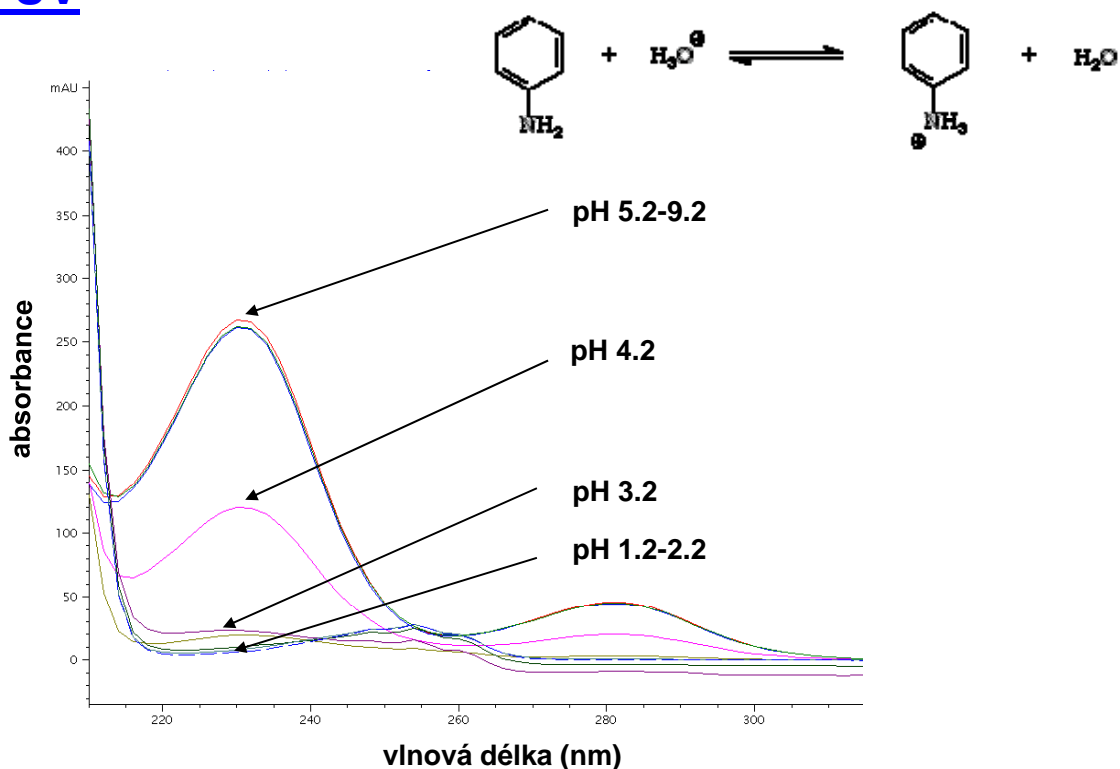
Minimalizace mrtvých objemů

Použití šroubu s pevně "zakouslou" ferulí.

Použití standardního šroubení pro kapiláry menších průměrů

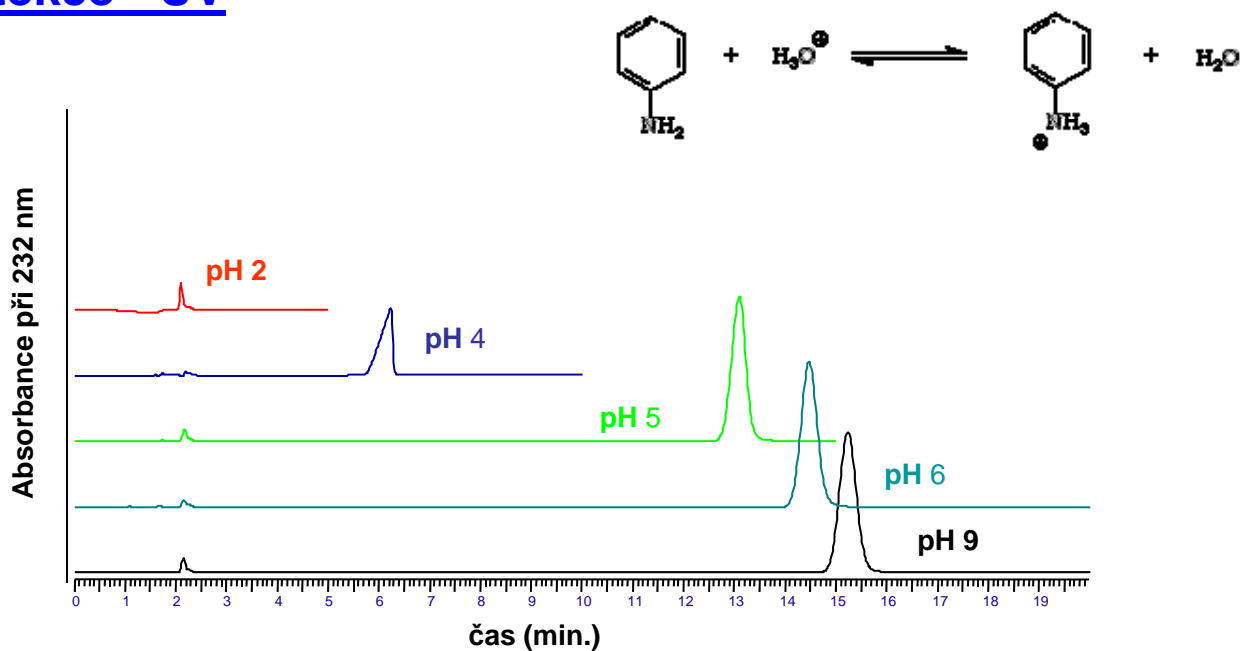


Detekce - UV



pH mobilní fáze má vliv na UV spektra ionizovatelných analytů. U anilinu klesá odezva při 232 nm s klesající hodnotou pH (anilín je více protonizován).

Detekce - UV



kolona: Luna C18(2), mobilní fáze: 15 mM K₂HPO₄ ve vodě/acetonnitril 90/10

Nejvyšší odezva (a retence) je v mobilních fázích, kde anilín není protonizovaný.

Detekce - MS

Kompatibilita mobilních fází s iontovým zdrojem MS detektoru

Reverzní chromatografie: vodně-organické nebo organické mobilní fáze, nízké koncentrace těkavých pufrů, pH většinou 2-8.

Velmi dobrá kompatibilita s většinou iontových zdrojů.

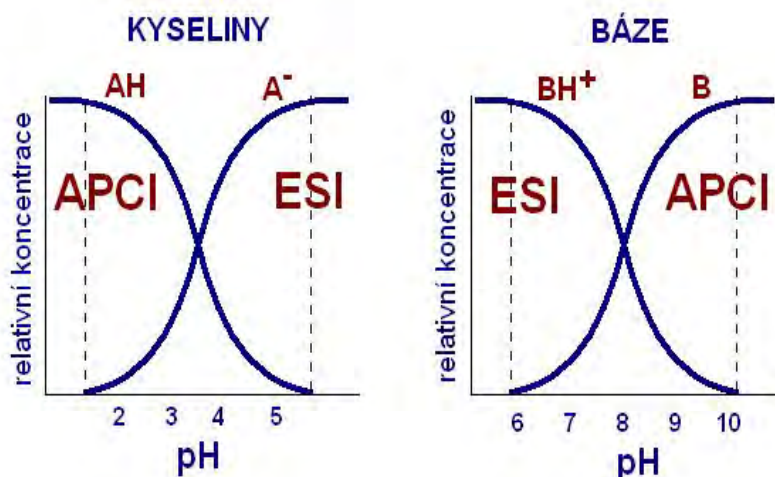
Normální chromatografie: organické mobilní fáze bez pufrů a úpravy pH.

Většinou dobrá kompatibilita s APCI a APPI.

Iontově párová chromatografie: vodně-organické nebo organické mobilní fáze s přidavkem iontově-párového činidla.

Omezená kompatibilita s ESI, iontově-párové činidlo potlačuje signál (nejsou volné ionty).

Detekce - MS



Elektrosprej:

bazické látky - detekce pozitivně nabitých iontů (MF kyselá, pH aspoň 2 jednotky pod pK_a)

kyselé látky - detekce negativně nabitých iontů (MF bazická, pH aspoň 2 jednotky nad pK_a)

Účinnost ionizace je závislá na pH mobilní fáze. Pro techniky, které vyžadují jako první krok odpaření (APCI, APPI) je výhodnější, pokud je analyt neutrální (vyšší těkavost). Pro ESI je výhodnější, aby byla látka v roztoku ionizována (desorpce iontu).

Pokud se optimální pH pro separaci liší od optima pro detekci, je možná poklonová úprava pH.

Metoda pro testování stavu systému

Pravidelné testování

Jednoduchá metoda pro pravidelné testování stavu HPLC systému. Analýza definovaného vzorku za daných podmínek.

Sledujeme zejména:

šířky píků – počet teoretických pater

asymetrii píků

retenční časy

relativní retenci nebo rozlišení kritických párů analytů

velikost odezvy (výšky píků)

Pravidelné testování umožní odhalit problémy v HPLC systému, kolonu na konci životnosti, poruchu detektoru apod.

HPLC instrumenty – vybrané výrobky

Agilent



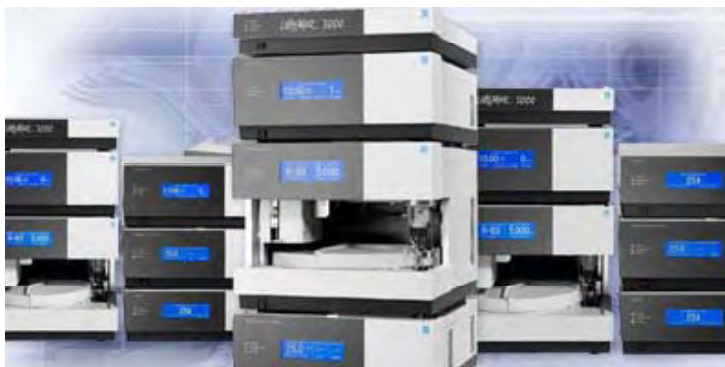
1120 Compact LC



1200 Series System

HPLC instrumenty – vybrané výrobky

Dionex



UltiMate® 3000 LCi Series

HPLC instrumenty – vybrané výrobky

Ecom



Izokratický analytický systém



Gradientní analytický systém

HPLC instrumenty – vybrané výrobky

Shimadzu



Prominence



Prominence UFLC

HPLC instrumenty – vybrané výrobky

Thermo



Surveyor Plus



Accela High Speed LC

HPLC instrumenty – vybrané výrobky

Waters



Alliance HPLC

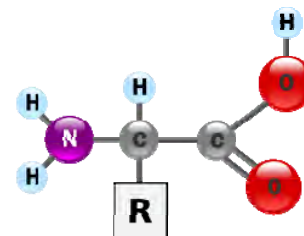


ACQUITY UPLC

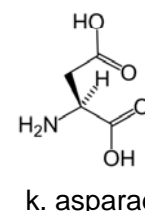
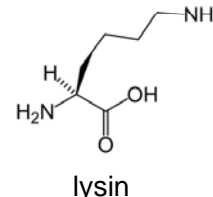
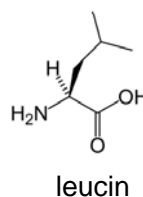
Analýza biomolekul a makromolekul

PEPTIDY

Základní stavební jednotkou **peptidů** jsou aminokyseliny (< 50), které lze rozdělit podle polaridy postranního řetězce R na polární (nenabitě, kyselě, bazické) a nepolární (hydrofobní).



Peptidy s bazickými a kyselými skupinami jsou charakterizovány izoelektrickým bodem, jejich celkový náboj závisí na pH roztoku (mobilní fáze).



Retenční chování je výrazně ovlivněno celkovou hydrofobicitou a počtem nabitých skupin. U "delších" peptidů (> cca 10 aminokyselin) hraje roli i sekundární struktura, případně tvorba disulfidových můstků.

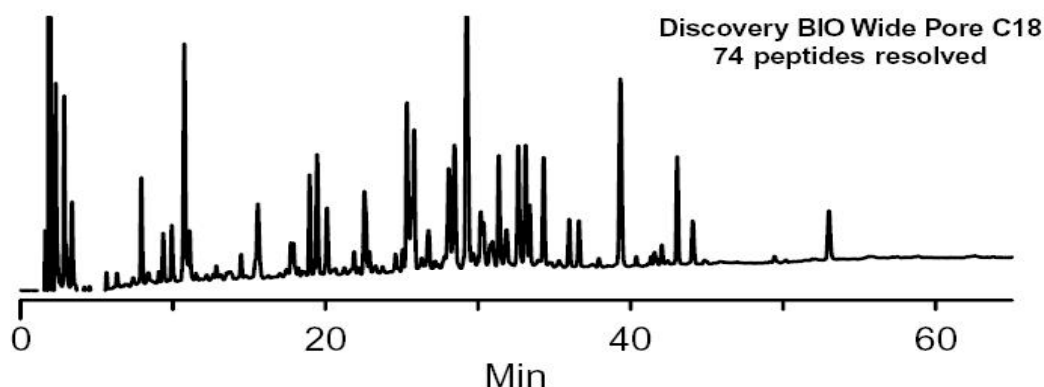
Separční systémy: reverzní chromatografie na C18 nebo C8 (separace dle hydrofobicity) a iontově-výměnná chromatografie (separace dle náboje).

Separace peptidů v RP systémech

Reverzní chromatografie je nejčastěji používaná kvůli možnostem měnit složení a pH mob. fáze v širokém rozmezí. Kolony C18 nebo C8 na silikagelovém nosiči, případně polymerní nebo monolitické fáze, pórovitost 50-300 Å, gradientové separace nejčastěji v systémech zředěná kyselina (octová, mravenčí, trifluoroctová)/acetonitril.

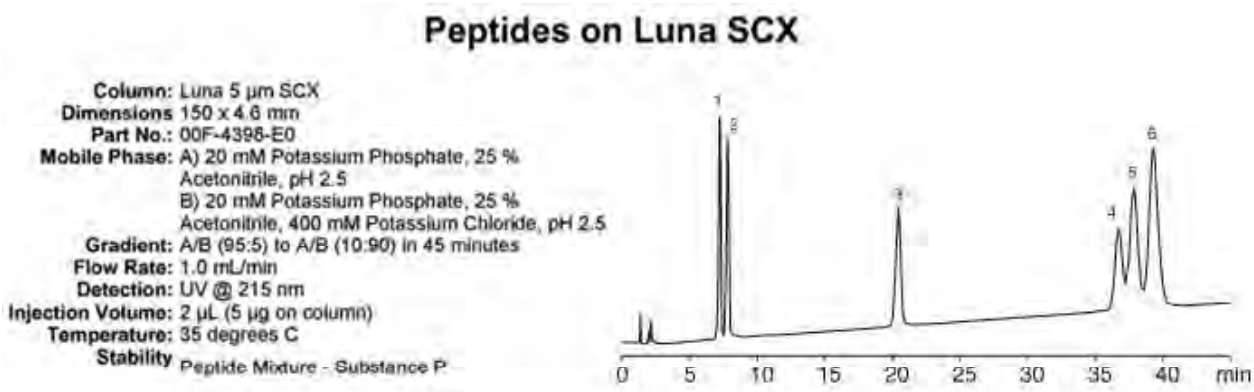
Tryptic Digest of Carboxymethylated Apohemoglobin on a Discovery Wide Pore C18

Column: Discovery BIO Wide Pore C18, 15cm x 4.6mm, 5µm
 Mobile Phase: (A) 95:5, (0.1% TFA in water):(0.1% TFA in CH₃CN);
 (B) 50:50, (0.1% TFA in water):(0.1% TFA in CH₃CN)
 Flow Rate: 1.0mL/min
 Temp.: 30°C
 Detection: 215nm
 Injection: 50µL carboxymethylated apohemoglobin tryptic digest in 50mM NH₄HCO₃
 Gradient: 0-100%B in 65 min



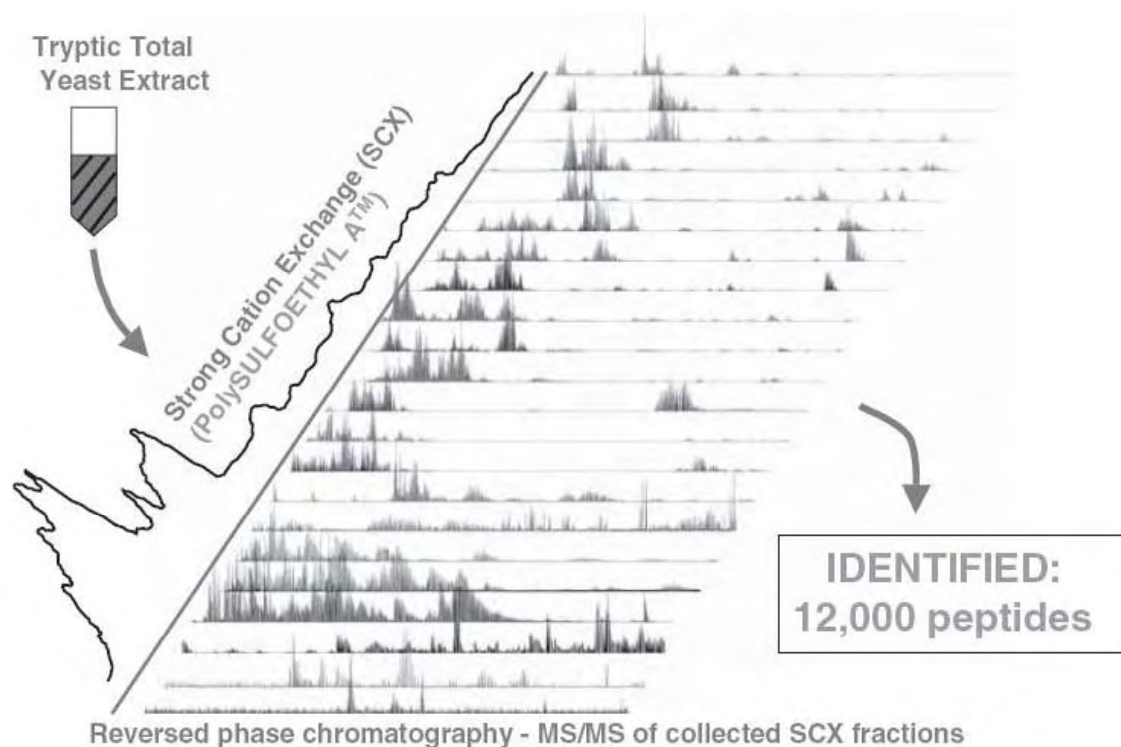
Separace peptidů v iontově-výměnných systémech

Iontově-výměnná chromatografie nejčastěji využívá silné katexy (sulfo skupina), které jsou negativně nabitě v neutrálním a kyselém prostředí. Při nízkém pH je karboxyl peptidů protonován a při separaci se tak projevují bazické funkční skupiny.



Separace peptidů v 2D (RPxIEC) systémech

Kombinace separačních mechanismů pro maximální dělení komplexních směsí peptidů. Hlavní využití v proteomice – MS detekce.

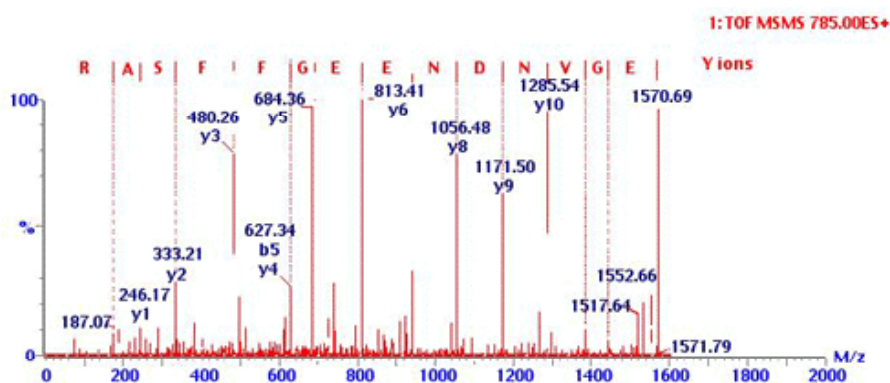


Detekce peptidů

Spektrofotometrická detekce v nízké UV oblasti 190-215 nm (absorbance amidové peptidické vazby)

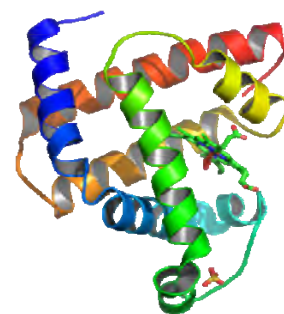
Hmotnostně-spektrometrická detekce elektropray nebo nanoelektropray

Citlivá detekce, určení molekulové hmotnosti peptidu, případně struktury z MS/MS dat.

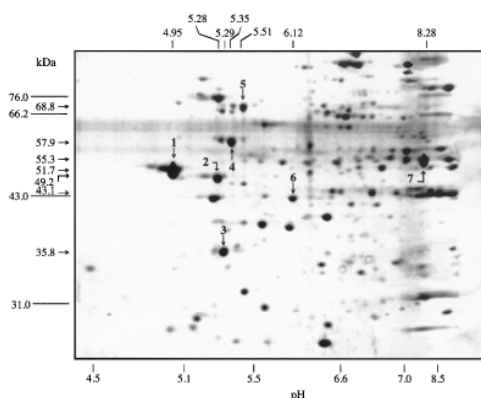


PROTEINY (BÍLKOVINY)

Proteiny jsou vysokomolekulární biomolekuly složené z aminokyselin (>> 50), které mohou být posttranslačně modifikovány. Proteiny v nativním stavu mají charakteristickou 3D strukturu, působením kyselin, bází, solí, org. rozpouštědel apod. denaturují (srážení, ztráta rozpustnosti).



Proteiny lze separovat na základě celkové hydrofobicity, velikosti molekul a počtu nabitých skupin. Nejčastěji využívanými separačními systémy jsou: reverzní chromatografie, vylučovací (size-exclusion, gelová) chromatografie a iontově výměnná chromatografie.



Separace komplexních proteinových směsí: klasickou metodu (*dvourozměrnou gelovou elektroforézu (2D-PAGE)*) lze nahradit 2D HPLC separací – kombinace SEC-RPHPLC, IEC-RPHPLC, příp. IEF (izoelektrická fokusace)-RPHPLC

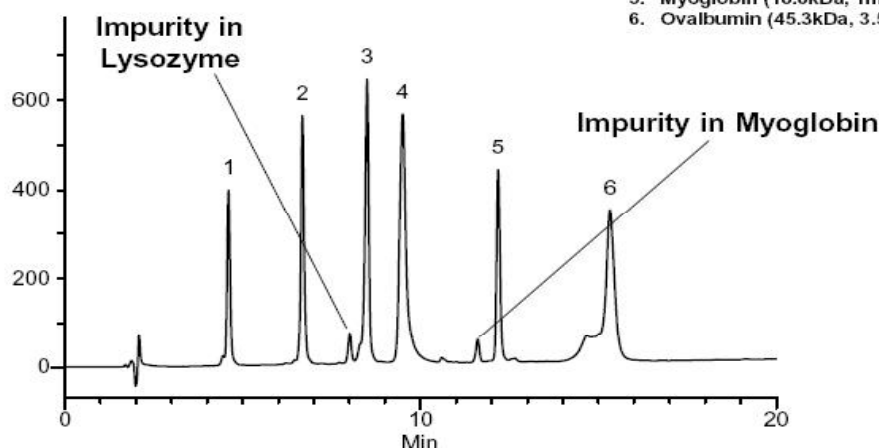
Separace proteinů v RP systémech

Reverzní chromatografie: Kolony C4 – C18 na silikagelovém nosiči, případně polymerní nebo monolitické fáze, široké póry 300 Å, gradientové separace nejčastěji v systémech zředěná kyselina (octová, mravenčí, trifluoroctová)/acetonitril.

Separation of Proteins on Discovery BIO Wide Pore C5

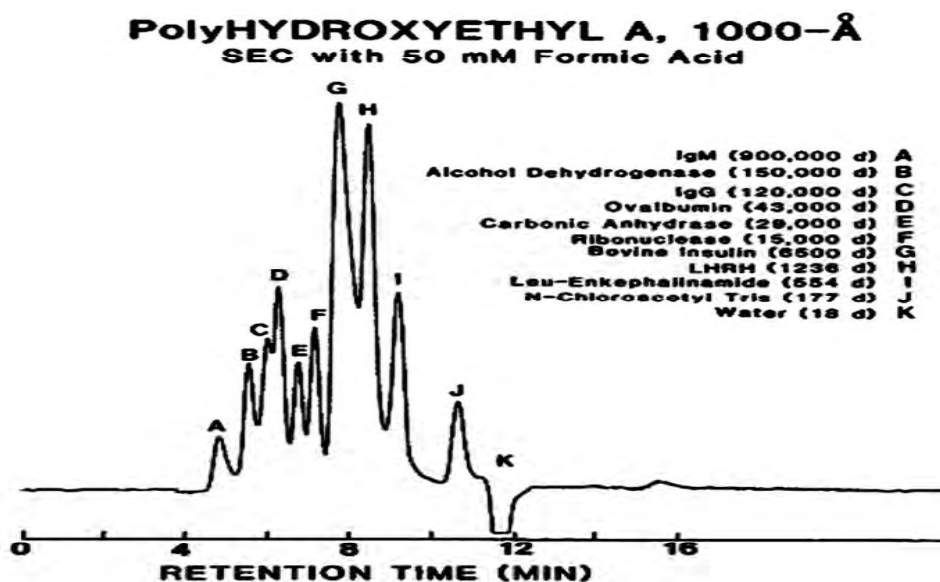
Column: Discovery BIO Wide Pore C5, 15cm x 4.6mm, 5 μ m
 Mobile Phase: (A) 75:25, (0.1% TFA in water):(0.1% TFA in CH₃CN);
 (B) 25:75, (0.1% TFA in water):(0.1% TFA in CH₃CN)
 Flow Rate: 1.0mL/min
 Temp.: ambient
 Detection: 220nm
 Injection: 12 μ L in 0.1%TFA
 Gradient: 0-100%B in 25 min

1. RNase (13.7kDa, 1mg/mL)
2. Cytochrome c (12.4kDa, 1mg/mL)
3. Lysozyme (14.3kDa, 1mg/mL)
4. BSA (67.0kDa, 2.5mg/mL)
5. Myoglobin (18.8kDa, 1mg/mL)
6. Ovalbumin (45.3kDa, 3.5mg/mL)

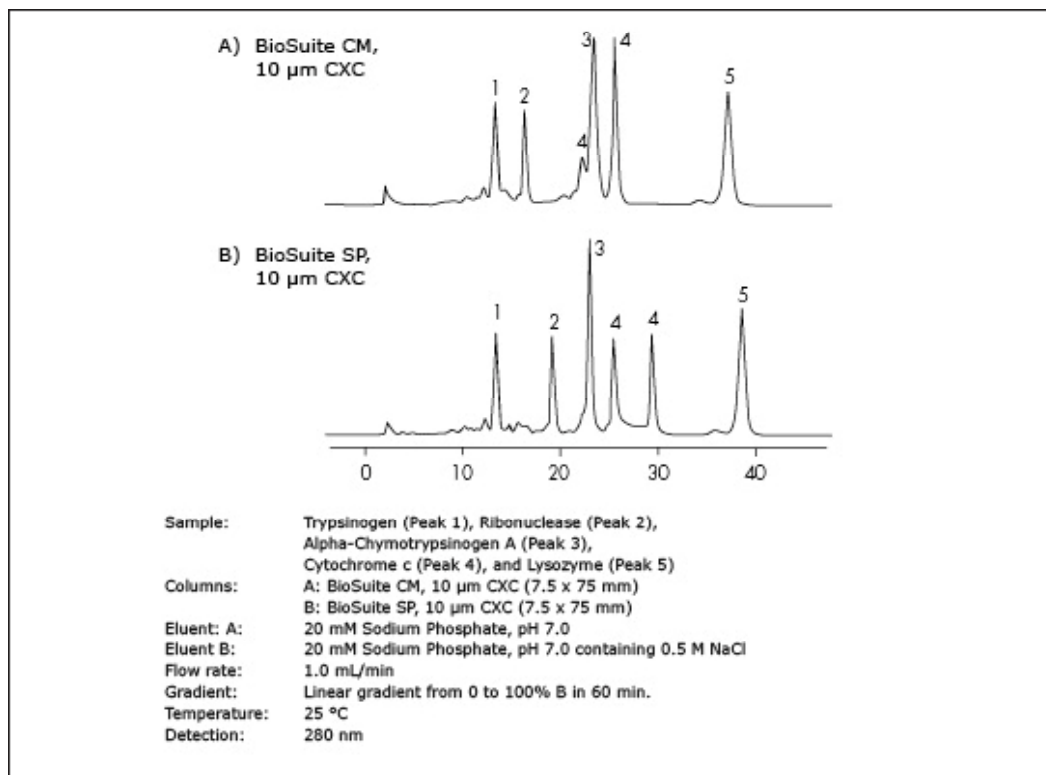


Separace proteinů v SEC systémech

Gelová chromatografie: gely různých pórovitostí (200-1000 Å) na silikagelovém nosiči, případně polymerní fáze, separace nejčastěji v roztocích pufrů. Adsorpce analytu na stacionární fázi a denaturace proteinů je minimalizována.



Separace proteinů v iontově-výměnných systémech

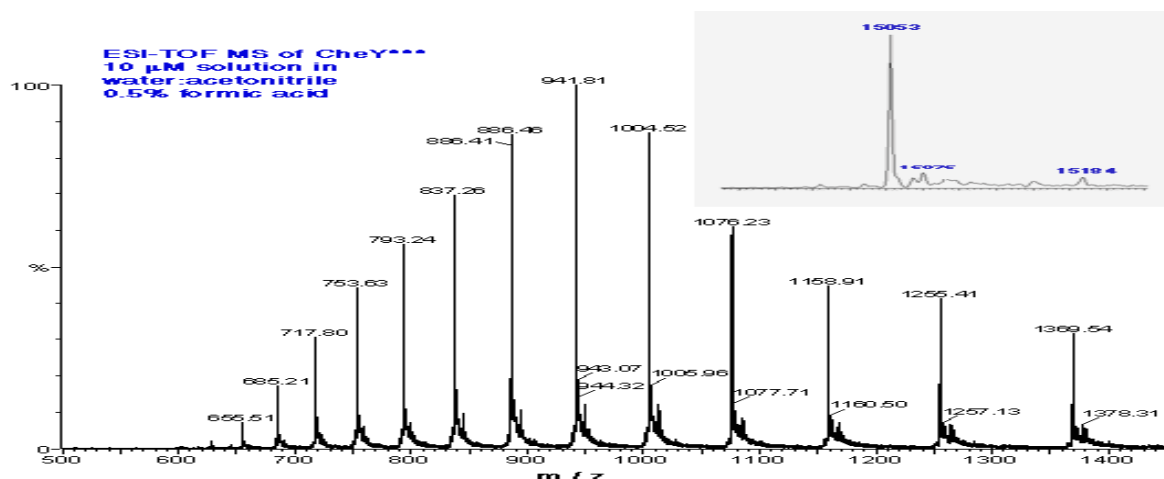


Detekce proteinů

Spektrofotometrická detekce v UV oblasti 190-215 nm (absorbance amidové peptidické vazby) nebo při 280 nm (absorbance aromaticity tyrosinu a tryptofanu).

Hmotnostně-spektrometrická detekce elektropray nebo nanoelektropray

Citlivá detekce, určení molekulové hmotnosti proteinu z vícenásobně nabitých iontů (dekonvoluce).



OLIGONUKLEOTIDY

Oligonukleotidy jsou krátké oligomery nukleových kyselin. Mají charakter polyanionů (kvůli přítomnosti fosfátových skupin). Chromatografické chování je ovlivněno celkovou velikostí molekul a sekvencí nukleových kyselin.

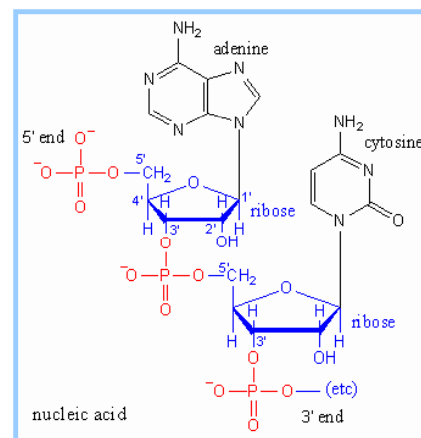


Možnosti separace oligonukleotidů:

Reverzní chromatografie – separace díky různým nukleobázím v řetězcích.

Iontově-výměnná chromatografie – separace na anexech díky záporně nabitým fosfátům.

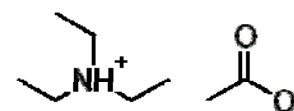
Gelová chromatografie - separace na základě různých velikostí molekul.



RP-HPLC (iontově-párová) oligonukleotidů

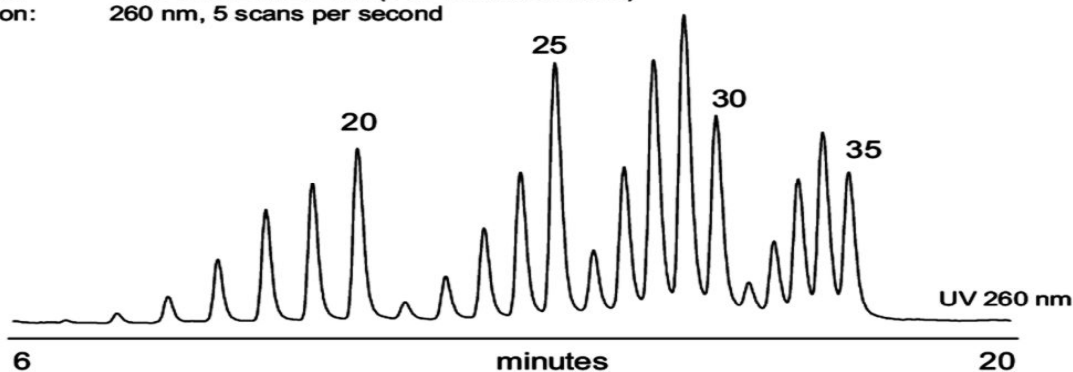
Pufr slouží jako iont-párové činidlo.

TEAA = triethylammonium acetate



Separation of detritylated oligodeoxythymidine ladders by ion-pair reversed-phase (IR-RP) chromatography

LC system: Waters Alliance® 2796 Bioseparations System with PDA
 Column: XBridge™ OST C18, 2.5 μm (2.1 x 50 mm)
 Mobile phase: A: 0.1 M TEAA
 B: Acetonitrile/0.1M TEAA, 20/80 w/w
 Flow rate: 0.2 mL/min
 Column temp.: 60 °C
 Gradient: 40 to 55% B in 20 min (8 to 11% acetonitrile)
 Detection: 260 nm, 5 scans per second



SACHARIDY



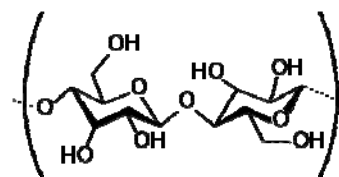
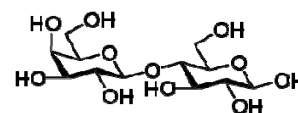
Sacharidy jsou aldehydy nebo ketony (příp. hemiacetaly nebo hemiketaly) s množstvím hydroxyskupin. Existují jako nízkomolekulární látky (mono-, disacharidy) až polymery (polysacharidy)

Možnosti separace mono, di- a oligosacharidů:

Normální chromatografie na amino fázích (HILIC)
- separace dle polariry sacharidu

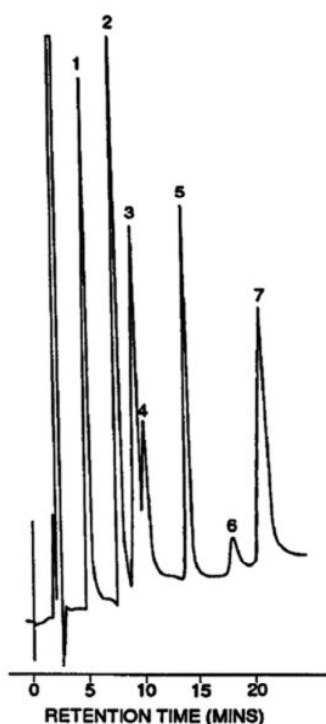
Chromatografie na iontově vylučovacích kolonách
- kombinace separačních mechanismů

Gelová chromatografie - separace na základě různých velikostí molekul.



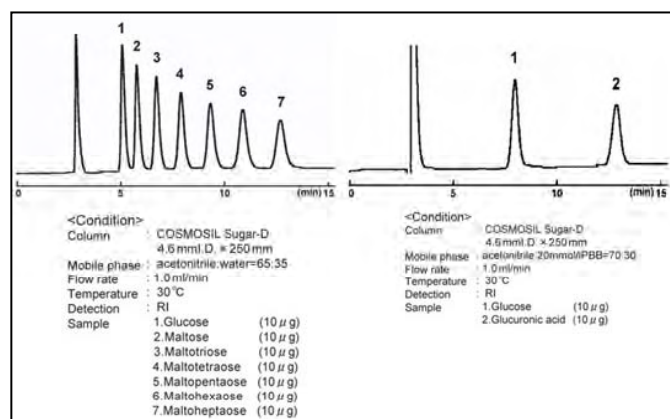
Separace mono, disacharidů na amino fázi

Kolony s chemicky vázanými aminoskupinami, mobilní fáze acetonitril/voda.



Column: Spherisorb S5 Amino 20cm x 4.6mm,
Catalogue Number: 831114
Flow: 0.95ml/min
Detn: RI (x50)
Eluent: 80/20 (v/v) Acetonitrile/Water
Sample: Mixture of common sugars
Inj: 20µl

1. Rhamnose
2. Fructose
3. Glucose
4. Galactose
5. Sucrose
6. Maltose
7. Lactose



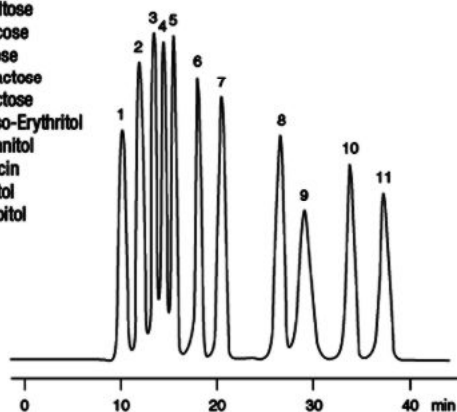
Separace sacharidů na iontově vylučovacích kolonách

Iontoměniče s navázanými ionty kovů: Ca, Ag, Pb apod. Mobilní fáze - voda

Saccharides

Column: Rezex RPM-Monosaccharide
 Dimensions: 300 x 7.8mm
 Order No: 00H-0135-K0
 Mobile Phase: Water
 Flow Rate: 0.6mL/min
 Detection: RI
 Temperature: 75°C

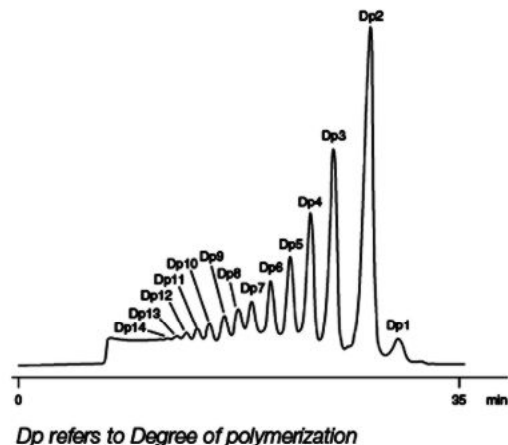
- Sample:
1. Stachyose
 2. Maltose
 3. Glucose
 4. Xylose
 5. Galactose
 6. Fructose
 7. Meso-Erythritol
 8. Mannitol
 9. Salicin
 10. Xylitol
 11. Sorbitol



Oligosaccharides

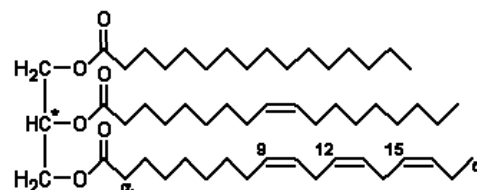
Column: Rezex RSO-Oligosaccharide
 Dimensions: 200 x 10mm
 Order No: 00P-0133-N0
 Mobile Phase: Water
 Flow Rate: 0.3mL/min
 Detection: RI
 Temperature: 75°C

Sample: Malto-Oligosaccharides as shown



LIPIDY

Lipidy – strukturně odlišné skupiny sloučenin odvozené od mastných kyselin. Jednoduché lipidy – mastné kyseliny, estery, acylglyceroly; složené lipidy – glykolipidy, fosfolipidy.

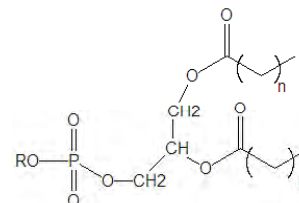
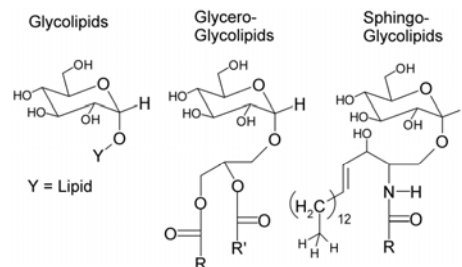


Možnosti separace lipidů:

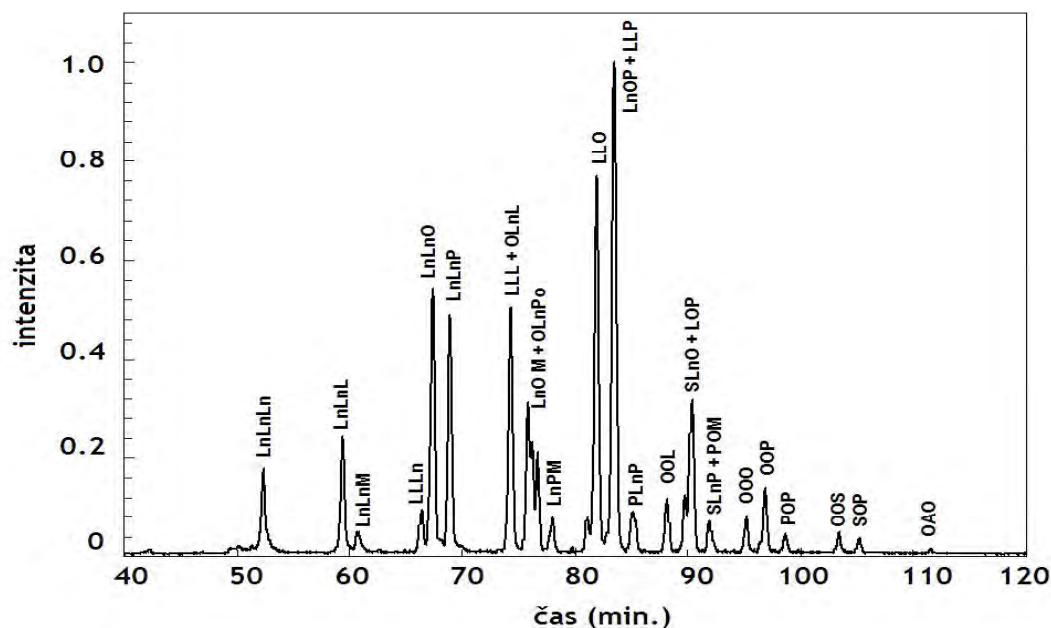
Normální chromatografie – separace jednotlivých skupin (tříd) lipidů podle polaritý funkčních skupin

Reverzní chromatografie – separace lipidů v rámci jedné třídy dle hydrofobicity (délky acylových zbytků)

Argentační chromatografie - separace podle počtu dvojných vazeb v molekule

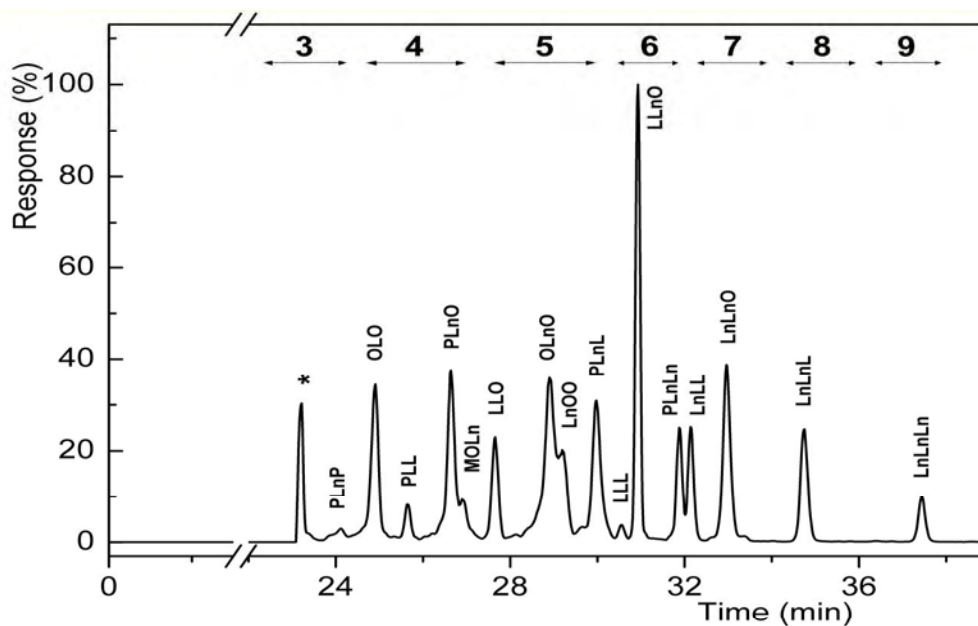


Separace triacylglycerolů v RP-HPLC



HPLC podmínky: kolony Nova-Pak C18 (300 x 3,9 a 150 x 3,9 mm, 4 μ m, Waters) zapojené do série. Mobilní fáze: acetonitril (A) a 2-propanol (B). Lineární gradient- 0 min - 100 % ACN, průtok 1 ml/min, 108 min - 70% IPA, průtok 1 ml/min, 122 min - 80 % IPA, průtok 0,7 ml/min, 128 min - 100 % ACN, průtok 0,7 ml/min, 130min - 100% ACN, průtok 1 ml/min. Pokolonový přídatek 100 mM octanu amonného v 2-propanol-vodě (1:1, v/v). APCI MS detekce full scan m/z 150-1200, 400°C.

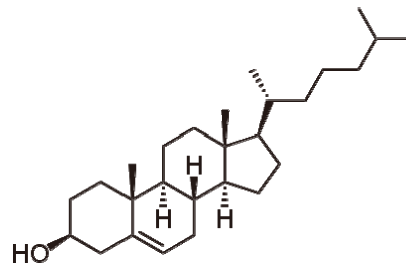
Argentační chromatografie triacylglycerolů



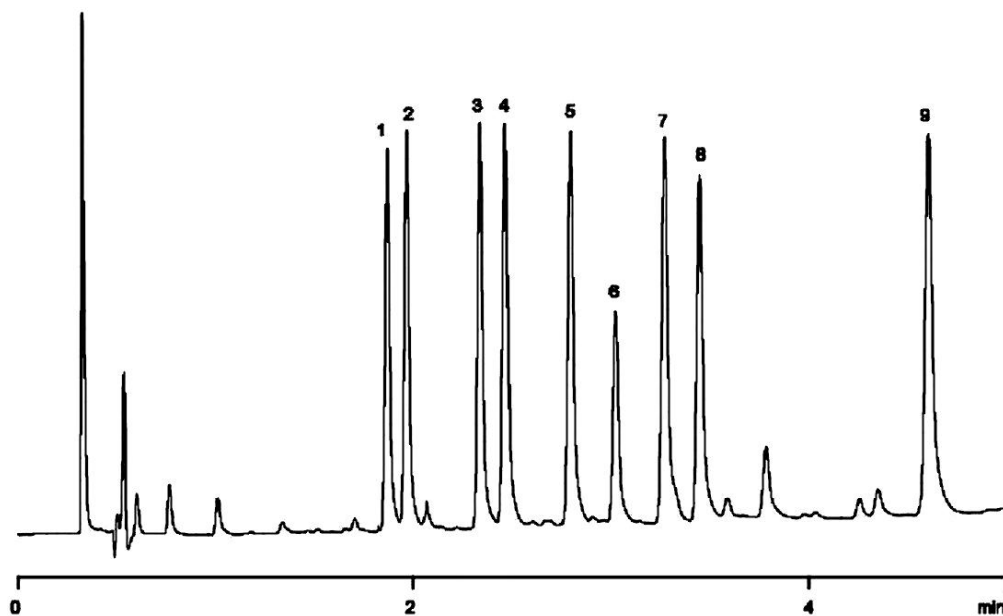
HPLC podmínky: kolona Valco ChromSpher 5 Lipids (250x4.6 mm, 5 mm) fáze: hexan (A), hexan/2-propanol/acetonitril 30:9:1, v/v/v (B) . Gradientový program: 100 % A 10 min, lineárně do 18 % B ve 32 min, do 35 % ve 37 min a do 100 % of B ve 40 min. Isokraticky 100 % of B do 41 min. Průtok 1ml/min. Pokolonový přídatek 100 mM octanu amonného v 2-propanol-vodě (9:1, v/v). APCI MS detekce full scan m/z 150-1200, 400°C.

STEROIDNÍ SLOUČENINY

Steroidy – terpenoidní lipidy, derivátyderiváty cyklopentan-perhydrofenanthrenu. Vznikají oxidací terpenů. Z hlediska chemie jde o alkoholy, alkaloidy, hormony, vitaminy, kyseliny.



Separace steroidů: Reverzní chromatografie – na C8-C18, ACN/voda, MeOH/voda



ANALYTES:

- 1 Prednisolone
- 2 Cortisone
- 3 Betamethasone
- 4 Corticosterone
- 5 11-Hydroxyprogesterone
- 6 Estradiol
- 7 11-Ketoprogesterone
- 8 Estrone
- 9 Progesterone

Steroids on Onyx C18

Column:	Onyx Monolithic C18												
Dimensions:	100 x 4.6 mm ID												
Order No:	CH0-7643												
Elution Type:	Gradient												
Eluent A:	Water												
Eluent B:	Acetonitrile												
Gradient Profile:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Step No.</th> <th>Time (min)</th> <th>Pct A</th> <th>Pct B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>7</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> </tbody> </table>	Step No.	Time (min)	Pct A	Pct B	1	0	80	20	2	7	10	90
Step No.	Time (min)	Pct A	Pct B										
1	0	80	20										
2	7	10	90										
Flow Rate:	3 mL/min												
Col. Temp.:	ambient												
Detection:	UV-Vis Abs. - Variable Wave. @ 220 nm (ambient)												

KAROTENOIDY

Karotenoidy – přírodní organické pigmenty (tetraterpenoidy), které se vyskytují v rostlinách jako fotosyntetická barviva. Mají výrazné antioxidační účinky.

Separace karotenoidů:

Reverzní chromatografie – separace dle hydrofobicity

kolony C8-C30, ACN/voda, MeOH/voda

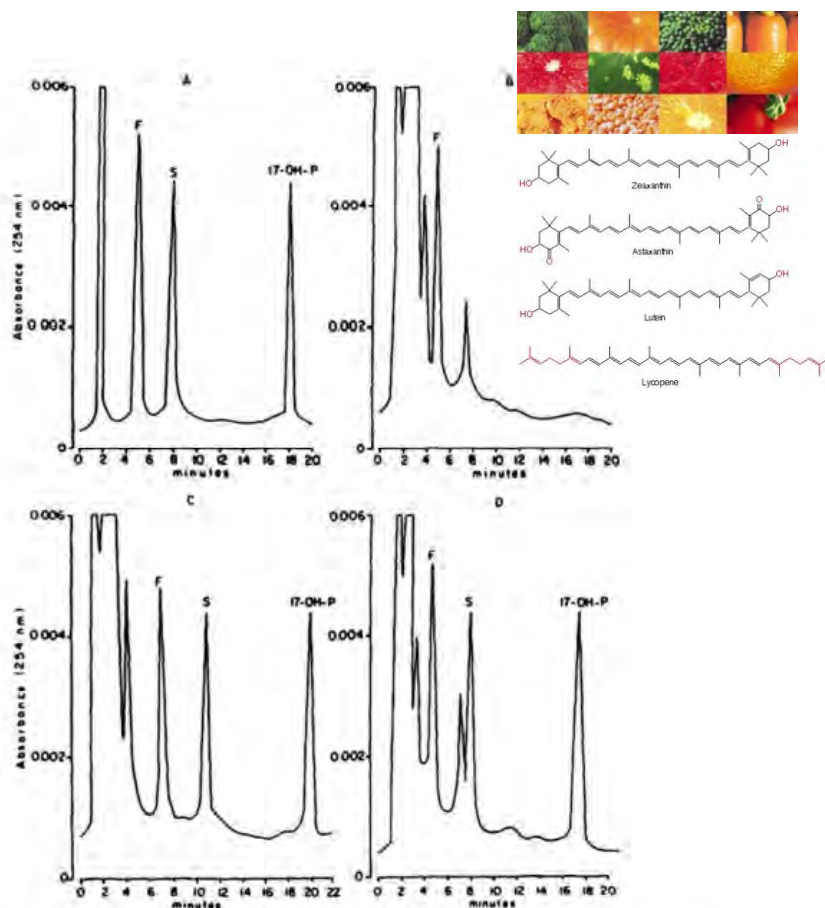
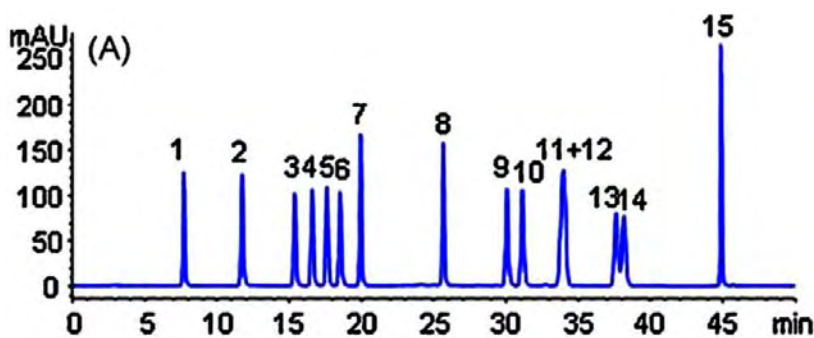
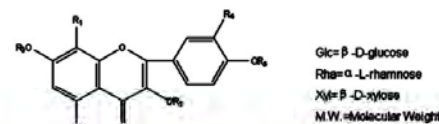
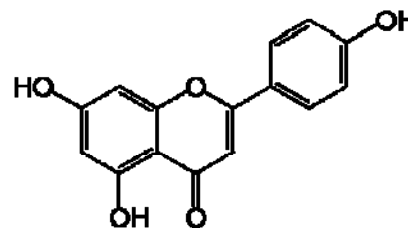


Fig. 4. Characteristic HPLC elution profiles. (A) A mixture of cortisol (F), 11-deoxycortisol (S), and 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) utilizing acetonitrile-water (43:57, v/v) as mobile phase. (B) A serum extract obtained from a normal subject (acetonitrile-water). (C) The same serum extract with the addition of 40 ng of 11-deoxycortisol and 17-hydroxyprogesterone eluted with methanol-water (60:40, v/v) or (D) acetonitrile-water. C_{18} - μ Bondapak column was used for determination. (From Ref. [8] with permission.)

FENOLICKÉ LÁTKY a POLYFENOLICKÉ LÁTKY

Flavonoidy – rostlinné fenoly odvozeny od flavanu. Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo ethoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace. Flavonoidy mají antioxidační vlastnosti.

Separace flavonoidů: Reverzní chromatografie, kolony C8-C18, ACN/voda, MeOH/voda



Kolona: Zorbax SB-C18 column (250mm×4.6mm I.D., 5 μm) Mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B). Gradient: 0–15 min, 22–28% B; 15–20 min, 28–35% B; 20–40 min, 35–39% B; 40–50 min, 39–100% B; Průtok 1 ml/min. UV detekce 270 nm.

Compounds	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	M.W.
hexandride E (1)	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-glc	-glc	-H	-H	678
kesmpferol-3-O-rhamnoside (2)	-H	-rha	-H	-H	-H	432
hexandride F (3)	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha(3-1)glc	-glc	-H	-CH ₃	838
epimedín A (4)	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha(2-1)glc	-glc	-H	-CH ₃	838
epimedín B (5)	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha(2-1)xyl	-glc	-H	-CH ₃	808
epimedín C (6)	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha(2-1)rha	-glc	-H	-CH ₃	822
icariín (7)	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha	-glc	-H	-CH ₃	676
epimedoside C (8)	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha	-glc	-H	-H	510
baohuoside II (9)	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha	-H	-H	-H	500
caohuoside C (10)	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha	-H	-OH	-CH ₃	530
baohuoside VII (11)	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha(4-1)glc	-H	-H	-CH ₃	676
sagittoside A (12)	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha(2-1)glc	-H	-H	-CH ₃	676
sagittoside B (13)	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha(2-1)xyl	-H	-H	-CH ₃	646
2'-O-rhamnosyl icarísid II (14)	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha(2-1)rha	-H	-H	-CH ₃	660
baohuoside I (15)	-CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	-rha	-H	-H	-CH ₃	514

Fig. 1. Chemical structures of 15 investigated compounds.

SYNTETICKÉ POLYMERY

Možnosti separace synt. polymerů:

Reverzní chromatografie – separace dle hydrofobicity

Vylučovací chromatografie - separace na základě různých velikostí molekul.

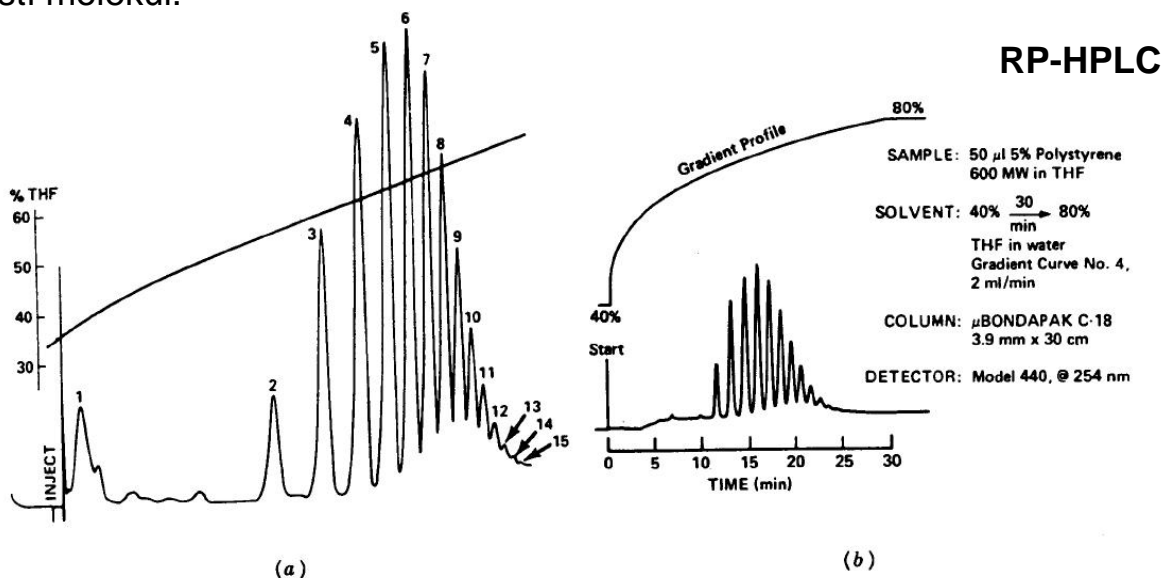
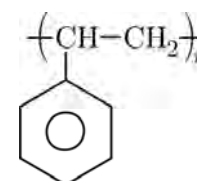


FIGURE 8.11 Separation of the oligomers of low-molecular-weight polystyrene by gradient elution. Conditions as shown in figure. (a) Linear gradient; (b) convex gradient. (Figure reprinted by permission of Waters Associates.)

SYNTETICKÉ POLYMERY

SEC-LC

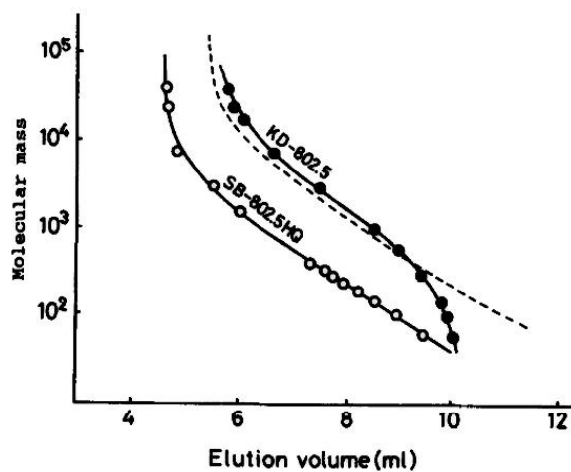
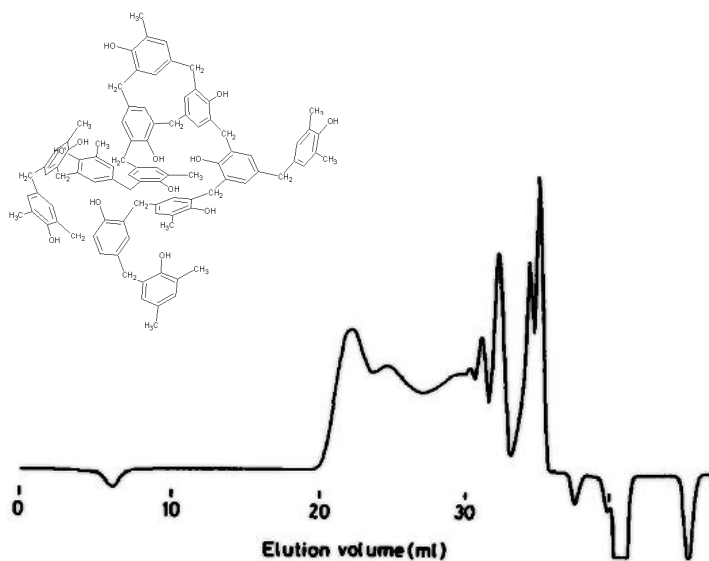


Fig. 4. Chromatogram of PF resols separated on KD-802.5 + KD-804. Eluent, DMF + 5 mM LiBr; flow-rate, 0.5 ml/min; column temperature, 40°C; RI detector; sample concentration, 0.5%; injection volume, 100 μ l.

Na základě kalibrace lze z elučních objemů v SEC určit molární hmotnost polymerů.