

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) u analizi biomolekula

Dr Ljubiša Ignjatović
Fakultet za fizičku hemiju, Beograd

HROMATOGRAFIJA

Hromatografija obuhvata više različitih grupa metoda koje omogućavaju razdvajanje, izolovanje, indentifikaciju i odredjivanje komponenti u smeši. Komponente smeše se razdvajaju na osnovu različitih koeficijenata raspodele izmedju POKRETNE(mobilne) i NEPOKRETNE(stacionarne)faze

Pokretna faza može biti gas ili tečnost, a nepokretna tečnost na nekom čvrstom nosaču, adsorpcioni sloj na površini čvrste faze ili jonoizmenjivač.

KLASIFIKACIJA HROMATOGRAFSKIH METODA

Podela hromatografskih metoda se može izvršiti na više načina:

Opšta klasifikacija ili klasifikacija prema načinu smeštanja stacionarne faze:

PLANARNA

Tankoslojna (TLC)

Papirna (PC)

Elektrohromatografija

NA KOLONI

Gasna (GC)

Tečna (LC)

Prema fizičkoj prirodi mobilne i stacionarne faze:

Tečno – tečno

Tečno – čvrsto

Gas – tečno

Gas – čvrsto

često se pod tečnom hromatografijom navode prva dva sistema, a pod gasom poslednja dva.

Prema fizičko-hemijskom procesu na granici faza:

Adsorpciona (Adsorpcija)

Jonoizmenjivačka (jonska izmena)

Taložna (taloženje)

Gel – filtracija (filtracija)

Afinitetna (stvaranje kompleksa)

Karakterističnih za čvrstu stacionarnu fazu,

i particiona (rastvaranje)

Karakterističnu za tečnu stacionarnu fazu.

Prema načinu pomeranja faza:

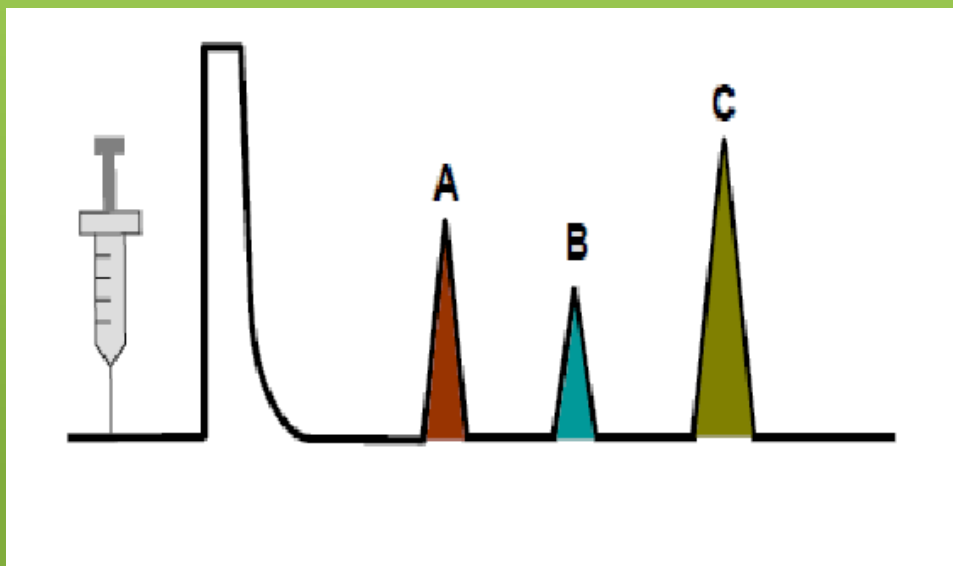
Eluirajuća

Frontalna

Istiskujuća

Kombinovana

Prema cilju: Analitička (kvalitativna i vantitativna)
i Preparativna (izdvajanje čiste supstance u većoj
količini)



Tečna hromatografija je varijanta hromatografije čija je pokretna faza tečna, a nepokretna faza može biti granulovana čvrsta faza ili tečna nanešena na granule čvrstog nosača (nerastvorna u tečnosti koja predstavlja mobilnu fazu).

Za razliku od gasne hromatografije koja zahteva da uzorak bude u stanju gasa ili pare, tj. da su temperature daleko iznad sobne, tečna hromatografija se izvodi uglavnom u blasti sobne temperature, tj. mogu se analizirati i termički nestabilne supstance (npr. organske supstance biološkog porekla i značaja).

VISOKOPERFORMANSNA TEČNA HROMATOGRAFIJA

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (high pressure liquid chromatography) ili tečna hromatografija visoke efikasnosti (high performance liquid chromatography - HPLC) je tečno-hromatografska tehnika u kojoj se tečnost kroz kolonu proteruje pod pritiskom do 400 bara, pa i veće. Analize sa različitim parovima pokretna/nepokretna faza se izvode jednim jedinstvenim uređajem koji omogućuje kontinualnu promenu hemijskog sastava pokretne faze u cilju poboljšanja separacije, priključivanje raznih tipova detektora i pumpi, automatsko upravljanje postupkom od uzimanja uzorka do registracije hromatograma i obrade podataka.

TIPOVI HPLC

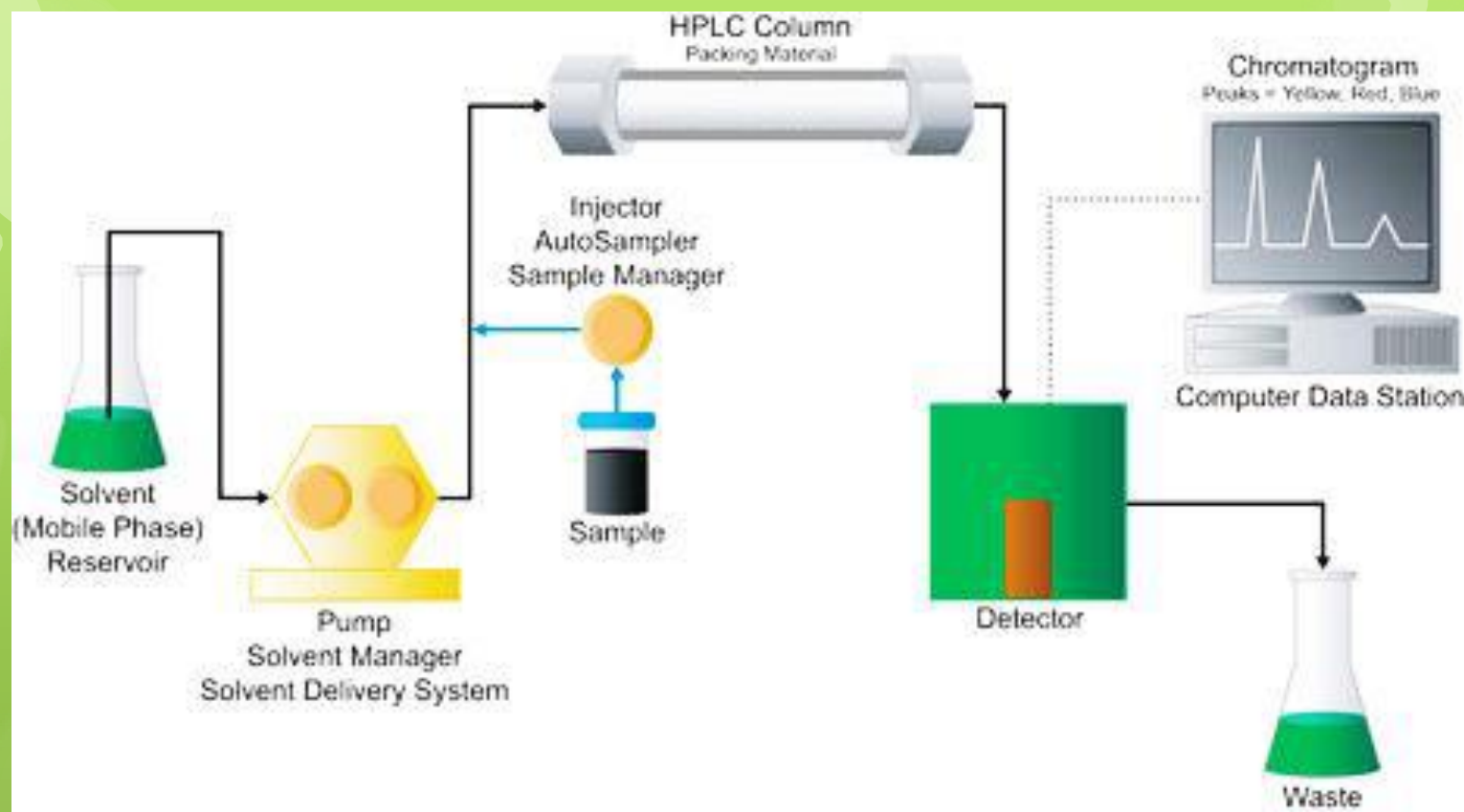
Četiri osnovna tipa HPLC su sledeća:

1. Hromatografija pomoću jonskih izmenjivača
2. Tečno-čvrsta (adsorpciona) hromatografija
3. Tečno-tečna hromatografija
4. Hromatografija istiskivanja (isključenja) po veličini (SEC, GPC)

Ovi tipovi reprezentuju četiri posebna mehanizma interakcije molekula uzorka sa stacionarnom fazom. Razlike između ovih tipova hromatografije leže u osnovi u različitim kolonama koje koriste.

Uredjaj za visokoperformansnu tečnu hromatografiju sastoji se iz rezervoara za mobilnu fazu, pumpe, injektora, kolone, detektora, termostata za kolonu i detektor, uredjaja za registrovanje i obradu podataka. Protok tečne faze kroz kolonu, koja je termostatirana obezbedjuje pumpa koja proizvodi visoki pritisak.

Tečna faza, nakon injektiranaj uzorka, po izlasku iz kolone, protiče kroz odgovarajući osetljivi detektor čiji je odziv srazmeran koncentraciji supstance. Odziv detektora se prevodi u odgovarajući naponski signal koji se automatski beleži.





REZERVOAR ZA MOBILNU FAZU

Rastavarač koji služi kao mobilna faza sipa se u poseban rezervoar. Rezervoar je obično sud od stakla ili nerđajućeg čelika zapremine 200-1000ml. Rezervoara može biti više rastvarača. Njihovi izvodi se spajaju u mešaču koji pušta rastvarače iz različitih rezervoara različitim brzinama time obezbeđuje mobilnu fazu određenog hemijskog sastava. U cilju efikasnijeg razdvajanja komponenti, sastav mobilne faze može da se linearno menja u toku samog procesa hromatografije (gradijentna hromatografija).

PUMPE

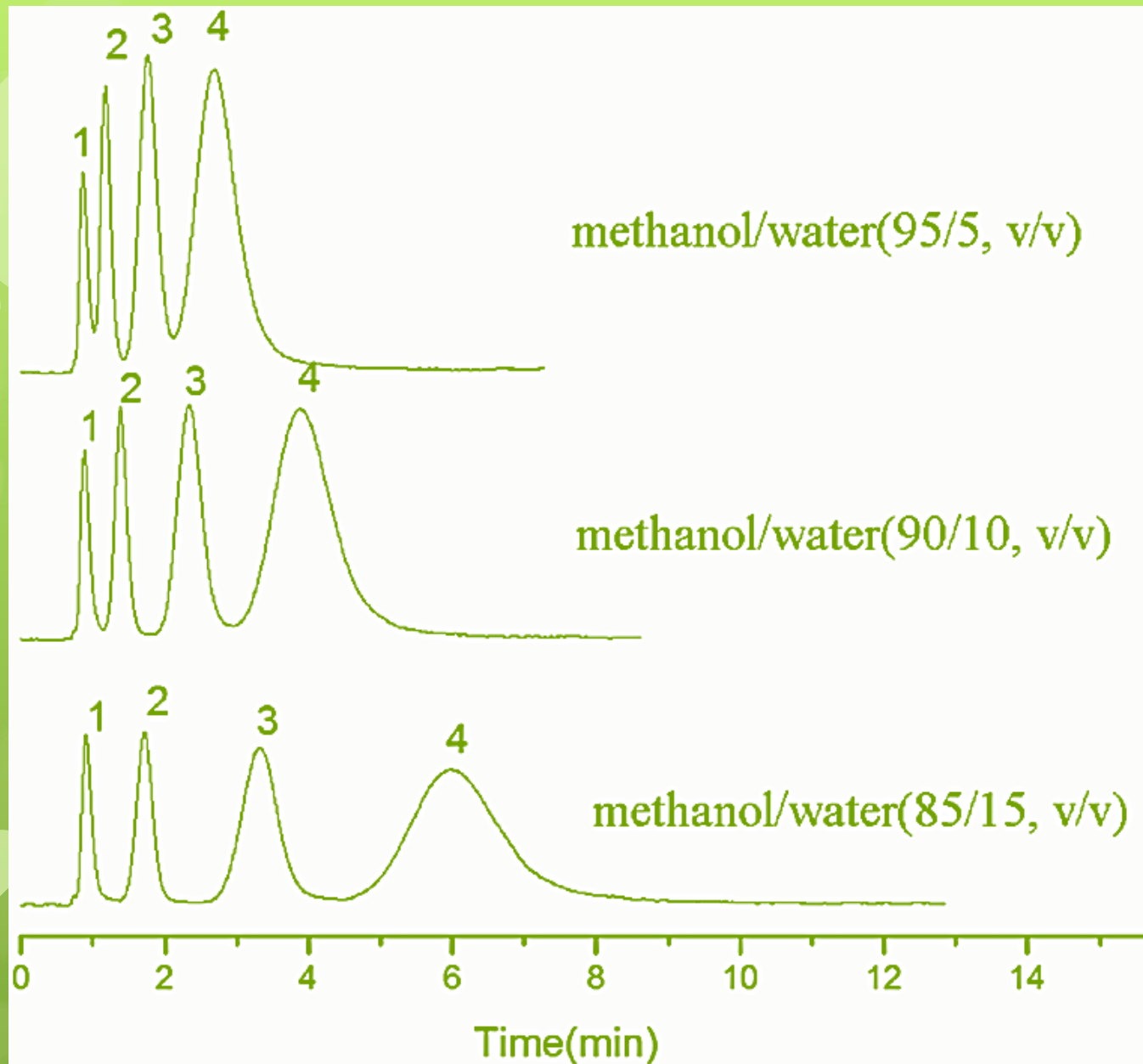
U tečnoj hromatografiji mobilna faza je tečnost, a njeno kretanje obezbeđuju sistemi za pumpanje. Pumpe obezbeđuju:

- brzinu protoka od 0.1 do 10ml/min
- kontrolu i reproduktivnost protoka
- visoke pritiske
- postizanje bezpulsirajućeg režima rada ili protok sa minimumom pulsacija

Mobilna faza

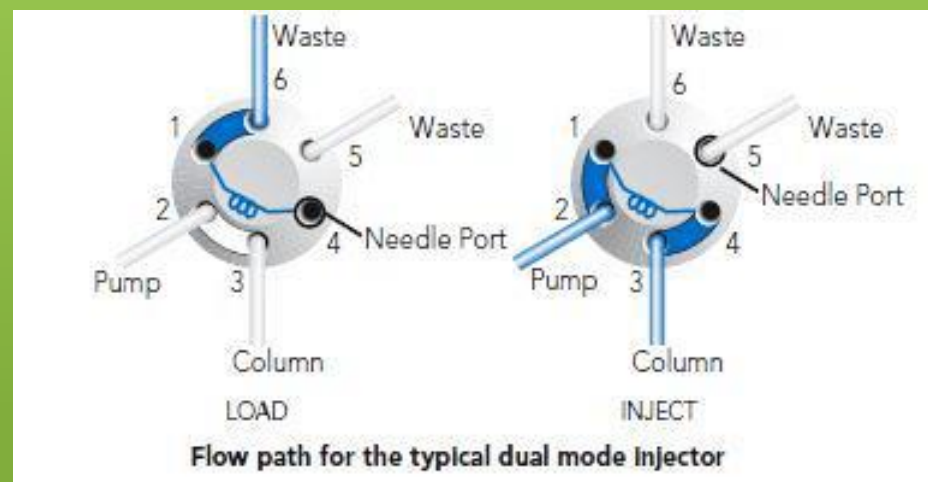
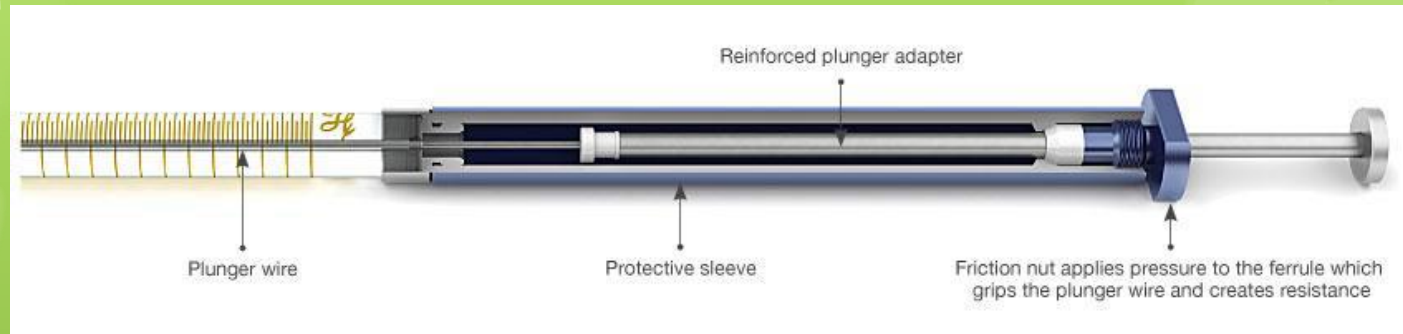
U tečnoj hromatografiji sastav mobilne faze je jedan od najbitnijih činjenica koji utiče na hromatografsko razdvajanje. Postoji veliki broj pogodnih organskih rastvarača ili vodenih puferskih rastvora. Za mobilnu fazu je osnovno da:

- ne menja karakteristike kolone
- bude kompatibilna sa detektorom
- rastvara uzorak
- ima malu viskoznost
- ima malu viskoznost
- omogućava ponovnu regeneraciju uzorka(ukoliko je potrebno)
- bude bez stranih primesa(HPLC čistoće), i
- bude komercijalno dostupna



Injekcioni sistem služi za unošenje uzorka u struju pokretne faze.

Injektori su četvorokrake ili šestokrake slavine koje mogu da izdrže visoke pritiske.



KOLONE

Kolone su cevi od nerđajućeg čelika (ili stakla) sa urezanim navojima na krajevima tako da se zašrafljivanjem mogu pričvrstiti na odgovarajuće mesto u termostatiranom prostoru hromatografa. Kolona je ispunjena granulama nepokretne faze (čvrstog adsorbensa) od čijeg hemijskog sastava zavisi namena kolone za analizu određene smeše. U praksi, izbor kolona se vrši na osnovu podataka iz literature ili iz kataloga proizvođača uređaja za HPLC.

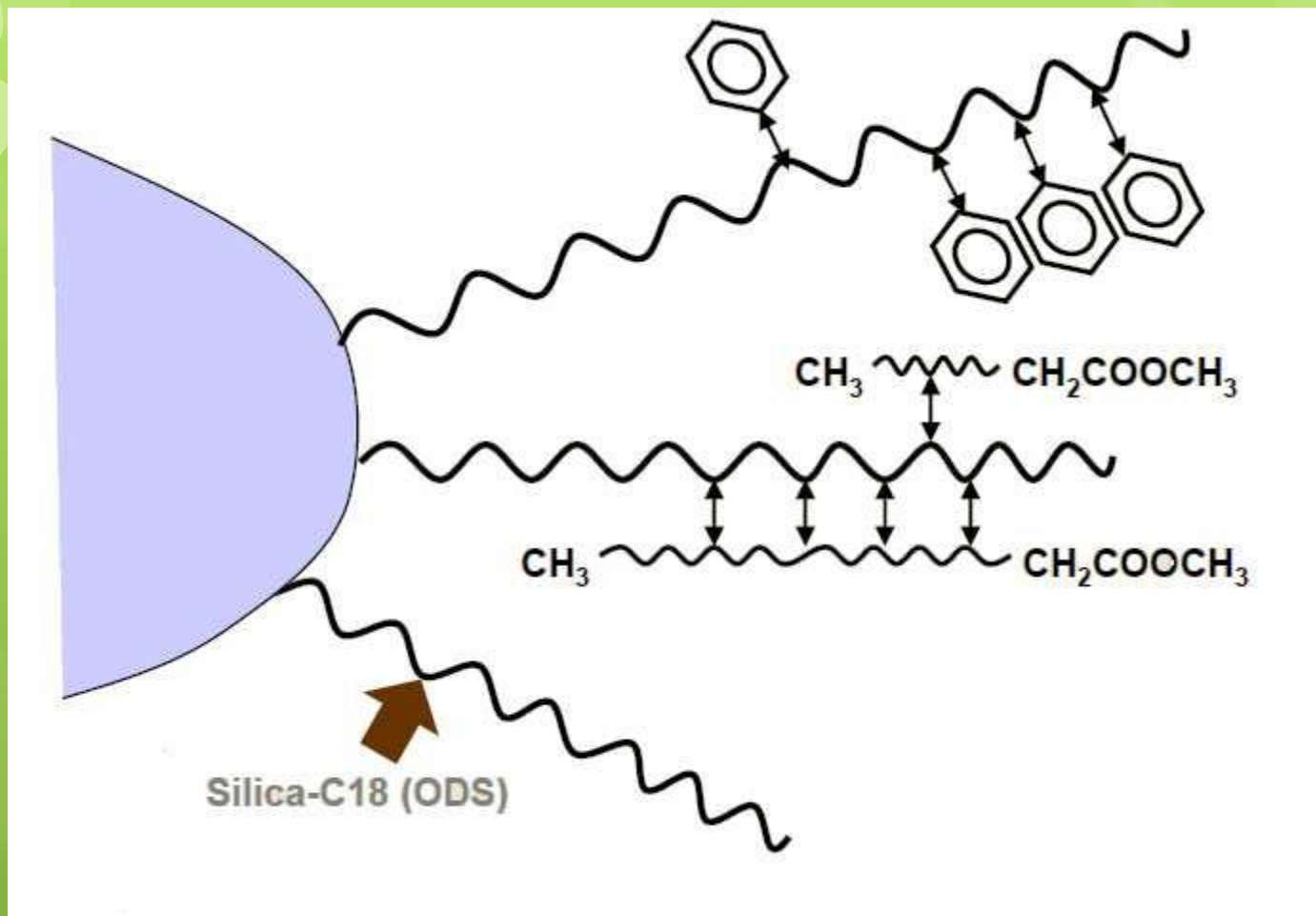
Od kolona zavisi razdvajanje komponenata, gde zadovoljavajuće (efikasno) razdvajanje predstavlja kompromis između moći razdvajanja, vremena trajanja analize i kapaciteta, što znači da poboljšanje jednog od parametara ide na račun druga dva. Pre svega razlikujemo:

1. analitičke
2. zaštitne (pretkolone)

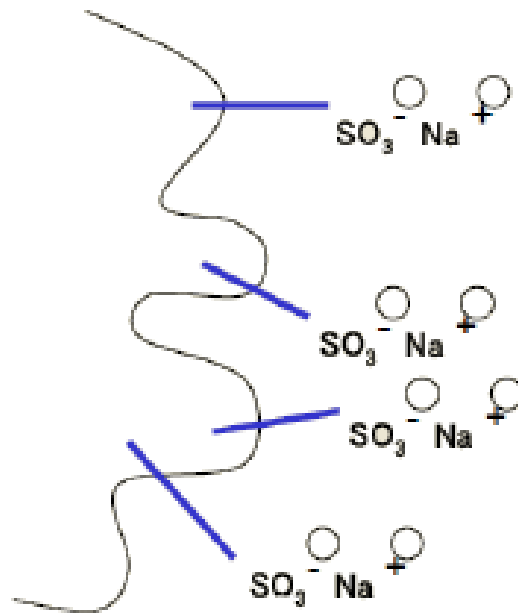
KOLONE



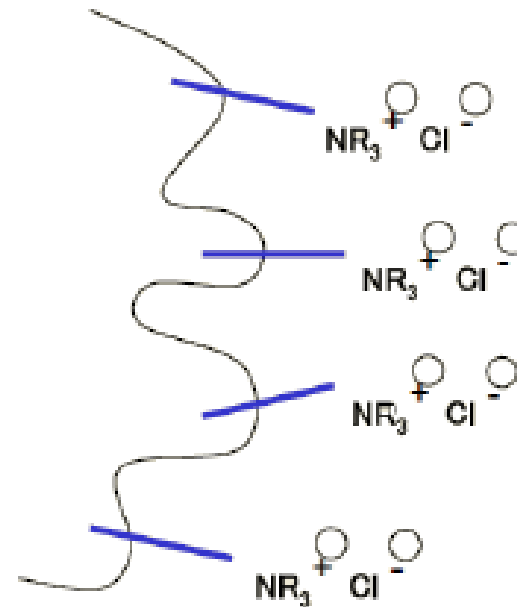
ADSORPCIONE INTERAKCIJE NA KOLONI



Gelovi za izmenu jona:



Gel za izmenu katjona



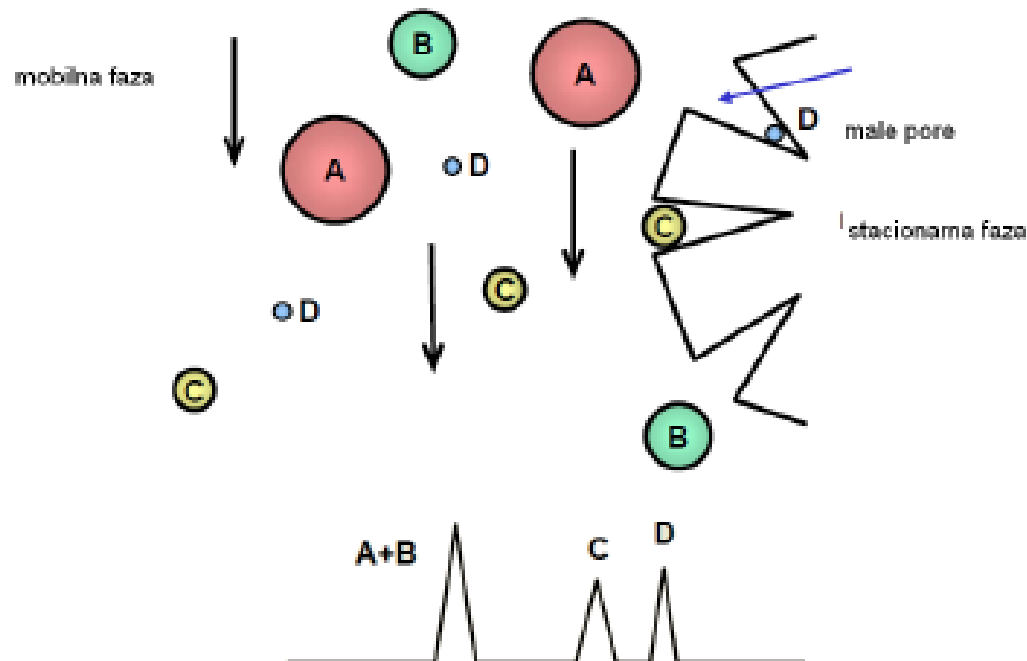
Gel za izmenu anjona

Najčešće se koristi sa konduktometrijskim detektorom.

Hromatografija zasnovana na veličini molekula

<i>Size-exclusion</i> hromatografija u nevodenoj sredini	1. Gel propustljiva hromatografija
Interakcije Pakovanje Mobilna faza Primer	Gel permeacija Porozni polistiren Organski rastvarači Razdvajanje sintetskih oligomera
<i>Size-exclusion</i> hromatografija u vodenoj sredini	2. Gel filtraciona hromatografija
Interakcije Pakovanje Mobilna faza Primer	Gel permeacija Hidrofilni silikagel ili hidrofilni polimer Rastvor pufera Razdvajanje polimera rastvorljivih u vodi (nukleinske kiseline, proteini, šećeri) Oligomeri

Mehanizam razdvajanja



Molekule se razdvajaju na osnovu veličine, velike molekule ne mogu da uđu u male pore pa se prve eluiraju dok manje molekule se zadržavaju u porama stacionarne faze i eluiraju kasnije.

DETEKTORI

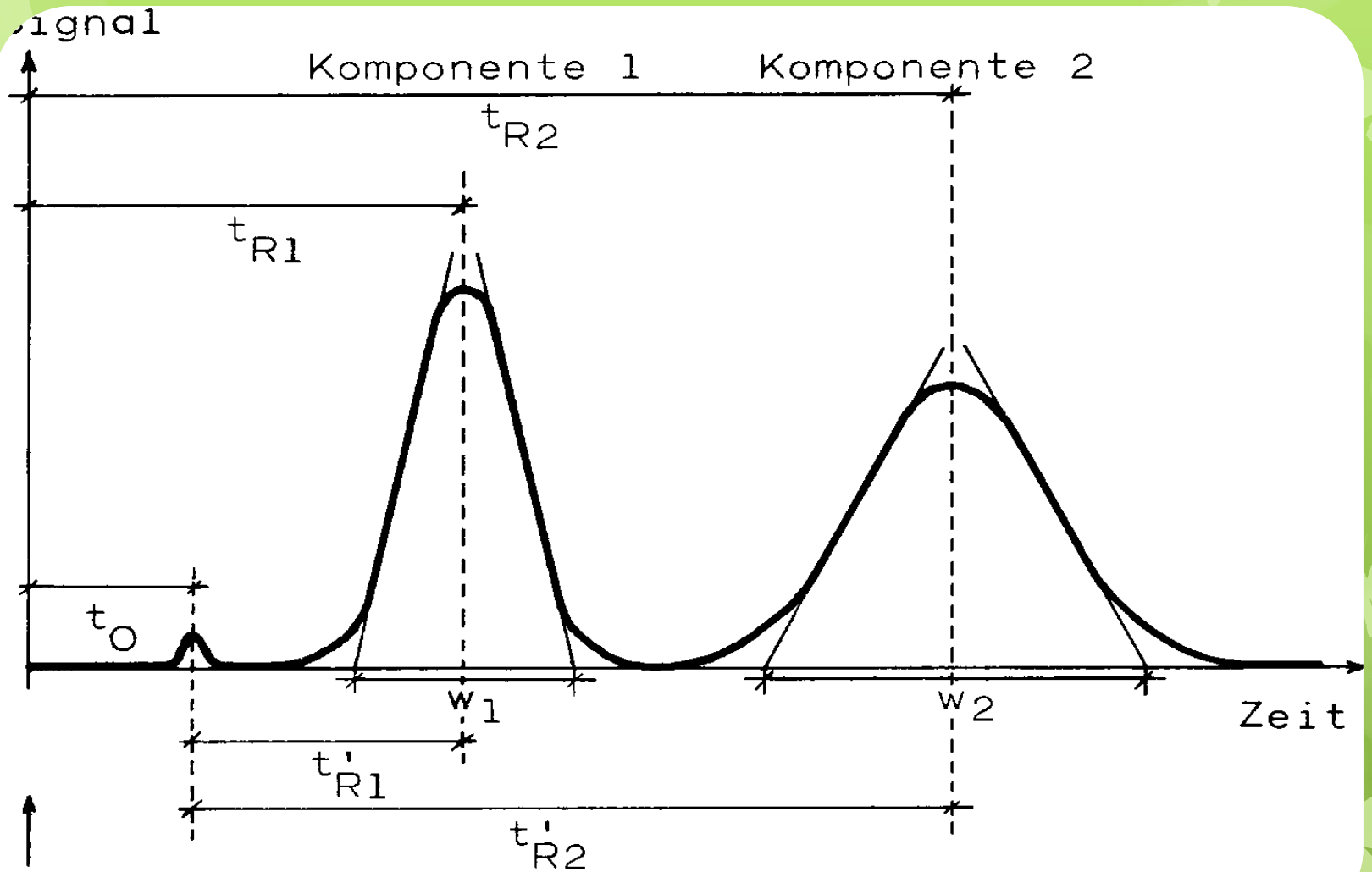
Detektori registruju prisustvo i mere količinu jedinjenja koje se eluira iz kolone. Dobri detektori:

- imaju visoku osetljivost
- mali šum
- mogućnost detektovanja velikog broja jedinjenja
- daju odgovor za svaku supstancu iz smeše
- daju linearan odgovor kao funkciju koncentracije
- odgovor detektora ne zavisi ili slabo zavisi od temperature ili brzine proticanja mobilne faze
- širok opseg linearnosti

DETEKTOR	GRANICA DETEKCIJE (mol/L)
UV detektori	10^{-8} - 10^{-9}
Fluorescentni	10^{-12}
Na bazi indeksa prelamanja	10^{-6}
Elektrohemijski	10^{-9}
Radiohemijski	10^{-9} - 10^{-10}
Maseno-spektrometrijski	10^{-8} - 10^{-9}

HROMATOGRAFSKI POJMOVI I PARAMETRI

Mobilna faza i stacionarna faza su standardni pojmovi koji se koriste u hromatografiji, uključujući i HPLC. Mobilna faza je rastvarač, a stacionarna faza je sorbent. Stacionarna faza koja takođe može biti tečna, može biti (a ne mora) na čvrsto nosaču (matriksu). Razdvajanje komponenti u HPLC-u je povezano sa ravnotežnim raspodelom različitih jedinjenja između stacionarne faze, doke je rasprostiranje rezultujućeg hromatograma povezano sa migracionom brzinom komponentenata. Različiti tipovi HPLC sistema zasnovani su na različitim supstancijama koje se koriste za stacionarnu i mobilnu fazu. Nakon izlaska komponenti iz kolone, one se mogu registrovati detektorom, čija je intenzitet signala proporcionalan koncentracijama komponenti.

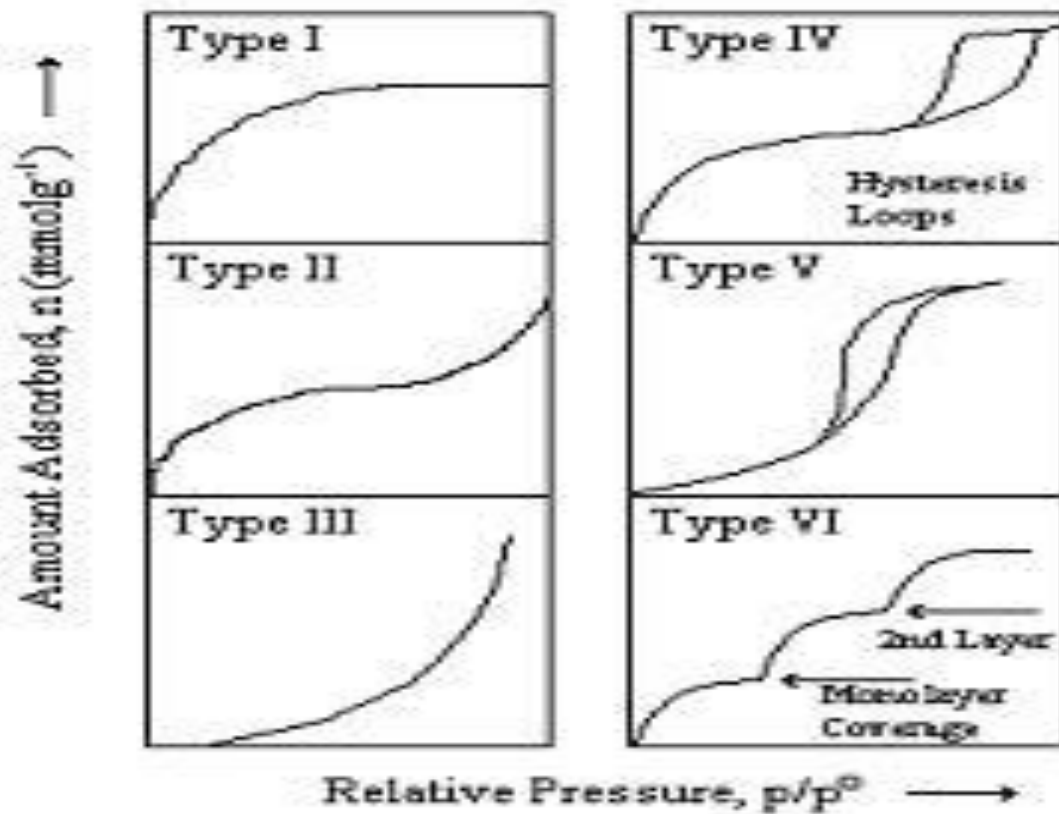


Probenaufnahme

Probenaufnahme

f_{BS}

Karakteristika	Hemisorpcija	Fizisorpcija
Tip	Monoslojna	Višeslojna
Tip veze	Kovalentna	Vandervalsove sile
Temperatura	Visoke temperature	Temperature ispod tačke ključanja adsorbata
Znak entalpije	Negativna	Negativna
Entalpija adsorpcije	>85 kJ/mol	< 40 kJ/mol
Uticaj prirode adsorbata i adsorbensa	Zavisi od prirode adsorbata i adsorbensa	Zavisi od prirode adsorbensa
Reverzibilnost	Ireverzibilna	Reverzibilna
Energija aktivacije	Postoji-aktivirana Ne postoji-neaktivirana	Ne postoji



Tipovi adsorpcionih izoterma

HPLC Applications



Chemical

polystyrenes
dyes
phthalates



Bioscience

proteins
peptides
nucleotides



Pharmaceuticals

tetracyclines
corticosteroids
antidepressants
barbiturates



Consumer Products

lipids
antioxidants
sugars



Environmental

polyaromatic hydrocarbons
Inorganic ions
herbicides



Clinical

amino acids
vitamins
homocysteine

METODA ANALIZE

Nikosulfuron se određuje visoko performansnom tečnom hromatografijom korišćenjem kolone Knauer C18 (250 x 4 mm). Jedinjenje se detektuje UV detektorom na 245 nm talasne dužine.



Mobilna faza pH 2.5 voda + acetonitril, podesiti na pH 2.5 fosforom kiselinom koristeći kalibrisani pH metar.

APARATI

Visoko performansni hromatograf opremljen konstantnim protokom pumpe, konstantnom temperaturom dela u kome se nalazi kolona, injektor za ubrizgavanje uzorka zapremine 2 μL , UV detektor promenljive talasne dužine (245 nm) i digitalni integrator.

HPLC kolona Knauer C18, 250 x 4 mm

pH metar Iskra, tip MA 5730

Analitička vaga Explorer Ohaus (max 110g, d = 0.1 mg)

Pumpa Bischoff

Injektor Biscoff , glass body 100 μL

Detektor Biscoff lambda 1010

Membranski filter Phenex, RC 0.45 μm

POSTUPAK

Radni uslovi

Kolona Knauer C18, 250 x 4 mm

Eluent 30% Acetonitril / 70% Voda
(pH 2.5 , H_3PO_4)

Protok 1.5 mL/min

Talasna dužina detektora 245 nm

Vreme analize 10 minuta

Kalibracioni rastvori

10 mg, 20 mg, 40mg, 60 mg, 80 mg
supstance nikosulfurona se odmeri i
prenese u normalni sud od 100 mL, zatim
se acetonitrilom dopuni do crte. Tretira se
u ultrazvučnom kupatilu oko 10 minuta.

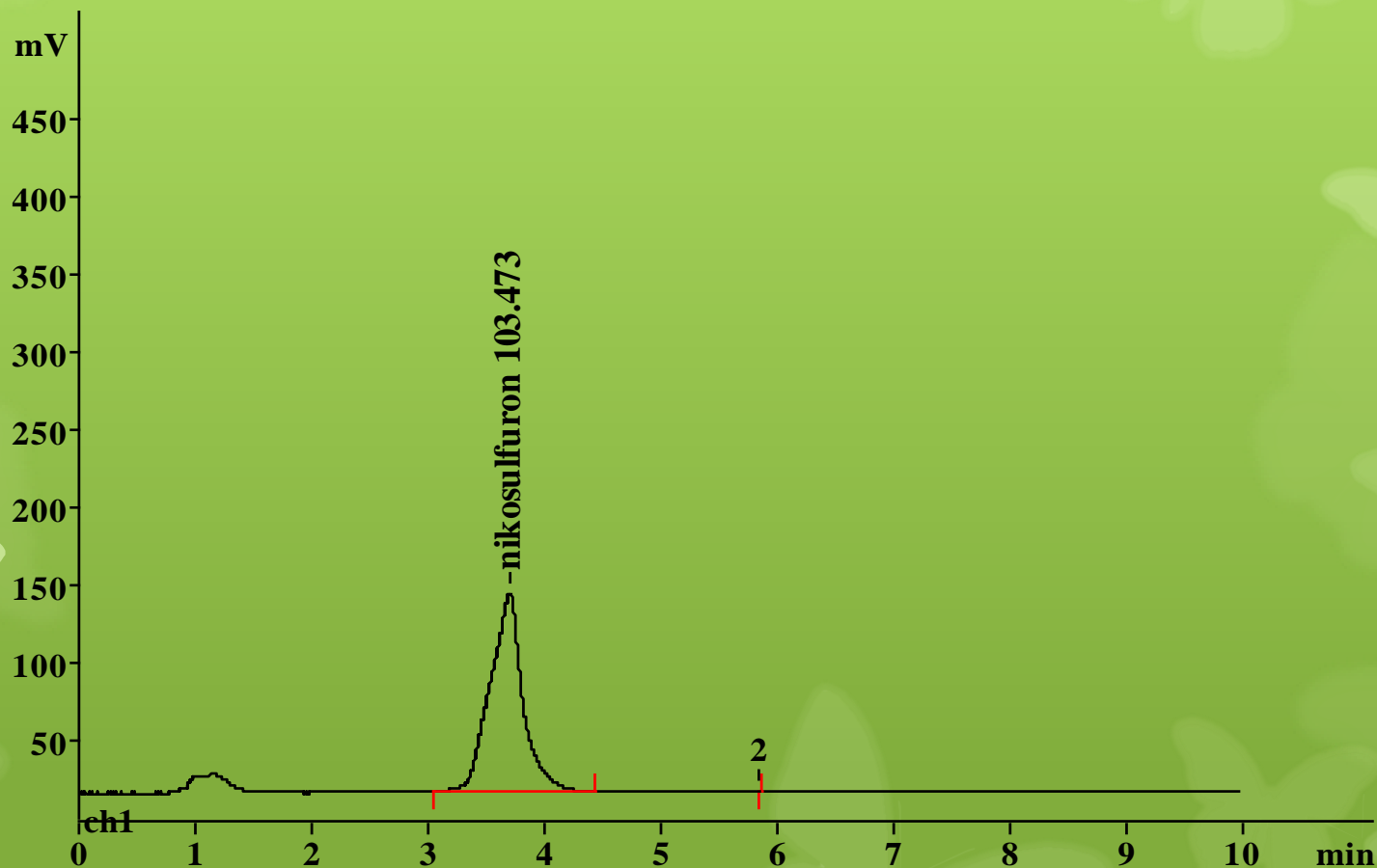
Koncentracija nikosulfurona u rastvorima
redom je 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L,
600 mg/L, 800 mg/L.

Kalibracija je u opsegu od 0 - 800 mg/L.
Da bismo dobili uzorak u opsegu
kalibracije moramo ga razblažiti.

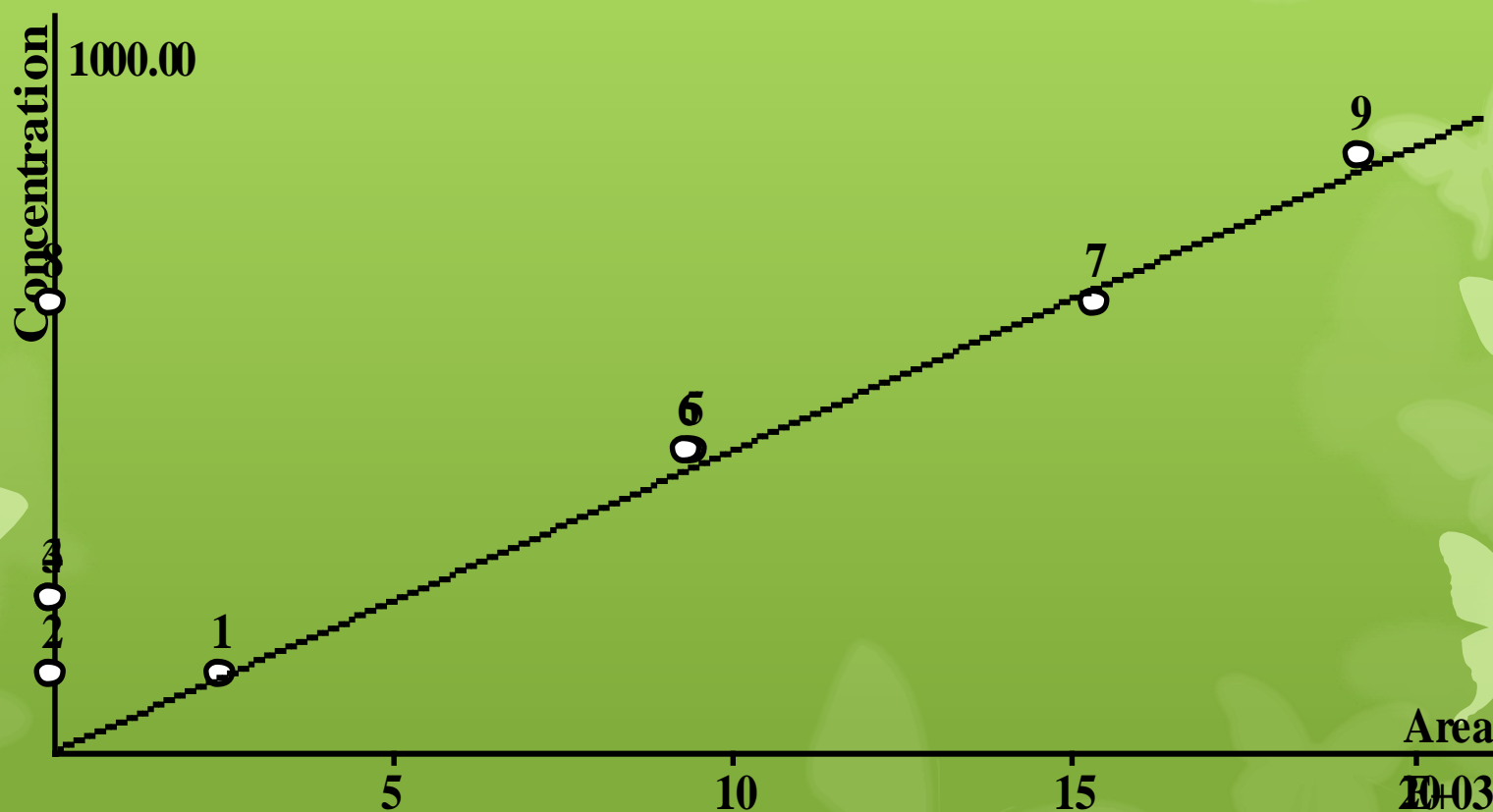
Konstruisanje kalibracionih dijagrama

Pri datim uslovima kao i načinu pripreme standardnih rastvora, snimljeni su hromatogrami standardnih rastvora ispitivane supstance (nikosulfurona). Dobijeni hromatogrami prikazani na slikama 1-5. Hromatogrami standardnih rastvora nikosulfurona su snimani tri puta i za dalji proračun korišćene su srednje vrednosti (površine pika) za svaku pojedinačnu koncentraciju.

HPLC hromatogram standardnog rastvora nikosulfurona koncentracije 100 mg/l



Na osnovu dobijenih vrednosti iz površine pika za svaku koncentraciju standardnog rastvora nikosulfurona konstruisan je kalibracioni dijagram, predstavljen na slici



Kalibraciona prava predstavljena na slici može se predstaviti analitičkim izrazom

$$S = A + BC ; R$$

S - površina pika

C- koncentracija

A-odsečak (apsorbancija)

B- koeficijent pravca

R- korelacioni koeficijent

Parametri dobijeni sa kalibracionog dijagrama su:

$$RSD = 4.007\%$$

$$R = 0.99754$$

$$C = 0.82016$$

$$A = 0$$

$$k_1 = 0.82016$$

$$S = 0 + 1/k_1 * C$$

PRIMERI PRIMENE

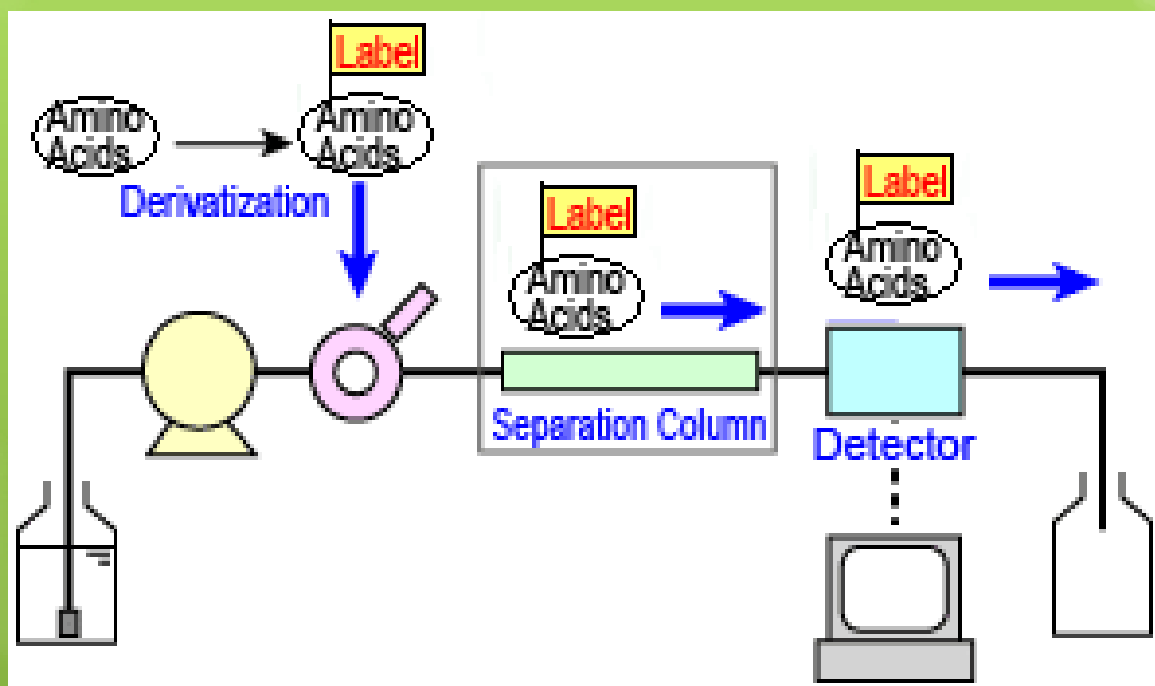
HPLC chromatogram SLEPE PROBE (bazna linija)

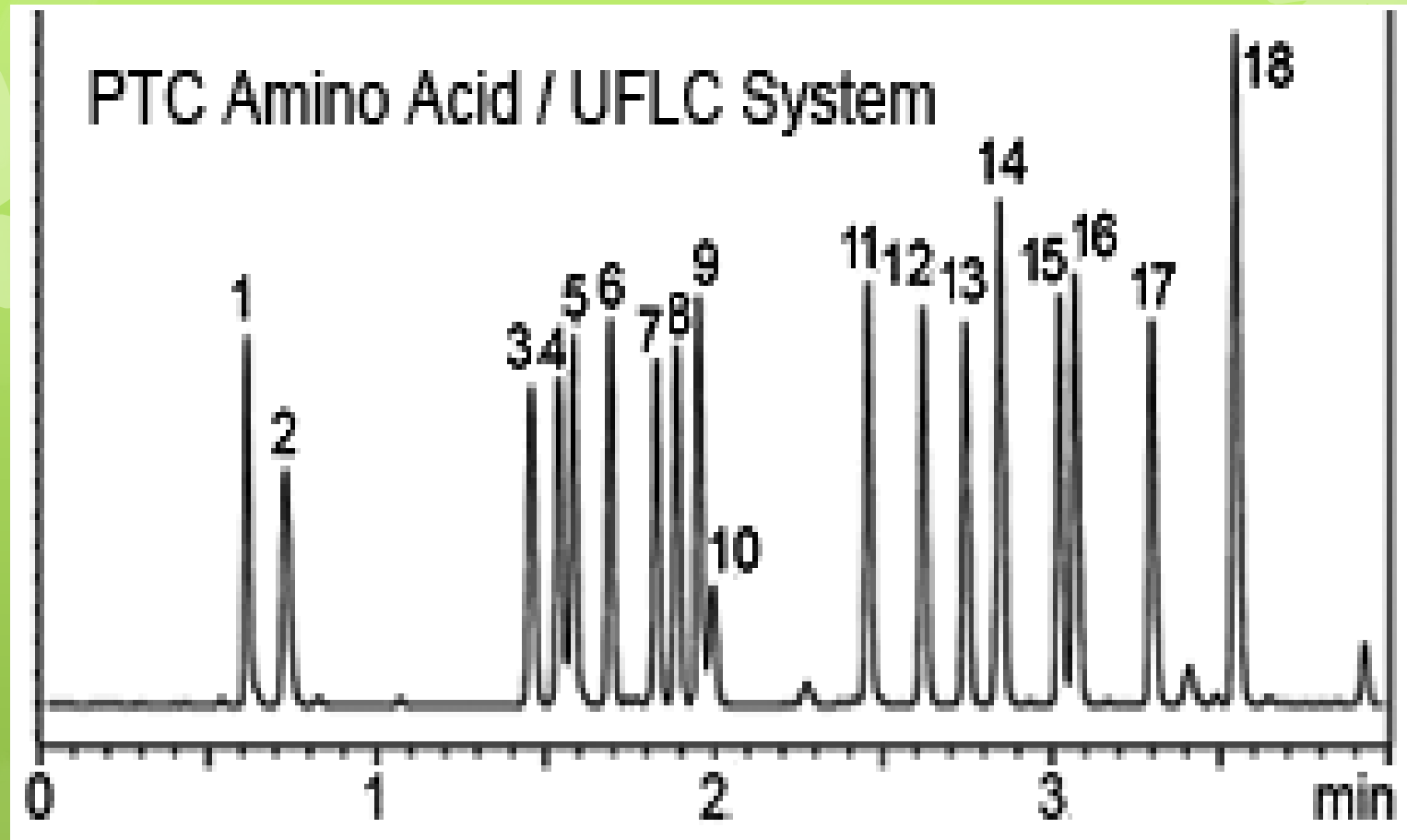


AMINOKISELINE

Predkolonska derivatizacija

o-phthalaldehyde, phenyl isothiocyanate (PITC), fluorescamine, dansyl chloride



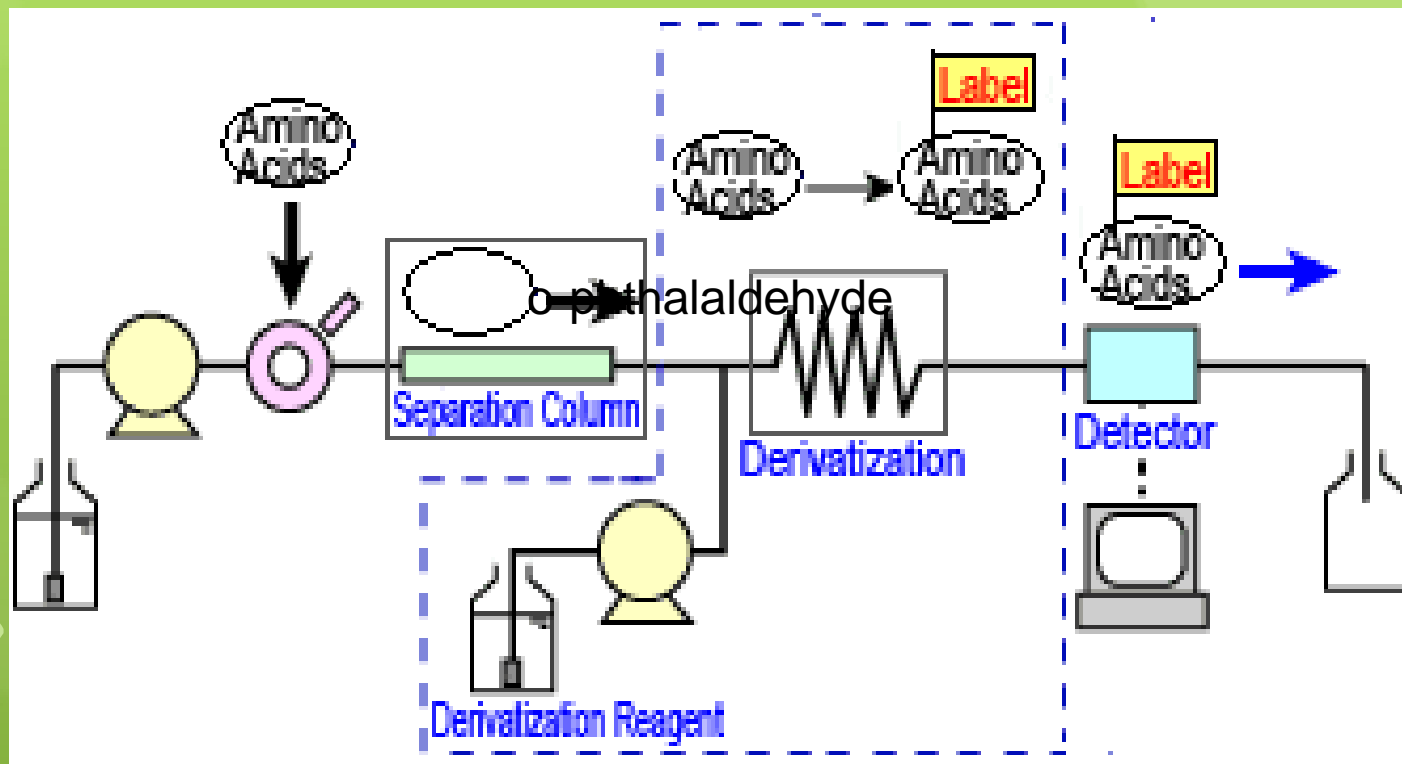


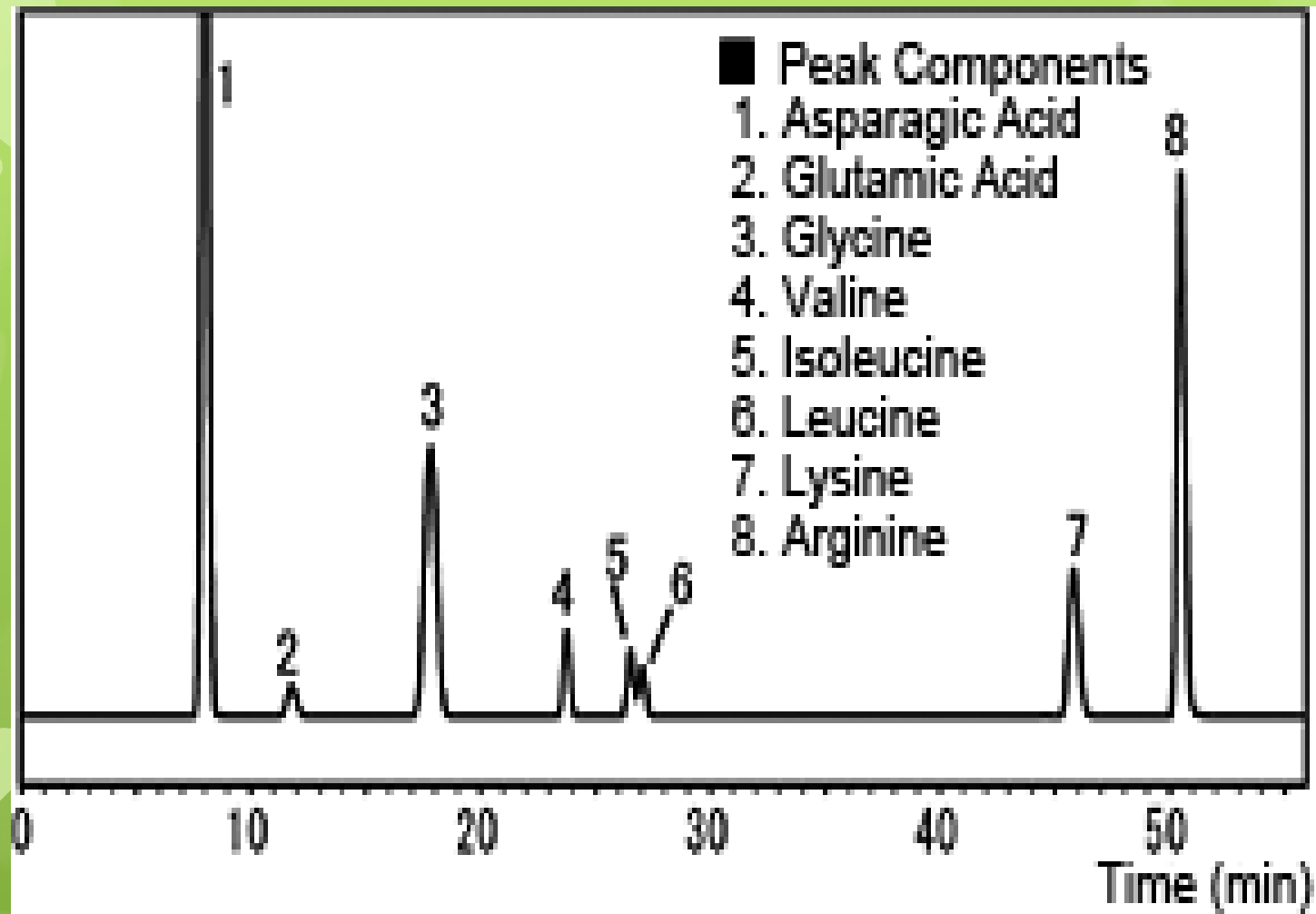
1. L-Aspartate, 2. L-Glutamate, 3. L-Serine, 4. Glycerin, 5. L-Histidine, 6. L-Arginine, 7. L-Threonine, 8. L-Alanine, 9. L-Proline, 10. Ammonia, 11. L-Tyrosine, 12. L-Valine, 13. L-Methionine, 14. L-Cysteine, 15. L-Isoleucine, 16. L-Leucine, 17. L-Phenylalanine, 18. L-Lysine

AMINOKISELINE

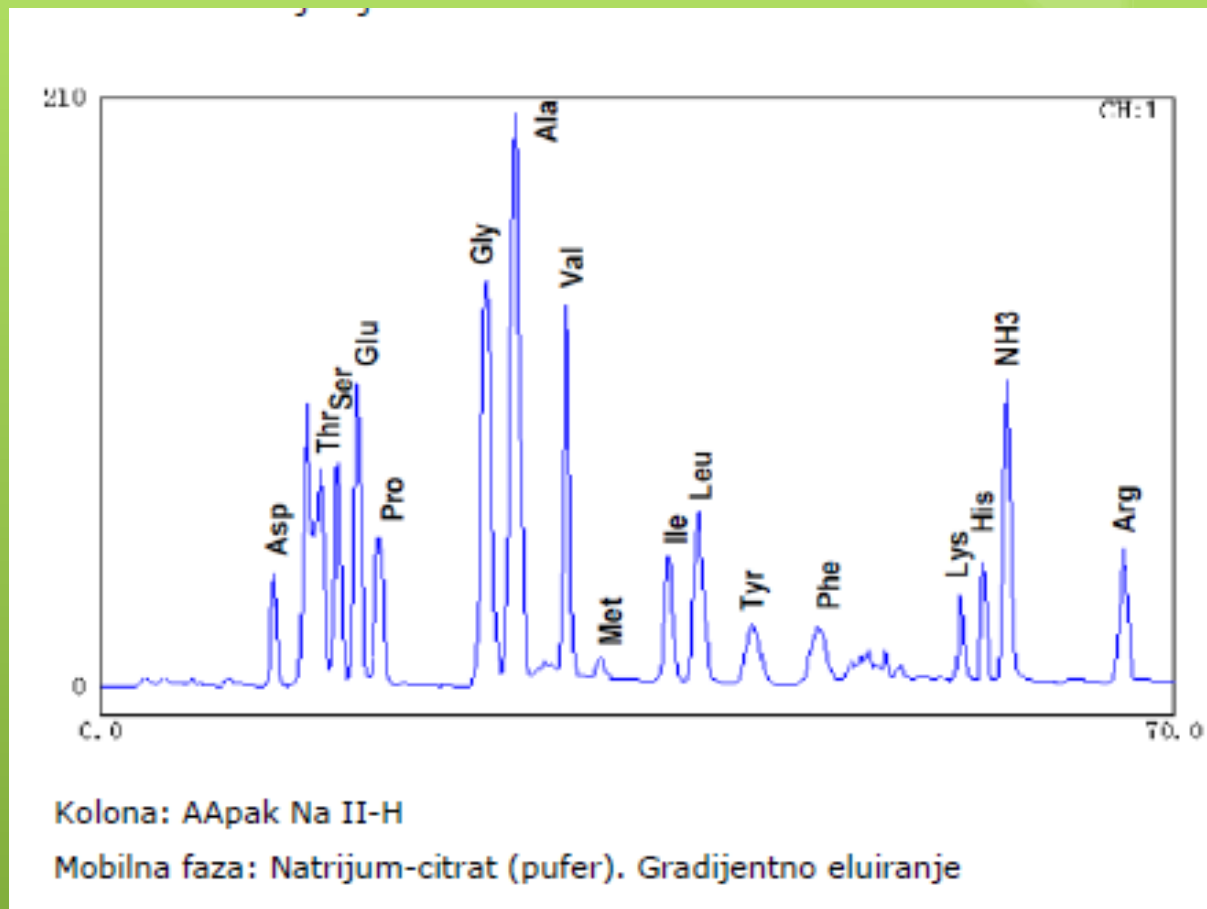
Postkolonska derivatizacija

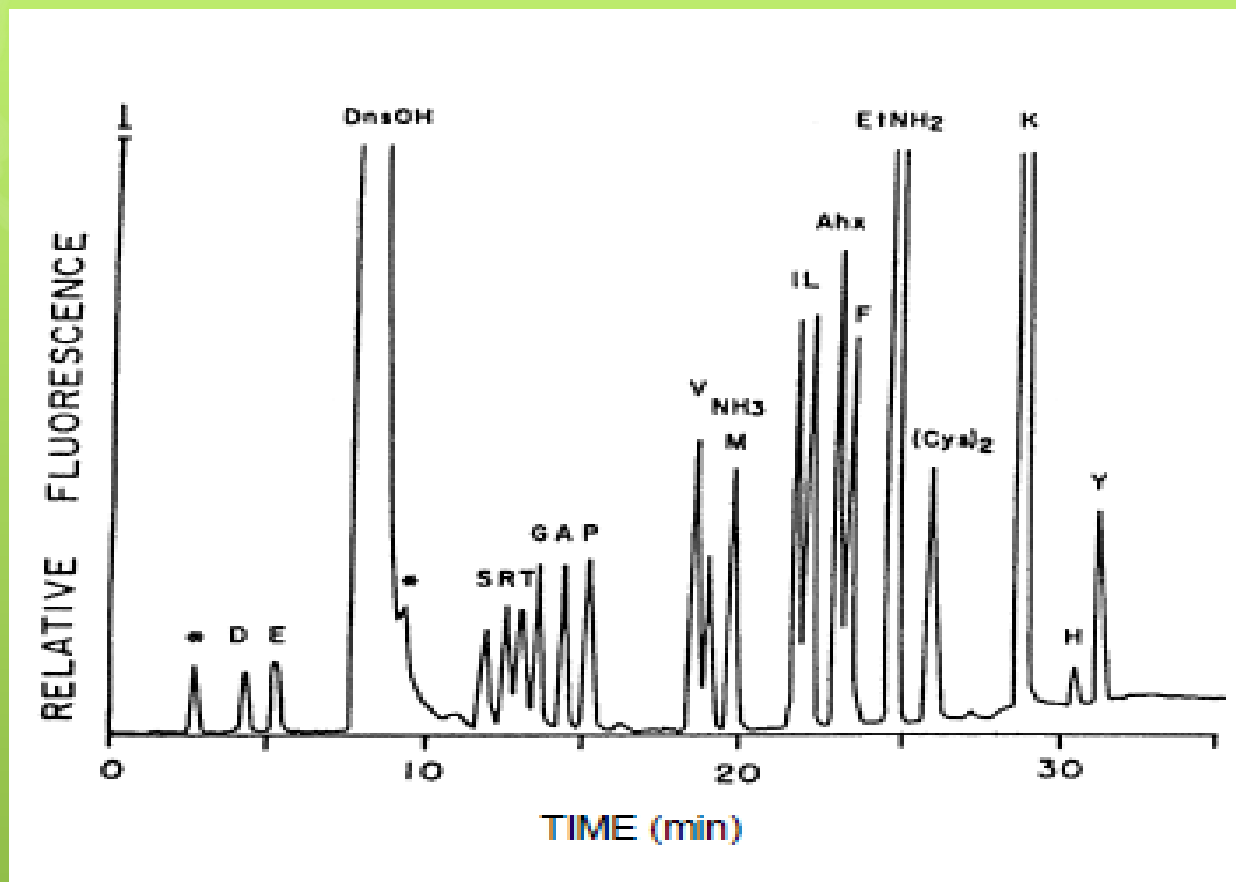
o-phthalaldehyde



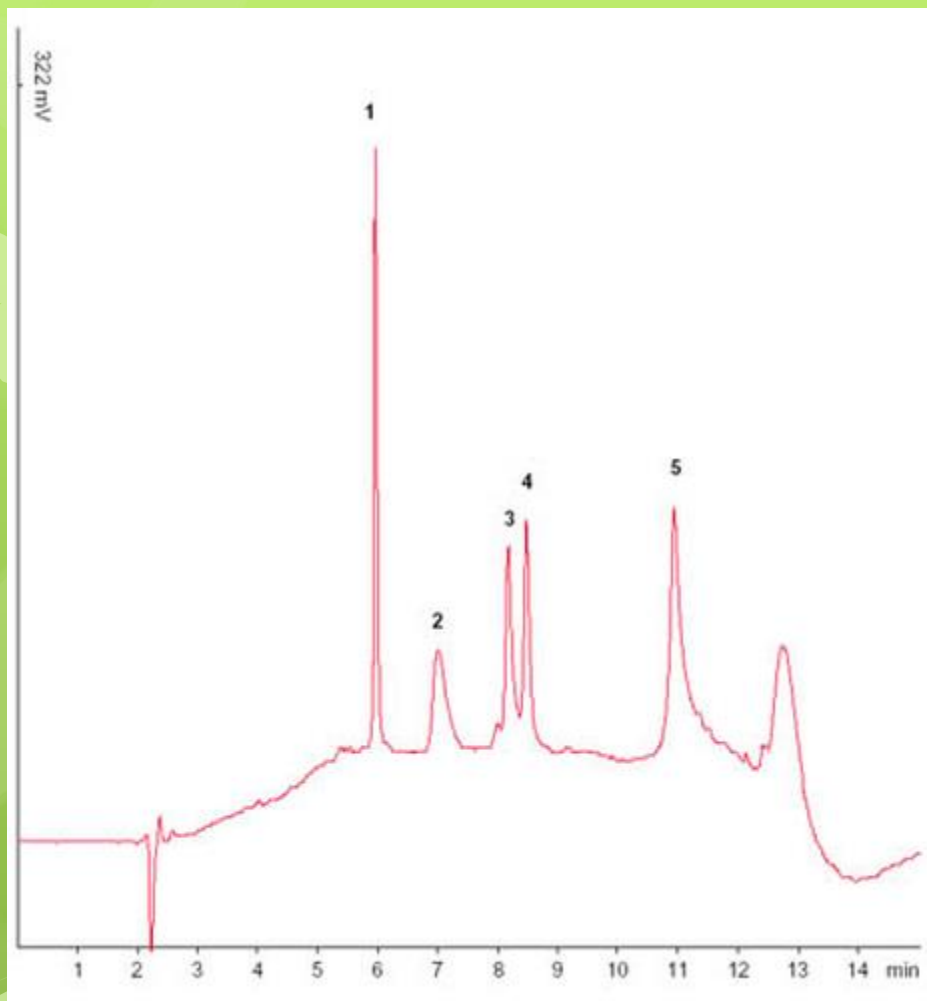


HPLC -IC hromatogram aminokiselina





C18; Gradient; Fluorescentna detekcija (318 nm, 455 nm)



- 1: Cytochrome c
- 2: Fibrinogen, human
- 3: Chymotrypsinogen
- 4: b-Lactoglobulin
- 5: Thyroglobulin

C18; Gradient; UV detekcija (220 nm);