

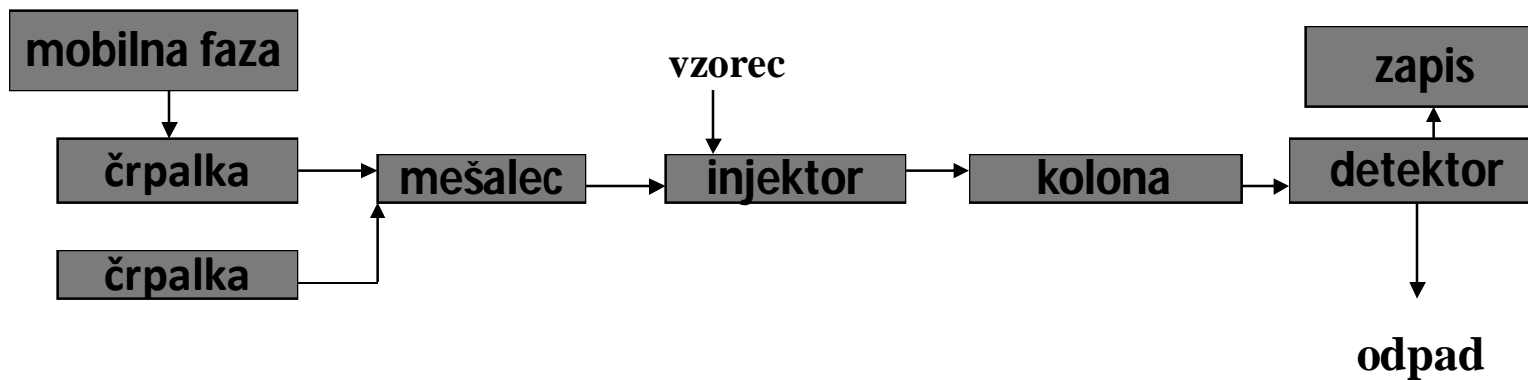
Tekočinska kromatografija

LC – Liquid Chromatography

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

UHPLC – Ultra High Performance Liquid Chromatography

HPLC



I zokratska – kdaj?

Gradientna analiza- pomen izbire topil

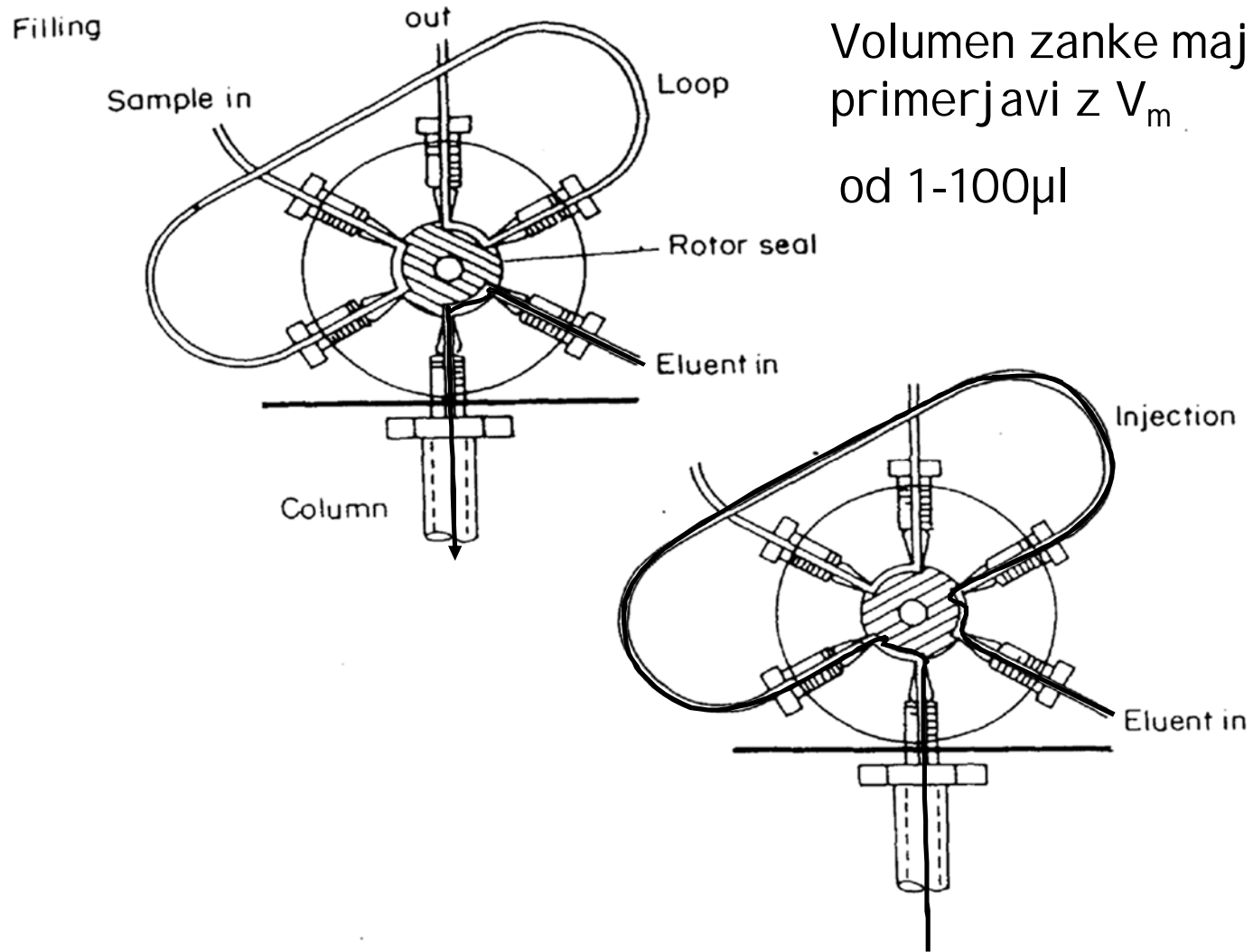
Črpalke kontinuirne batne črpalke s kombinacijo ventilov

diskontinuirne batne za majhne pretoke

mešanje topil pri nizkem/visokem pritisku

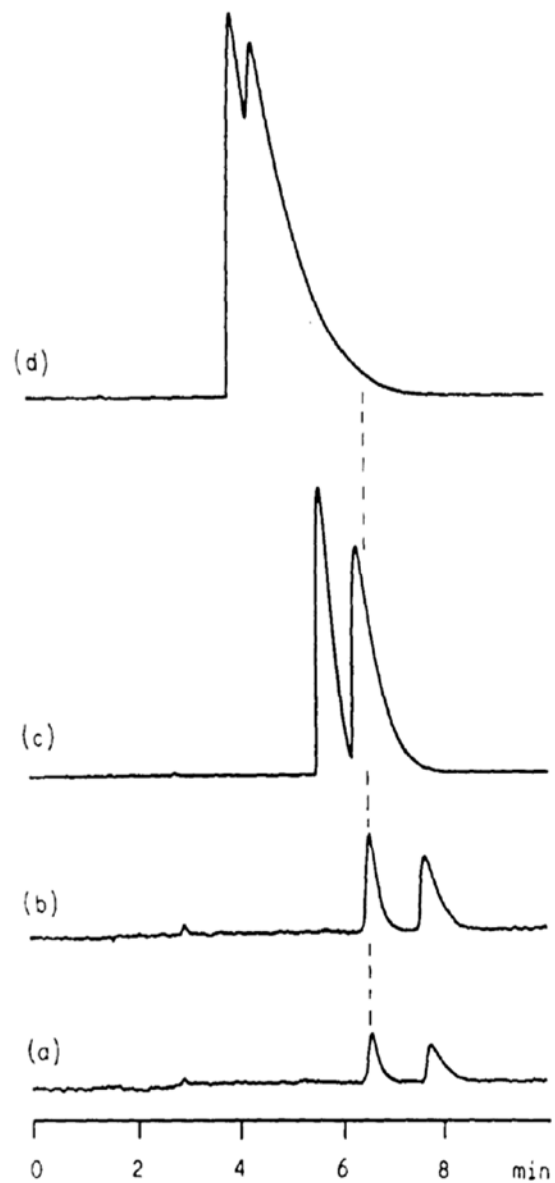
problemi zaradi mehurčkov

Injektorji (ročni/avtomatski)



Volumen zanke majhen v primerjavi z V_m
od 1-100 μ l

Količina spojin na koloni



2mg

Cikloheksanon,
Ciklopentanon,
NP

200 μ g

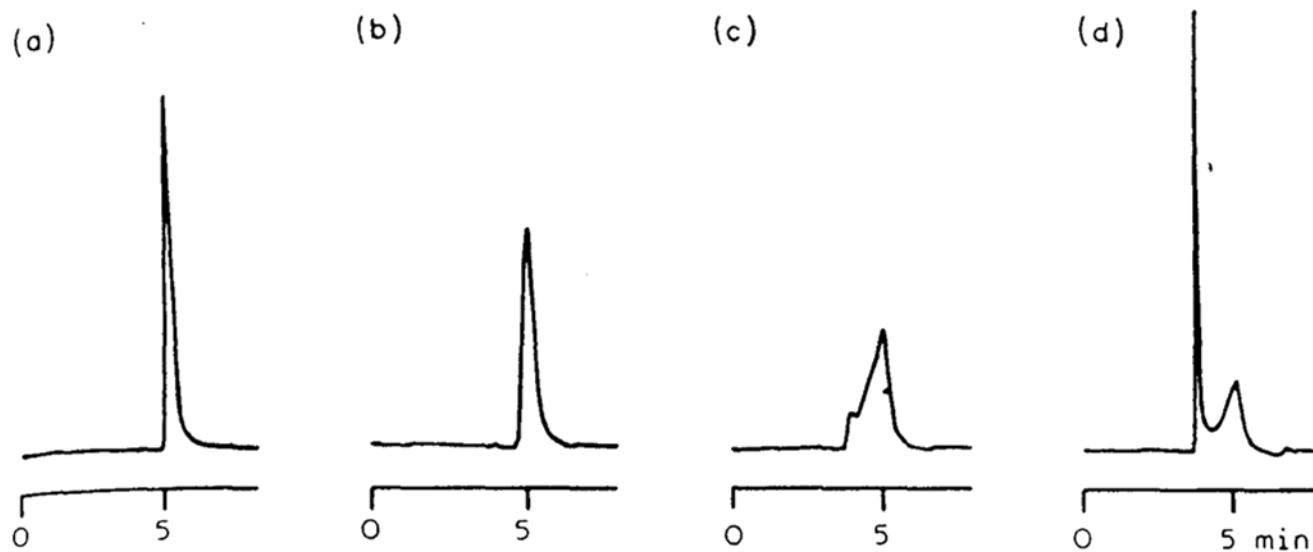
10 μ g

5 μ g

Izbira topila za raztapljanje vzorca

- Topilo naj bo enako kot je sestava mobilne faze v začetku analize
- Nepolarne vzorce (maščobe) raztopimo v nepolarnem topilu in določamo s kromatografsko metodo, ki omogoča uporabo nepolarnih mobilnih faz - nevarnost, da se topilo ne meša z m.f.
- Polarne vzorce raztopimo v vodi (dodatek metanola/acetoneitrila, pH) in analiziramo na nepolarnih (RP) kolonah
- Popačenje kromatogramov zaradi spremembe mobilne faze!

Vpliv topila na obliko kromatograma



Vzorec: fenilalanin, m.f.pufer pH3-acetonitril (92:8), RP

- a) Vzorec v pufru; b) 30% acetonitrila; c) 50% acetonitrila;
d) 70% acetonitrila

Kolone

Material: nerjaveče jeklo, steklene kolone

Dimenzije: premer: 2-5mm, večji preparativne

dolžina: 5-25cm

**polnilo: delci sferični, pod $10\mu\text{m}$,
tipično $5\mu\text{m}$, $3\mu\text{m}$, tudi do $1,7\mu\text{m}$**

1. manjši delci → večja upornost kolone

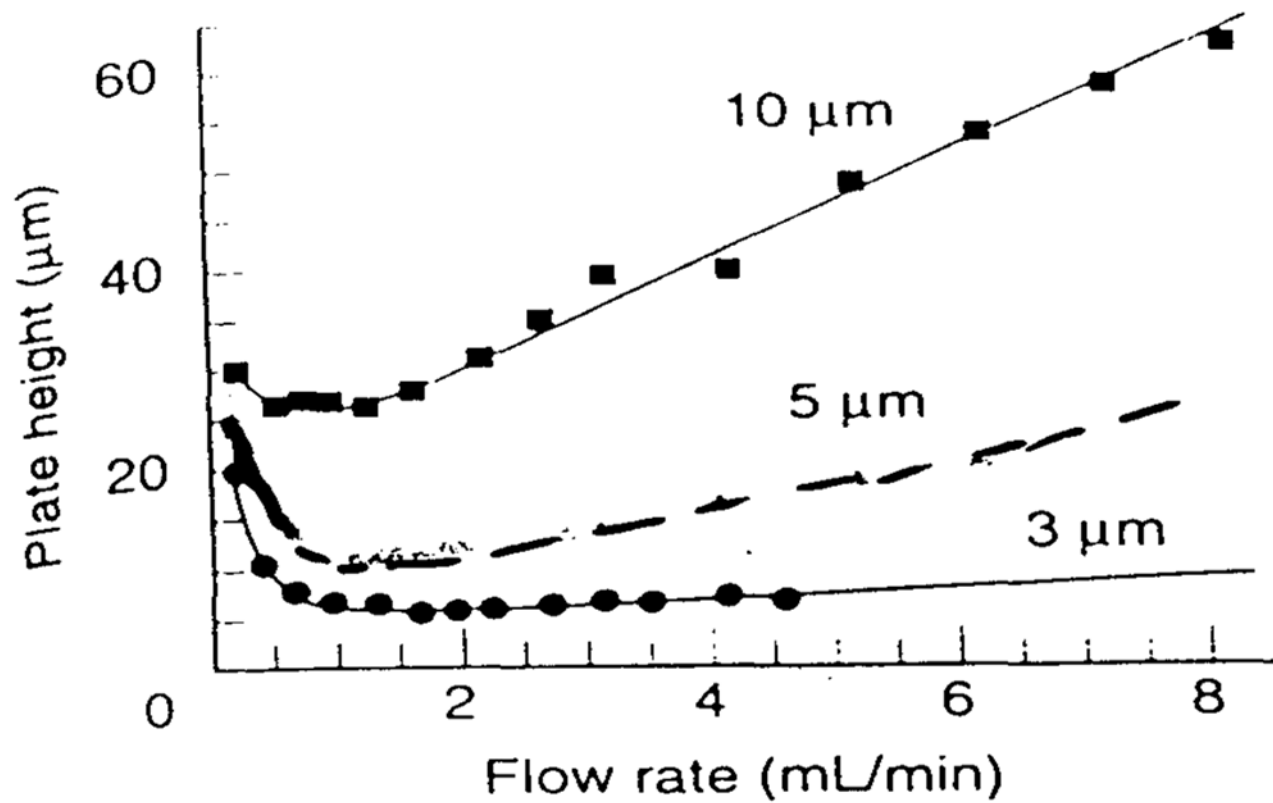
(A manjši zaradi enakomernih pretokov)

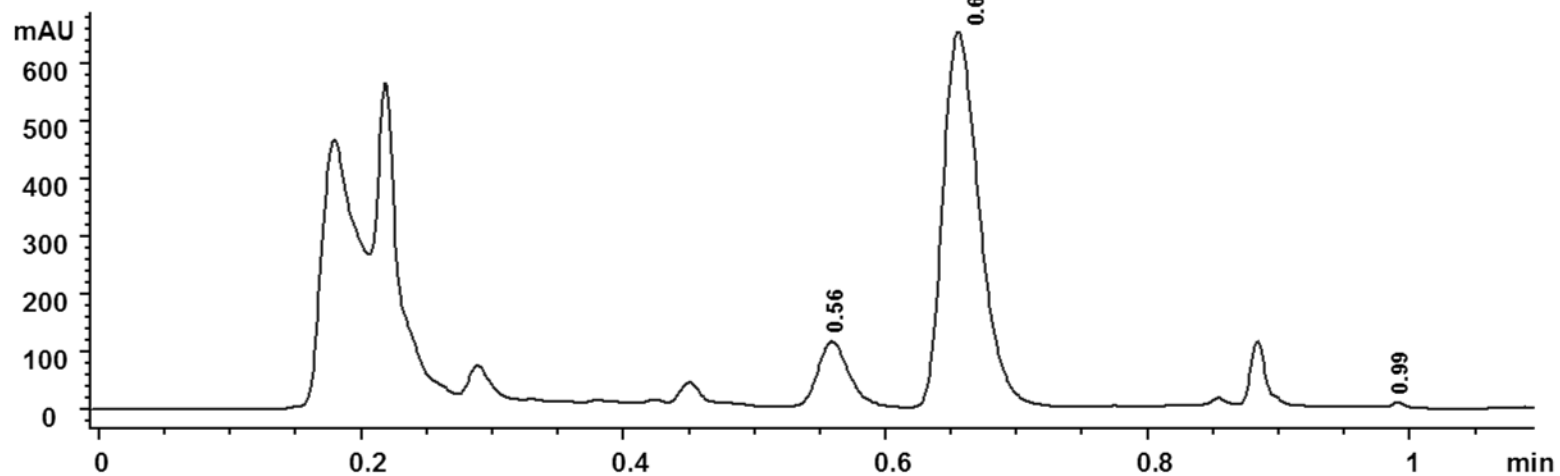
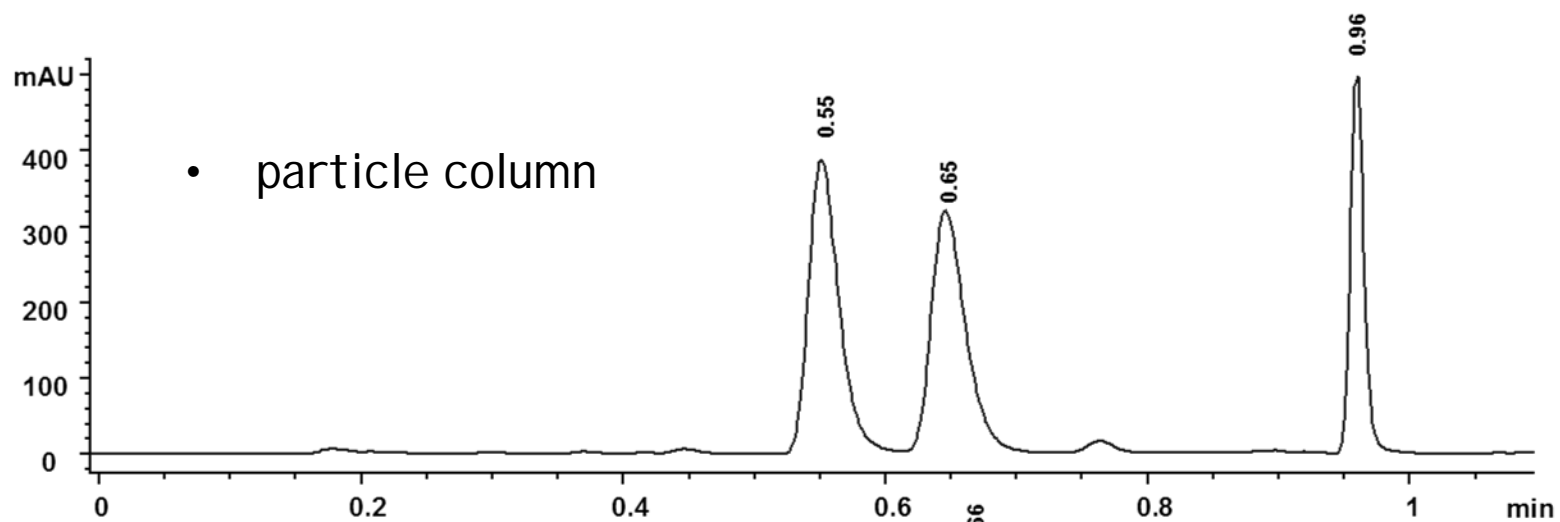
2. razdalja za difuzijo je velikosti delcev,

(C manjši)

Oblika in velikost delcev, UPLC, monolitne kolone

Vpliv velikosti delcev na H





Zorbax SB-C-18; 1,8 μ m (50 X 4,6)mm, določanje pravastatina v fermentacijski brozgi

Izvedba kolone, V_m , vloga predkolone

- Priključki, ki ne povečujejo V_m
- Določanje V_m ob zmanjševanju, slabšanju ločljivosti kolone
- Predkolona- filter
- Uporaba predkolone premakne t_r
- Raztapljanje silikagelskih stacionarnih faz pri pH nad 8

Stacionarne faze

- **NP -normalno fazna kromatografija**

Polarna stacionarna faza

Mobilna faza nepolarna (ogljikovodiki) 5%

- **RP - reverzno fazna kromatografija - kromatografija z obrnjeno fazo**

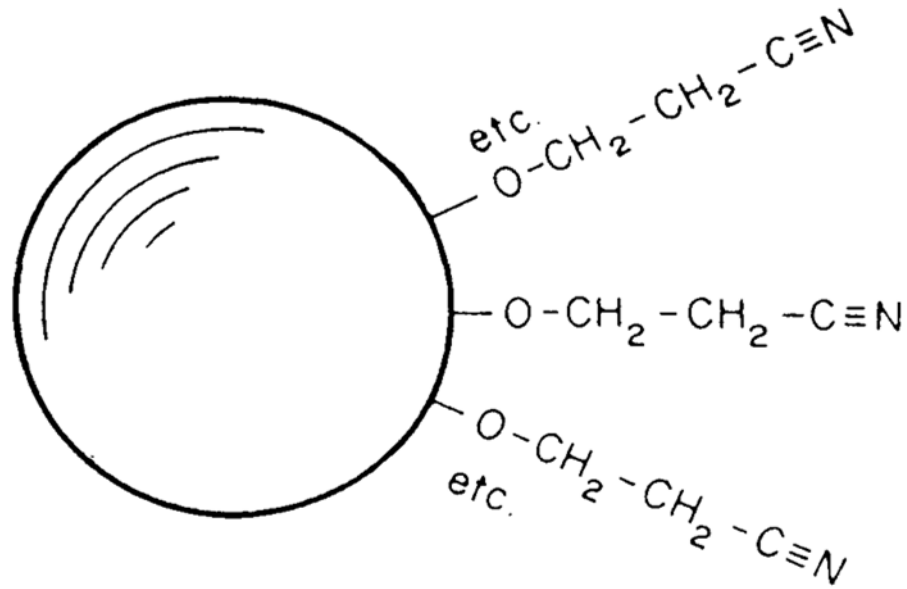
Nepolarna stacionarna faza

Mobilna faza polarna (voda/metanol/acetonitril) 94%

dodatki soli, pufrov, ionskoparnih reagentov -čistost uporabljenih reagentov!

Vplivamo na topnost v mobilni fazi!

Modificiran silikagel

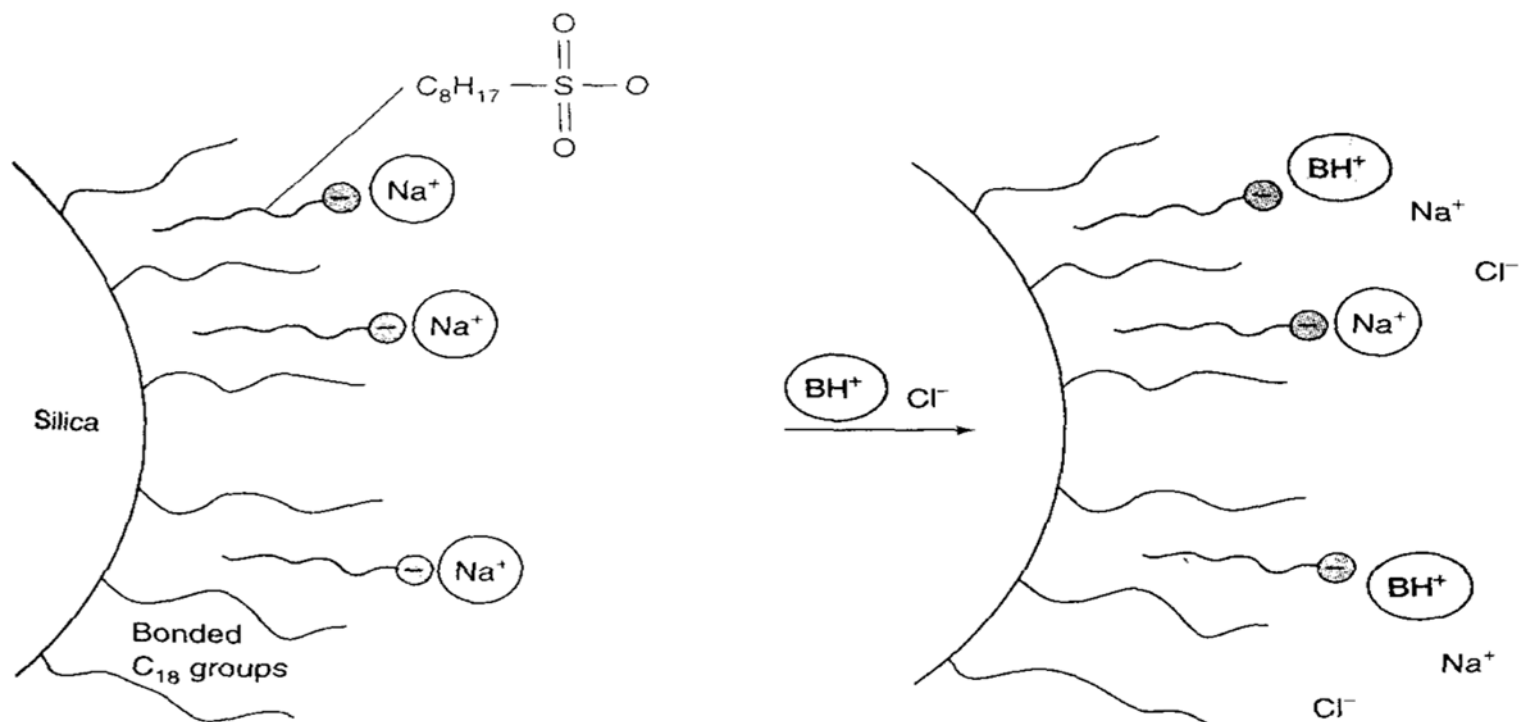


Različne skupine - vpliv na interakcijo s stacionarno fazo,
različna količina - kapaciteta kolone

Ločevanje polarnih spojin z RP-kolonami

Pretvorba nepolarnih polnil v ionske izmenjalce

Uporaba ionskoparnih reagentov - možnost regeneracije (alkilamini - anioni; alkilsulfonati - kationi)

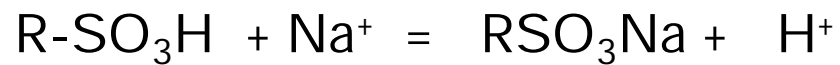


Specialne stacionarne faze

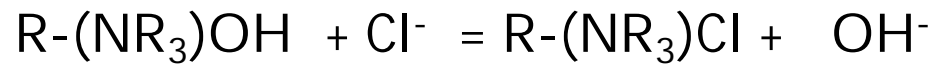
- Različno oglje
- Polimeri- SDB
- Kiralne stacionarne faze (na osnovi ciklodekstrinov) - ločevanje optičnih izomer

Ionski izmenjalci

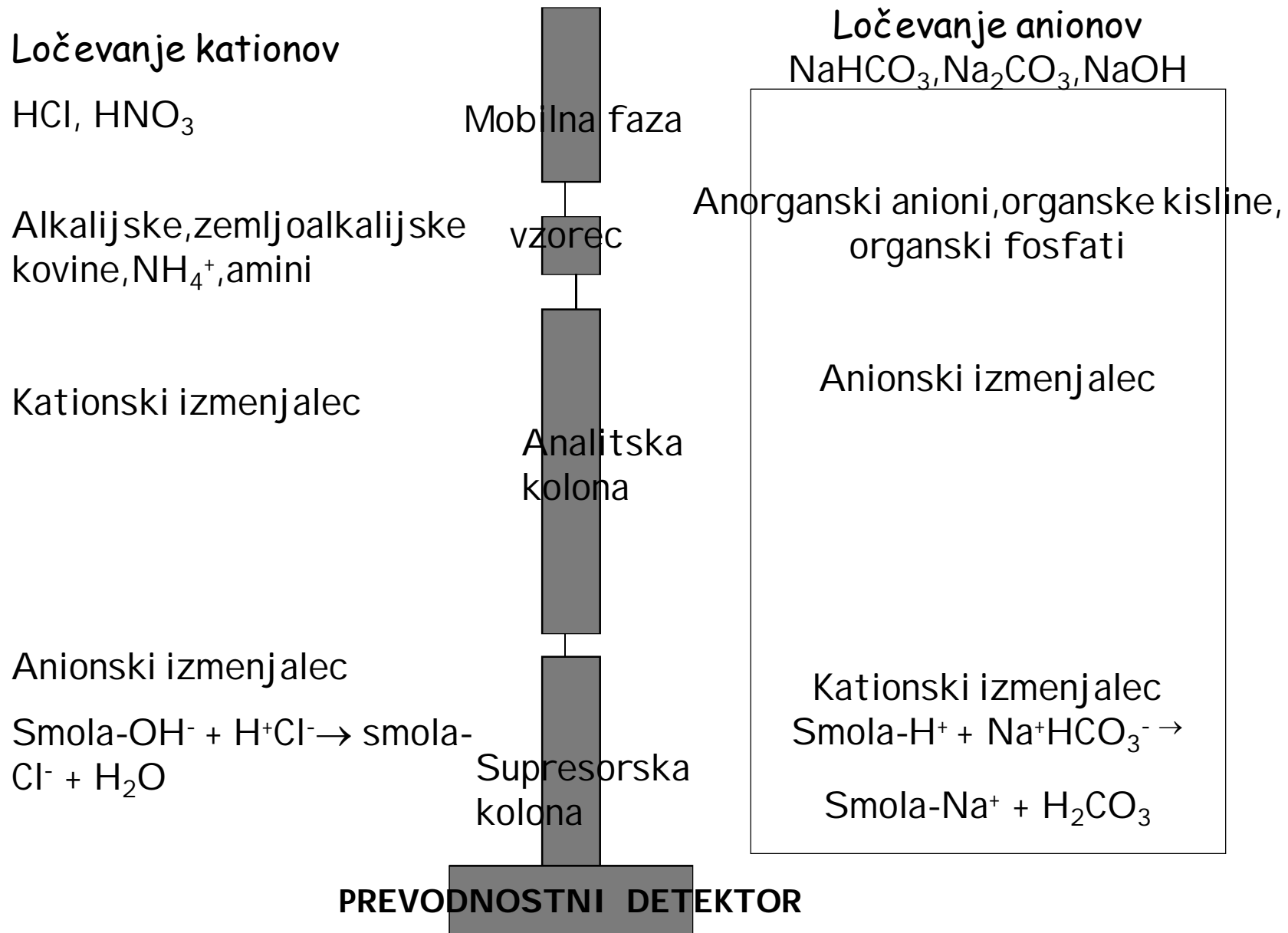
- Polimeri SDB-
- R-SO₃H - kationski izmenjalec



- R(NR₃)OH - anionski izmenjalec

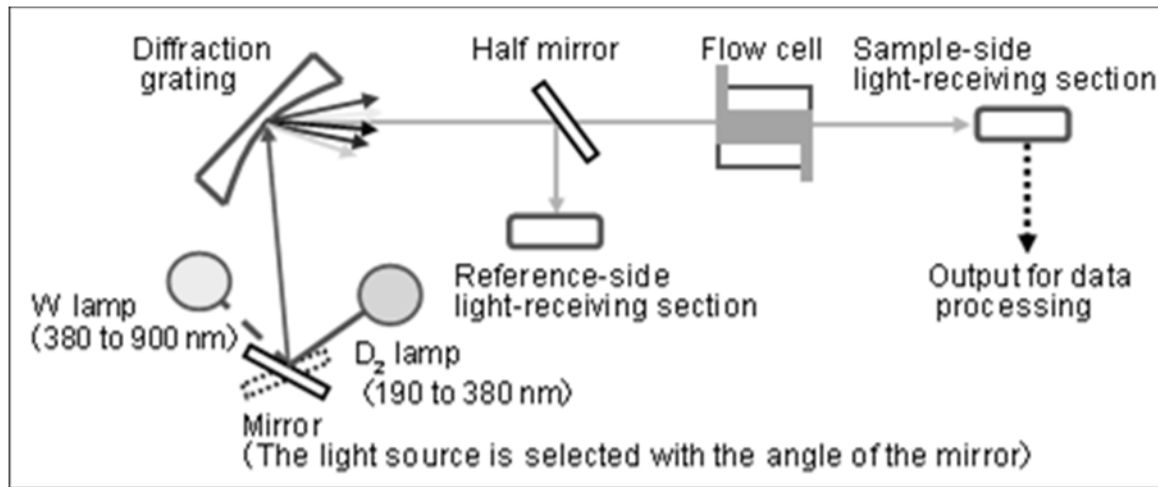


Ionska kromatografija



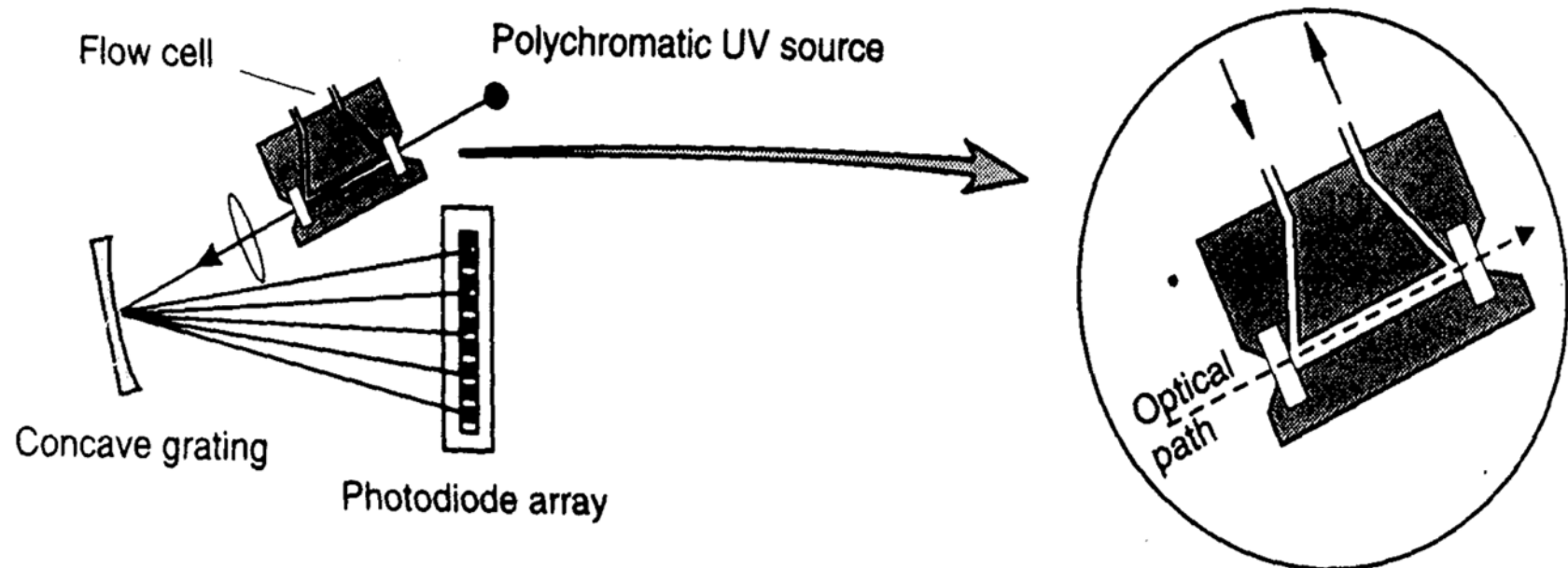
Detektorji pri HPLC

- Celice majhnega volumna (20 μ l) ; pretočne mikrocelice
- Elektrokemijski- prevodnost - kombinacija s spektrofotometričnimi detektorji



Spektrofotometrični detektorji

Standardni UV-VIS, z nizom dinod (volumen celice do $20\mu\text{L}$), mikrocelice?



Spektrofotometrični detektorji

- Beerov zakon
- $A = \epsilon l c$ izvedba celice za nizke koncentracije
 izvedba za preparativno ločevanje

Problem: absorpcija svetlobe v mobilni fazi:

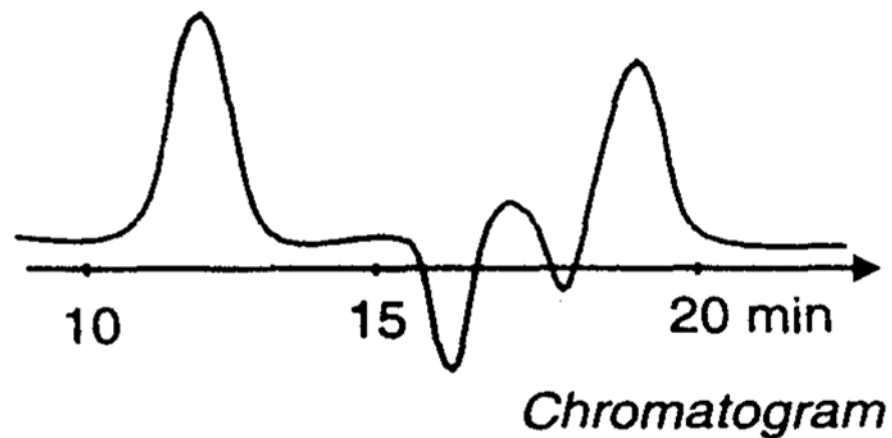
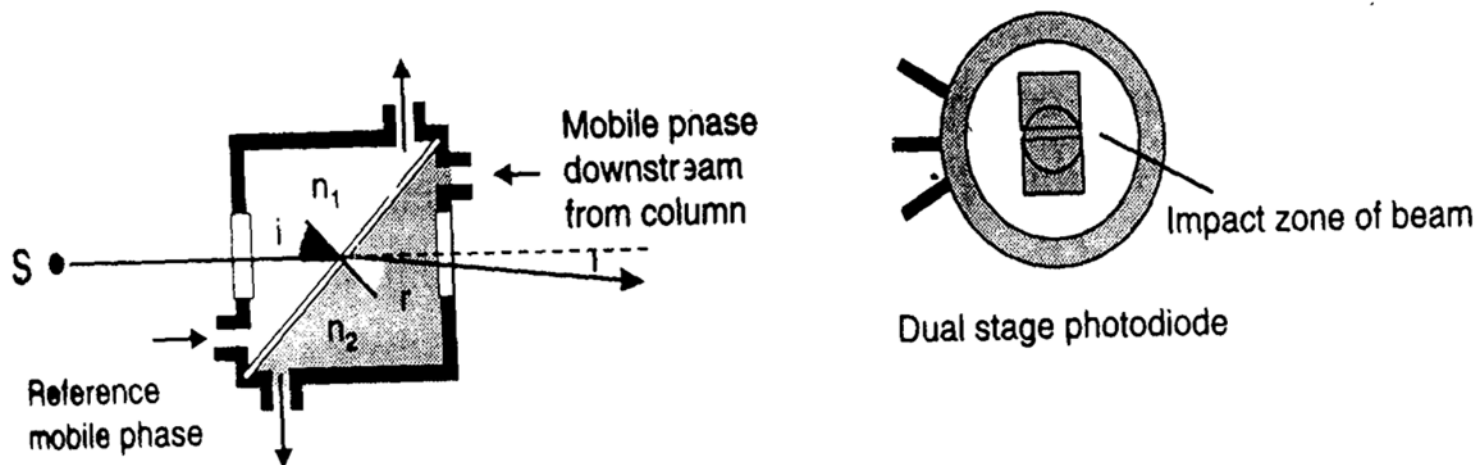
acetone - VIS

UV-čista topila

Vsa topila in dodatki problematični, če merimo absorbanco pri λ pod 220nm (acetatni pufri!) primerni fosfatni pufri

Uporaba UV detektorjev za spojine, ki ne absorbirajo svetlobe - INVERZNA DETEKCIJA

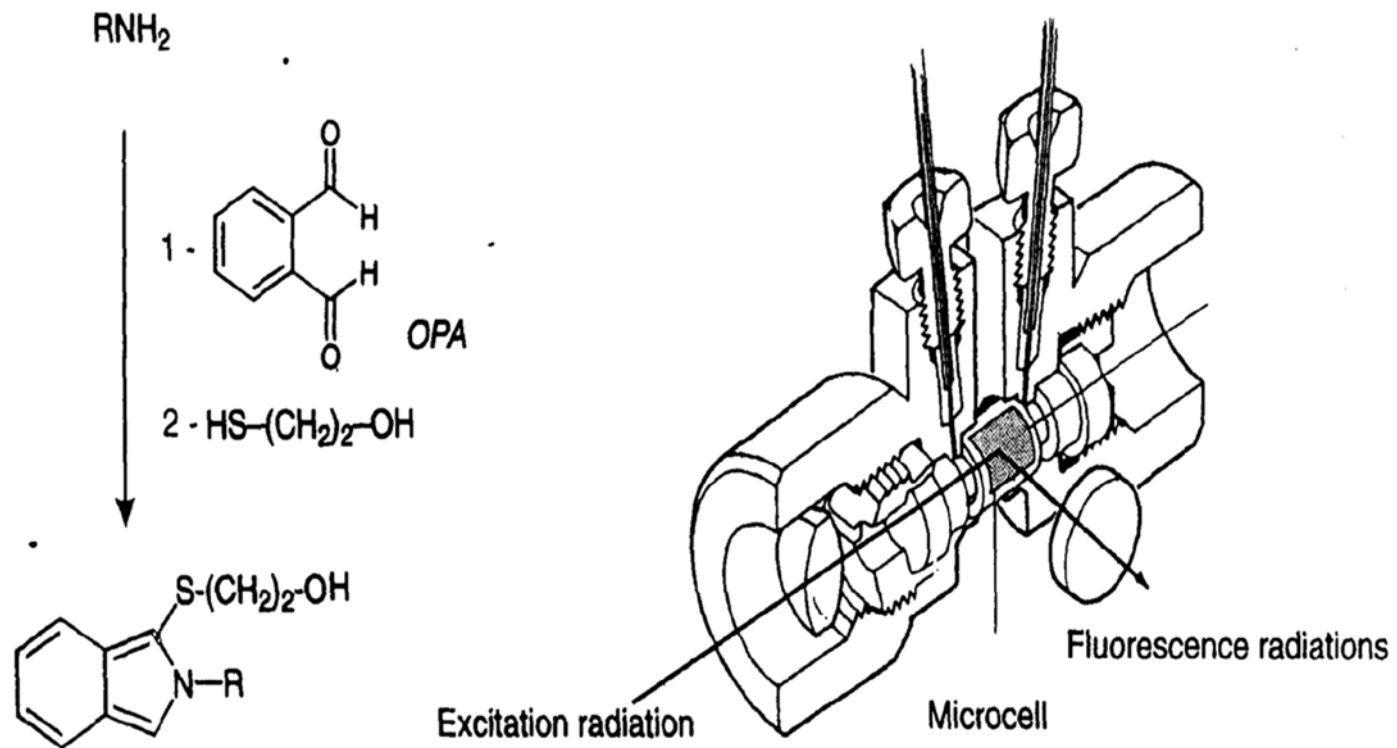
Refraktometrični detektorji



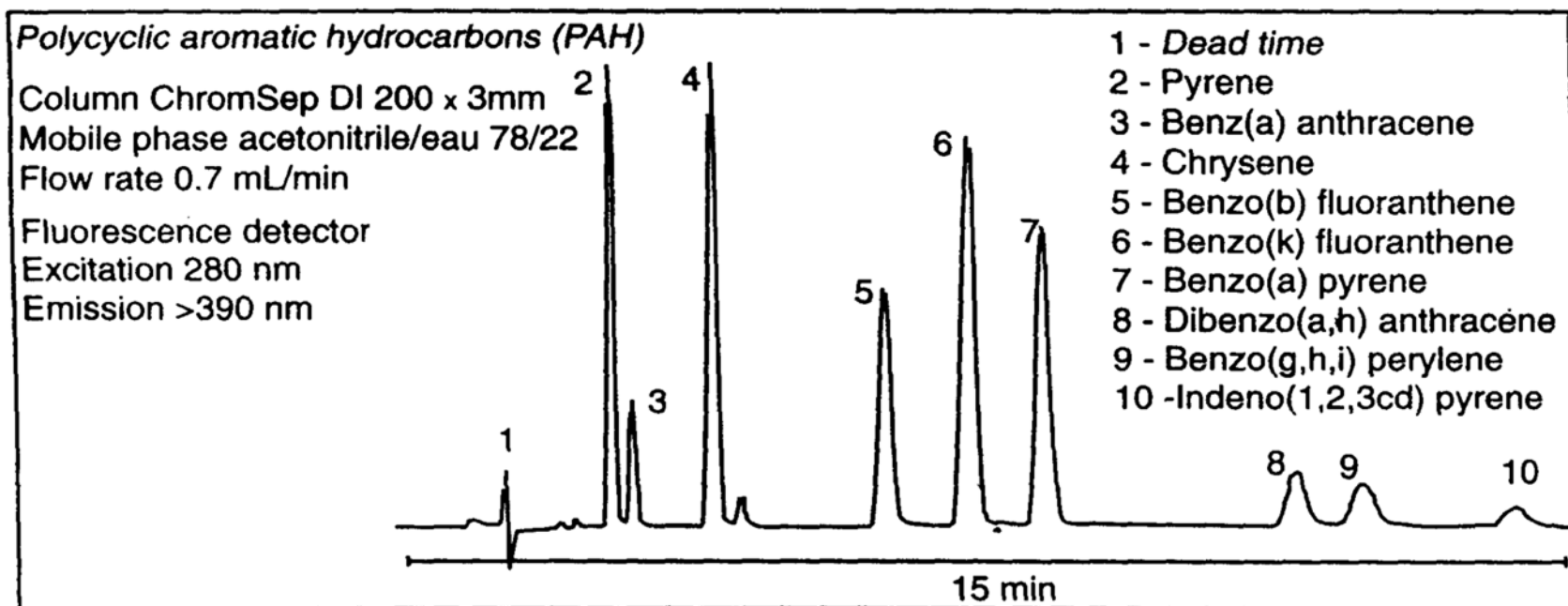
Fluorescenčni detektorji

- $I_f = I_0 k (1 - e^{-\epsilon l c}) \sim k' c$ samo pri nizkih konc.
- Selektivnost (izbira dveh λ)
- Nizka meja zaznave (meritev emitirane svetlobe)
- LOD 20pg za B(a)piren
- Spojine, ki fluorescirajo:
 - Adrenalin
 - Triptofan
 - Aflatoksini
 - Opiati (LSD)
 - PAH
- Priprava derivatov, ki fluorescirajo
 - Primarne aminokisliline - OPA (o-ftaldialdehid)
 - Sekundarne aminokisliline - FMOC (9-fluorenilmetilkloromravljica kislina)

Fluorescenčni detektorji



Določanje PAH s fluorescenčnim detektorjem



MDK nekaj ng/L,

standardna metoda SPE in HPLC-FL

Kvantitativna analiza

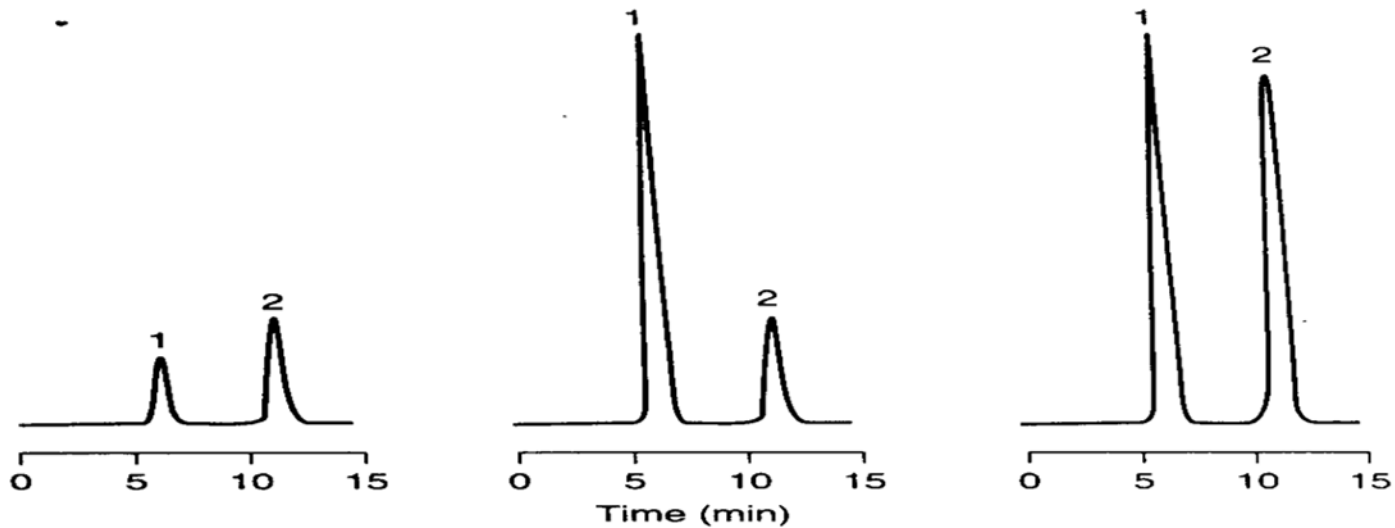
- Priprava umeritvene krivulje (standarne raztopine)
ploščina kromatografskega vrha-množina
- Normalizacija ploščin (ko spojine, ki jih ločujemo vsebujejo enake kromofore) npr: metil-, etilestri dekadienojske kisline
- Uporaba standardnega dodatka (dodatek iste spojine k alikvotu vzorca)
- Uporaba internega standarda

Kvantifikacija z internimi standardi

Interni standard mora biti po fizikalnih lastnostih podoben preiskovani spojini – idealno izotopi (MS)

Npr:

1-etanol, 2- izopropanol



Kvantifikacija z internimi standardi

- Priprava umeritvene krivulje
- $Y = S_1/S_2$ $X = c_1/c_2$ $S_1/S_2 = k c_1/c_2$

$k =$ naklon, relativna občutljivost

Ob predpostavki, da je interni standard pravi, lahko zanemarimo izgube-napake pri pripravi vzorca

Iz kromatograma ekstrakta vzorca določimo razmerje S_{v1}/S_{v2}

Ker poznamo konc. 2 v vzorcu, lahko določimo iz podatkov konc.1

$$c_{v1} = c_{v2} \times S_{v1}/S_{v2} k$$