

Pražské analytické centrum inovací

Projekt CZ.04.3.07/4.2.01.1/0002 spolufinancovaný ESF a Státním rozpočtem ČR

Obecný úvod do problematiky

Karel Štulík
PřF UK Praha



Vymezení tématiky probírané v kursu

Z velkého počtu rozmanitých biologicky aktivních látek vybrány jen organické látky.

Hlavní důraz:

- aminokyseliny
- peptidy
- proteiny
- glykoproteiny
- lipidy

Metodicky:

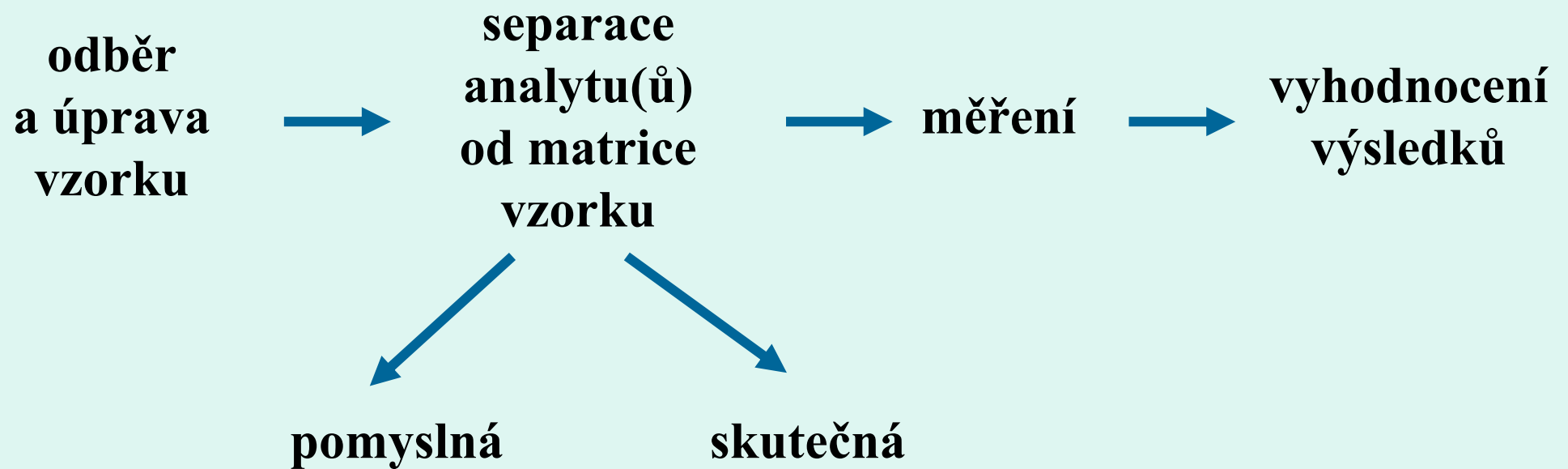
- HPLC, HPLC-MS
- CE, CE-MS
- (-GC)
- chirální separace
- předběžné úpravy vzorku

Typy analýz biologicky aktivních látek

- **Podle charakteru činnosti, která analýzy využívá:**
 - (a) výzkum
 - (b) rutinní aktivity
- **Podle obecného zadání analytického problému:**
 - (a) (identifikace a) stanovení jediného analytu
 - (b) (identifikace a) stanovení velké skupiny analytů
 - (c) (identifikace a) stanovení isomerů
 - (d) sledování přeměn určité látky (určitých látek)
(časový faktor – kontinuální monitorování)

- **Podle charakteru analytů a matric vzorků**
- **Podle účelu konkrétního měření:**
 - (a) orientační sledování přetržitých hodnot určitého parametru (např. glukosa u diabetiků);
 - (b) monitorování určitých parametrů (např. analytická kontrola při dialýze na umělé ledvině);
 - (c) periodická kontrolní měření nejrůznějších klinických, biochemických, hygienických a environmentálních faktorů;
 - (d) systematické sledování rozsáhlého problému měřeními téhož typu (genomika, proteomika, cellomika, ...)
 - (e) analytická kontrola přírodních či vyráběných látek;
 - (f) spolupráce na výzkumu nově objevených či připravených látek

Současná analytická chemie



- vysoce selektivní měření – pomyslná separace
- rozvoj separačních technik – spíše technologický, méně nových principů



výjimka: afinitní techniky

Analytické separace organických látek I

- **Plynová chromatografie, GC**

jednoduchá, rychlá, blízká teoretickému modelu,
avšak: malý aplikační rozsah

- **Kapalinová chromatografie, HPLC**

složitá, těžkopádná, pomalá, vzdálená teoretickému modelu,

ALE: velmi široké aplikace,

širší možnosti ladění experimentálních podmínek (stacionární i mobilní fáze)

Analytické separace organických látek II

- **Chromatografie v nadkritické tekutině, SFC**

kompromis mezi GC a HPLC

trpí malým výběrem separačních systémů

- **Kapilární elektroforéza, CE**

vysoce účinná, rychlá, poněkud méně spolehlivá než HPLC, poněkud menší možnosti regulace separačního děje než v HPLC

Analytické separace organických látek III

- **Hybridy mezi HPLC a CE**
 - kapilární elektrochromatografie (CEC)
 - micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)
 - kapilární gelová elektroforéza (CGE)

Vysokoúčinná separace

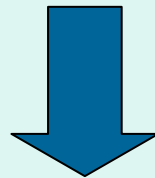
- klíčový krok při analýzách velkých molekul



Hyphenation:

- kombinace separačních kroků
- kombinace detekčních metod
- vztah separace-detekce

Vztah mezi vysokoúčinnou separací a vysoce výkonnou detekcí

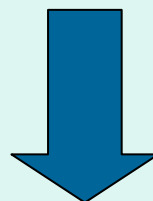


**faktor, který do značné míry rozhoduje
o úspěchu analýzy**

Posun v nazírání na separační a detekční systém

V důsledku nedávného ohromného rozšíření vysoce výkonných měřicích technik, např. *MS, IR, Raman, NMR*

- Klasický pohled: Detekce je koncovka vysokoúčinné separace
- Nový pohled: Vysokoúčinná separace je předběžným krokem pro vlastní měření



Pravda je kdesi uprostřed

Kombinace separačního a detekčního kroku

má řadu rysů typických
pro (mimo)manželské soužití

například:

- **představy partnerů bývají různé a harmonického vztahu se nedosahuje lehce**
- **partneři mívají snahu dominovat ve vztahu**
- **někteří partneři jsou skromní, jiní nároční a rozhazovační**
- **o zvláště idylických a harmonických vztazích se píše v literatuře**

Současný vývoj partnerských vztahů

- **Asertivita a náročnost partnerů vzrůstá.**
- **Rostou sklony k promiskuitě a polygamii.**
- **Vztahy bývají turbulentní a nestálé.**

Zásadní úloha dohazovače

rozhraní neboli **interface**
(smíří rozvaděné partnery)

Kombinace separačního kroku s detekcí

- nechodit na komára s kanónem
- vybrat nejjednodušší možné separační a detekční systémy, které nejen dodají minimální dostatečnou informaci, ale jsou si vzájemně sympatické
- nelze-li jinak, vložit mezi znepřátelený separační a detekční systém dostatečně měkký polštář
- **nedobrovolné kritérium:** kam až kapsa stačí
- **nežádoucí kritérium:** zvyk, setrvačnost a pohodlnost

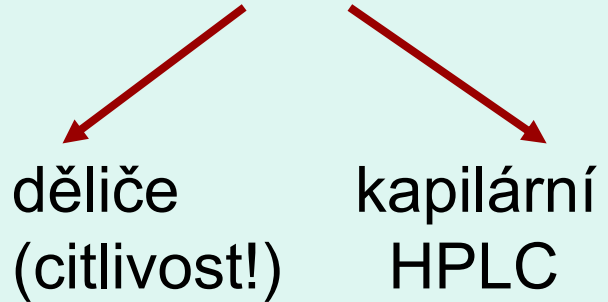
Difuzní hranice mezi HPLC a CE

HPLC	CE			
	CEC	CGE	MEKC	CZE
stacionární fáze	stacionární fáze	polyakrylamidový gel	pseudostacionární fáze	nosný elektrolyt
mobilní fáze	nosný elektrolyt	nosný elektrolyt	nosný elektrolyt	
rozdělovací hydrofobní elektrostatická vylučovací	rozdělovací (hydrofobní, elektrostatická)	rozdělovací vylučovací	rozdělovací hydrofobní elektrostatická + rychlost migrace micel	rychlost migrace (náboj, hmotnost)
Hlavní rozdíl – hnací síla				
Přetlak	Elektrické pole (gradient potenciálu)			
parabolický rychlostní profil	přechod mezi parabolickým a plochým profilem			plochý profil elektroosmotického toku

Typické operační parametry HPLC a CE

Parametr	HPLC	CE
vzorek	1-50 μl	< 1-5 nl
objemový průtok	0,1-2,0 ml min^{-1}	0,1-2,0 $\mu\text{l min}^{-1}$
objem píku	cca 500 μl	1-10 nl
eluční čas píku	cca 30 s	1-5 s
doba analýzy	10-40 min	5-15 min
cena kolony či kapiláry	300 USD	cca 10-15 USD
cena mobilní fáze či nosného elektrolytu	cca 15-25 USD	cca 0,5-2,0 USD
počet teoretických pater	cca 10^4	cca 10^5
LOD (UV detekce)	cca 10^{-7} - 10^{-9} mol l^{-1}	cca 10^{-5} to 10^{-7} mol l^{-1}
reprodukovatelnost retenčních parametrů	< 2,0 %	< 5 %
přesnost a správnost stanovení	cca 2,0 %	cca 2,0-5 %

HPLC a CE z hlediska detekce

HPLC	CE
<p>složité systém</p> <p>velké průtoky</p>  <p>děliče (citlivost!) kapilární HPLC</p> <p>složení mobilní fáze, její programování</p>	<p>jednoduchý systém, krátká optická dráha malé průtoky</p> <p>jednoduché elektrolyty - soli!</p>
CEC, MEKC	
	<p>nepohodlí vysokého napětí (elektrochemie, ale i vibrační spektroskopie - interface)</p>

TEDY:

- a) CE je jednodušší, levnější a rychlejší než HPLC
- b) CE je lepší pro malé, vzácné vzorky, HPLC je lepší pro preparativní účely a odběr frakcí
- c) Lepší rozlišení u CE, identifikace analytů snadnější u HPLC
- d) Kapacita píků je větší u HPLC
- e) Vývoj postupu a jeho optimalizace je rychlejší u CE
- f) Spolehlivost stanovení je poněkud lepší u HPLC
- g) Malé detekční cely s definovanou geometrií na kapiláře u CE, širší paleta detekčních technik a vyšší citlivost detekce u HPLC
- h) Při spojení s MS: složitý eluát o velkém objemu u HPLC, silné elektrolyty v malém objemu u CE
- i) Podstatně širší aplikační rozsah u HPLC



**HPLC a CE jsou partneři,
kteří se vzájemně doplňují, jak *off-line*, tak *on-line***

Přednášky tohoto kursu PACI se zabývají vybranými důležitými úseky širokého pole separací biologicky aktivních organických látek, jak z hlediska aplikací na určité skupiny analytů, tak z hlediska metodického.

Věříme, že řadu otázek pomůže osvětlit i diskuse po přednáškách.