

# 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, identifikaciju i određivanje komponenti u smeši. Komponente smeše se razdvajaju na osnovu različitih koeficijenata raspodele između 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:

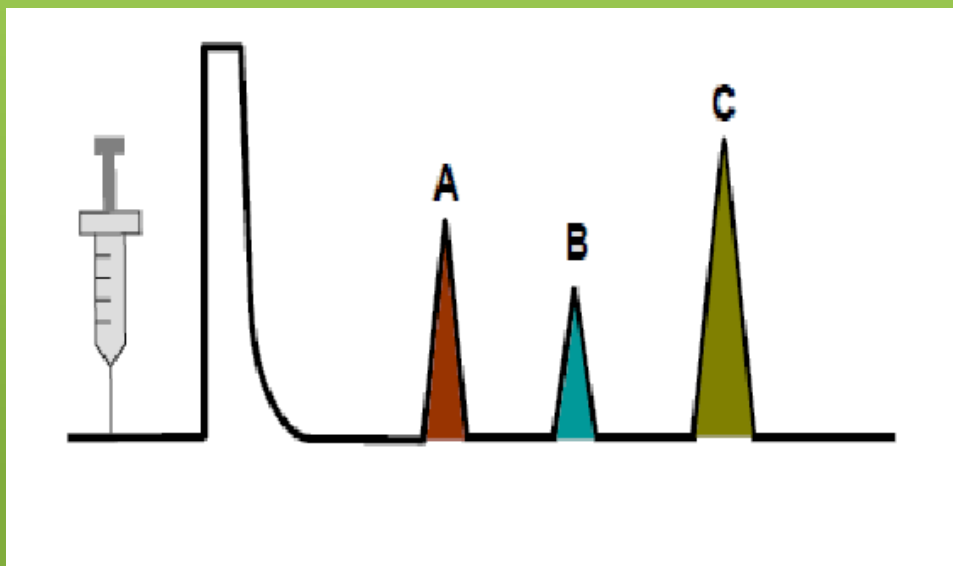
Eluirajuća

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

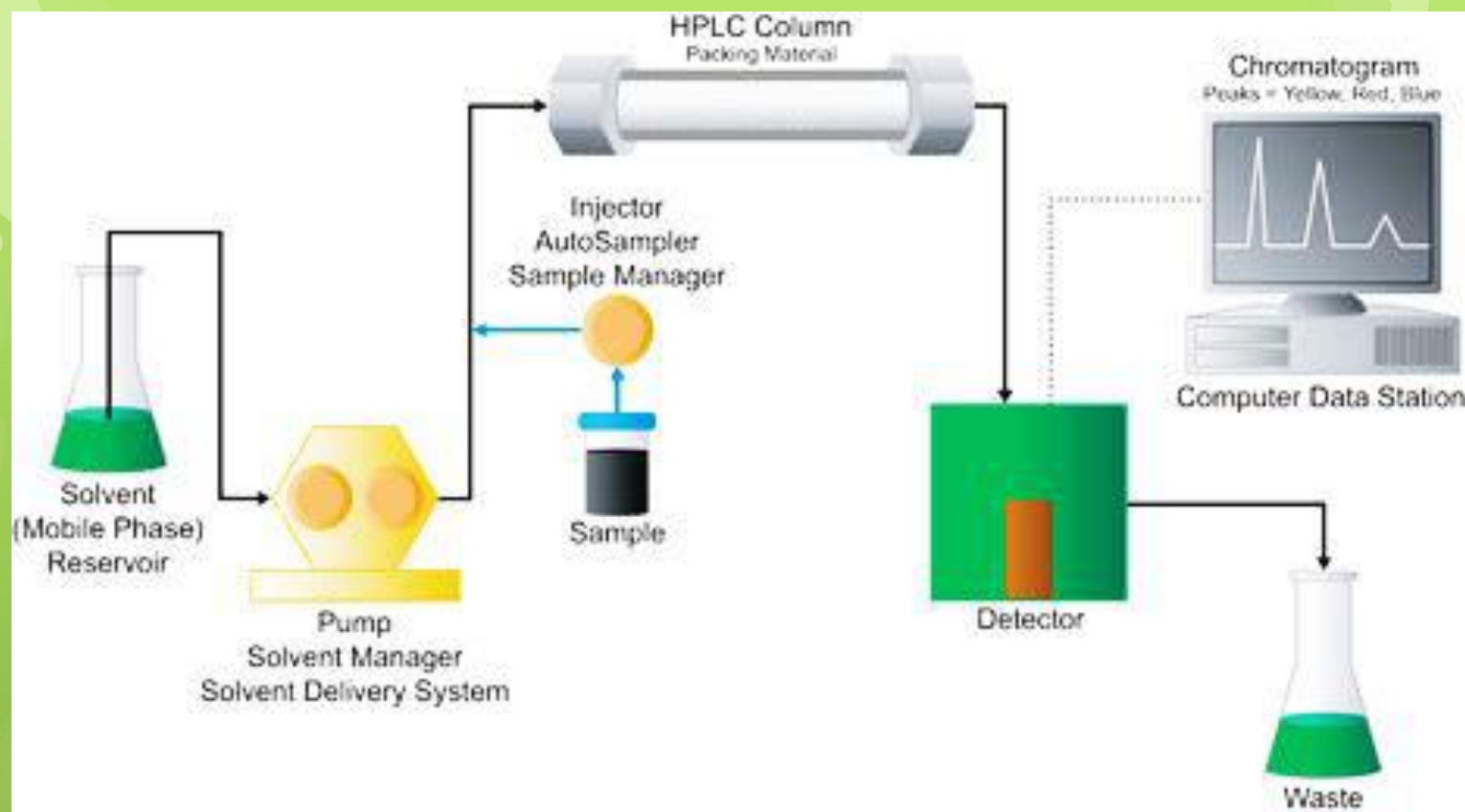
Četiri osnovna tipa HPLC su sledeća:

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:

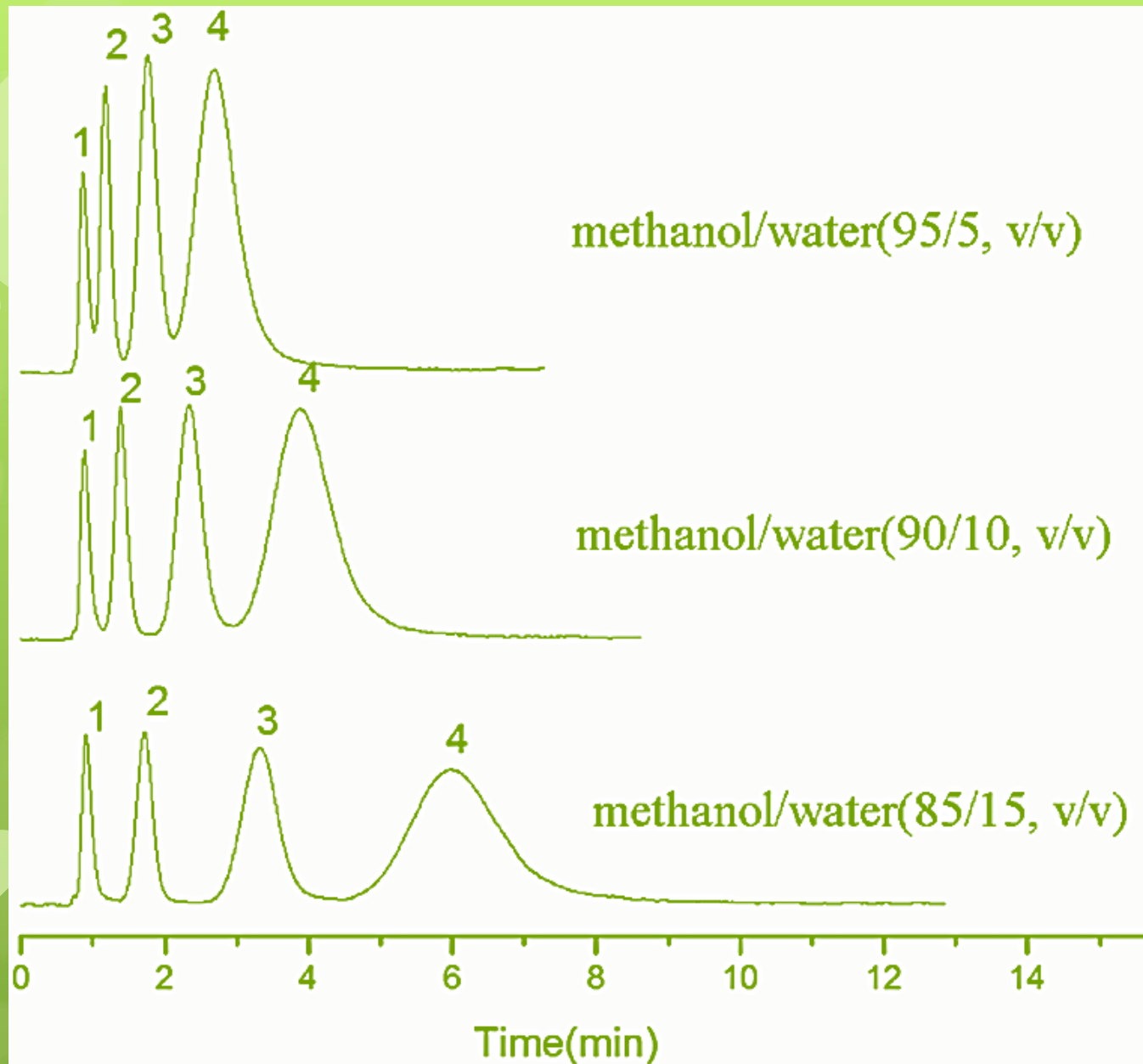
- brzinu protoka od 0.1 do 10ml/min
- kontrolu i reproduktivnost protoka
- visoke pritiske
- postizanje bezpulsirajućeg režima rada ili protok sa minimumom pulsacija



## 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:

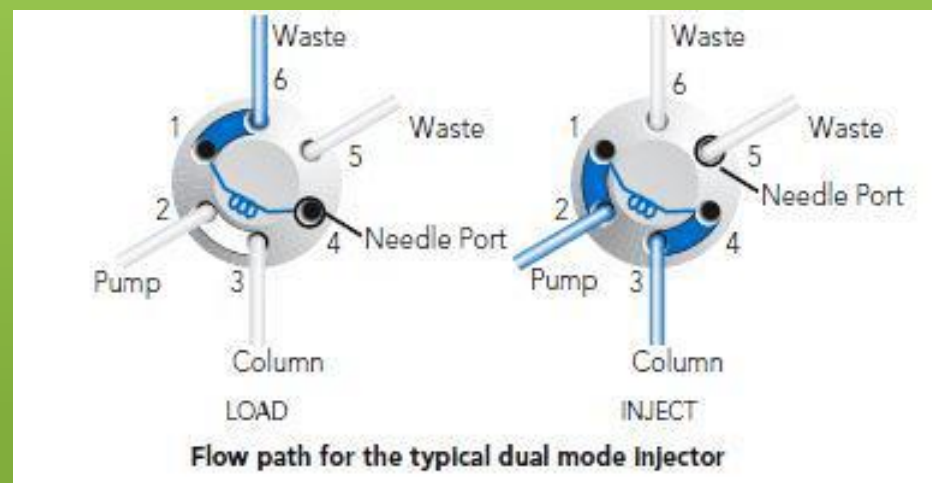
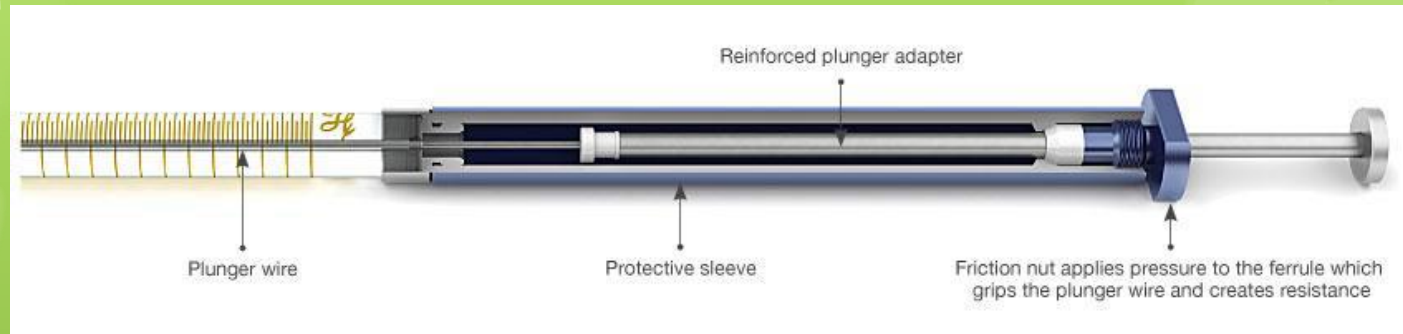
- ne menja karakteristike kolone
- bude kompatibilna sa detektorom
- rastvara uzorak
- ima malu viskoznost
- ima malu viskoznost
- omogućava ponovnu regeneraciju uzorka(ukoliko je potrebno)
- bude bez stranih primesa(HPLC čistoće), i
- bude komercijalno dostupna





Injekcioni sistem služi za unošenje uzorka u struju pokretne faze.

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



# KOLONE

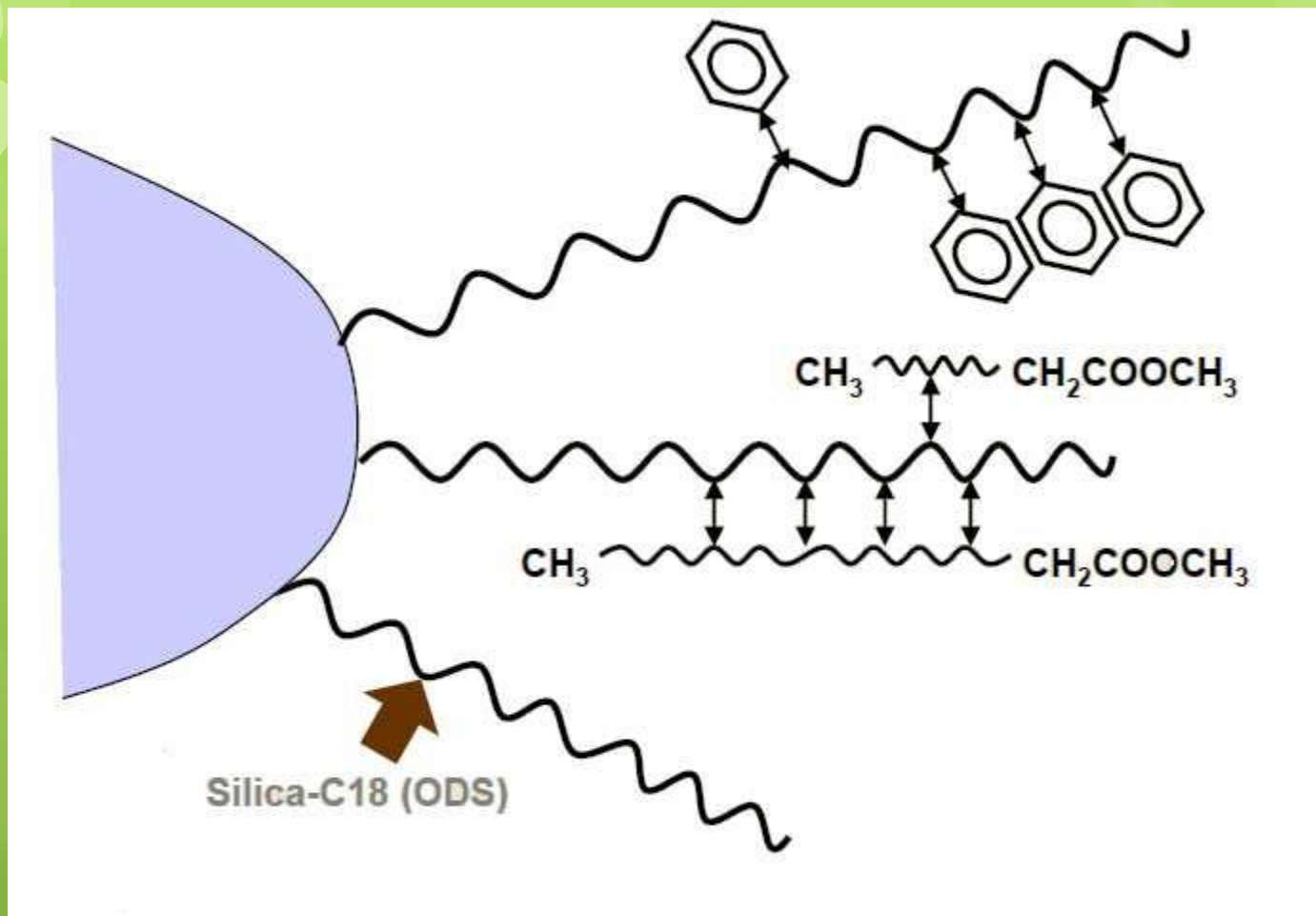
Kolone su cevi od nerđajućeg čelika (ili stakla) sa urezanim navojima na krajevima tako da se zašrafljivanjem mogu pričvrstiti na odgovarajuće mesto u termostatiranom prostoru hromatografa. Kolona je ispunjena granulama nepokretne faze (čvrstog adsorbensa) od čijeg hemijskog sastava zavisi namena kolone 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:

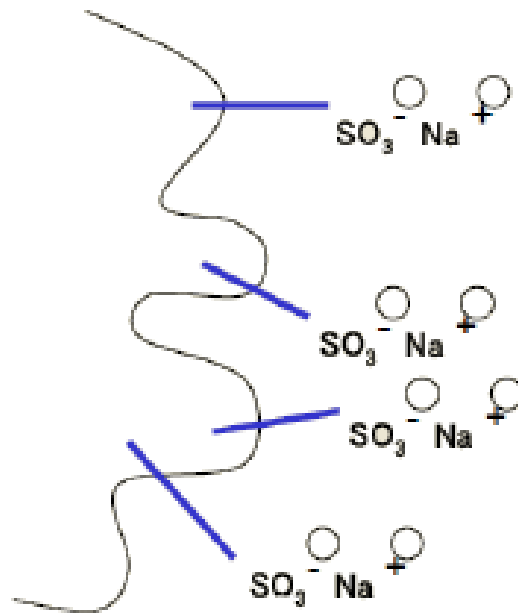
1. analitičke
2. zaštitne (pretkolone)



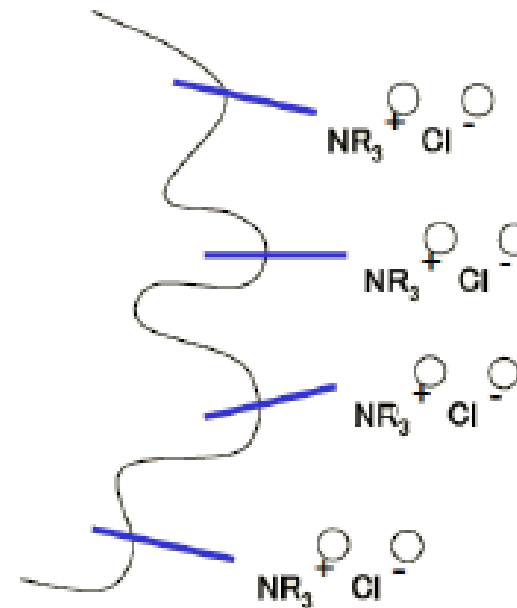
## ADSORPCIONE INTERAKCIJE NA KOLONI



## Gelovi za izmenu jona:



Gel za izmenu katjona



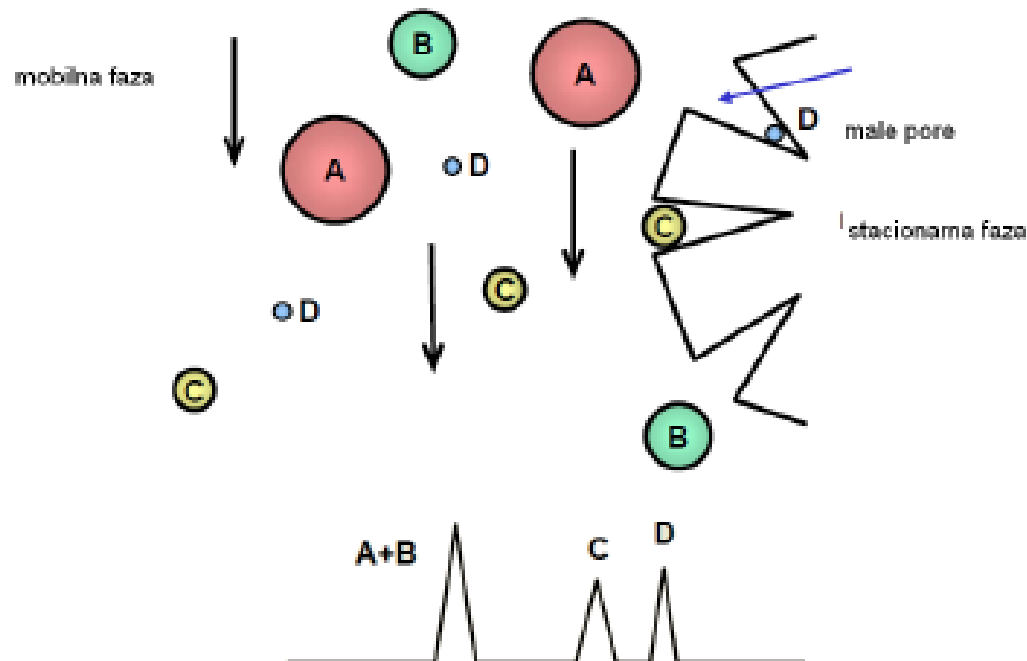
Gel za izmenu anjona

Najčešće se koristi sa konduktometrijskim detektorom.

# Hromatografija zasnovana na veličini molekula

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

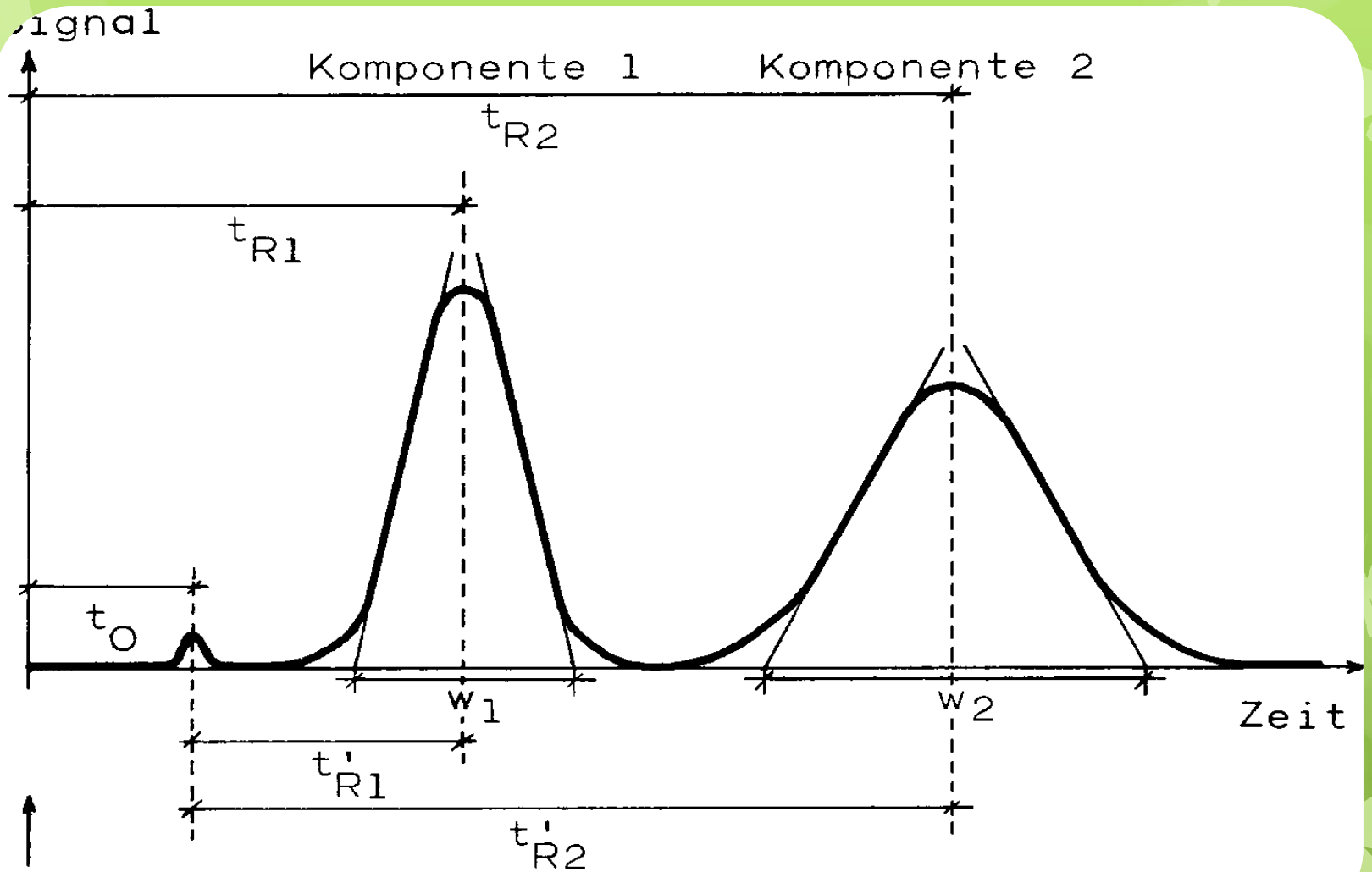
- imaju visoku osetljivost
- mali šum
- mogućnost detektovanja velikog broja jedinjenja
- daju odgovor za svaku supstancu iz smeše
- daju linearan odgovor kao funkciju koncentracije
- odgovor detektora ne zavisi ili slabo zavisi od temperature ili brzine proticanja mobilne faze
- širok opseg linearnosti



| <b>DETEKTOR</b>                   | <b>GRANICA DETEKCije<br/>(mol/L)</b> |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| <b>UV detektori</b>               | $10^{-8}$ - $10^{-9}$                |
| <b>Fluorescentni</b>              | $10^{-12}$                           |
| <b>Na bazi indeksa prelamanja</b> | $10^{-6}$                            |
| <b>Elektrohemijski</b>            | $10^{-9}$                            |
| <b>Radiohemijski</b>              | $10^{-9}$ - $10^{-10}$               |
| <b>Maseno-spektrometrijski</b>    | $10^{-8}$ - $10^{-9}$                |

# 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.

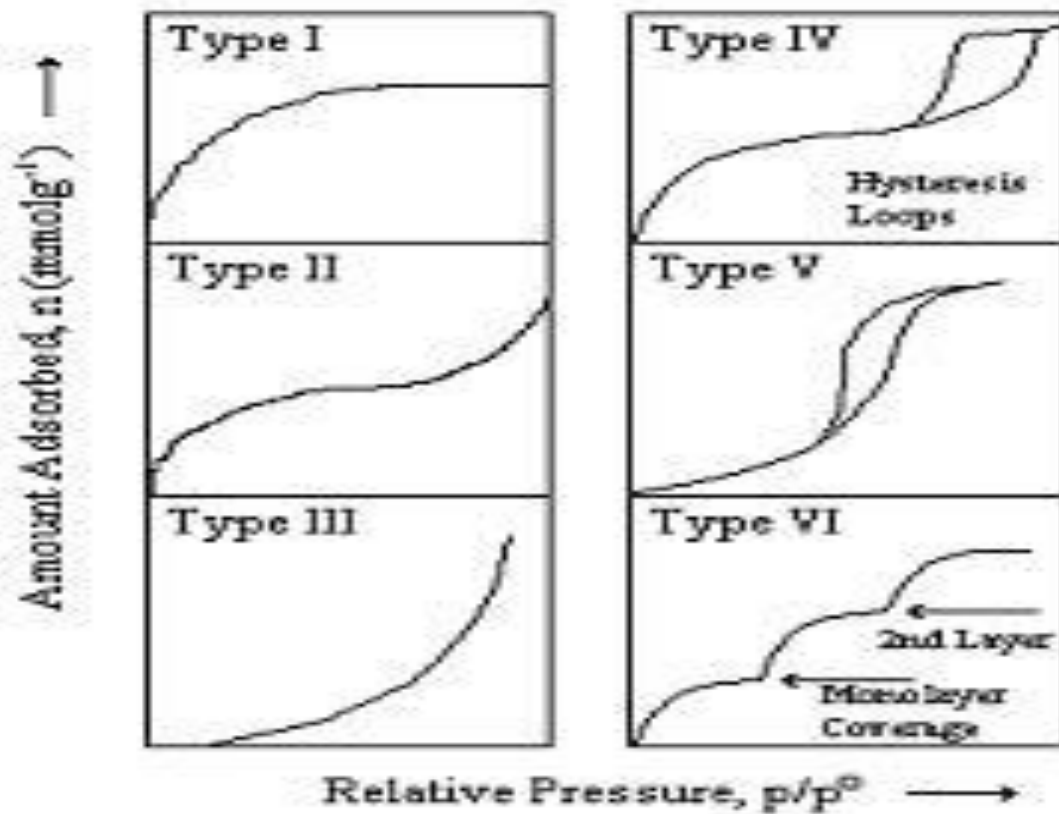


Probenaufnahme

Probenaufnahme

$f_{BS}$

| <b>Karakteristika</b>                        | <b>Hemisorpcija</b>                           | <b>Fizisorpcija</b>                         |
|--|---|---|
| <b>Tip</b>                                   | Monoslojna                                    | Višeslojna                                  |
| <b>Tip veze</b>                              | Kovalentna                                    | Vandervalsove sile                          |
| <b>Temperatura</b>                           | Visoke temperature                            | Temperature ispod tačke ključanja adsorbata |
| <b>Znak entalpije</b>                        | Negativna                                     | Negativna                                   |
| <b>Entalpija adsorpcije</b>                  | $> 85 \text{ kJ/mol}$                         | $< 40 \text{ kJ/mol}$                       |
| <b>Uticaj prirode adsorbata i adsorbensa</b> | Zavisi od prirode adsorbata i adsorbensa      | Zavisi od prirode adsorbensa                |
| <b>Reverzibilnost</b>                        | Ireverzibilna                                 | Reverzibilna                                |
| <b>Energija aktivacije</b>                   | Postoji-aktivirana<br>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  $\mu\text{L}$  , 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  $\mu\text{L}$

Detektor Biscoff lambda 1010

Membranski filter Phenex, RC 0.45  $\mu\text{m}$



# POSTUPAK

Radni uslovi

Kolona Knauer C18, 250 x 4 mm

Eluent 30% Acetonitril / 70% Voda  
(pH 2.5 ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  )

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.

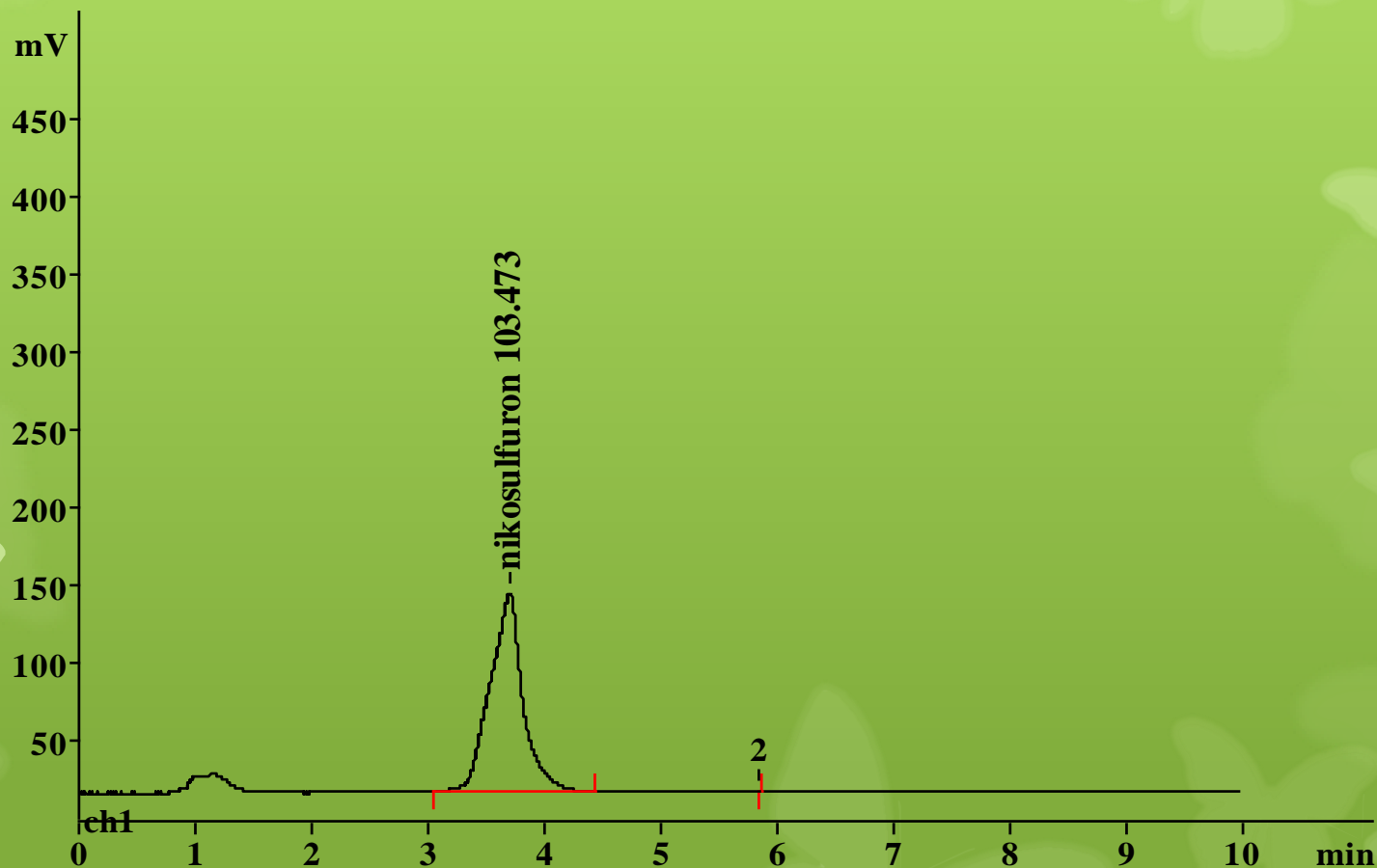
Koncentracija nikosulfurona u rastvorima  
redom je 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L,  
600 mg/L, 800 mg/L.

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

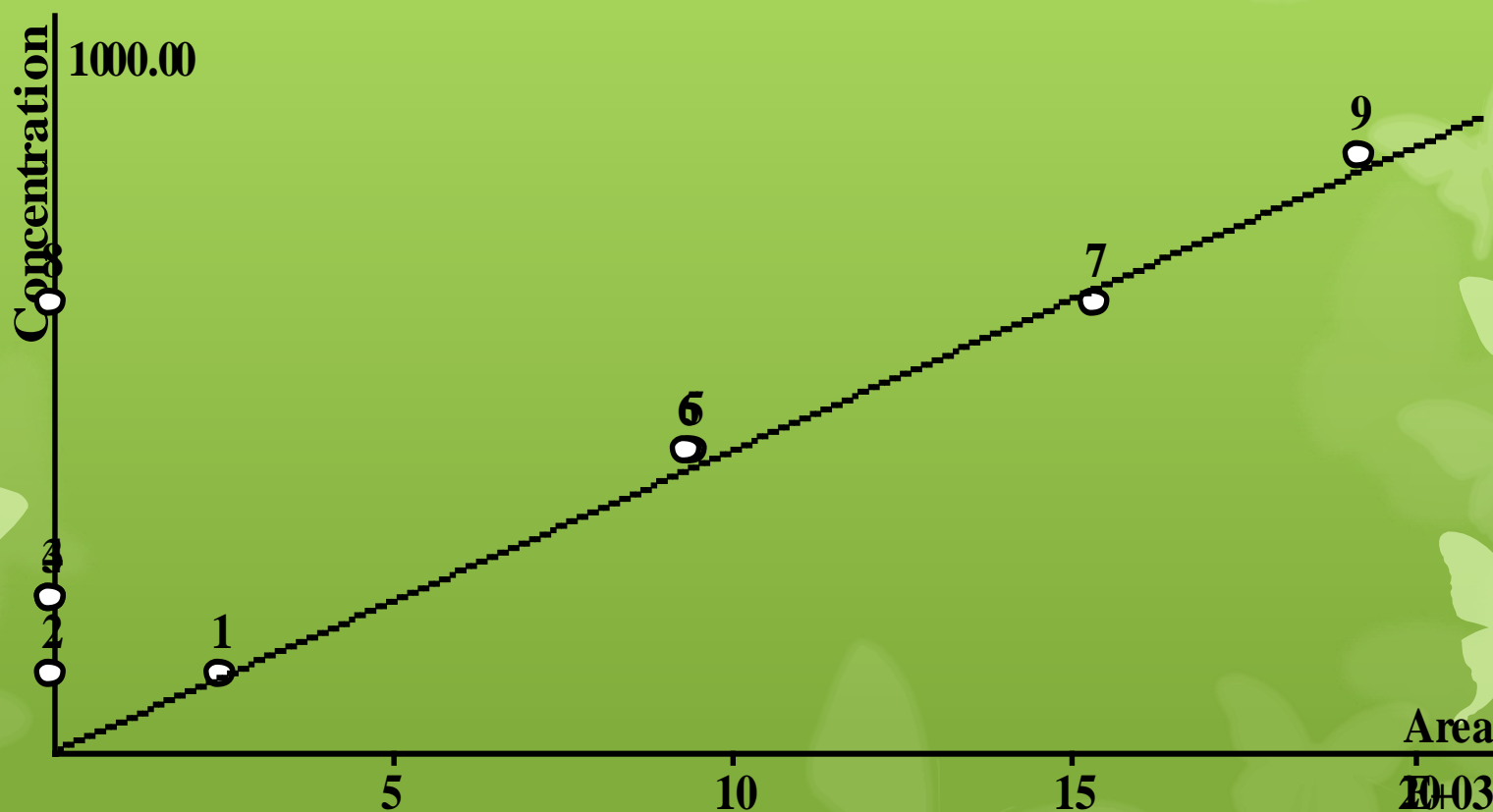
## Konstruisanje kalibracionih dijagrama

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)

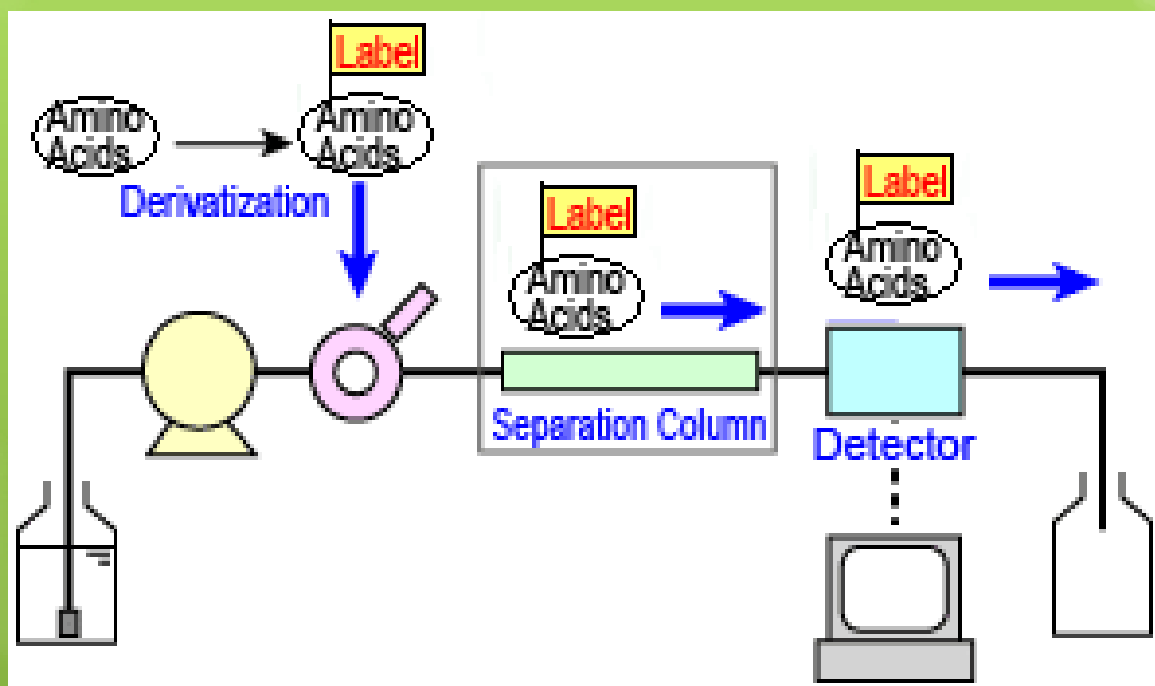


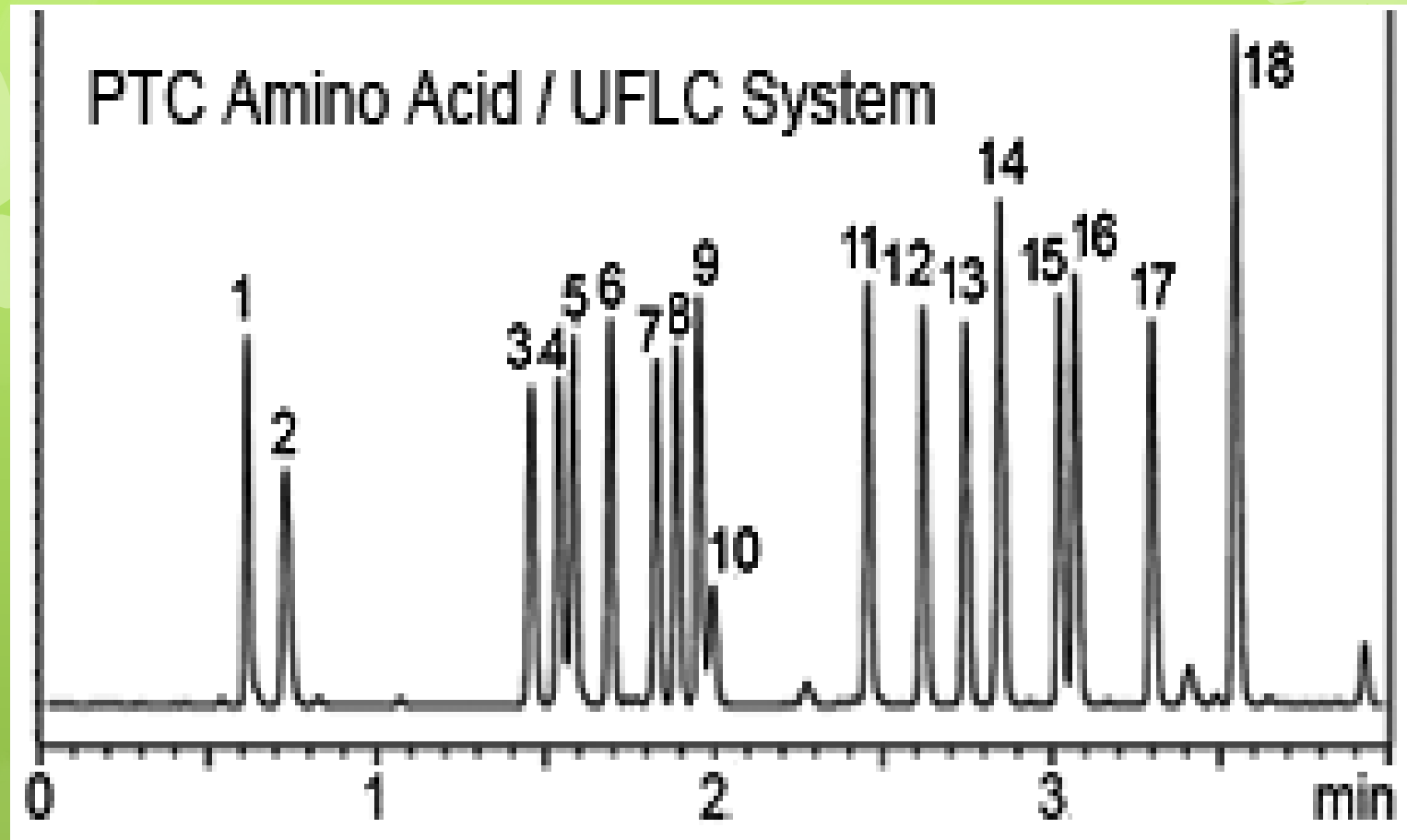


# AMINOKISELINE

## Predkolonska derivatizacija

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



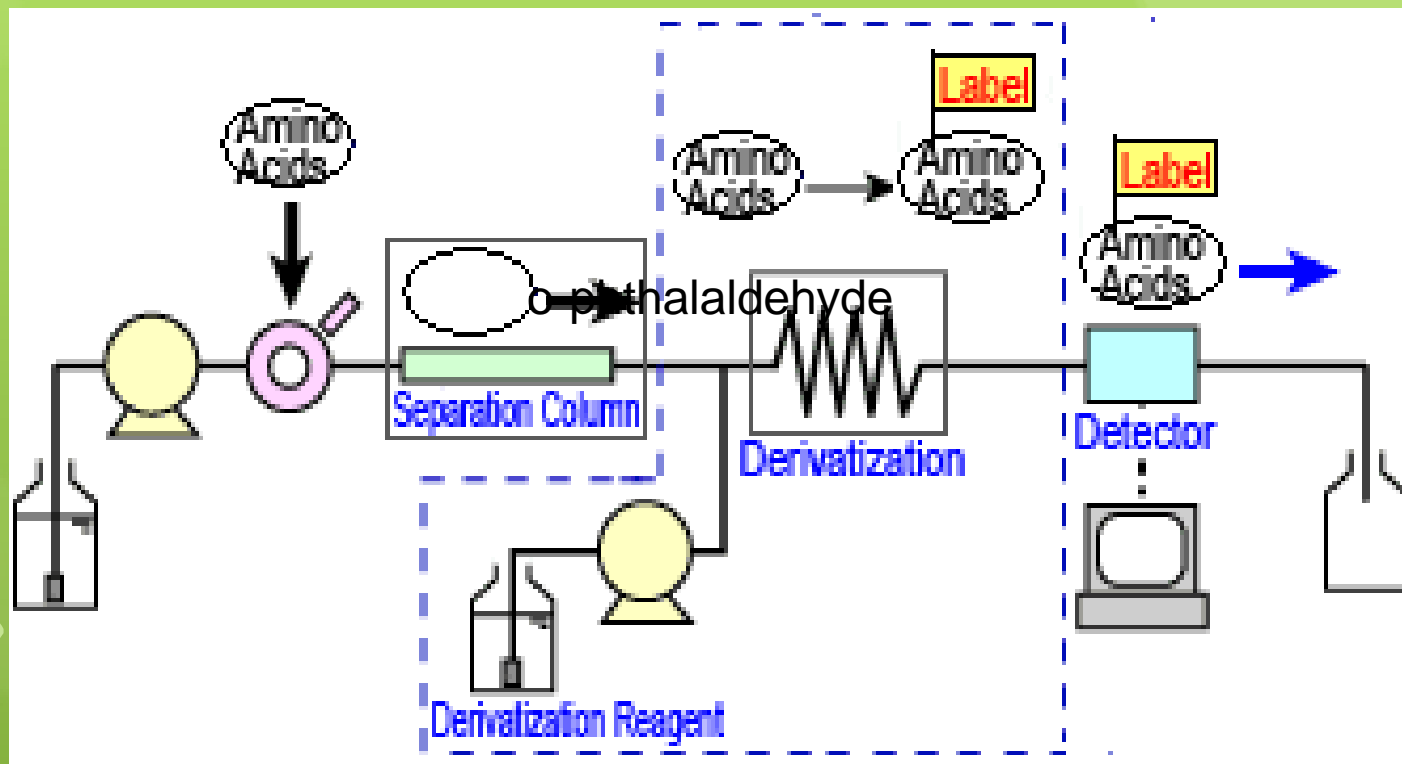


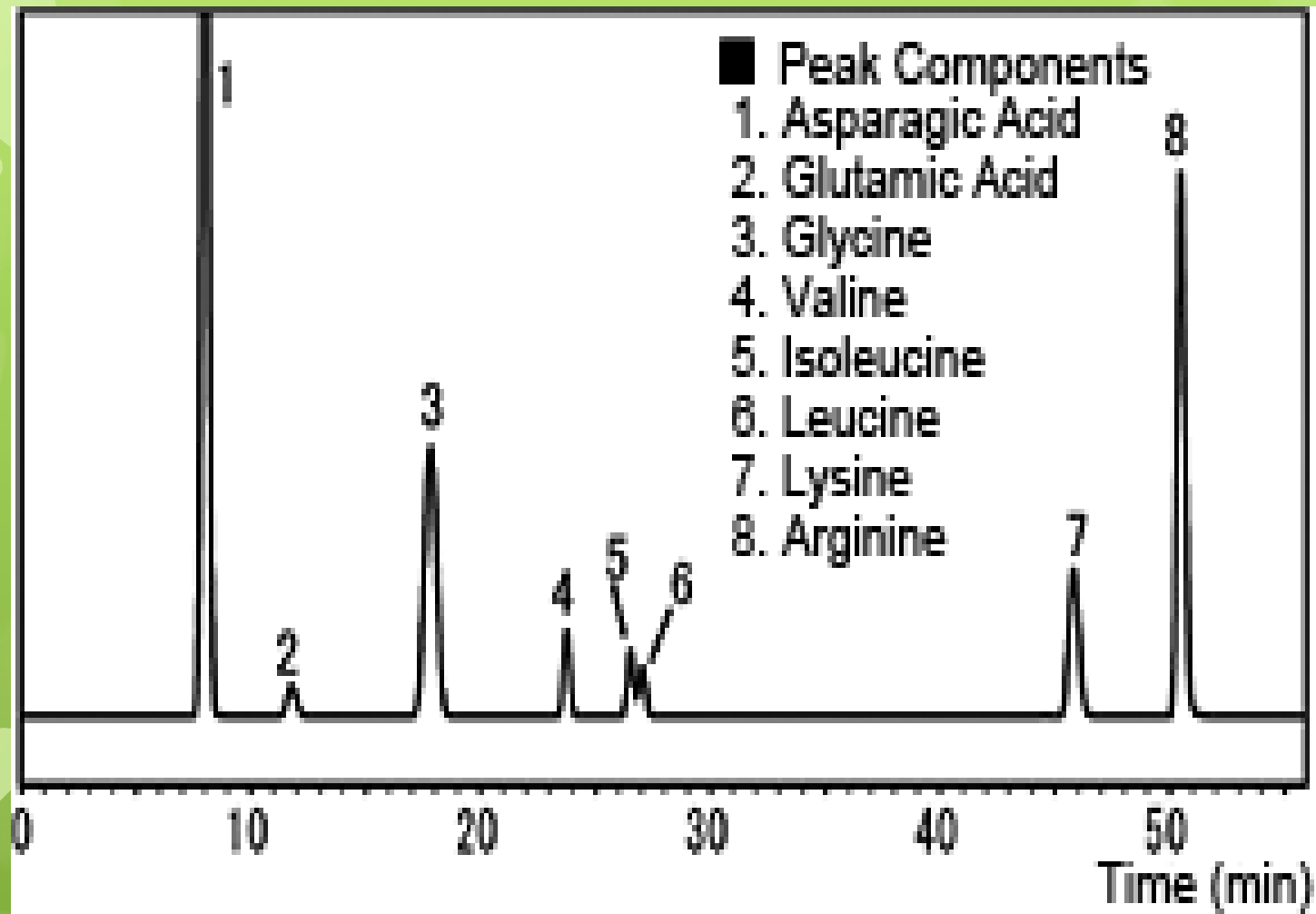
1. L-Aspartate, 2. L-Glutamate, 3. L-Serine, 4. Glycerin, 5. L-Histidine, 6. L-Arginine, 7. L-Threonine, 8. L-Alanine, 9. L-Proline, 10. Ammonia, 11. L-Tyrosine, 12. L-Valine, 13. L-Methionine, 14. L-Cysteine, 15. L-Isoleucine, 16. L-Leucine, 17. L-Phenylalanine, 18. L-Lysine

# AMINOKISELINE

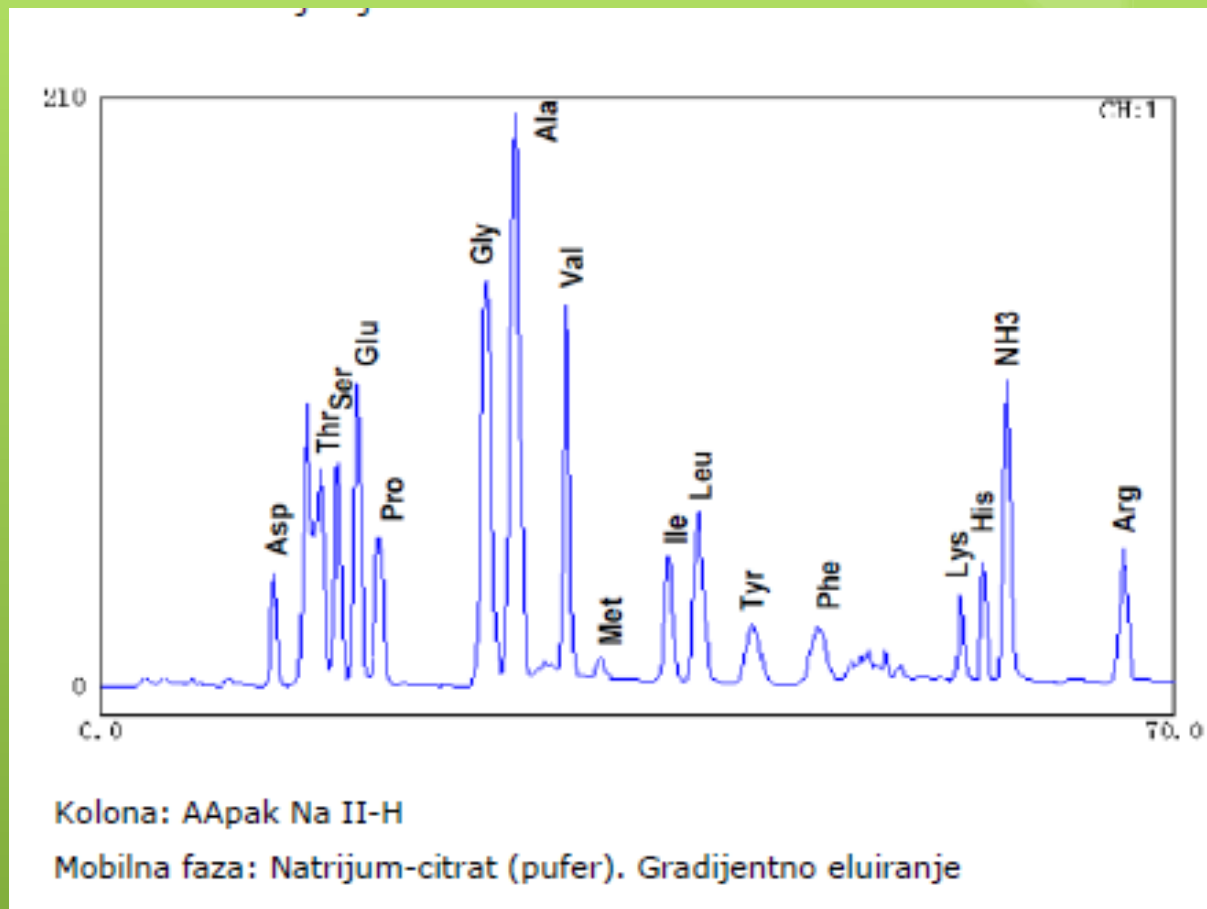
## Postkolonska derivatizacija

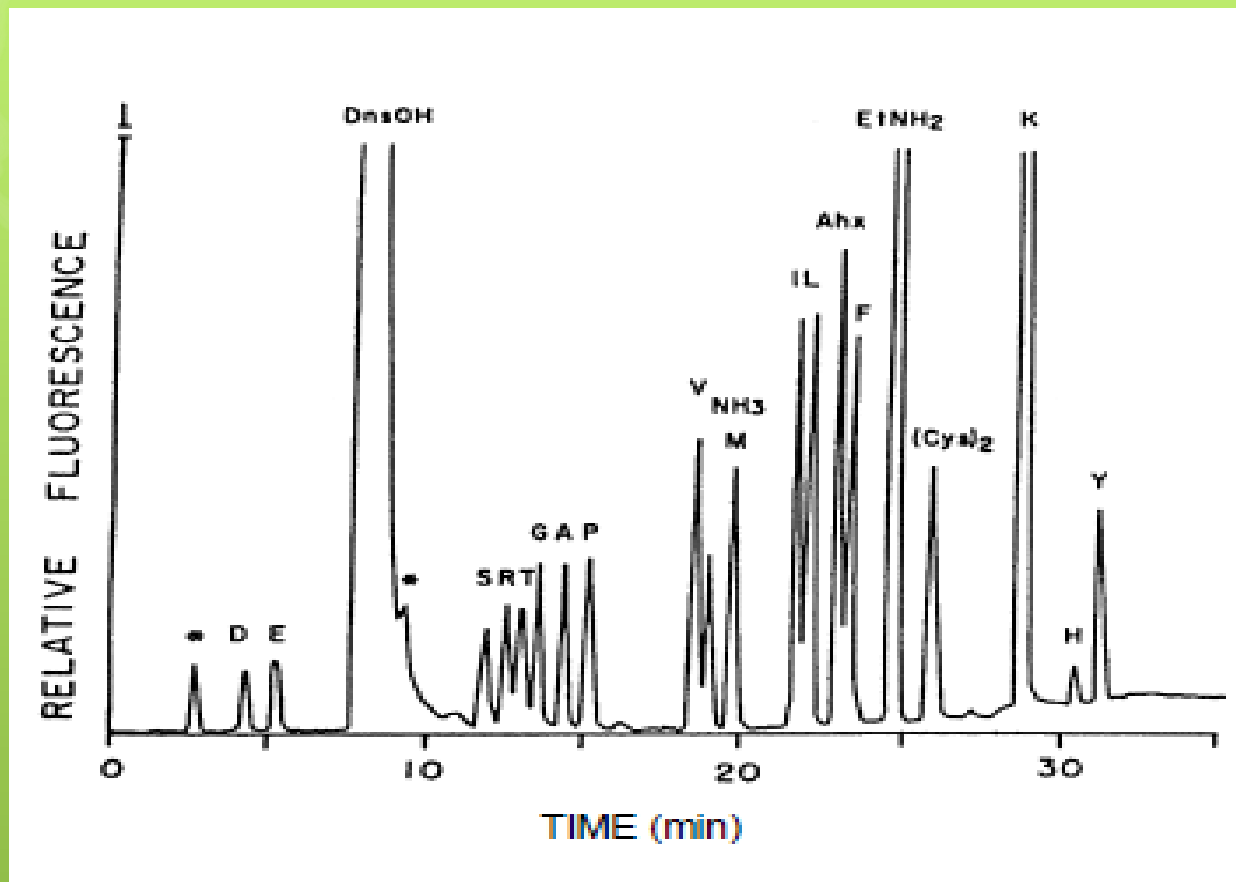
o-phthalaldehyde



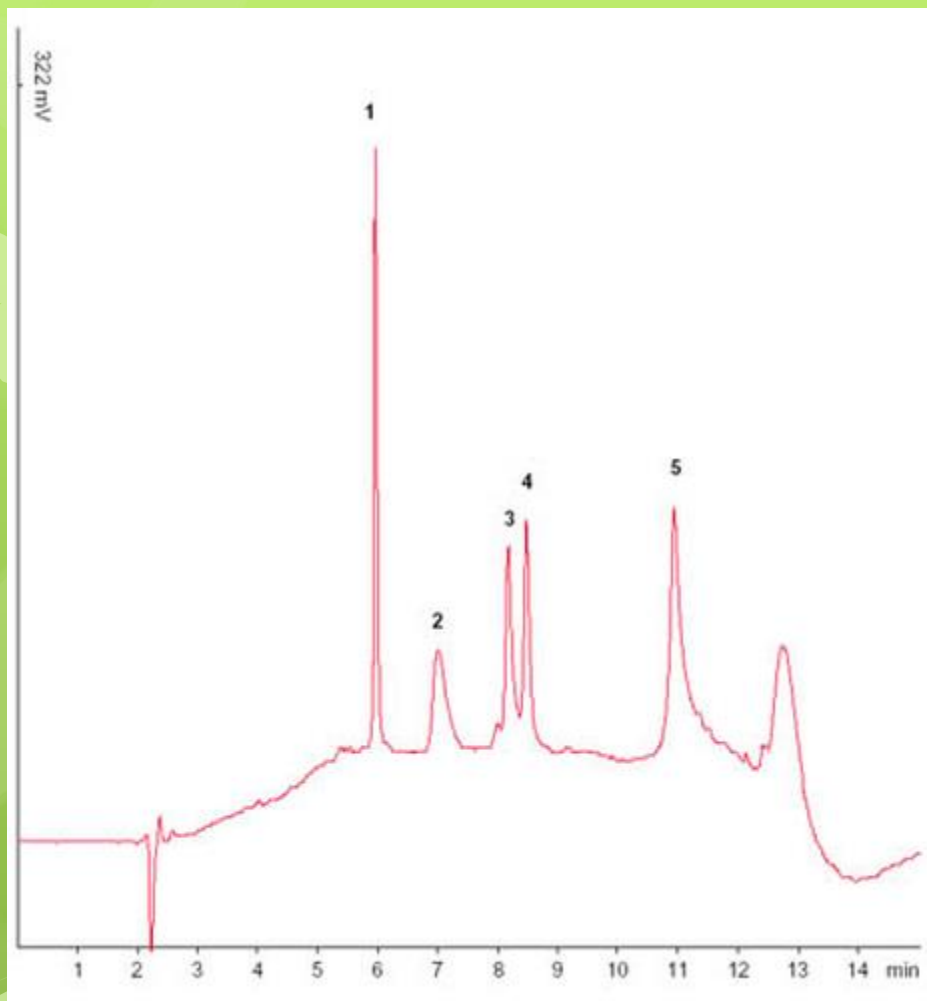


# HPLC -IC hromatogram aminokiselina





C18; Gradijent; 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);