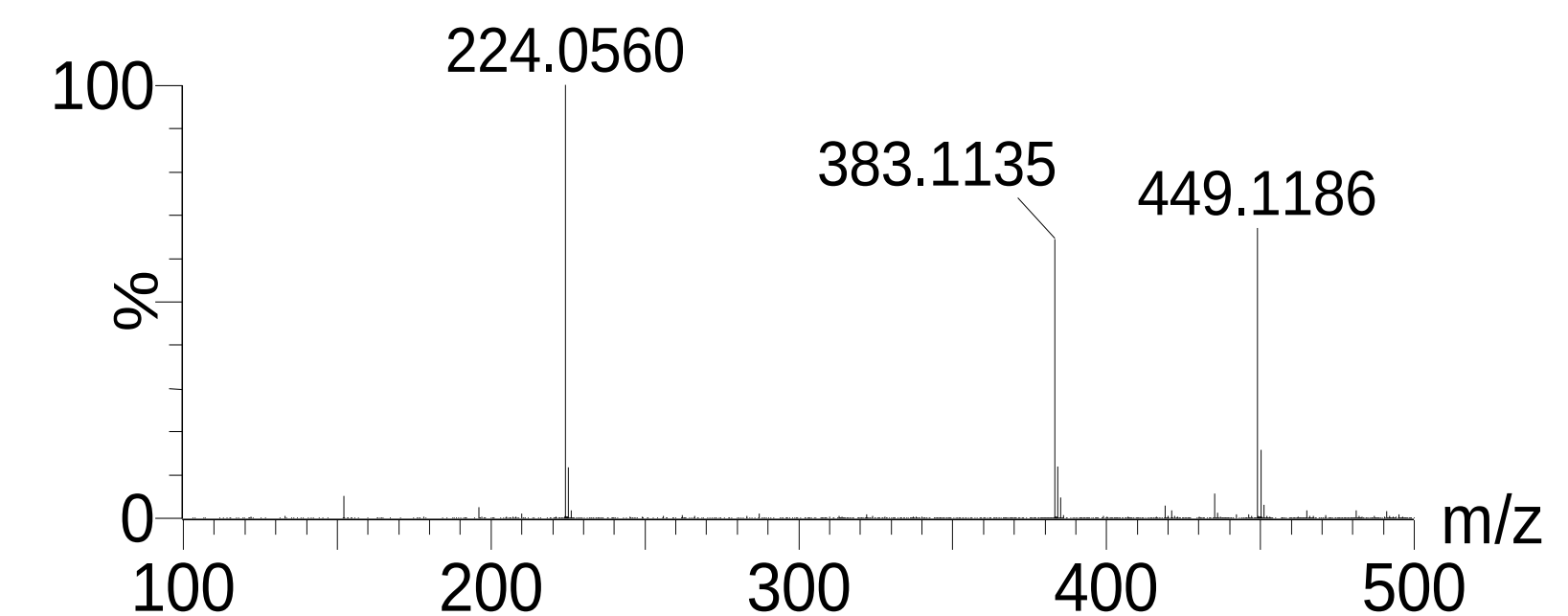
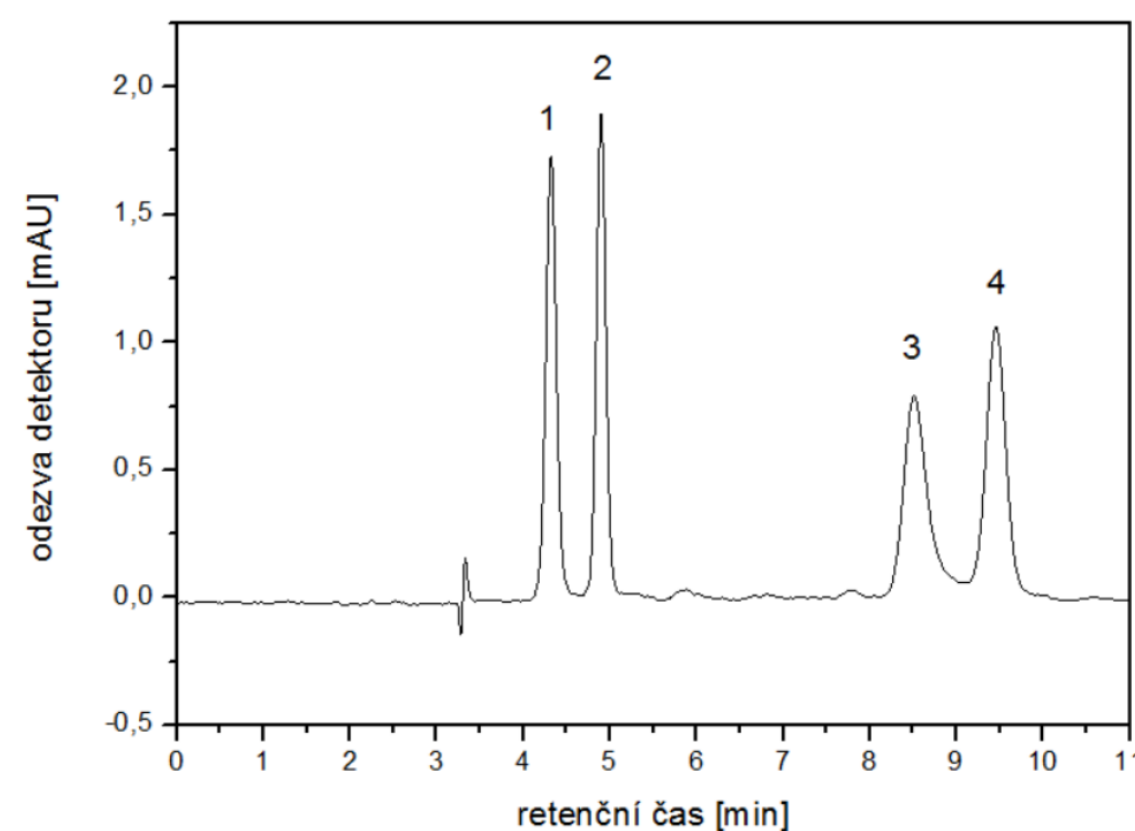


PŘEHLED CHROMATOGRAFICKÝCH METOD V ANALYTICKÉ CHEMII

Repetitorium chemie (20/04/2023)



Lukáš Cudlman



PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova



ÚOCHB AV
ČR
IOCB PRAGUE

Sylabus přednášky

- Historie, princip a teorie chromatografických metod
- Planární metody (tenkovrstvá chromatografie) – výpočty
- Kolonové metody (gelová, kapalinová a plynová chromatografie)
- Vývoj a optimalizace chromatografických metod
- Praktická měření (toxiny muchomůrky zelené, lipidy novorozeneckého mázku, antimikrobiální látky v kultivačním médiu bakterií, analýza methanolu a ethanolu)

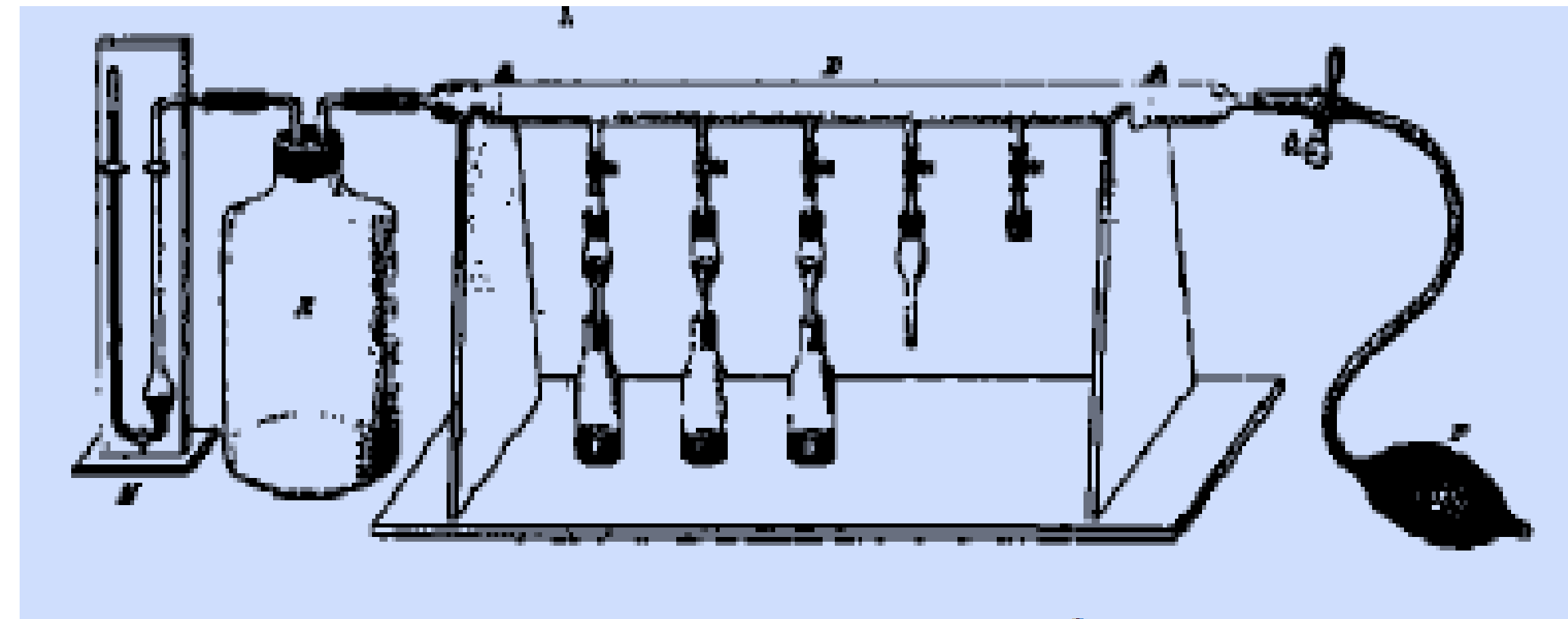
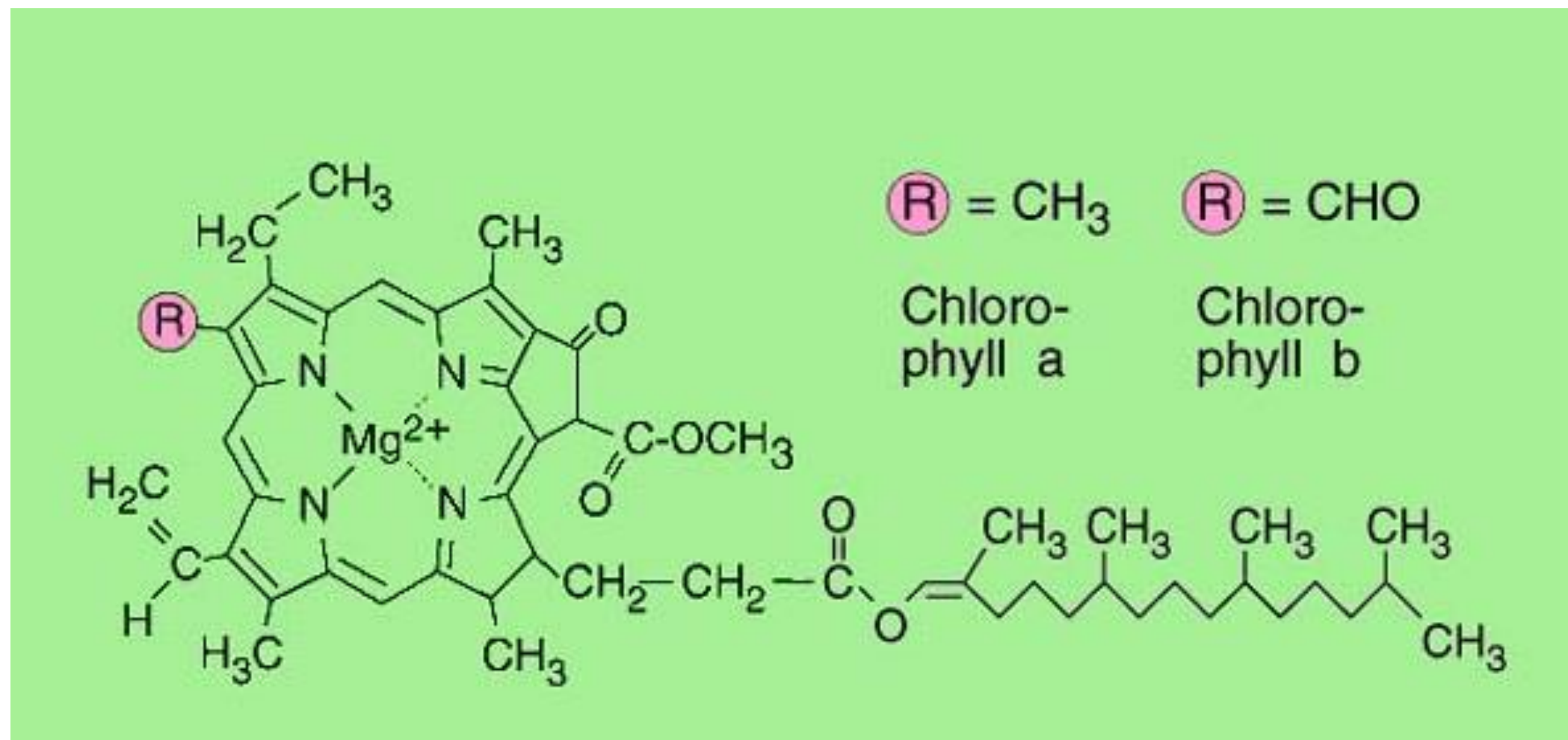
Historie chromatografie

Michail Semjonovič Cvět

- Separace rostlinných pigmentů (chlorofyly, xantofyly a karotenoidy) pomocí jemně práškového CaCO_3 a petroletheru s ethanolem
- Poprvé od sebe oddělil a popsal **chlorofyl a** a **chlorofyl b**

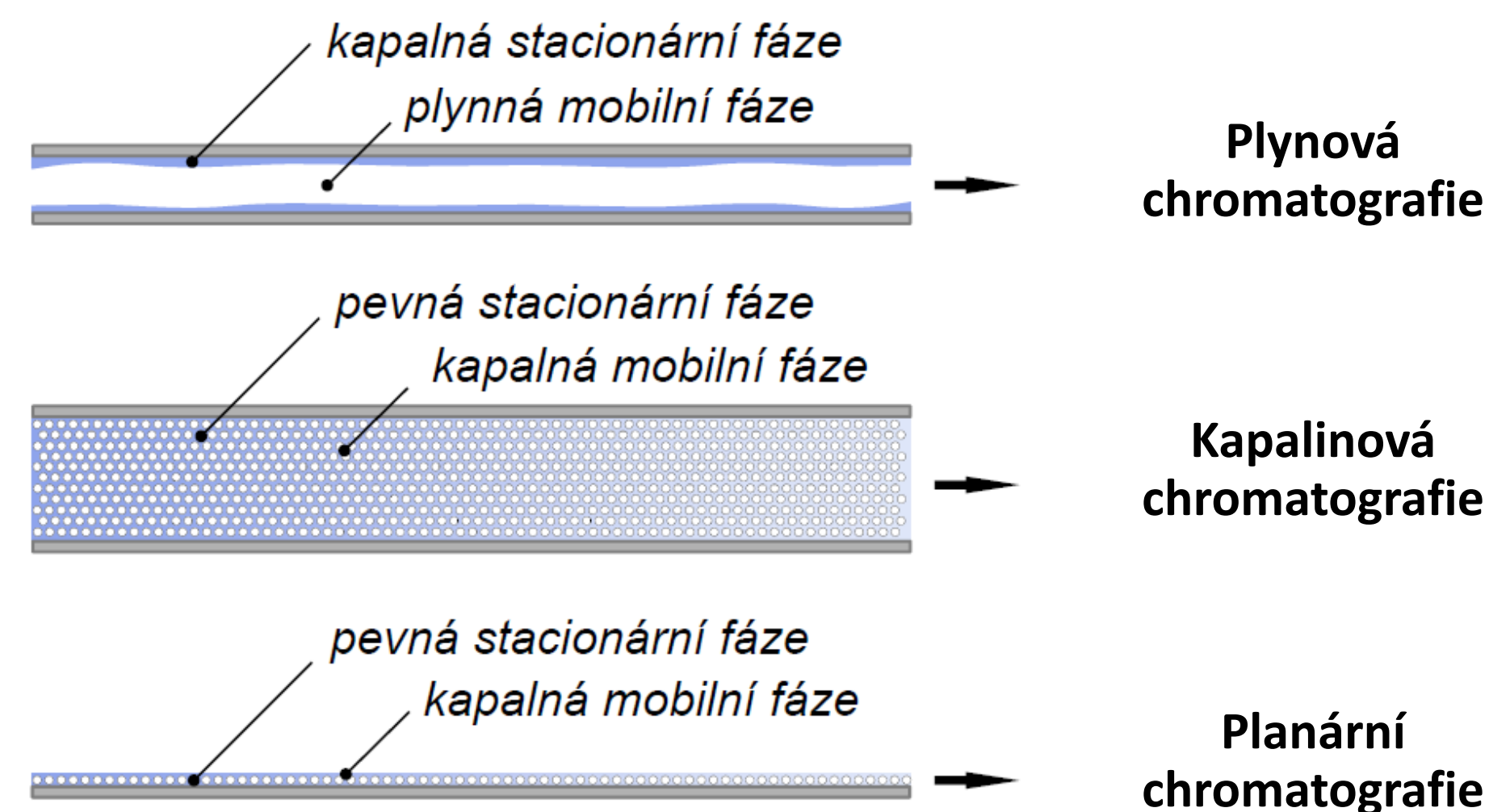


1872 – 1912



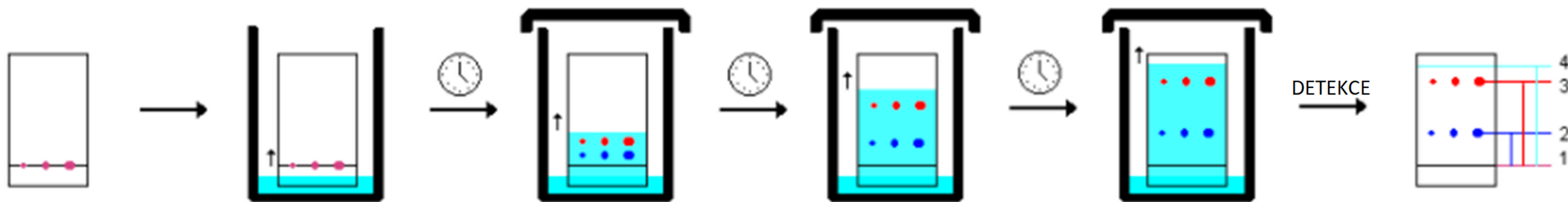
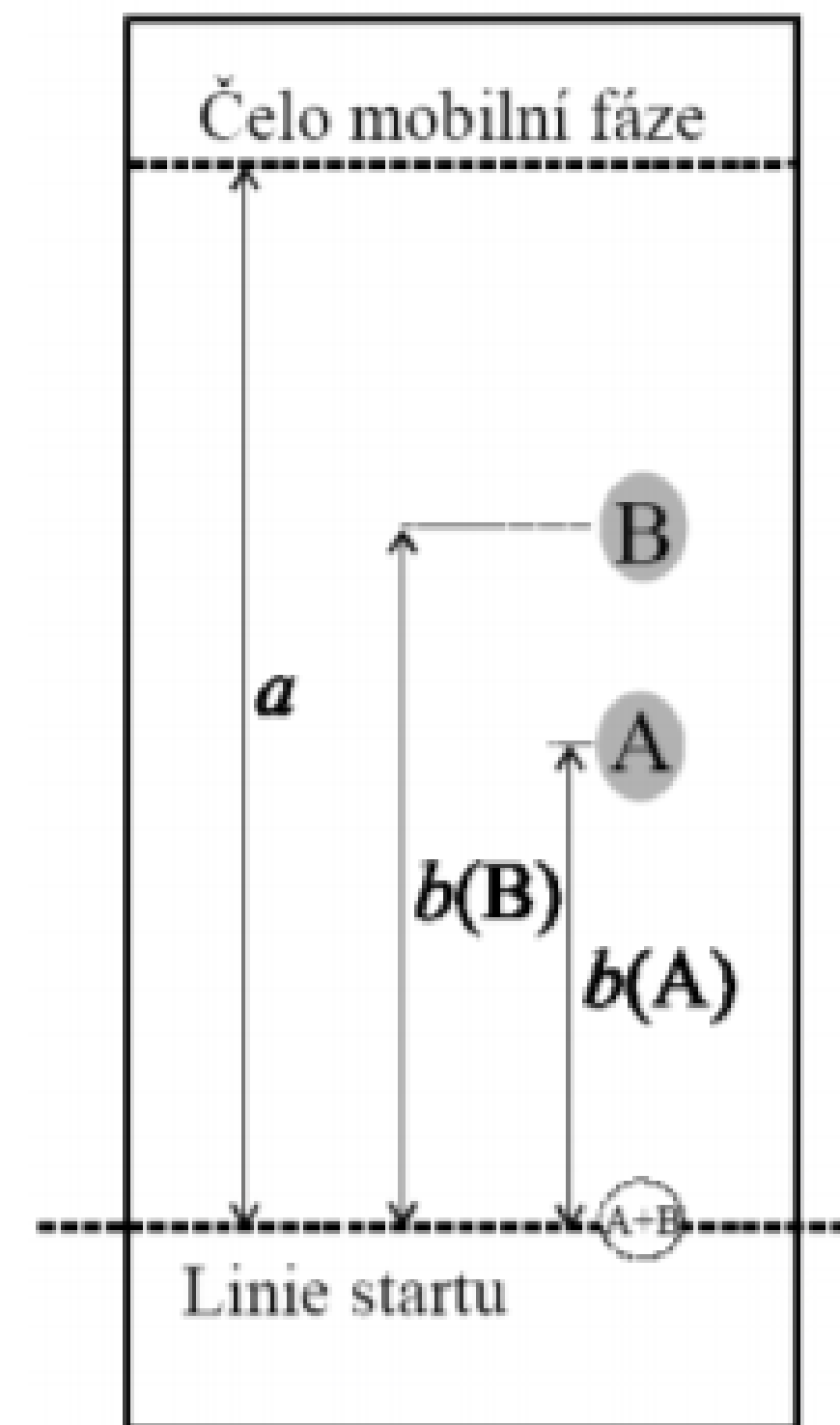
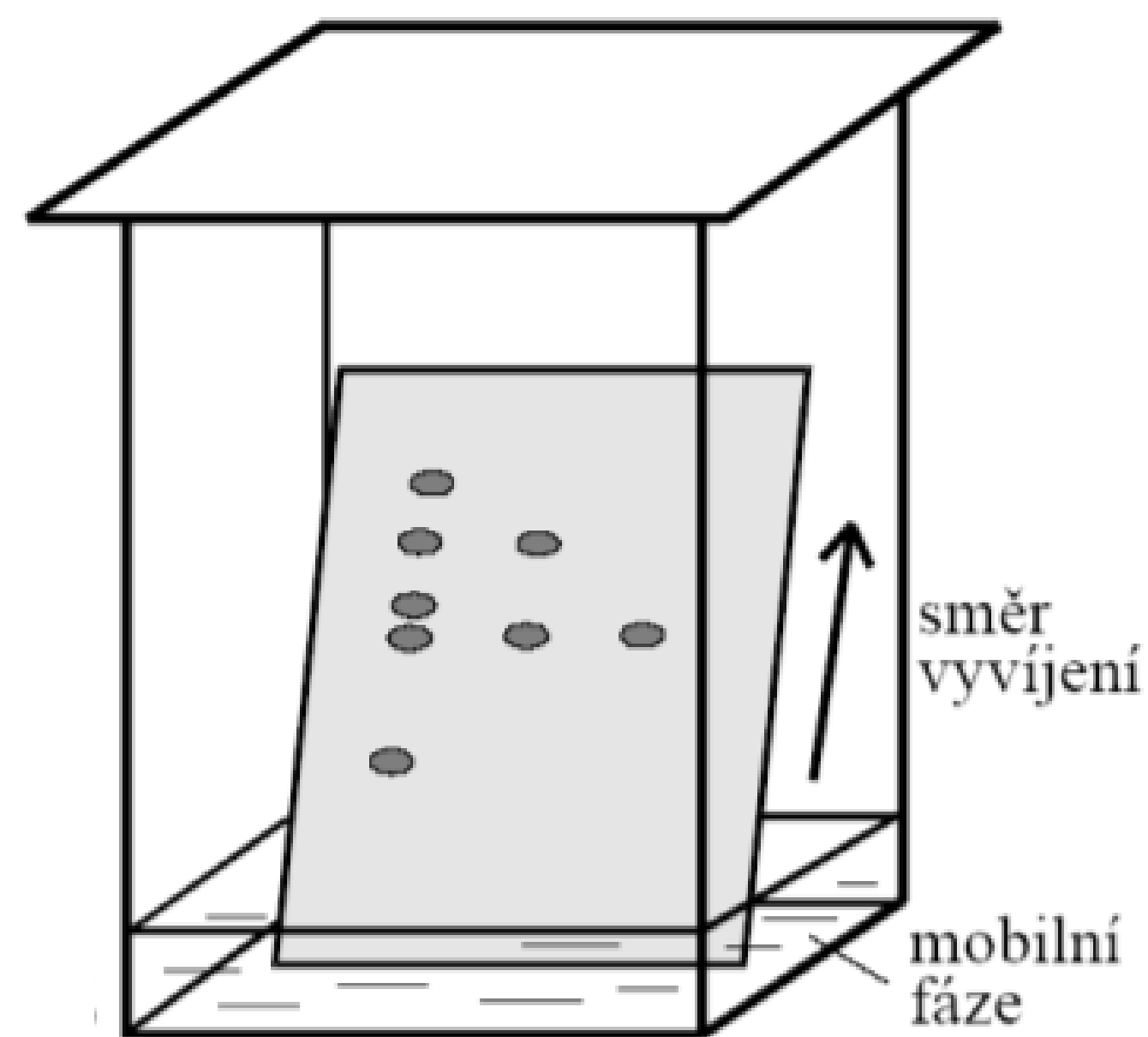
Princip chromatografie

- Rozdělování látek analyzované směsi vzorku mezi **dvěma fázemi**:
 - **Stacionární fáze** (nepohyblivá)
 - silikagel, modifikovaný silikagel, celulóza nebo polymerní částice
 - **Mobilní fáze** (pohyblivá)
 - voda, pufr nebo směs organických rozpouštědel
- Analyzované látky vzorku se více či méně ochotně poutají ke stacionární fázi
- Látky, které se poutají více, se pohybují pomaleji
- Látky, které se poutají méně, se pohybují rychleji



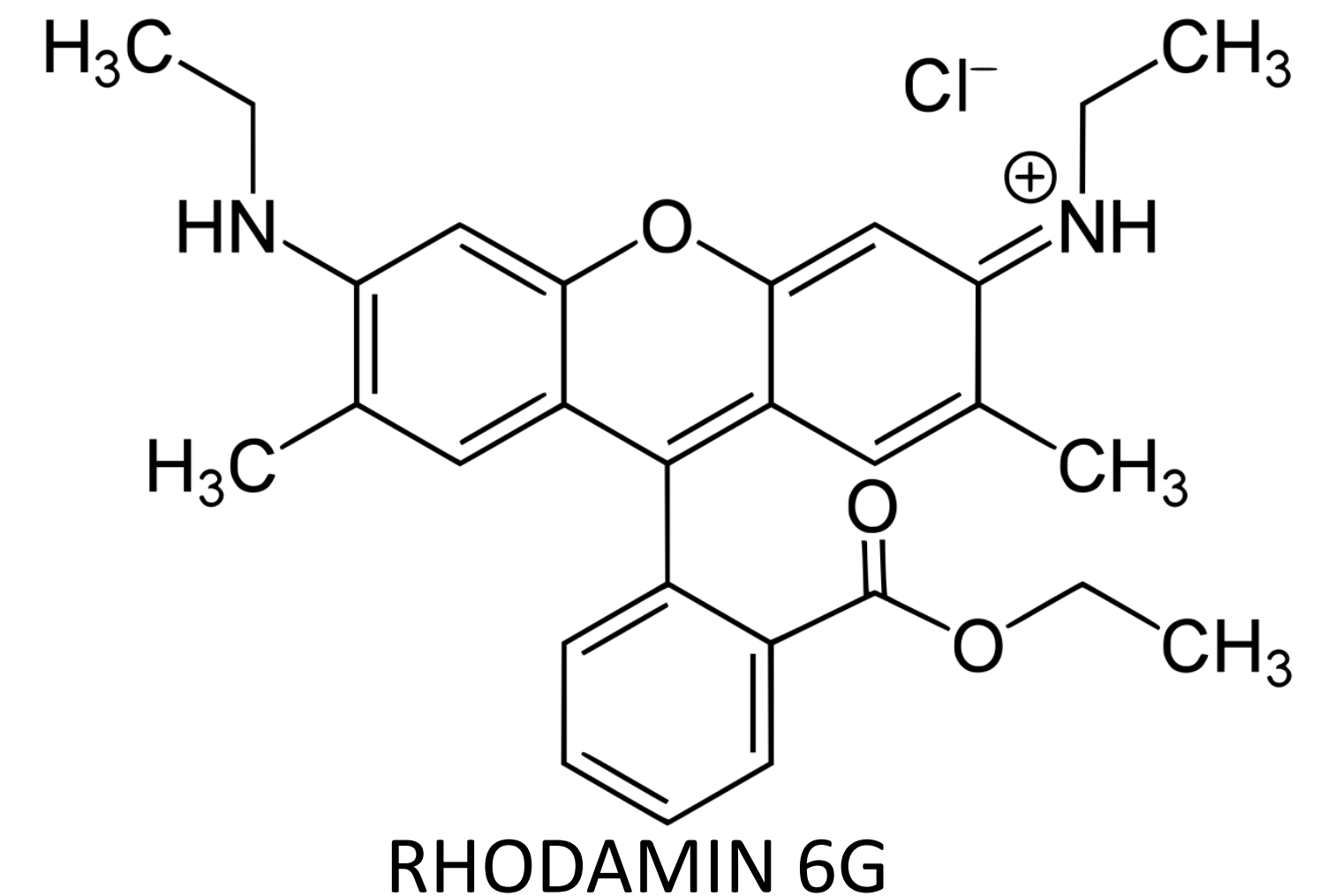
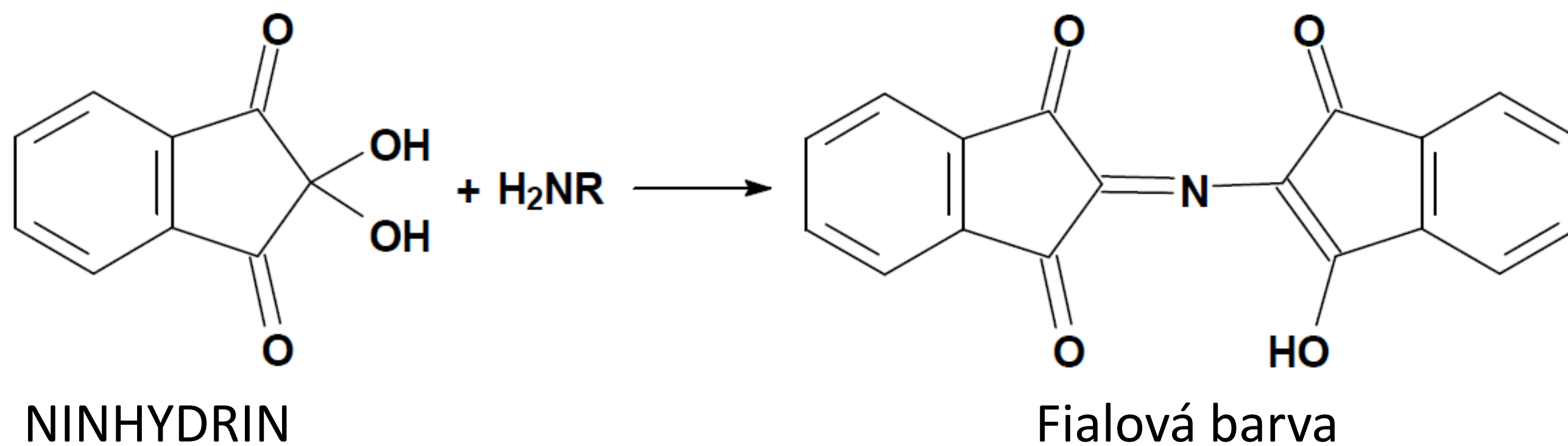
Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

- Vyvíjecí tank (nádoba)
- Stacionární fáze (chromatografické desky)
- Mobilní fáze (organická rozpouštědla)
- Nanášecí zařízení (pipeta, kapilára)
- Detekční činidlo + sušárna + UV lampa



Detekční činidla v TLC

- H_2SO_4 , KMnO_4 , I_2 (téměř univerzální)
- Ninhydrin (pro aminokyseliny): selektivní reakce aminoskupiny za vzniku intenzivní fialové sloučeniny
- Rhodamin 6G: fluorescence luminoforů v UV záření



Vyhodnocení TLC chromatogramu

Kvalitativní informace (o jakou se jedná látku?)

Retardační faktor R_F :

$$R_F(A; B) = \frac{\text{vzdálenost od startu ke středu zóny látky}}{\text{vzdálenost od startu k čelu mobilní fáze}} = \frac{b(A;B)}{a}$$

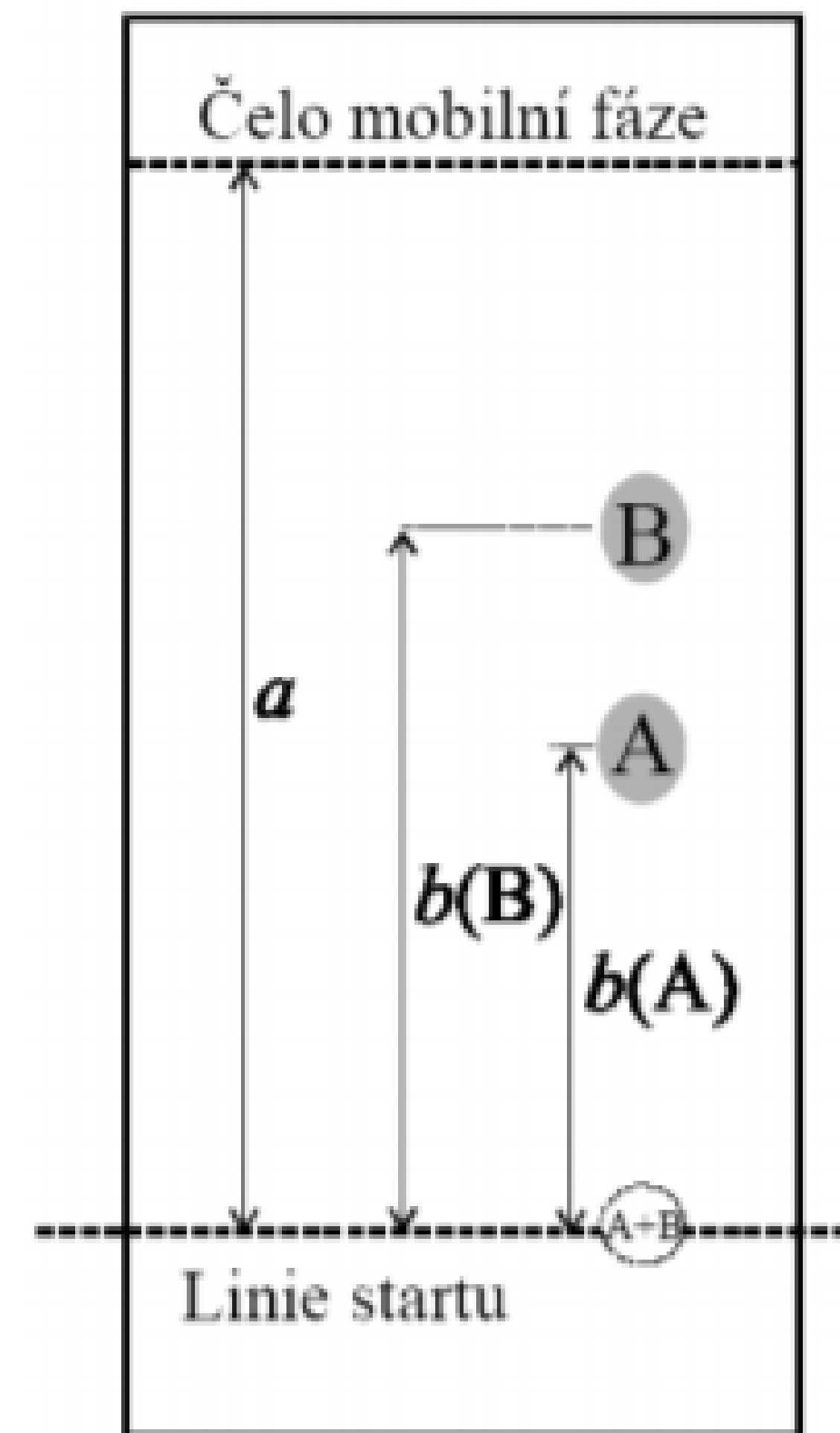
R_F je vždy < 1

Ideální případ, když: $0.1 < R_F < 0.9$

Kvantitativní informace (kolik je zde té látky?)

Rozsah (plocha) skvrny:

- Okem či denzitometrem

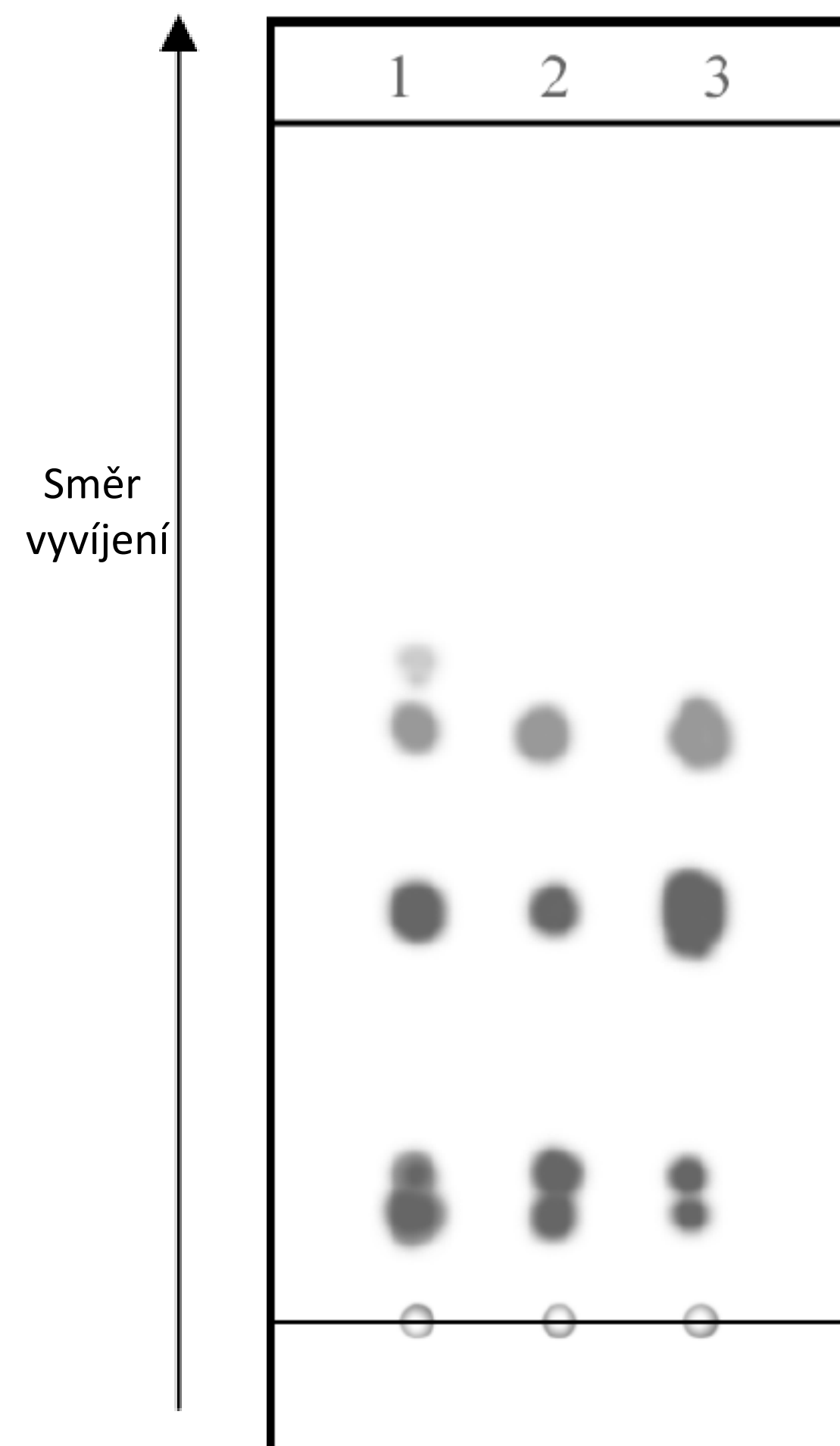


TLC výpočty – příklad

TLC separace alkaloidů extrahovaných z máku (3 různé vzorky)

Stacionární fáze: papír impregnovaný hydrogencitrátem sodným

Mobilní fáze: směs butanolu a 5% kyseliny citronové

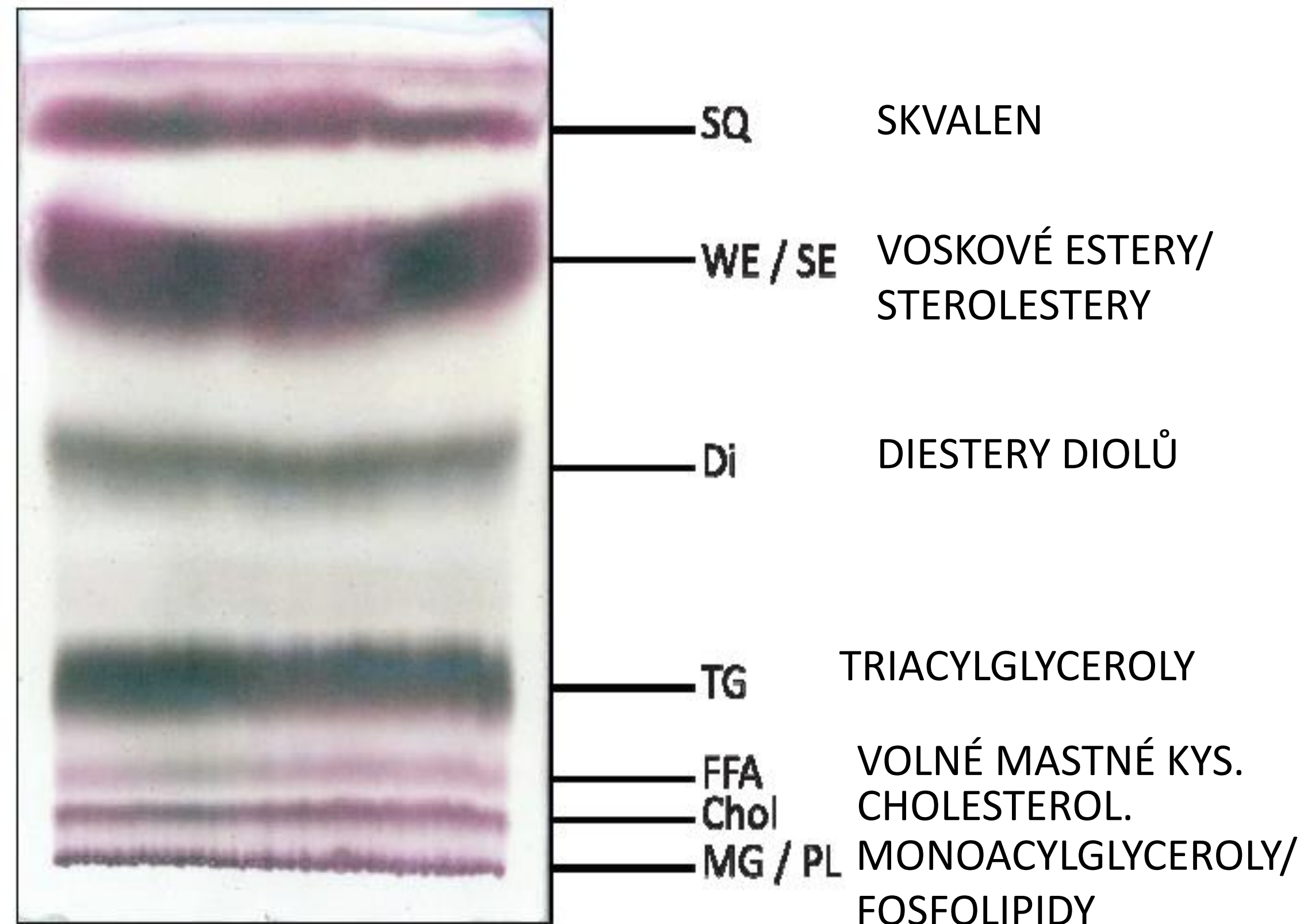


- Které z alkaloidů uvedených v tabulce se ve vzorcích 1, 2 a 3 nacházejí?
- Ve kterém vzorku se nachází nejvíc morfinu a je tudíž nejnáchylnější ke zneužití?

Alkaloid	R _F
Akonitin	0,72
Kodein	0,14
Morfin	0,11
Papaverin	0,54
Sparteín	0,20
Thebain	0,33

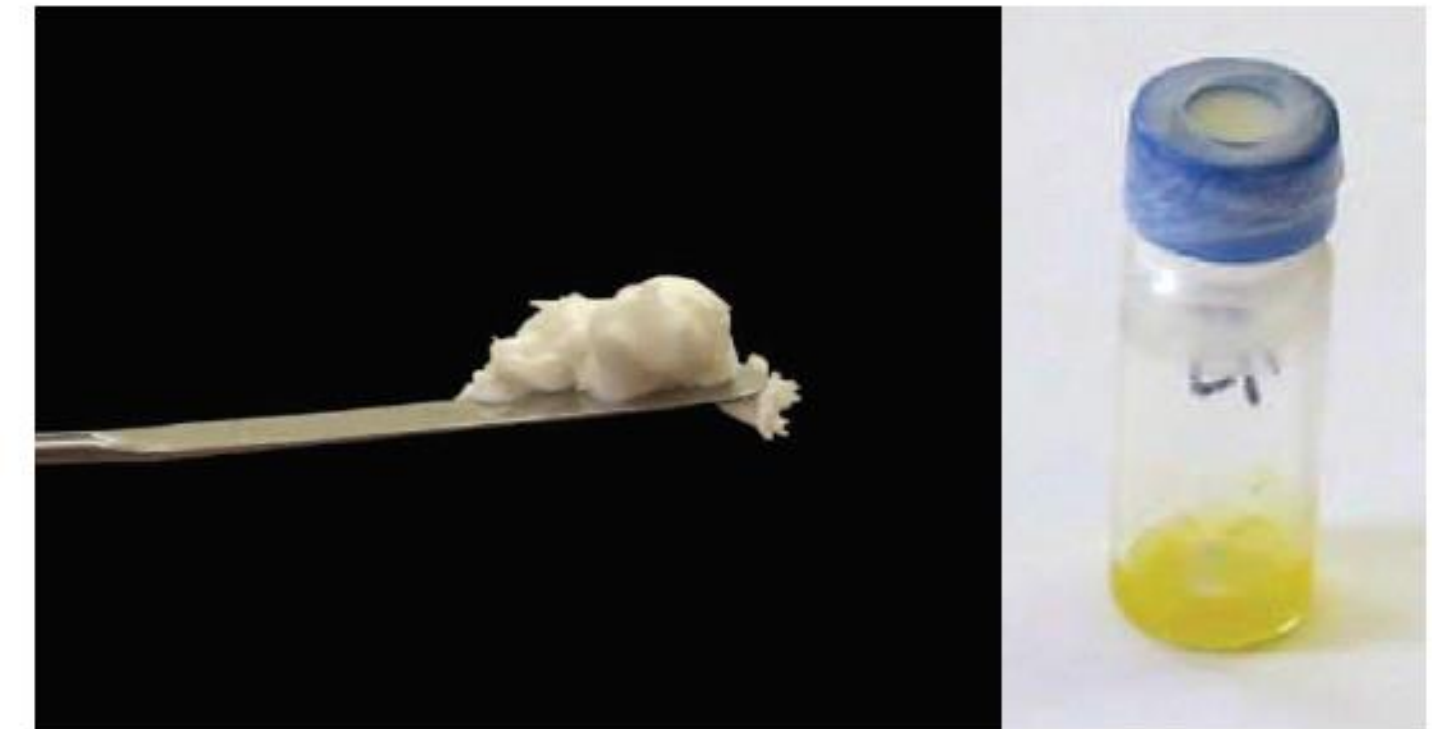
Praxe TLC

TLC analýza lipidů novorozeneckého mázku



Stacionární fáze: silikagel

Mobilní fáze: Hexan:diethylether:kyselina mravenčí (80:20:2)



- Snižuje tření při porodu
- Antimikrobiální látky
- Ovlivňuje chování matky (feromony?)

Sloupcová kolonová chromatografie

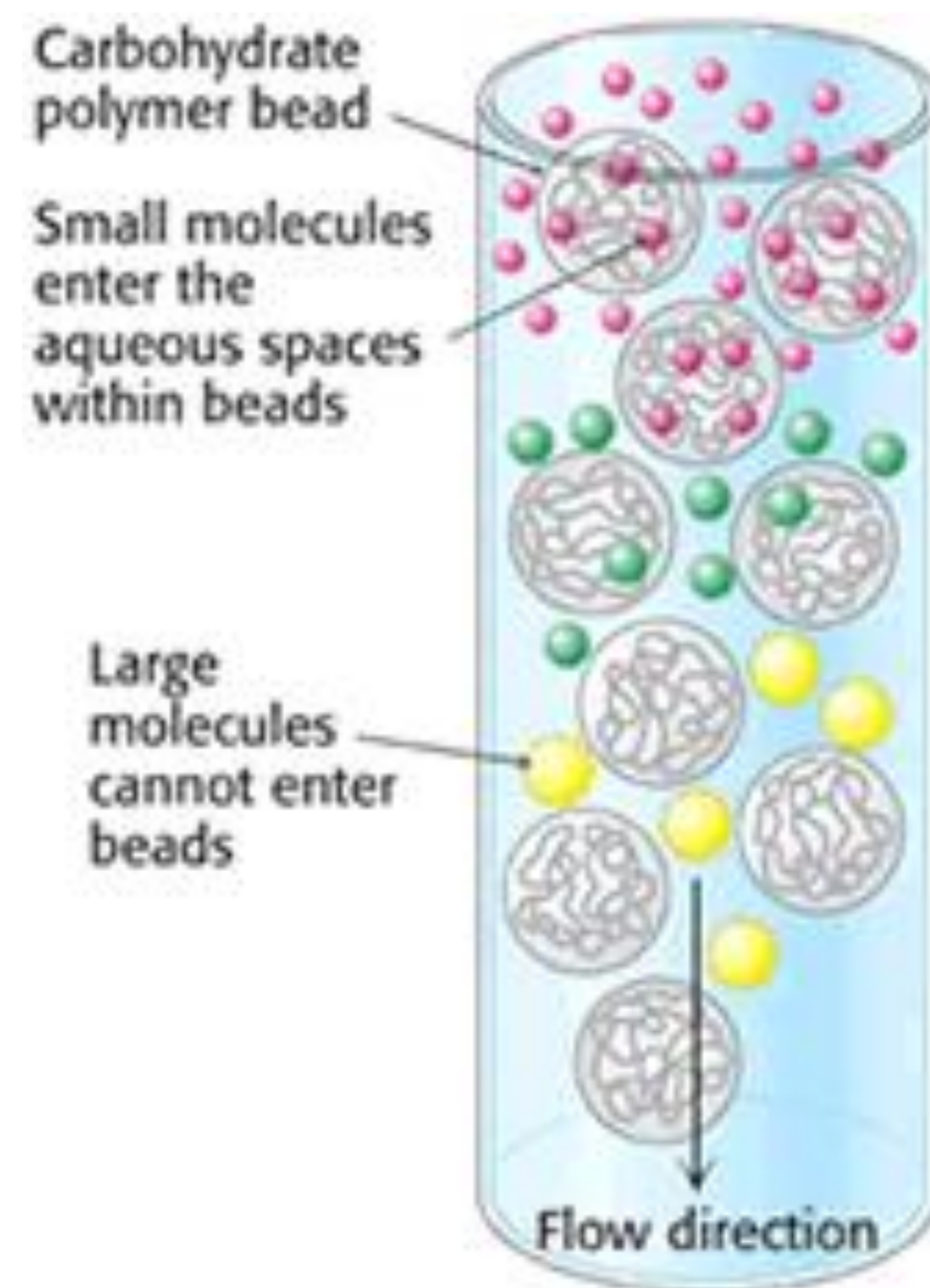


- Na čistou kolonu se do proudu mobilní fáze nadávkuje směs analyzovaných látek
- Průtokem mobilní fáze dochází k separaci složek směsi podle jejich **afinit ke stacionární fázi**

- Ty látky, které se na kolonu váží **nejméně**, jí opouští jako **první**
- Ty látky, které se na kolonu váží **nejvíce**, jí opouští jako **poslední**

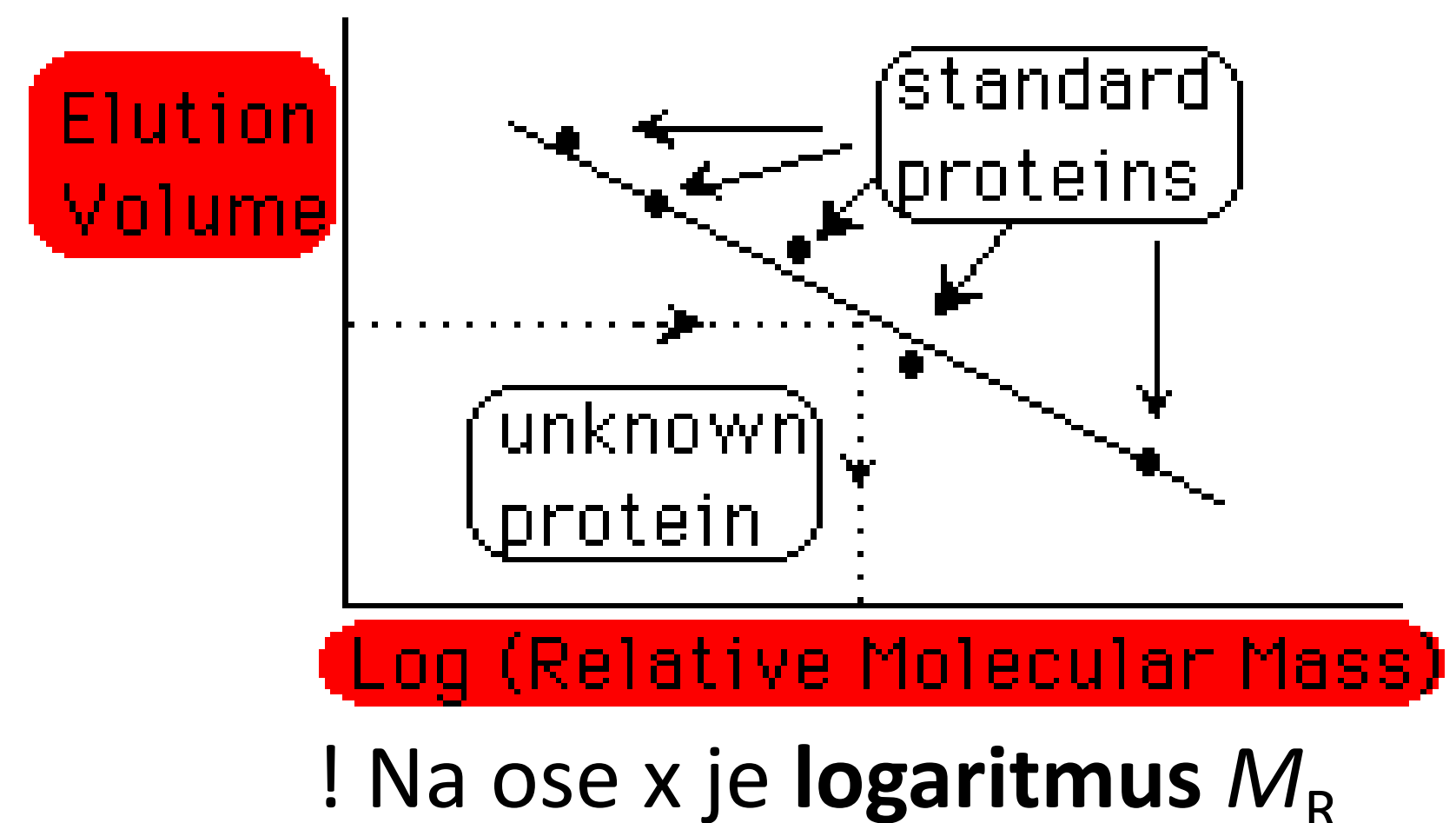
Gelová permeační chromatografie (GPC)

- Vhodná pro dělení **makromolekul**
- JINÝ MECHANISMUS DĚLENÍ: **síťový efekt**
- Stacionární fáze je tvořena polymerem s póry
- Malé molekuly pronikají do pórů velmi dobře, ale velké molekuly méně ochotně
 - Tzn. čím vyšší M_R analyzované látky, tím dříve eluce z kolony
- Nutná předem kalibrace: křivka závislosti elučního objemu na logaritmu M_R



KALIBRACE:

3 standardní látky (A, B, C) o různé molekulové hmotnosti pro pokrytí rozsahu eluovaných molekul



Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

- Široce využívaná metoda pro **analýzu (separaci) netěkavých sloučenin**, zvláště dnes v separaci biomolekul
- Mobilní fáze je hnána pod vysokým tlakem (do 40 MPa)

Stacionární fáze: kolona se sorbentem

Mobilní fáze: voda, pufr a organická rozpouštědla

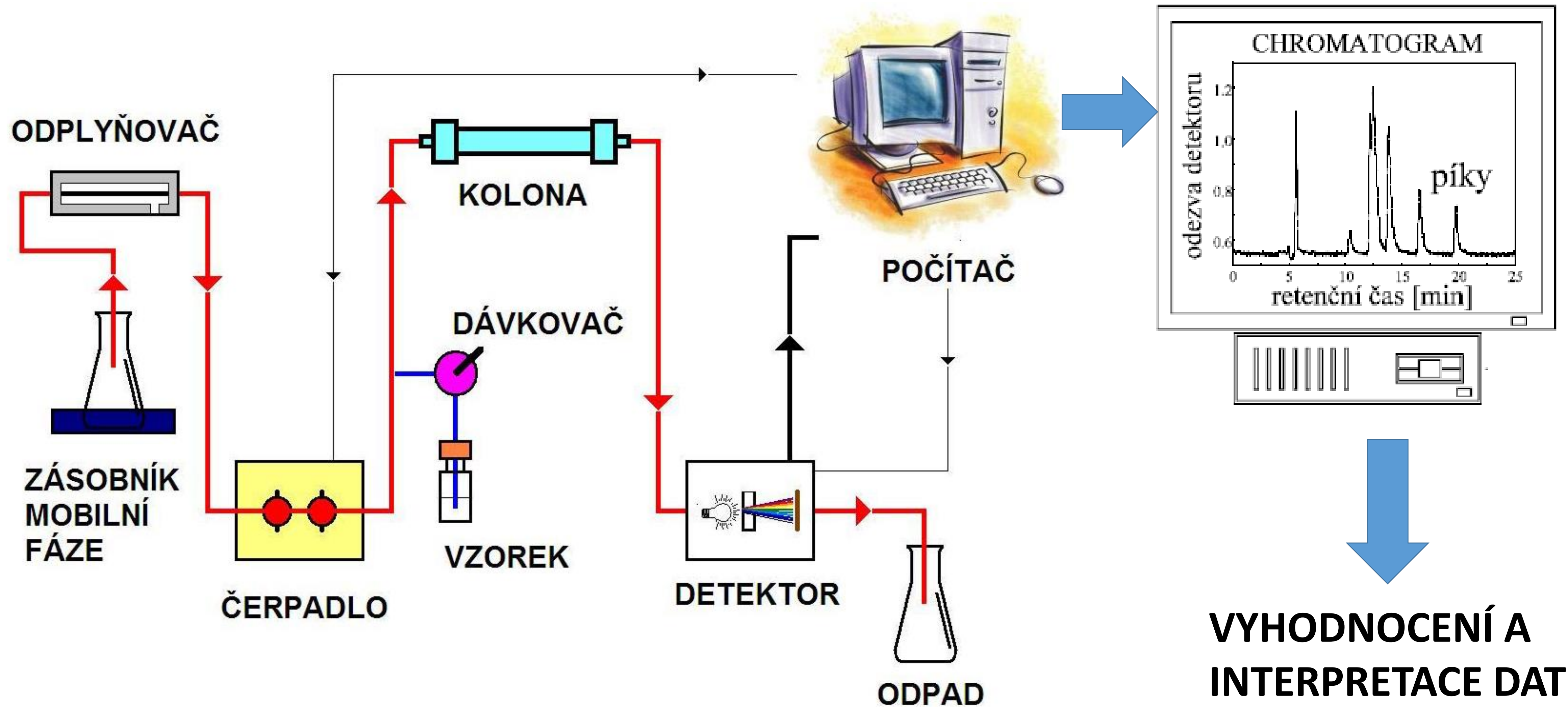


Stacionární fáze (chromatografické kolony)



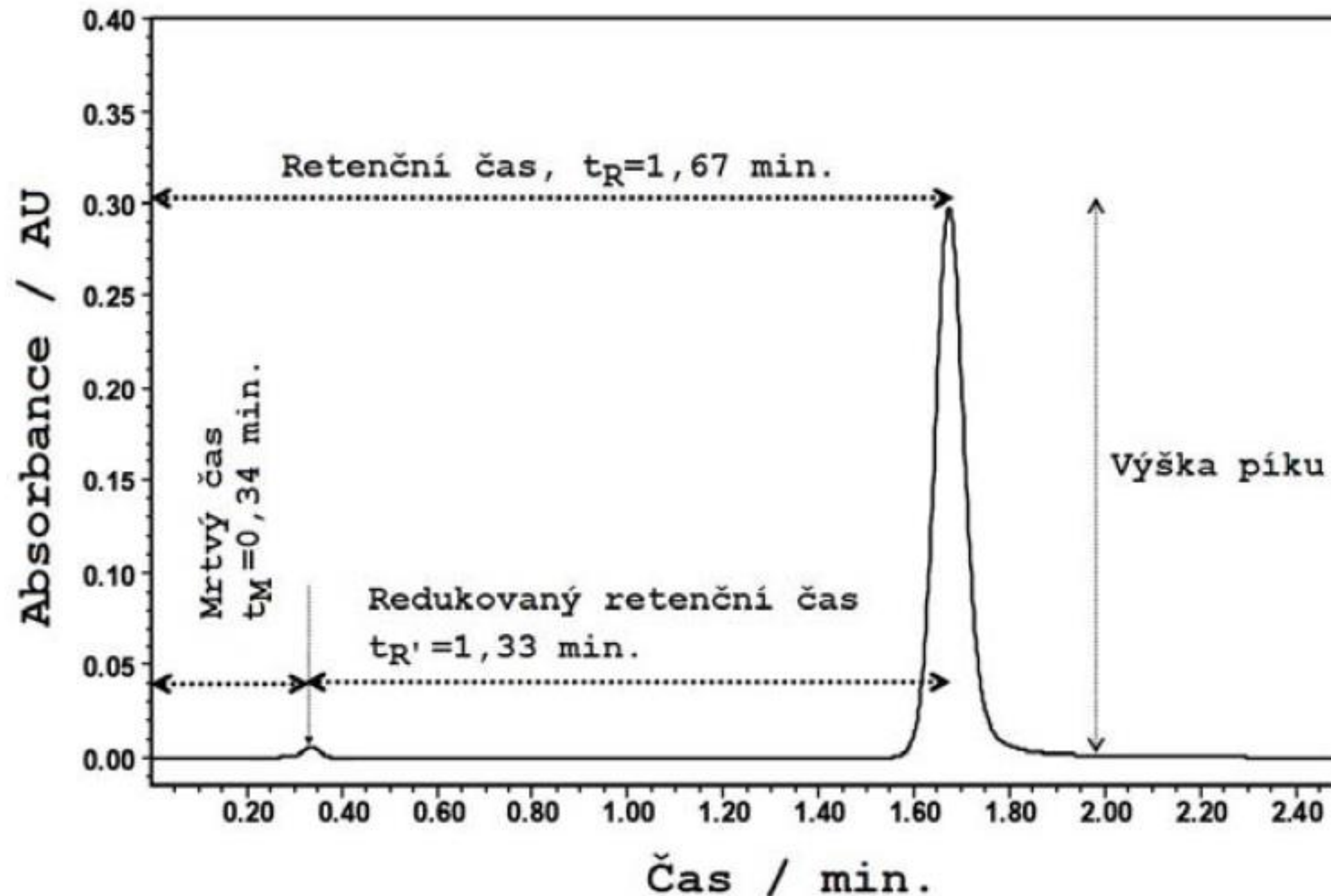
HPLC chromatograf s počítačem

Instrumentace HPLC



Charakterizace chromatogramu

Kvalitativní informace (o jakou se jedná látku?)



Retenční čas t_R je celkový čas od nástřiku vzorku do zaznamenání píku detektorem

Retenční čas závisí na struktuře analytu, na složení mobilní a stacionární fáze

- uplatňují se různé mezimolekulové interakce
- znalost interakcí umožňuje ovlivňovat dělení látek

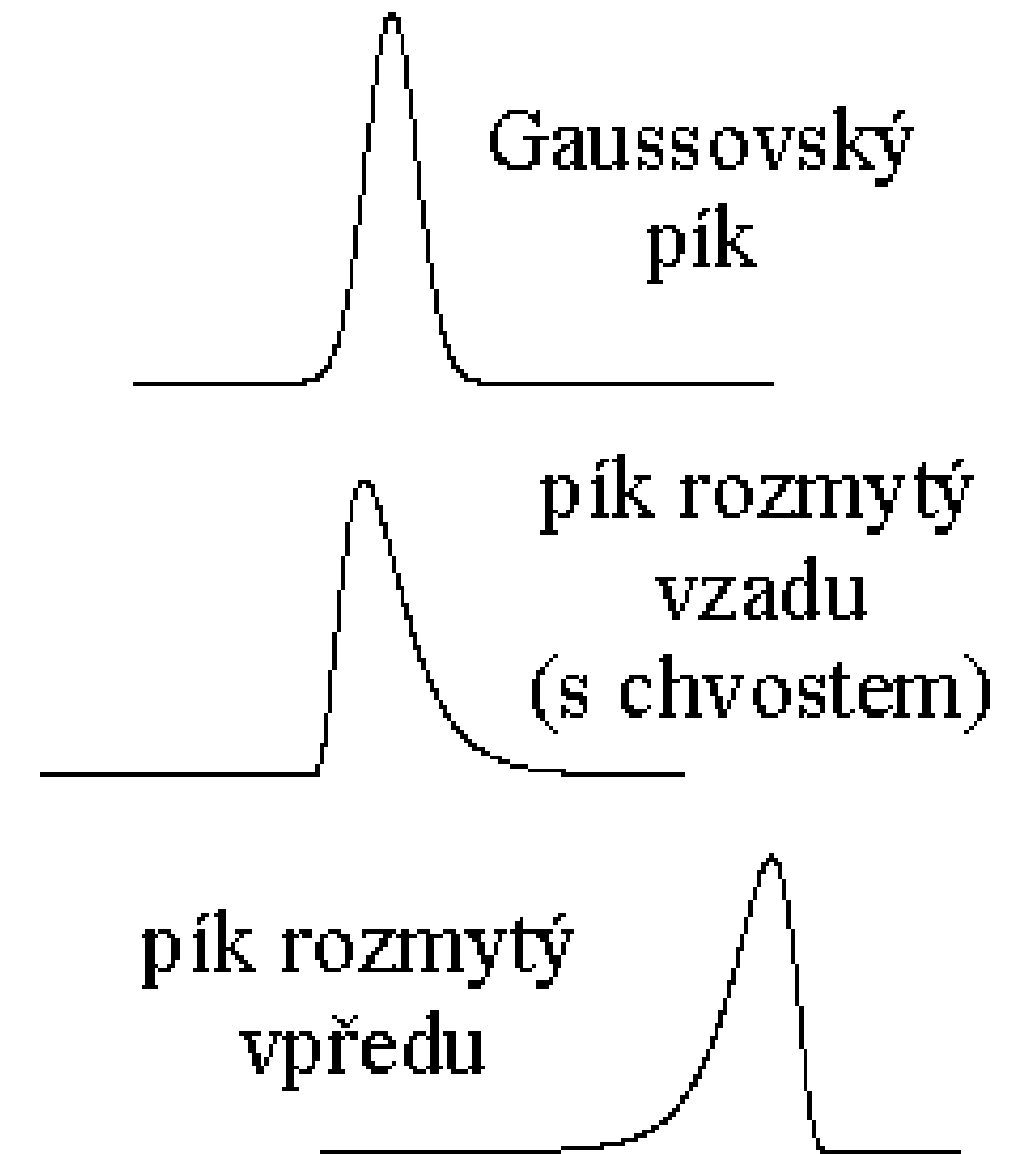
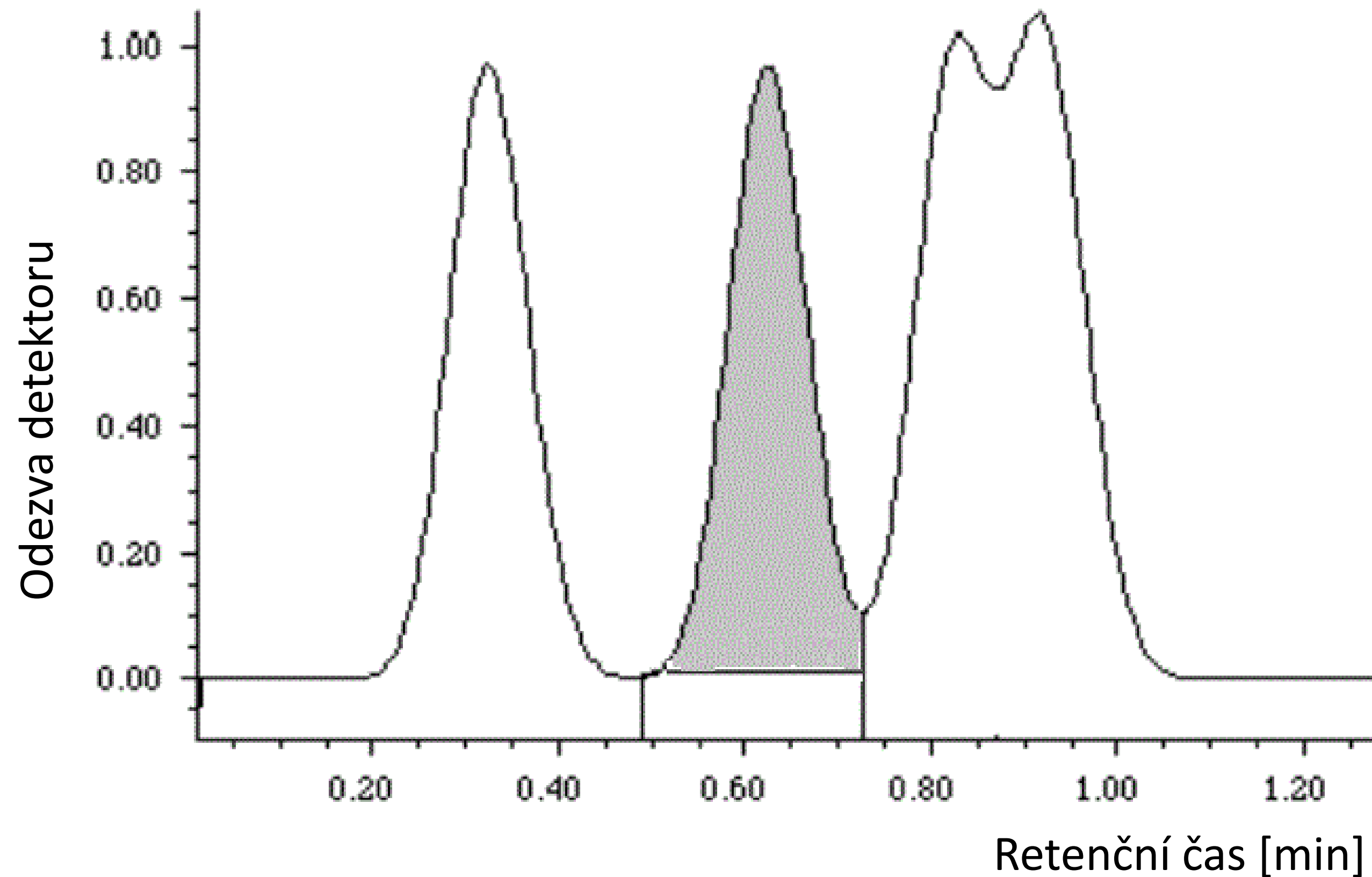
Mrtvý čas t_M – retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Všechny analyty stráví v mobilní fázi stejný čas – mrtvý čas kolony

Redukovaný retenční čas t_R' – čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi

Charakterizace chromatogramu

Kvantitativní informace (kolik je zde té látky?)

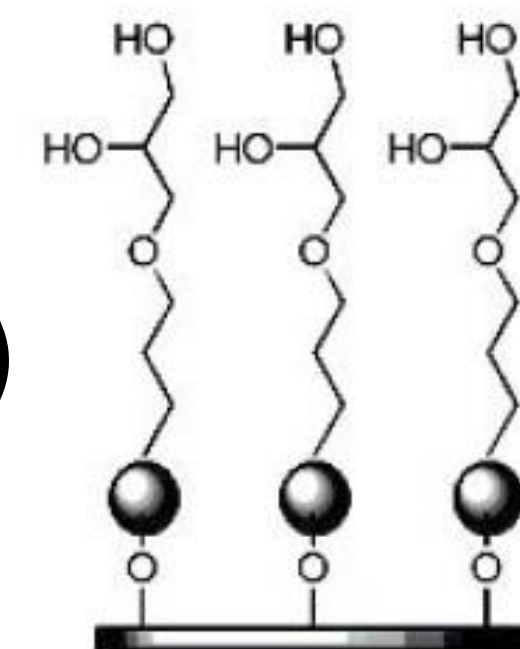
Plocha píku (plocha pod křivkou) → množství, koncentrace látky



Normální a reverzní mód dělení HPLC

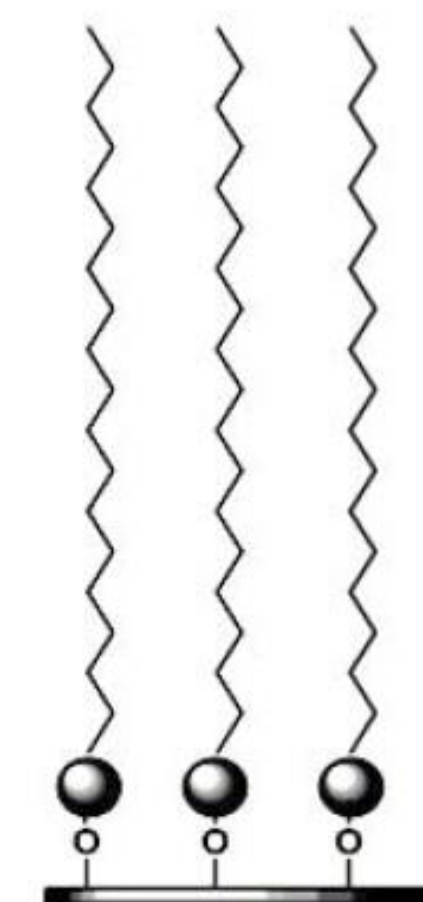
Chromatografie s normálními fázemi

- **Stacionární fáze:** polární
- **Mobilní fáze:** směs méně polárních organických rozpouštědel (např. hexan a dichlormethan)
- Používá se zejména pro látky nerozpustné ve vodě, pro preparativní HPLC a na dělení isomerů



Chromatografie s obrácenými (reverzními) fázemi

- **Stacionární fáze:** nepolární (např. C18)
- mobilní fáze: polární – směs vody a organického rozpouštědla (například acetonitril nebo methanol)
- nejčastěji používaným systémem HPLC, pro většinu analyzovaných látek v HPLC



Van Deemterova rovnice

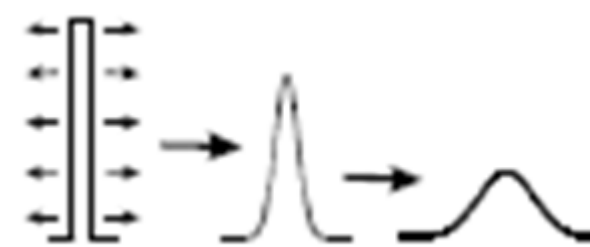
- Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární rychlosti mobilní fáze (u)
- **Minimum křivky** odpovídá optimální průtokové rychlosti, při které chromatografická kolona má nejvyšší účinnost (minimálně rozšiřuje zóny analytu)

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u}$$

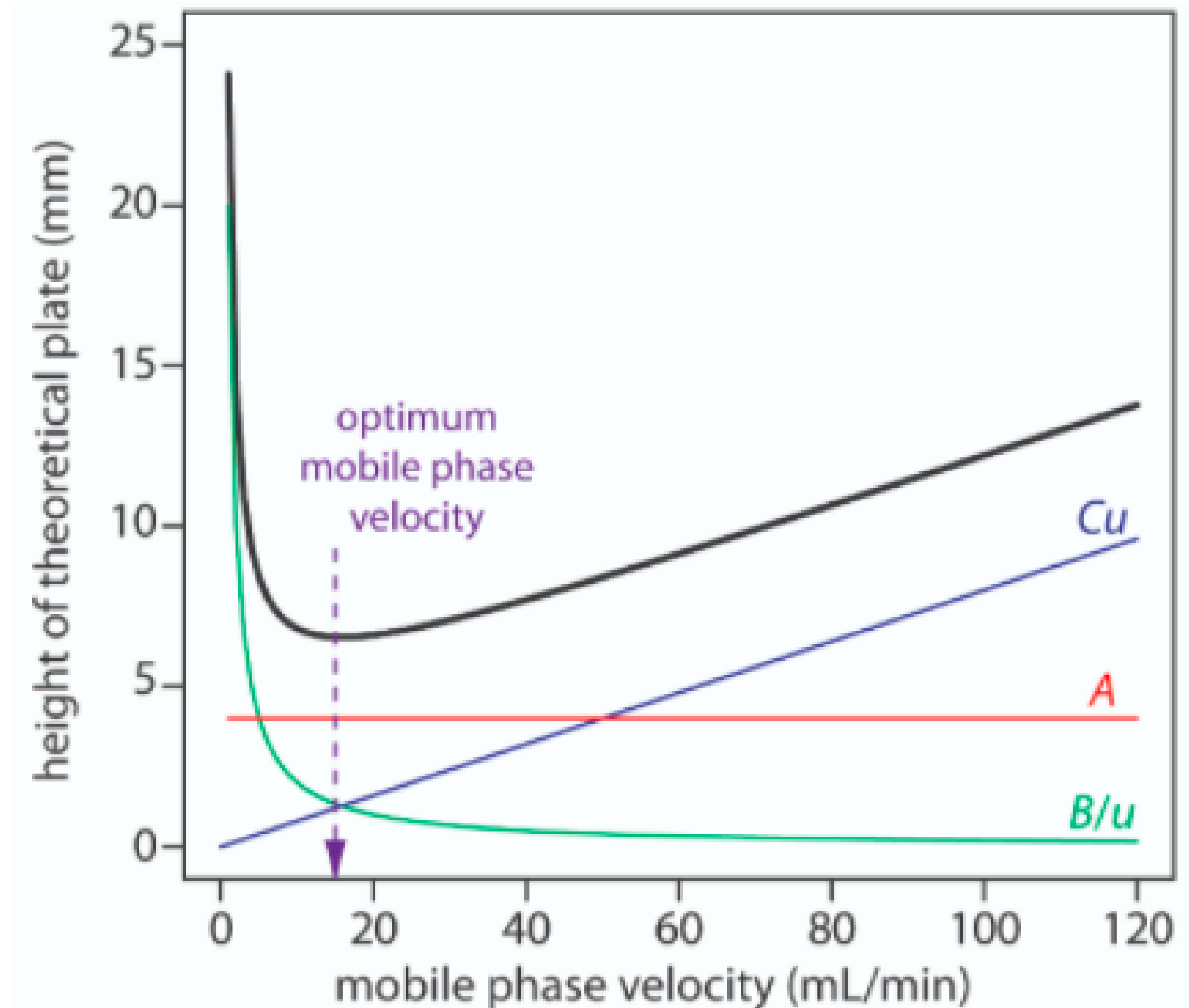
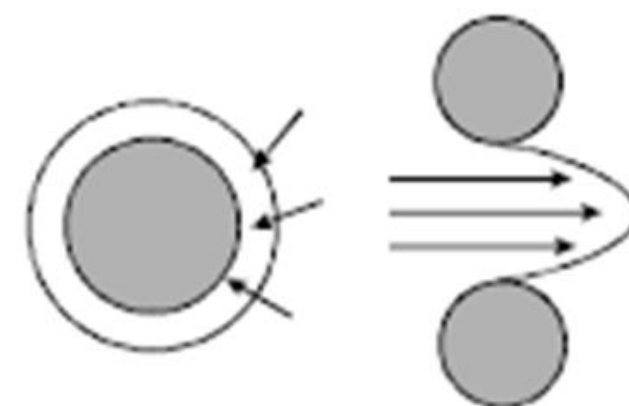
A ... příspěvek vířivé difúze



B ... příspěvek podélné molekulární difúze



C ... příspěvek odporu proti přenosu hmoty



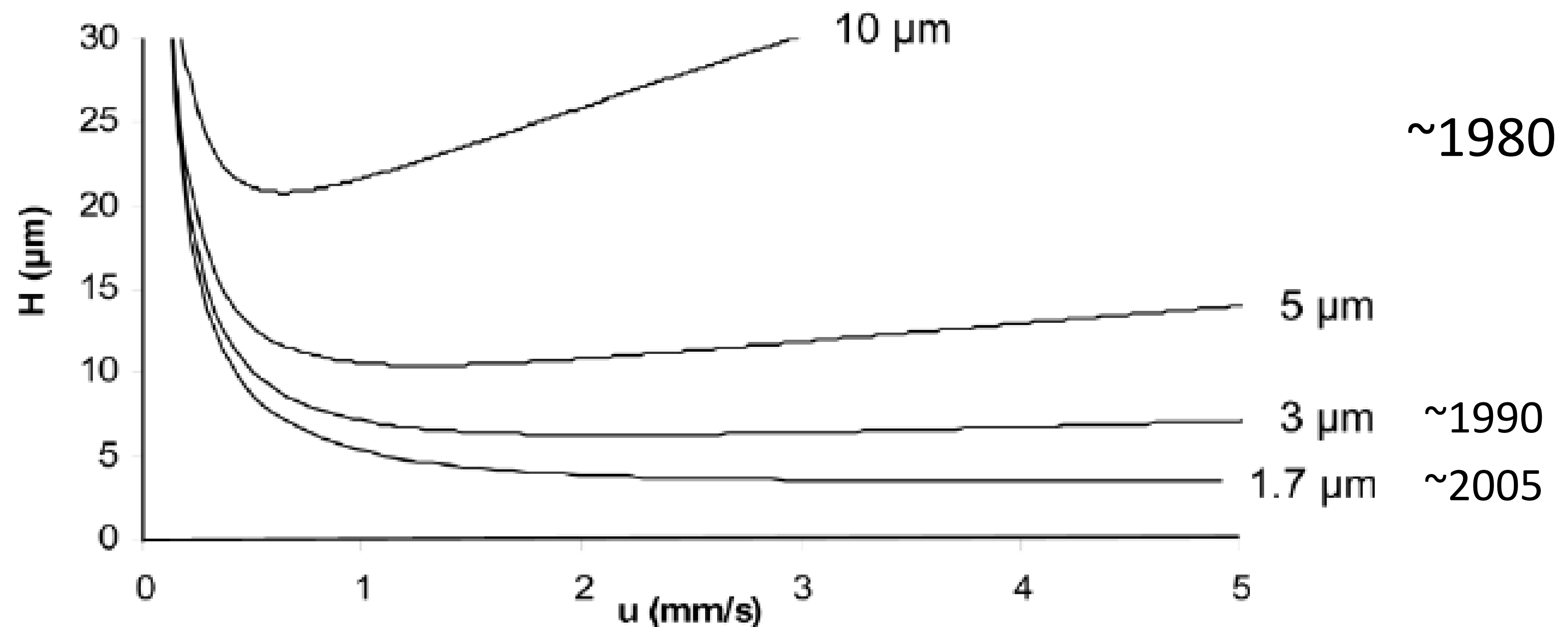
Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

UHPLC = HPLC s částicemi menšími než **2 μm** a velkým provozním tlakem do **100 MPa**

- rychlejší separace
- vyšší účinnost
- menší spotřeba vzorku
- menší spotřeba mobilní fáze

Van Deemterova křivka (HPLC vs. UHPLC)

Různé velikosti částic stacionární fáze

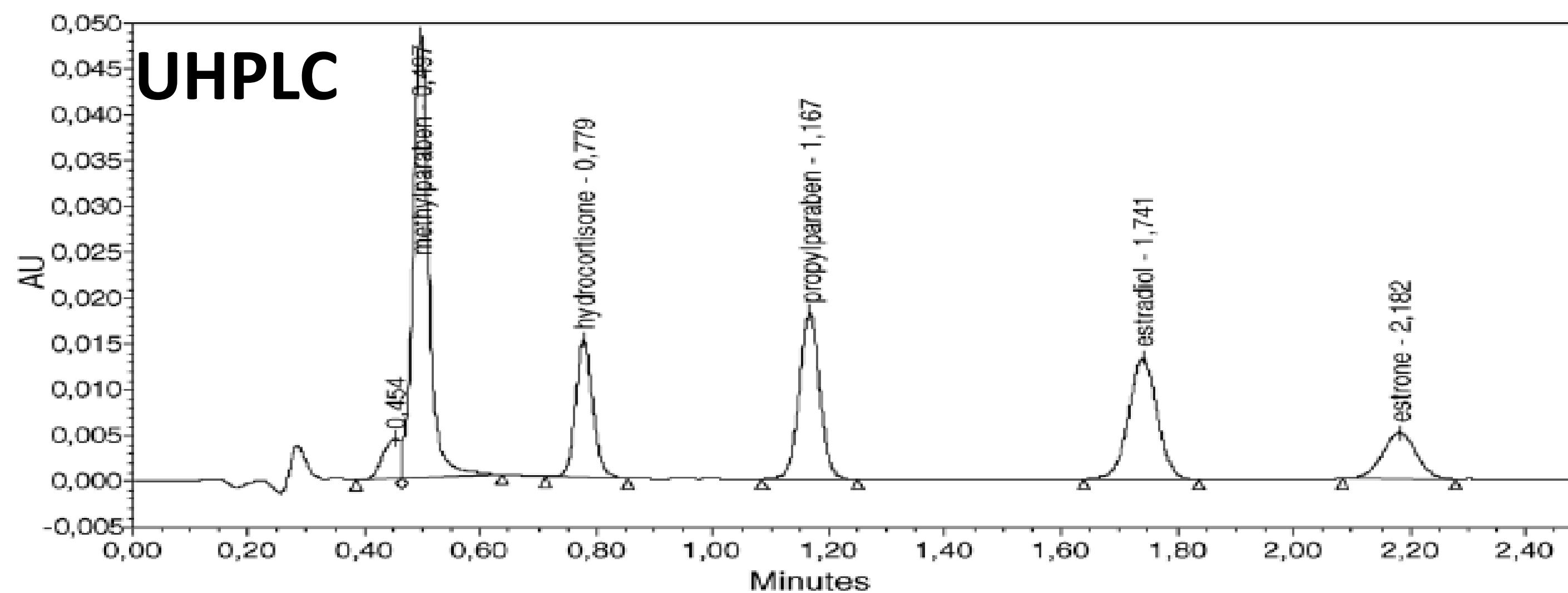
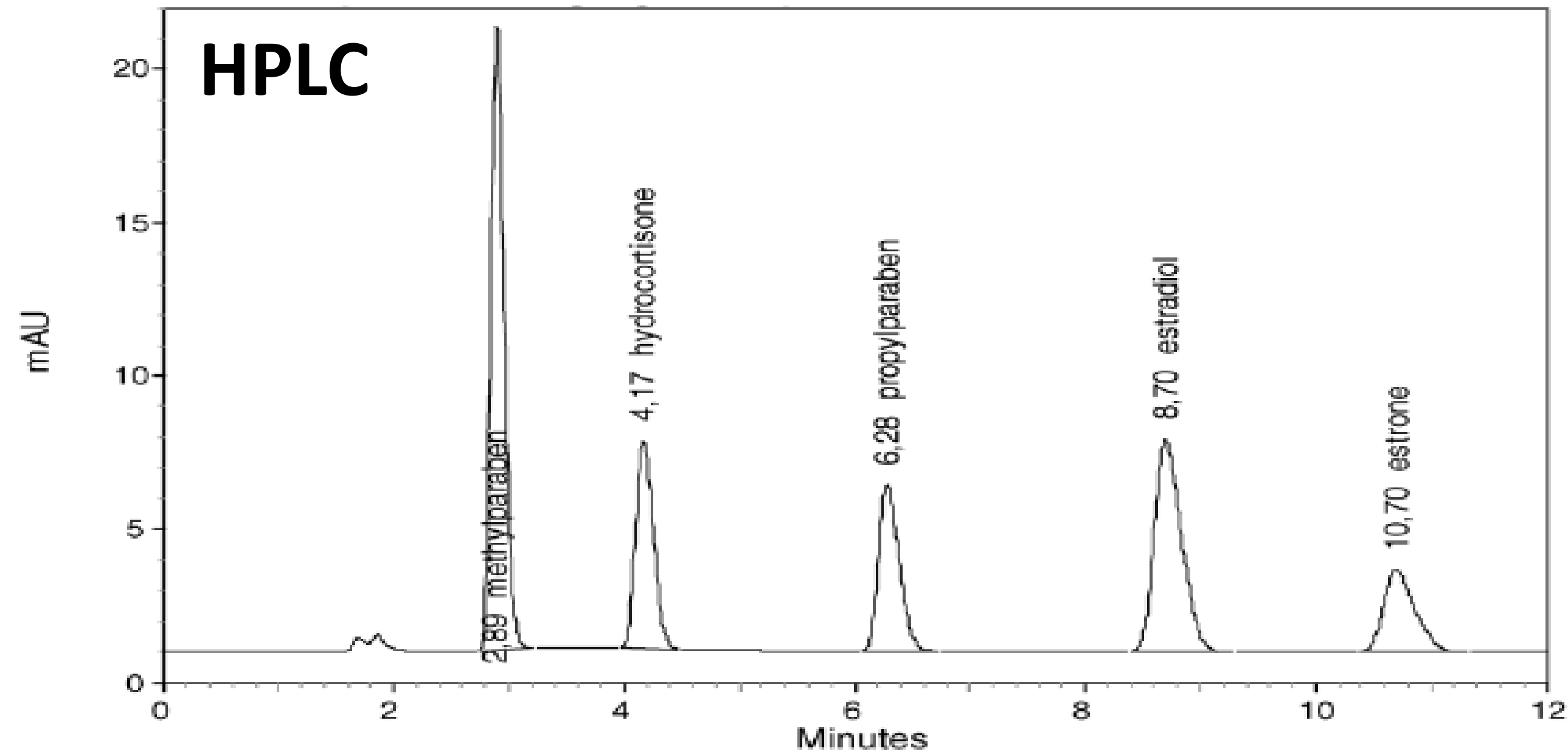


Minimum křivky je pro malé částice ploché

-> je možno provádět analýzu v **širším rozsahu** průtoků bez ztráty účinnosti

HPLC vs. UHPLC

Př. Analýza estrogenové masti



Aplikace HPLC



FARMACEUTICKÉ ANALÝZY

Antidepresiva
Antibiotika
Kortikosteroidy



POTRAVINÁŘSKÉ ANALÝZY

Antioxidanty
Mykotoxiny
Alkaloidy
Barviva



KLINICKÉ A TOXIKOLOGICKÉ ANALÝZY

Vitaminy
Glykovaný hemoglobin
Aminokyseliny
Drogy



BIOCHEMICKÉ ANALÝZY

Proteiny
Peptidy
Lipidy
Nukleotidy



PRŮMYSLOVÉ ANALÝZY

Polystyreny
Ftaláty



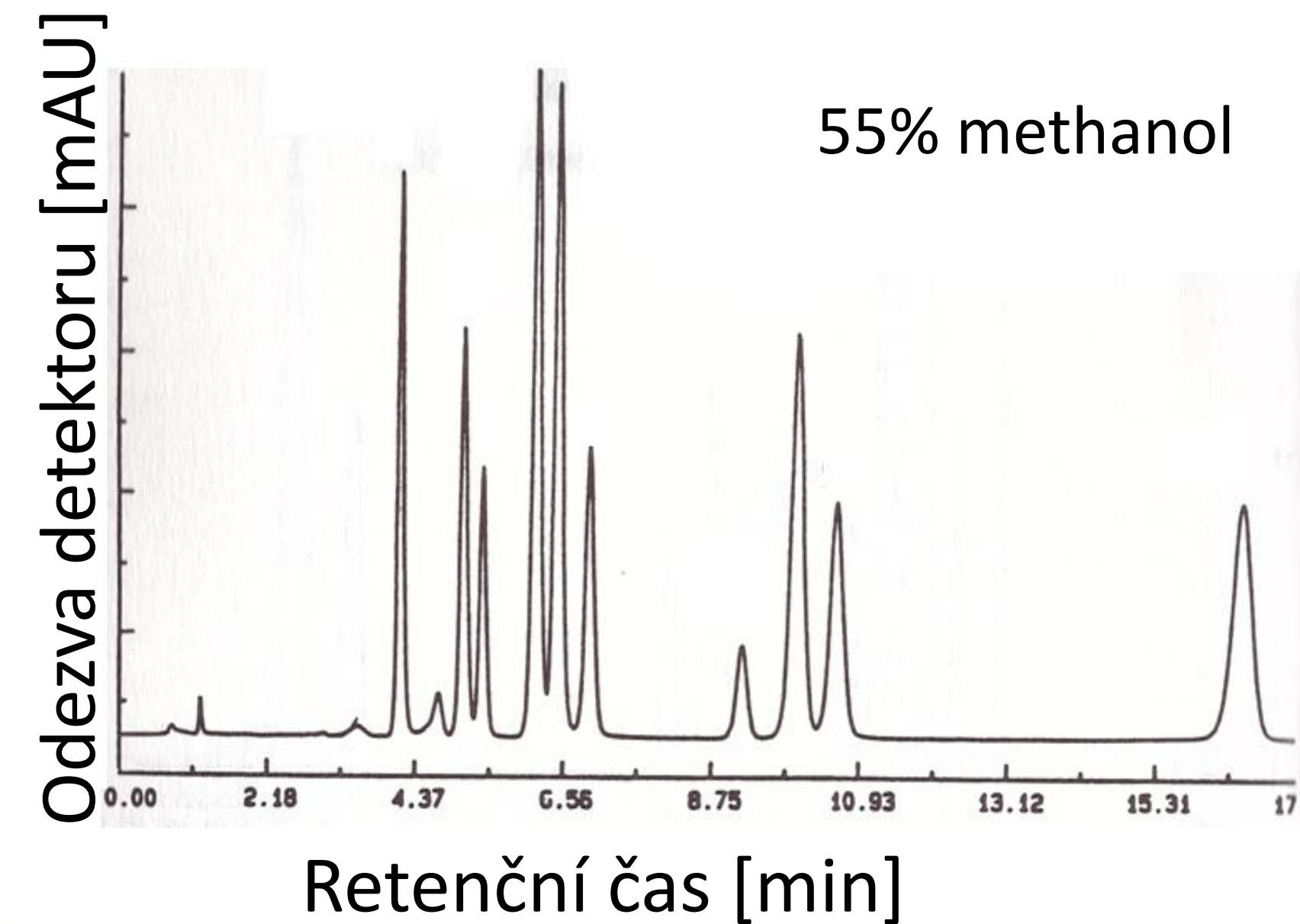
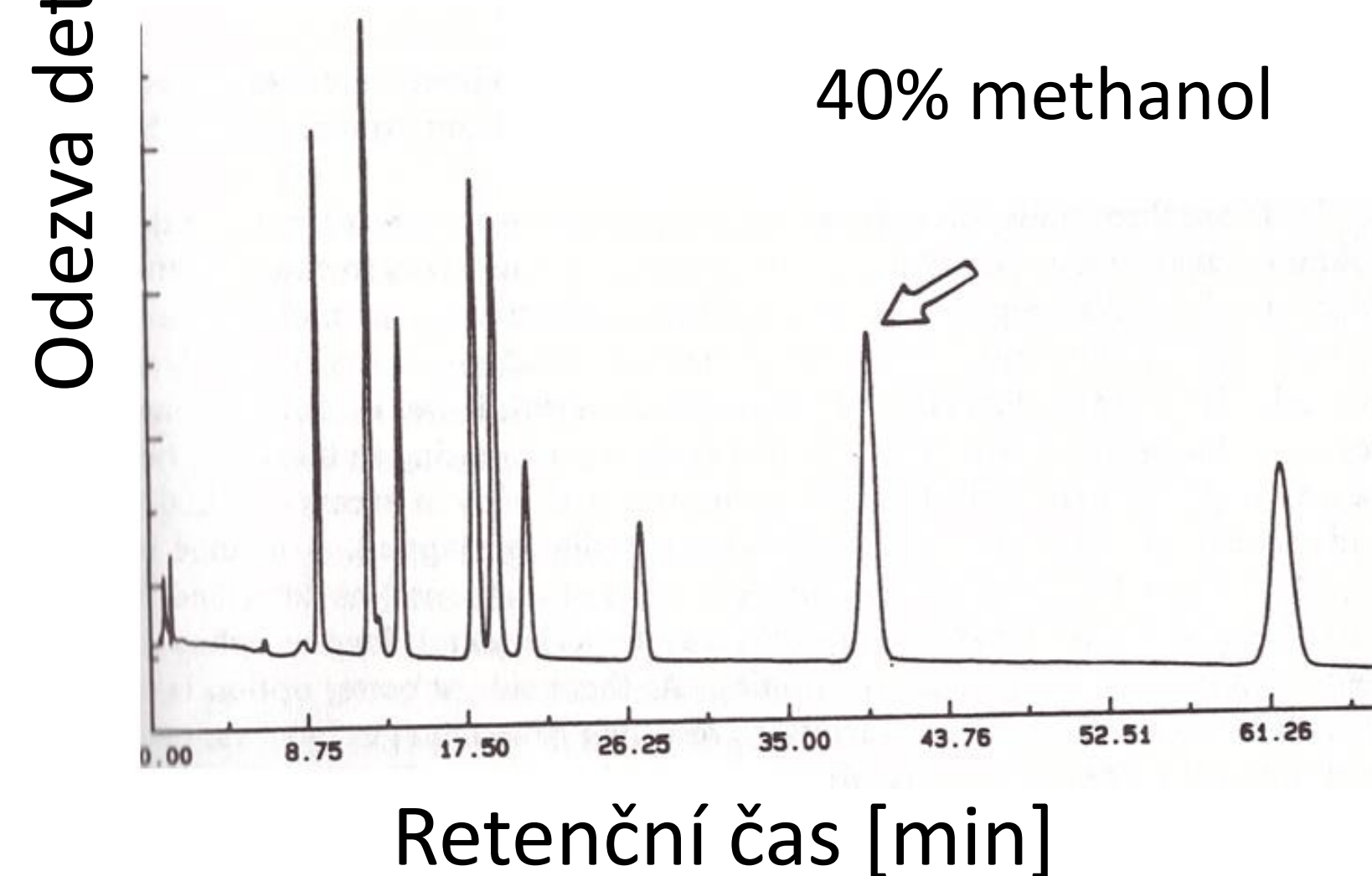
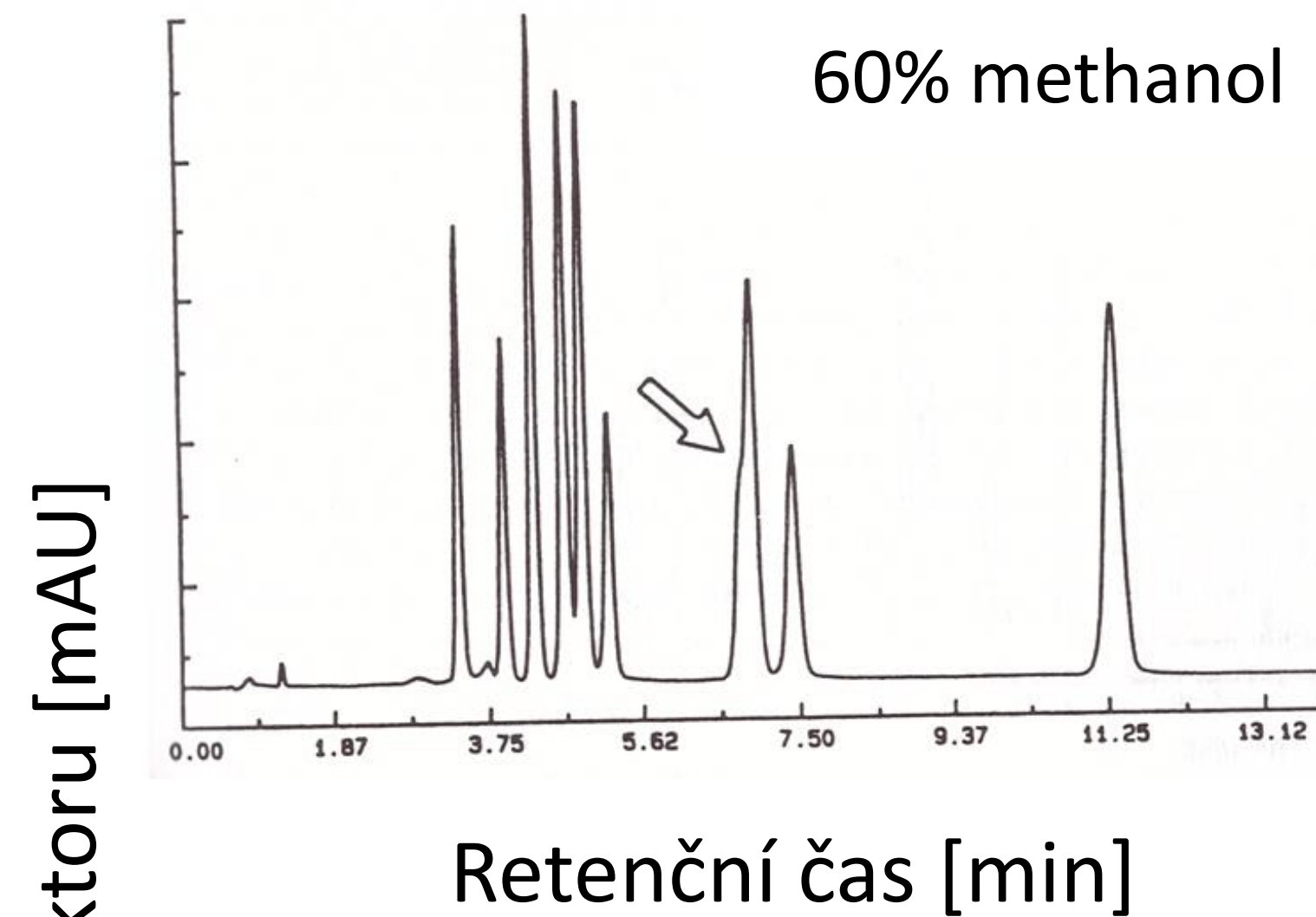
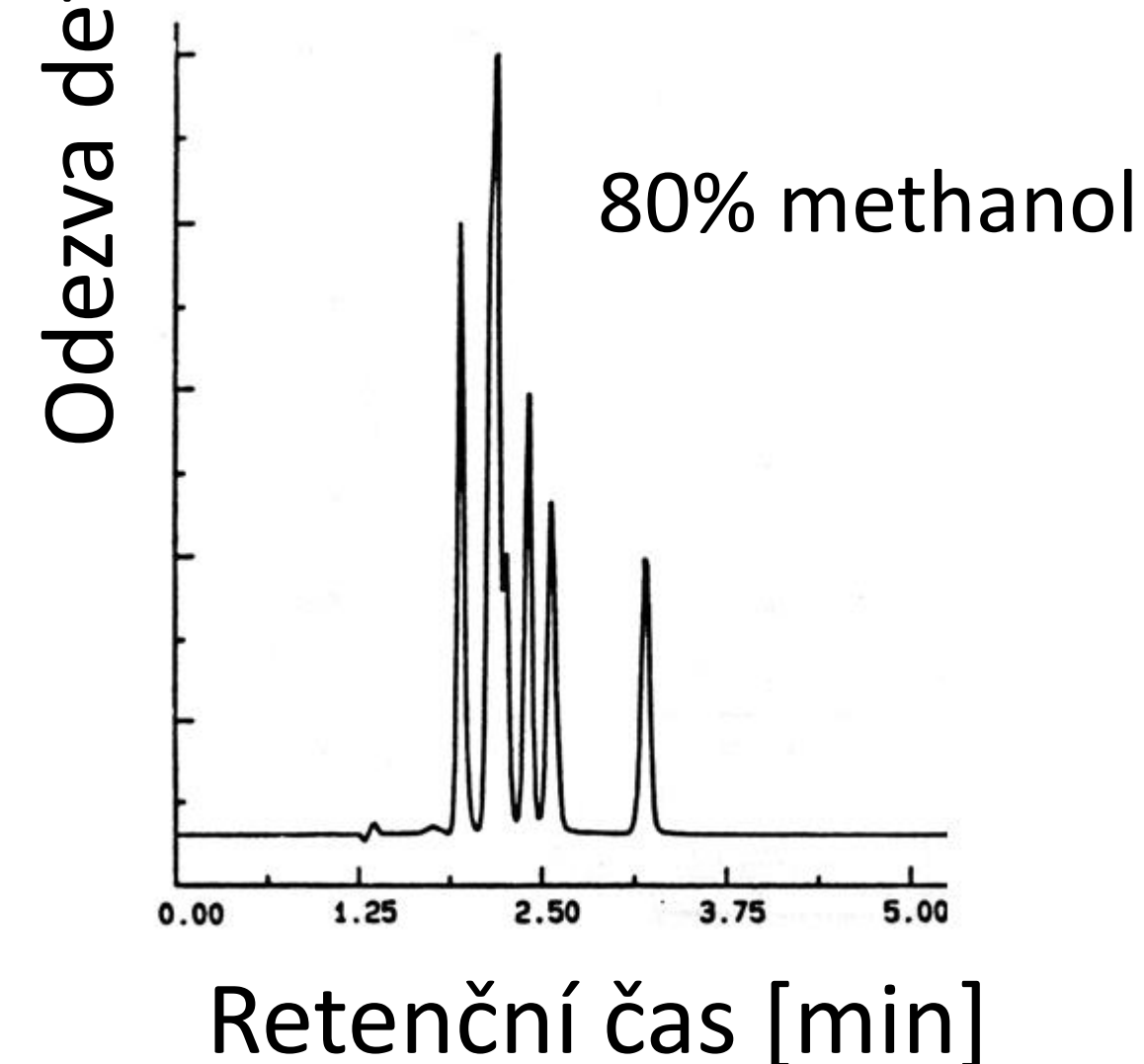
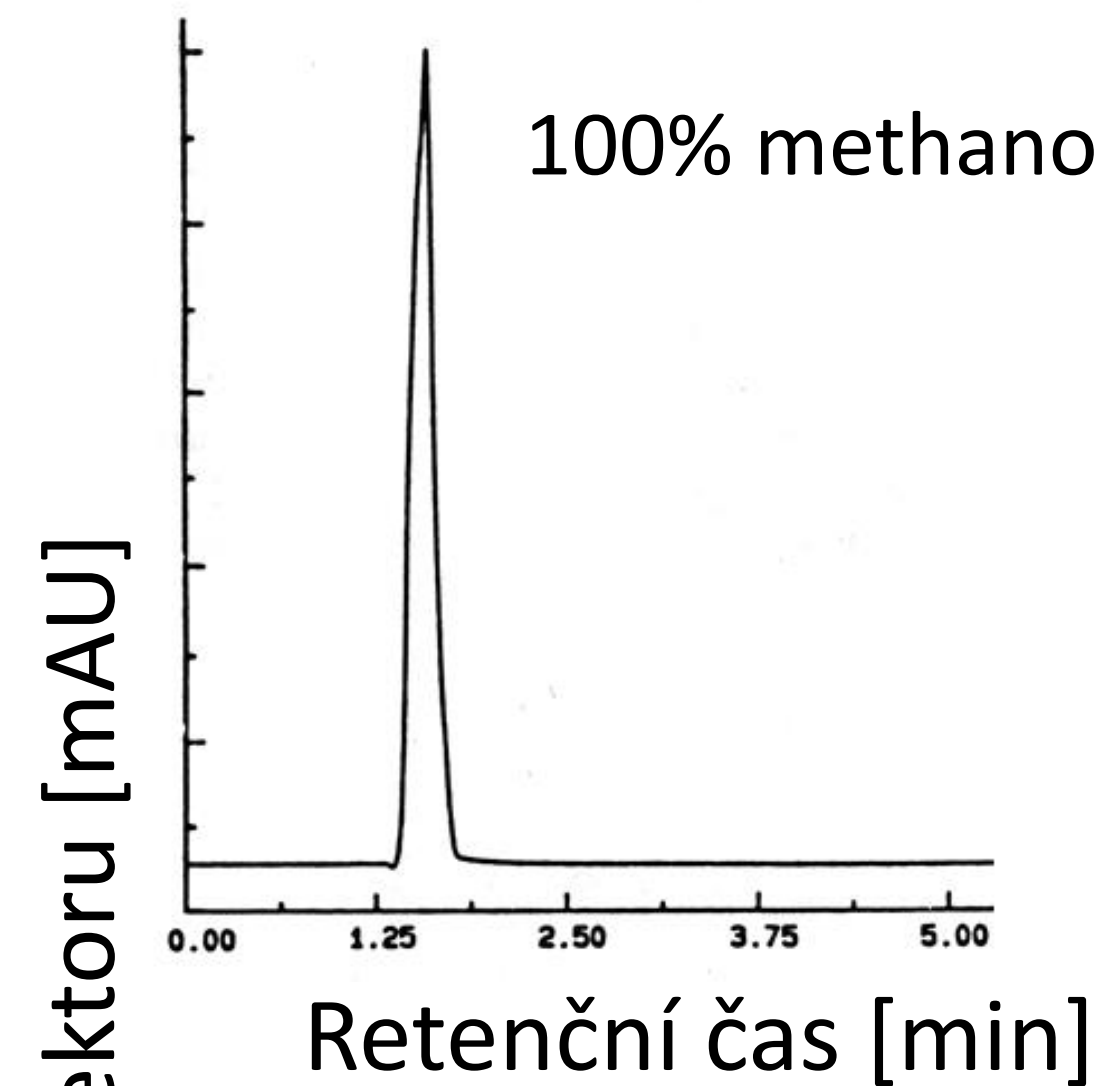
ENVIROMENTÁLNÍ ANALÝZY

Pesticidy
Herbicidy
PAU

Vývoj a optimalizace metody v HPLC

Volba vhodných rozpouštědel mobilní fáze

Analýza nitrosloučenin



Silný vliv obj. % organického modifikátoru v mobilní fázi na separaci

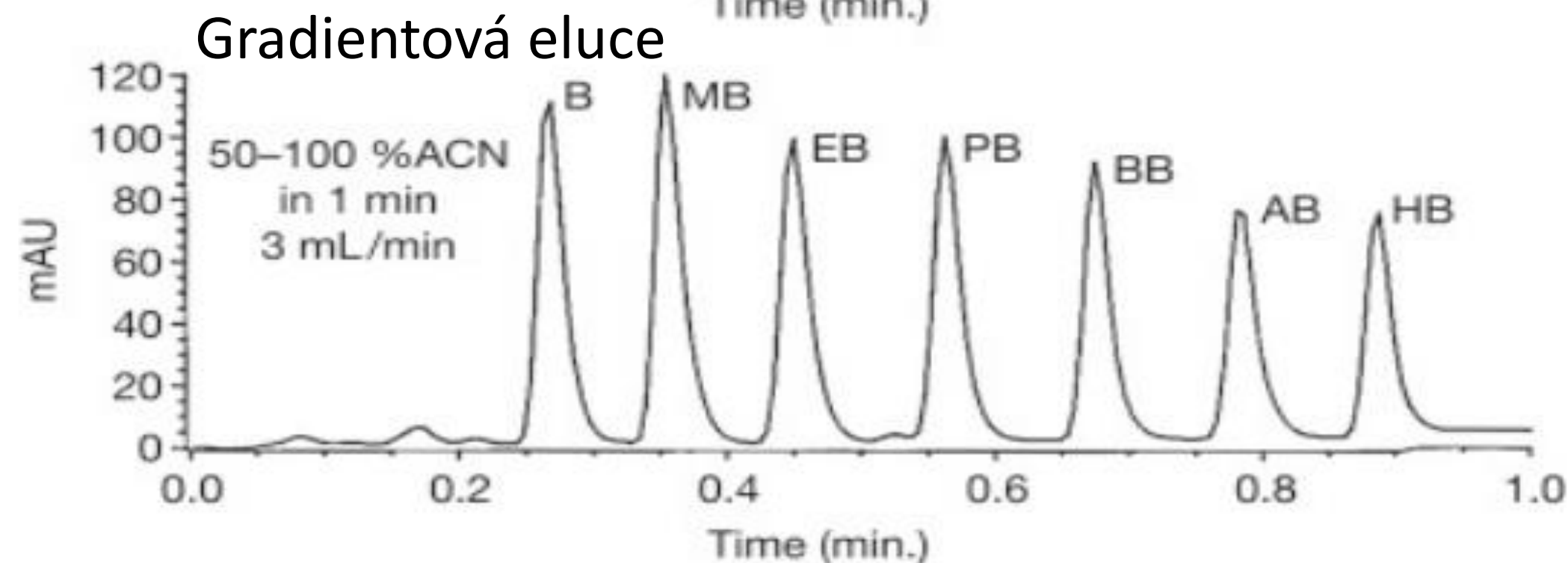
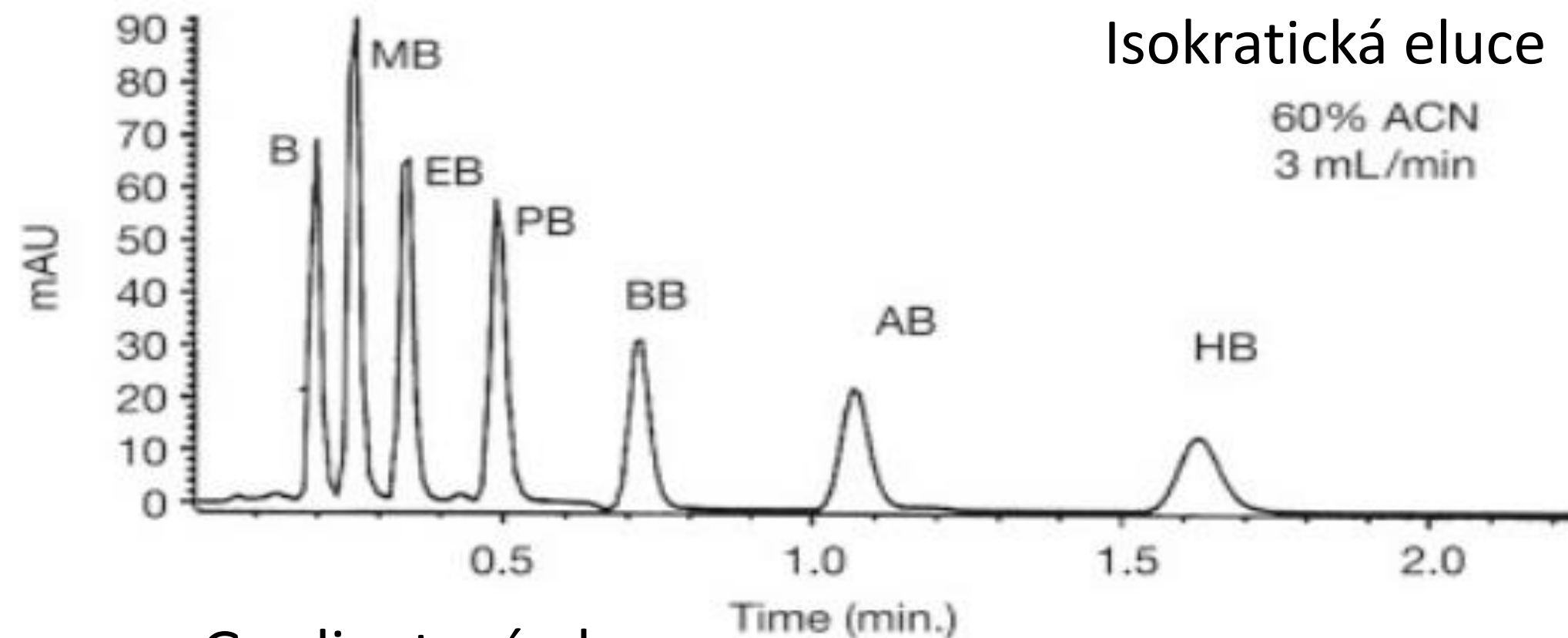
Vývoj a optimalizace metody v HPLC

Isokratická a gradientová eluce

Izokratická eluce: Složení mobilní fáze (její eluční síla) se během analýzy nemění

Gradientová eluce: Eluční síla mobilní fáze vzrůstá během analýzy (vhodnější pro složitější směsi)

Analýza alkylbenzenů



Analyty:

B: benzen

MB: methyl-

EB: ethyl-

PB: propyl-

BB: butyl-

AB: amyl-

HB: hexyl-benzen

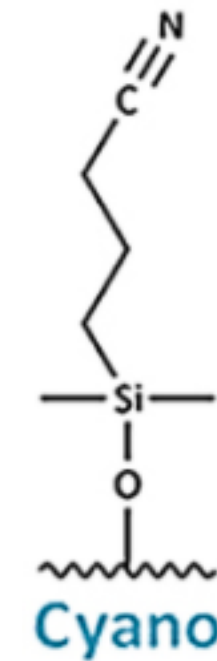
Kolona: C18 (30 mm × 3.0 mm; 3 μm I.D.)

Vývoj a optimalizace metody v HPLC

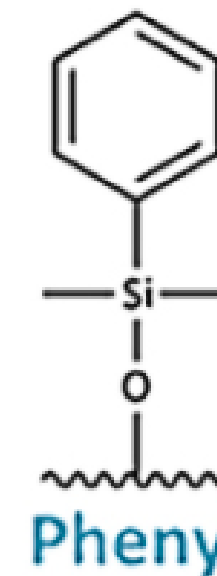
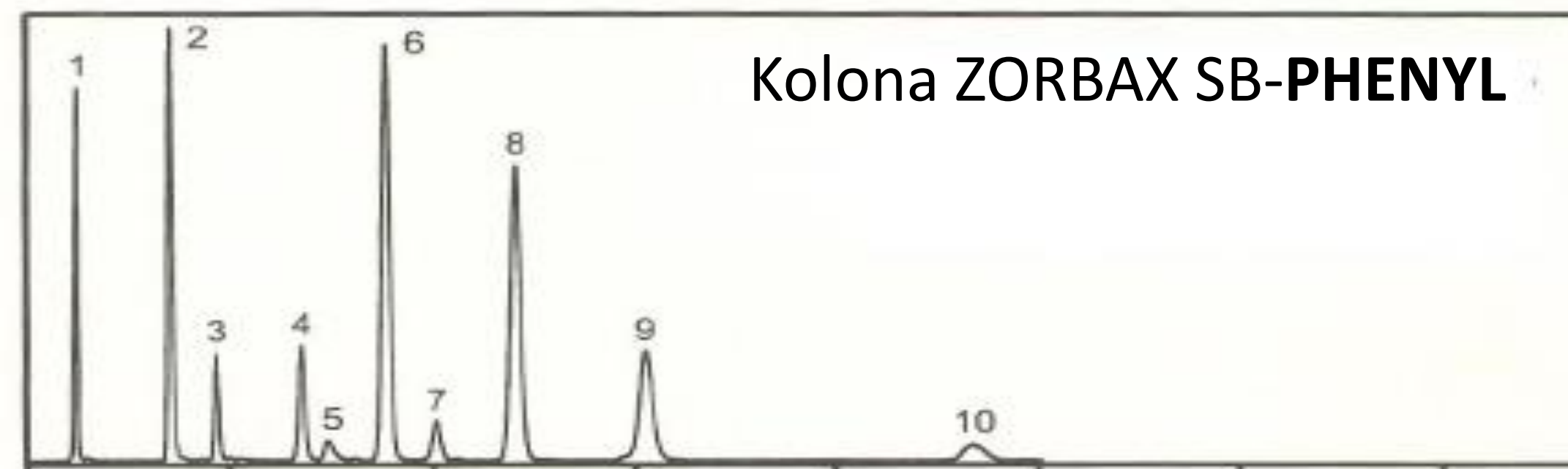
Volba chromatografické kolony

Analýza herbicidů

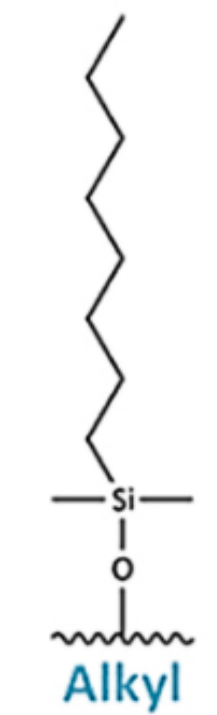
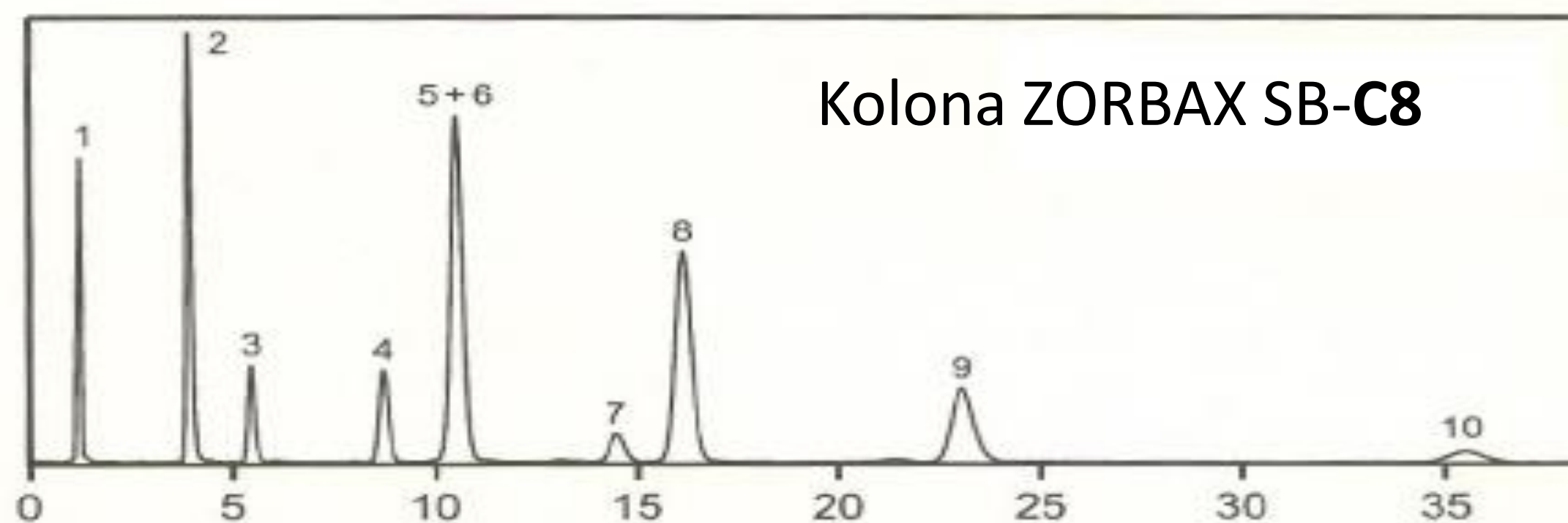
Odezva detektoru [mAU]



Cyano



Phenyl



Alkyl

Retenční čas [min]

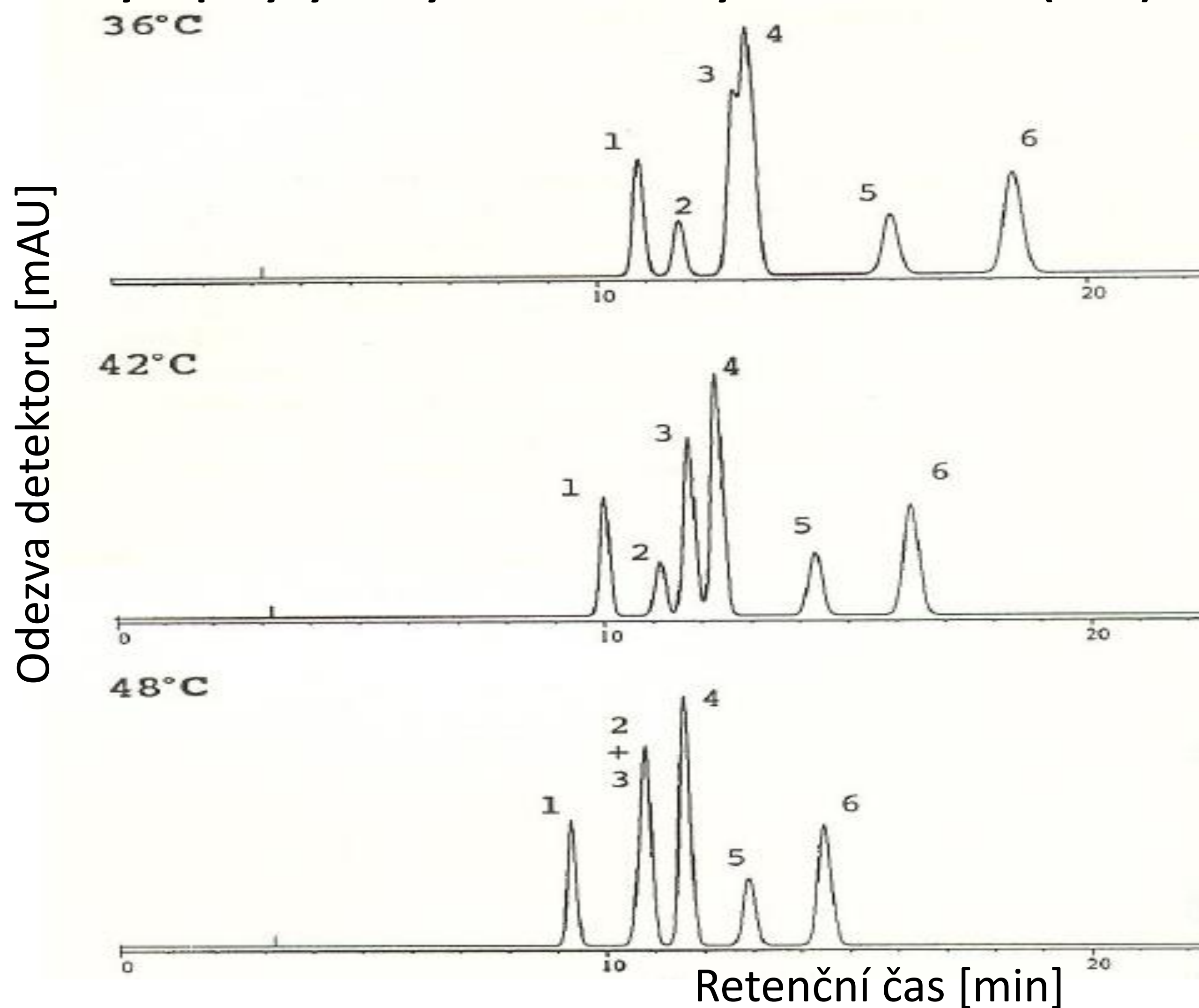
Analyty (UV detekce 254 nm):

1. BENTAZON
2. TEBOTHIURON
3. SIMAZIN
4. ATRAZIN
5. PROMETRON
6. DIURON
7. PROPAZIN
8. PROPANIL
9. PROMETRYN
10. METOLACHLOR

Vývoj a optimalizace metody v HPLC

Volba teploty chromatografické separace

Analýza polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH)



Analyty

1. ANTRACEN
2. *o*-TERPHENYL
3. FLUORANTHREN
4. *m*-TERPHENYL
5. TRIPHENYLEN
6. CHRYSEN

Volba vhodného detektoru (HPLC i obecně)

KRITÉRIA:

- 1) Fyzikálně-chemické vlastnosti analyzovaných látek
- 2) Požadovaná citlivost identifikace a kvantifikace
- 3) Různorodost vzorku (matricové efekty)
- 4) Dostupnost a cena detektoru

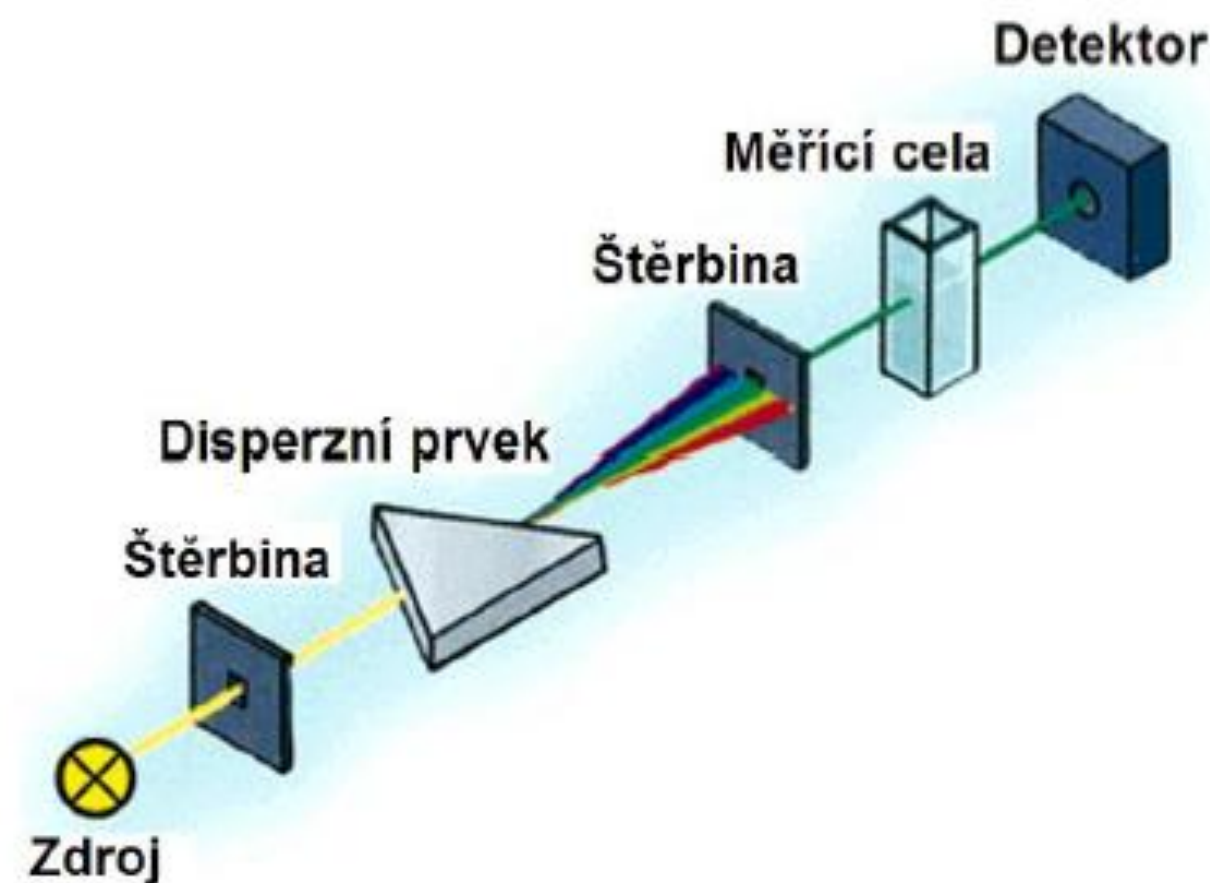
Detektory v HPLC

1) UV/VIS absorpční detektor

- Měří absorbanci HPLC eluátu v oblasti UV/VIS vlnových délek
- Velikost odezvy je dána Lambert-Beerovým zákonem

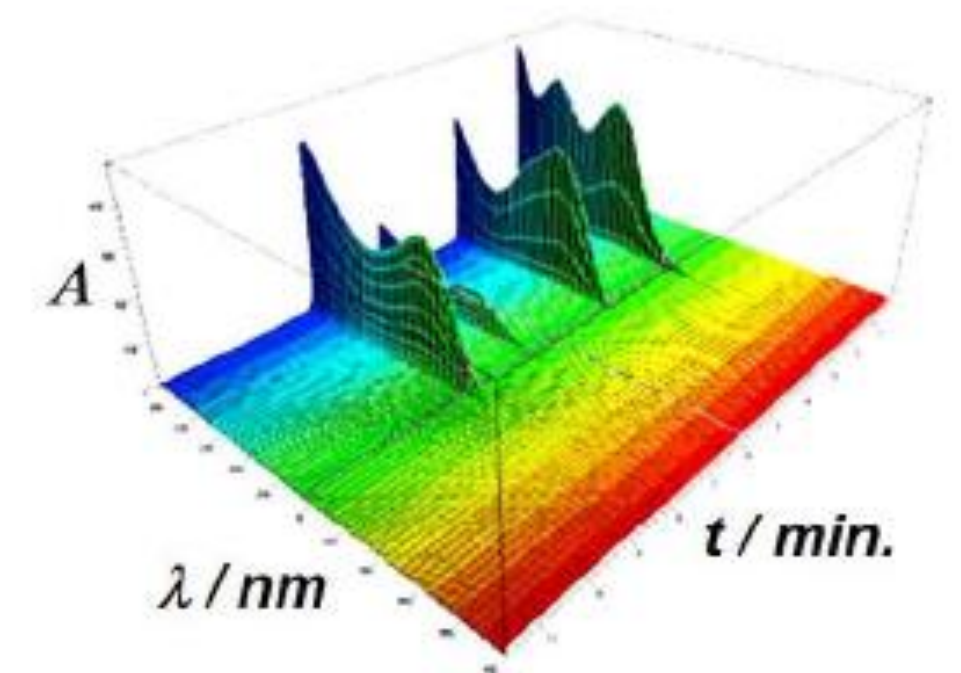
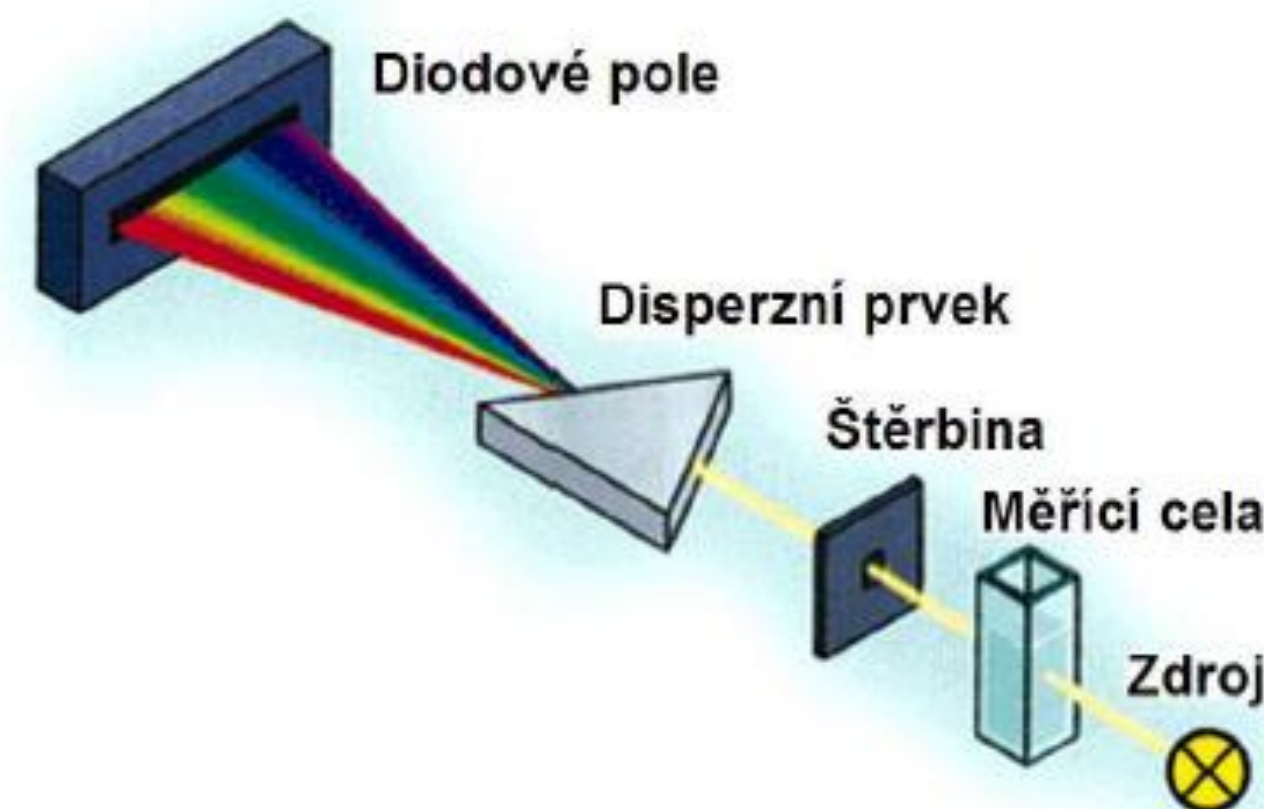
a) Fixní vlnová délka (nízkotlaká rtuťová výbojka 254 nm, zinková výbojka 214 nm)

b) Nastavitelná vlnová délka (výběr z několika vlnových délek)



2) Detektor s diodovým polem (DAD)

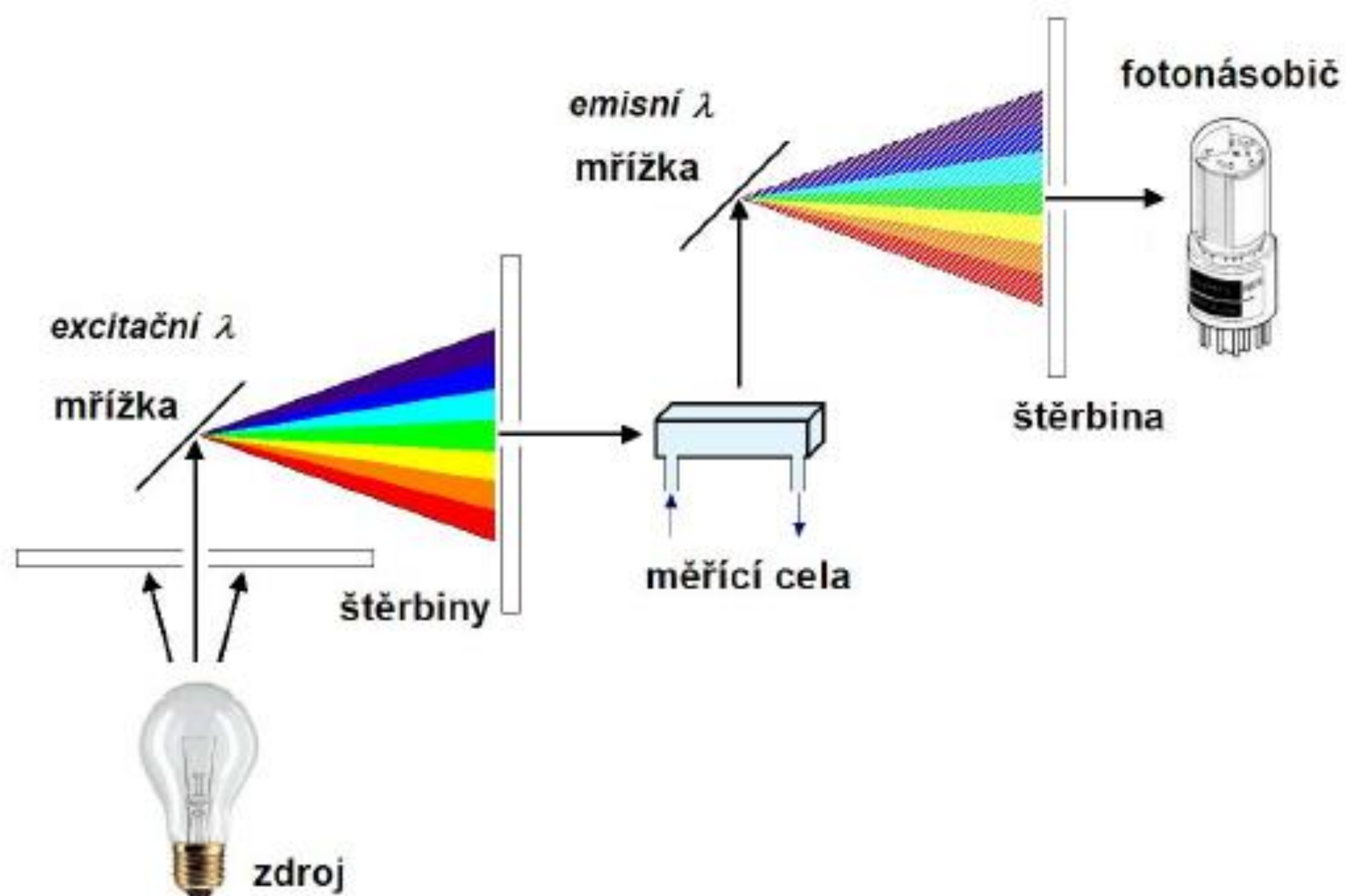
- Umožňují detekci analytu při jakékoliv zvolené vlnové délce
- Dobré, když nevíme, při jaké vlnové délce látka nejvíce absorbuje
- Odhalí, zda v píku eluuje pouze jedna látka nebo směs nerozdělených analytů



Detektory v HPLC

3) Fluorimetrický detektor

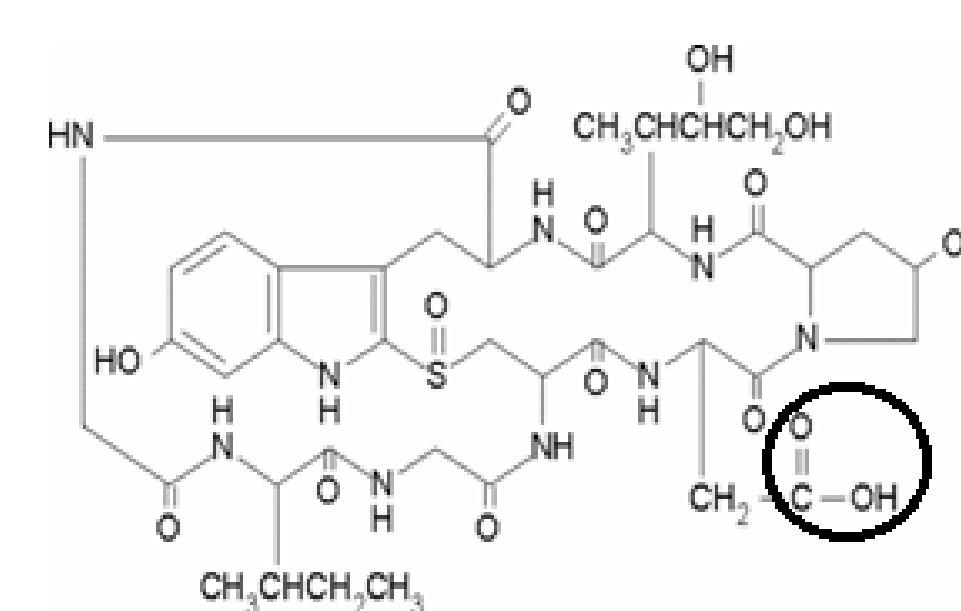
- Fotonásobič je chráněn pře dopadem excitačního záření
-> umísťuje se **KOLMO** na zdroj excitačního záření



A large, pale yellow mushroom with a thick, white, textured stem, growing in a forest floor covered with green foliage and brown leaves. The mushroom has a smooth, slightly domed cap and a very thick, almost bulbous stem. The base of the stem is covered in dark, soil-like material. The surrounding environment is a forest floor with various green leaves and brown, dried leaves.

Chromatogram showing the separation of four compounds: AMATOXINY (peaks 1 and 2) and FALOTOXINY (peaks 3 and 4). The x-axis is retention time in minutes (0 to 11), and the y-axis is detector response in mAU (-0.5 to 2.0). Peaks 1 and 2 are at approximately 4.3 and 4.8 minutes, while peaks 3 and 4 are at approximately 8.5 and 9.5 minutes.

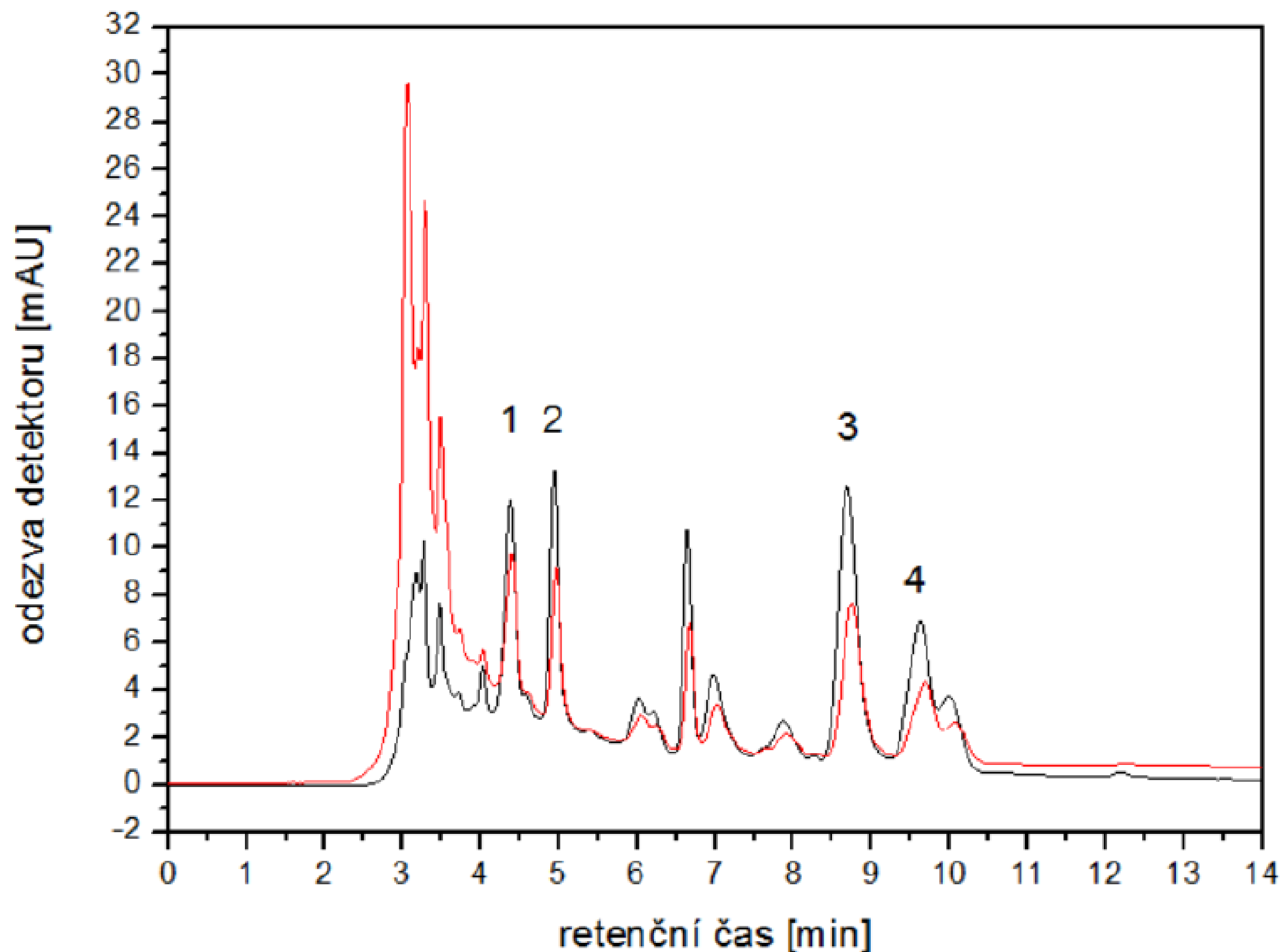
DAD detekce (295 nm)

CC(C)NC(=O)NC(=O)C(C)C(=O)NCC1C(=O)N(C)C(=O)N1CC2C(=O)N(C)C(=O)N2CC3C(=O)N(C)C(=O)N3CC4C(=O)N(C)C(=O)N4CC5C(=O)N(C)C(=O)N5CC6C(=O)N(C)C(=O)N6CC7C(=O)N(C)C(=O)N7CC8C(=O)N(C)C(=O)N8CC9C(=O)N(C)C(=O)N9CC10C(=O)N(C)C(=O)N10CC11C(=O)N(C)C(=O)N11CC12C(=O)N(C)C(=O)N12CC13C(=O)N(C)C(=O)N13CC14C(=O)N(C)C(=O)N14CC15C(=O)N(C)C(=O)N15CC16C(=O)N(C)C(=O)N16CC17C(=O)N(C)C(=O)N17CC18C(=O)N(C)C(=O)N18CC19C(=O)N(C)C(=O)N19CC20C(=O)N(C)C(=O)N20CC21C(=O)N(C)C(=O)N21CC22C(=O)N(C)C(=O)N22CC23C(=O)N(C)C(=O)N23CC24C(=O)N(C)C(=O)N24CC25C(=O)N(C)C(=O)N25CC26C(=O)N(C)C(=O)N26CC27C(=O)N(C)C(=O)N27CC28C(=O)N(C)C(=O)N28CC29C(=O)N(C)C(=O)N29CC30C(=O)N(C)C(=O)N30CC31C(=O)N(C)C(=O)N31CC32C(=O)N(C)C(=O)N32CC33C(=O)N(C)C(=O)N33CC34C(=O)N(C)C(=O)N34CC35C(=O)N(C)C(=O)N35CC36C(=O)N(C)C(=O)N36CC37C(=O)N(C)C(=O)N37CC38C(=O)N(C)C(=O)N38CC39C(=O)N(C)C(=O)N39CC40C(=O)N(C)C(=O)N40CC41C(=O)N(C)C(=O)N41CC42C(=O)N(C)C(=O)N42CC43C(=O)N(C)C(=O)N43CC44C(=O)N(C)C(=O)N44CC45C(=O)N(C)C(=O)N45CC46C(=O)N(C)C(=O)N46CC47C(=O)N(C)C(=O)N47CC48C(=O)N(C)C(=O)N48CC49C(=O)N(C)C(=O)N49CC50C(=O)N(C)C(=O)N50CC51C(=O)N(C)C(=O)N51CC52C(=O)N(C)C(=O)N52CC53C(=O)N(C)C(=O)N53CC54C(=O)N(C)C(=O)N54CC55C(=O)N(C)C(=O)N55CC56C(=O)N(C)C(=O)N56CC57C(=O)N(C)C(=O)N57CC58C(=O)N(C)C(=O)N58CC59C(=O)N(C)C(=O)N59CC60C(=O)N(C)C(=O)N60CC61C(=O)N(C)C(=O)N61CC62C(=O)N(C)C(=O)N62CC63C(=O)N(C)C(=O)N63CC64C(=O)N(C)C(=O)N64CC65C(=O)N(C)C(=O)N65CC66C(=O)N(C)C(=O)N66CC67C(=O)N(C)C(=O)N67CC68C(=O)N(C)C(=O)N68CC69C(=O)N(C)C(=O)N69CC70C(=O)N(C)C(=O)N70CC71C(=O)N(C)C(=O)N71CC72C(=O)N(C)C(=O)N72CC73C(=O)N(C)C(=O)N73CC74C(=O)N(C)C(=O)N74CC75C(=O)N(C)C(=O)N75CC76C(=O)N(C)C(=O)N76CC77C(=O)N(C)C(=O)N77CC78C(=O)N(C)C(=O)N78CC79C(=O)N(C)C(=O)N79CC80C(=O)N(C)C(=O)N80CC81C(=O)N(C)C(=O)N81CC82C(=O)N(C)C(=O)N82CC83C(=O)N(C)C(=O)N83CC84C(=O)N(C)C(=O)N84CC85C(=O)N(C)C(=O)N85CC86C(=O)N(C)C(=O)N86CC87C(=O)N(C)C(=O)N87CC88C(=O)N(C)C(=O)N88CC89C(=O)N(C)C(=O)N89CC90C(=O)N(C)C(=O)N90CC91C(=O)N(C)C(=O)N91CC92C(=O)N(C)C(=O)N92CC93C(=O)N(C)C(=O)N93CC94C(=O)N(C)C(=O)N94CC95C(=O)N(C)C(=O)N95CC96C(=O)N(C)C(=O)N96CC97C(=O)N(C)C(=O)N97CC98C(=O)N(C)C(=O)N98CC99C(=O)N(C)C(=O)N99CC100C(=O)N(C)C(=O)N100CC101C(=O)N(C)C(=O)N101CC102C(=O)N(C)C(=O)N102CC103C(=O)N(C)C(=O)N103CC104C(=O)N(C)C(=O)N104CC105C(=O)N(C)C(=O)N105CC106C(=O)N(C)C(=O)N106CC107C(=O)N(C)C(=O)N107CC108C(=O)N(C)C(=O)N108CC109C(=O)N(C)C(=O)N109CC110C(=O)N(C)C(=O)N110CC111C(=O)N(C)C(=O)N111CC112C(=O)N(C)C(=O)N112CC113C(=O)N(C)C(=O)N113CC114C(=O)N(C)C(=O)N114CC115C(=O)N(C)C(=O)N115CC116C(=O)N(C)C(=O)N116CC117C(=O)N(C)C(=O)N117CC118C(=O)N(C)C(=O)N118CC119C(=O)N(C)C(=O)N119CC120C(=O)N(C)C(=O)N120CC121C(=O)N(C)C(=O)N121CC122C(=O)N(C)C(=O)N122CC123C(=O)N(C)C(=O)N123CC124C(=O)N(C)C(=O)N124CC125C(=O)N(C)C(=O)N125CC126C(=O)N(C)C(=O)N126CC127C(=O)N(C)C(=O)N127CC128C(=O)N(C)C(=O)N128CC129C(=O)N(C)C(=O)N129CC130C(=O)N(C)C(=O)N130CC131C(=O)N(C)C(=O)N131CC132C(=O)N(C)C(=O)N132CC133C(=O)N(C)C(=O)N133CC134C(=O)N(C)C(=O)N134CC135C(=O)N(C)C(=O)N135CC136C(=O)N(C)C(=O)N136CC137C(=O)N(C)C(=O)N137CC138C(=O)N(C)C(=O)N138CC139C(=O)N(C)C(=O)N139CC140C(=O)N(C)C(=O)N140CC141C(=O)N(C)C(=O)N141CC142C(=O)N(C)C(=O)N142CC143C(=O)N(C)C(=O)N143CC144C(=O)N(C)C(=O)N144CC145C(=O)N(C)C(=O)N145CC146C(=O)N(C)C(=O)N146CC147C(=O)N(C)C(=O)N147CC148C(=O)N(C)C(=O)N148CC149C(=O)N(C)C(=O)N149CC150C(=O)N(C)C(=O)N150CC151C(=O)N(C)C(=O)N151CC152C(=O)N(C)C(=O)N152CC153C(=O)N(C)C(=O)N153CC154C(=O)N(C)C(=O)N154CC155C(=O)N(C)C(=O)N155CC156C(=O)N(C)C(=O)N156CC157C(=O)N(C)C(=O)N157CC158C(=O)N(C)C(=O)N158CC159C(=O)N(C)C(=O)N159CC160C(=O)N(C)C(=O)N160CC161C(=O)N(C)C(=O)N161CC162C(=O)N(C)C(=O)N162CC163C(=O)N(C)C(=O)N163CC164C(=O)N(C)C(=O)N164CC165C(=O)N(C)C(=O)N165CC166C(=O)N(C)C(=O)N166CC167C(=O)N(C)C(=O)N167CC168C(=O)N(C)C(=O)N168CC169C(=O)N(C)C(=O)N169CC170C(=O)N(C)C(=O)N170CC171C(=O)N(C)C(=O)N171CC172C(=O)N(C)C(=O)N172CC173C(=O)N(C)C(=O)N173CC174C(=O)N(C)C(=O)N174CC175C(=O)N(C)C(=O)N175CC176C(=O)N(C)C(=O)N176CC177C(=O)N(C)C(=O)N177CC178C(=O)N(C)C(=O)N178CC179C(=O)N(C)C(=O)N179CC180C(=O)N(C)C(=O)N180CC181C(=O)N(C)C(=O)N181CC182C(=O)N(C)C(=O)N182CC183C(=O)N(C)C(=O)N183CC184C(=O)N(C)C(=O)N184CC185C(=O)N(C)C(=O)N185CC186C(=O)N(C)C(=O)N186CC187C(=O)N(C)C(=O)N187CC188C(=O)N(C)C(=O)N188CC189C(=O)N(C)C(=O)N189CC190C(=O)N(C)C(=O)N190CC191C(=O)N(C)C(=O)N191CC192C(=O)N(C)C(=O)N192CC193C(=O)N(C)C(=O)N193CC194C(=O)N(C)C(=O)N194CC195C(=O)N(C)C(=O)N195CC196C(=O)N(C)C(=O)N196CC197C(=O)N(C)C(=O)N197CC198C(=O)N(C)C(=O)N198CC199C(=O)N(C)C(=O)N199CC200C(=O)N(C)C(=O)N200CC201C(=O)N(C)C(=O)N201CC202C(=O)N(C)C(=O)N202CC203C(=O)N(C)C(=O)N203CC204C(=O)N(C)C(=O)N204CC20[illegible]CC(CO)CCNC(=O)C1CCNC(=O)N1C(=O)CC2C(=O)NC(C)C(=O)N2CC3=C(N)C=CC=C3

4. faloidin

HPLC analýza toxinů muchomůrky zelené

Klobouk muchomůrky zelené



Analyzované toxiny:

1. β -amanitin
2. α -amanitin
3. falacidin
4. faloidin

Červený chromatogram – před druhou extrakcí

Černý chromatogram – po druhé extrakci

Stacionární fáze: Zorbax-Phenyl

Mobilní fáze: 1 M octan amonný o pH 3,33 (A) a methanol (B) = 55:45
DAD detekce (295 nm)



Kazuistika otrav muchomůrkou zelenou

Případ č. 1

Do FN Olomouc byla přijata 85letá žena pro extrémní dehydrataci, **zvracení** a opakované průjmy. Před **třemi dny** požíla houby. Při příjmu byla u pacientky výraznější porucha vědomí, bez užitečného kontaktu, rozumí, ale nekomunikuje a je neklidná. V laboratorních testech vysoké hladiny **aminotransferáz** a kreatininu. Po několika hodinách u ní dochází k multiorgánovému selhání a umírá. V moči byl posmrtně prokázán **α -amanitin** (75 hodin po intoxikaci). Jednalo se o otravu muchomůrkou zelenou.

Případ č. 2

V tomto případě šlo o 7leté dítě, které **dva dny** po sobě jedlo houbový pokrm. Následující den, vzhledem k **zažívacím potížím**, rodiče s dítětem navštívili dětského lékaře, kde se ovšem **nezmínili o požití hub, a tak dítě bylo odesláno domů**. Po dalším zhoršení stavu, bylo dítě čtvrtý den od požití hub hospitalizováno v nemocnici, kde již rodiče uvedli požití hub. Vzhledem k vysoké hodnotě **jaterních testů** vzniklo podezření na požití muchomůrky zelené. Přes zahájení léčby dítě umírá **7. den** od požití hub. Moč byla odebrána pátý den od požití hub. Při pitvě byl odebrán obsah apendixu a **střevní obsah**, byla zde potvrzena přítomnost **amatoxinů a falotoxinů**. Vzhledem k provedené dialýze nebyla již prokázána těchto toxinů v moči dítěte.

Detektory v HPLC

5) Hmotnostně-spektrometrický detektor (MS)

Fred McLafferty – první spojení HPLC-MS (1973)

- **Hmotnostní spektrometrie:** fyzikálně-chemická metoda určování **hmotností** atomů a molekul po jejich převedení na kladně nebo záporně nabitě ionty
- Tato kombinace se stala jednou z klíčových pro farmaceutickou a toxikologickou analýzu, v testování kvality potravin a analýze životního prostředí
- Můžeme v jedné analýze zároveň separovat i identifikovat složitou směs látek



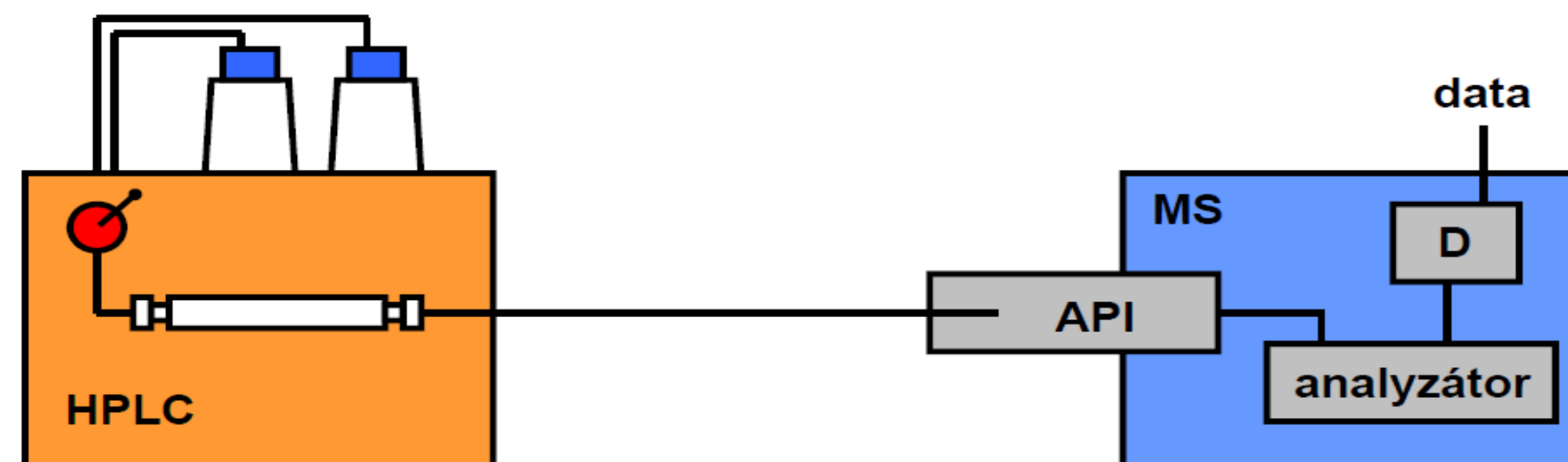
1923 –

HPLC

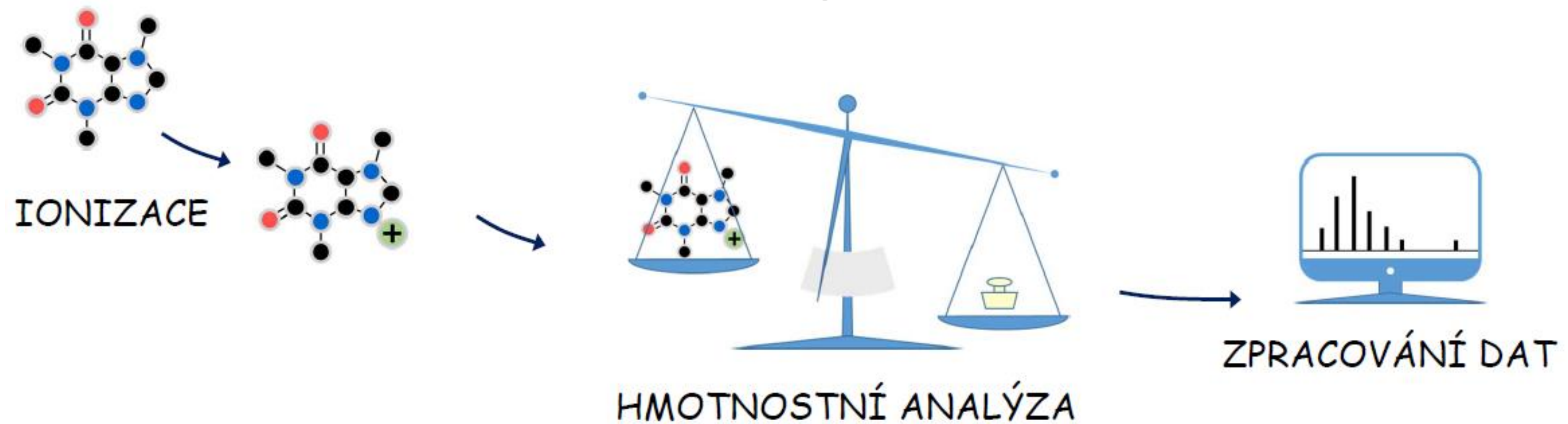
- + vysoká separační účinnost
- málo informací pro identifikaci složek vzorku (i při použití zmíněných UV/VIS detektorů)

MS

- bez možnosti separace
- + velké množství informací pro identifikaci složek vzorku

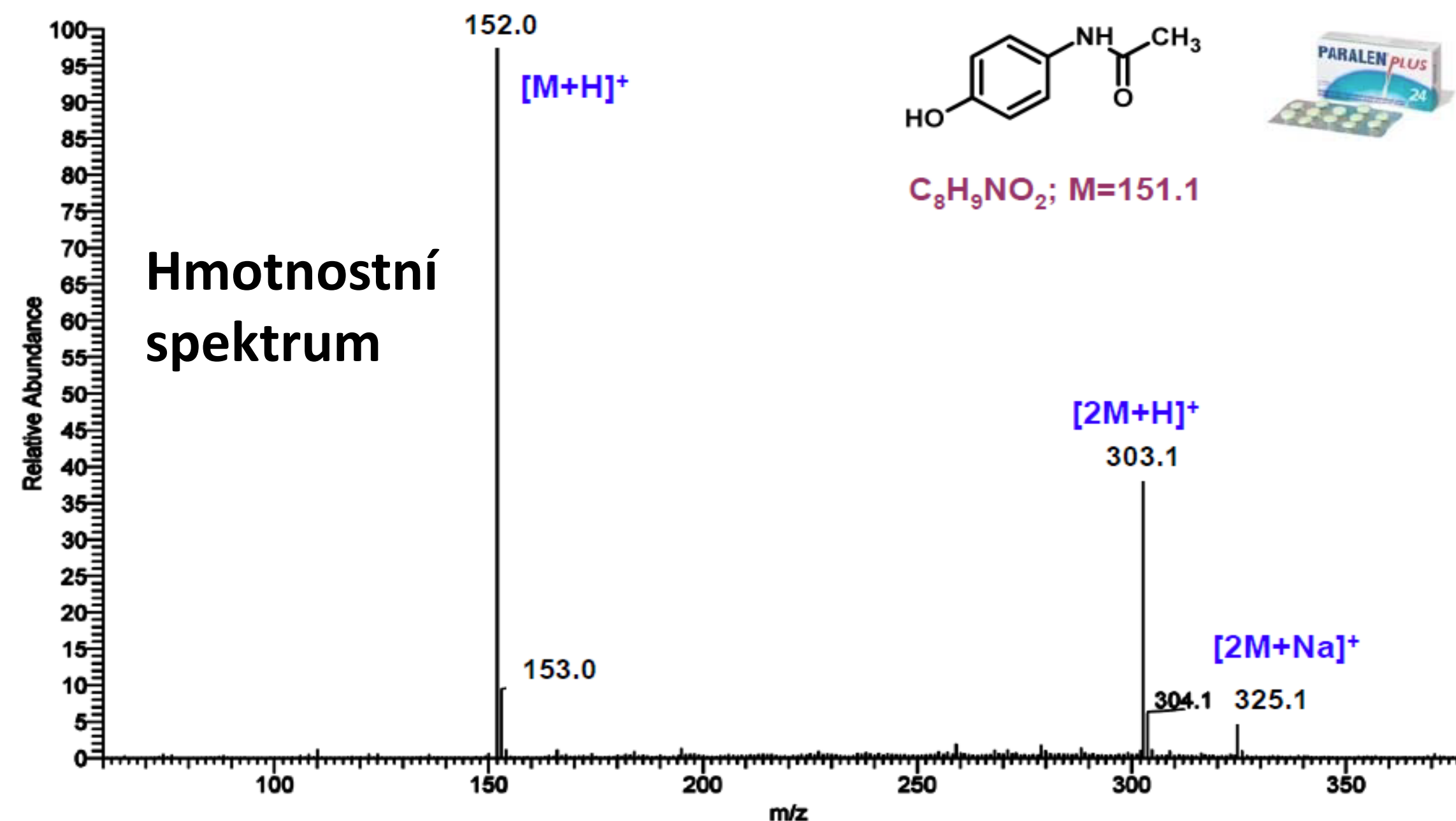


Hmotnostní spektrometrie



Paracetamol N-(4-hydroxyfenyl)acetamid

ESI-MS



HPLC-MS (ÚOCHB AV ČR)



Orbitrap Fusion™ Lumos™ (Thermo Scientific)

Spojení HPLC-MS

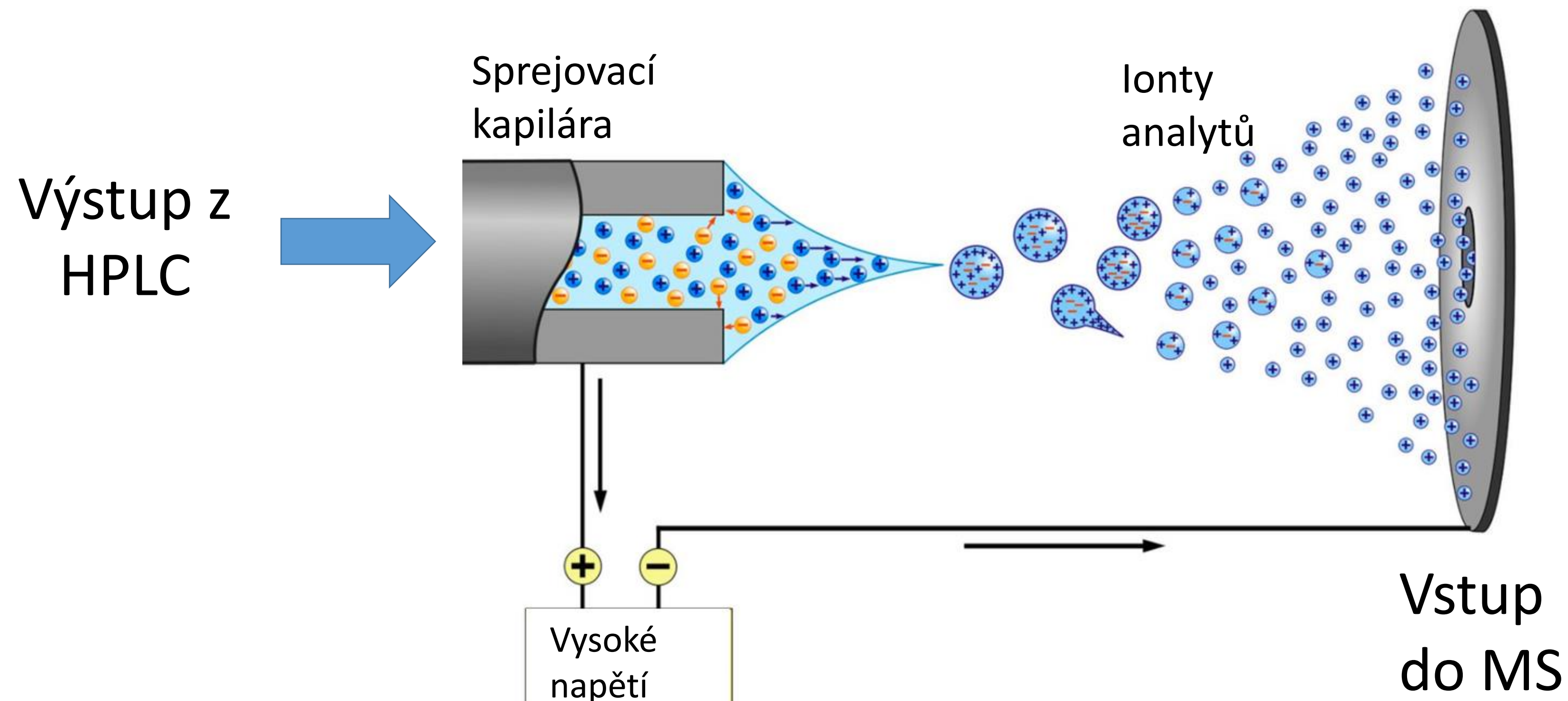
Iontový zdroj

ÚKOL: Potřebujeme převést kapalný vzorek z HPLC do plynné fáze a zionizovat

Ionizace elektrosprejem (ESI)

Pomocí intenzivního elektrického pole

Na sprejovací kapiláru vloženo vysoké napětí (3000 V)



Spojení HPLC-MS

Analyzátor

ÚKOL: Rozdělit ionty vzniklé v iontovém zdroji podle HMOTNOSTI a NÁBOJE (poměr m/z)

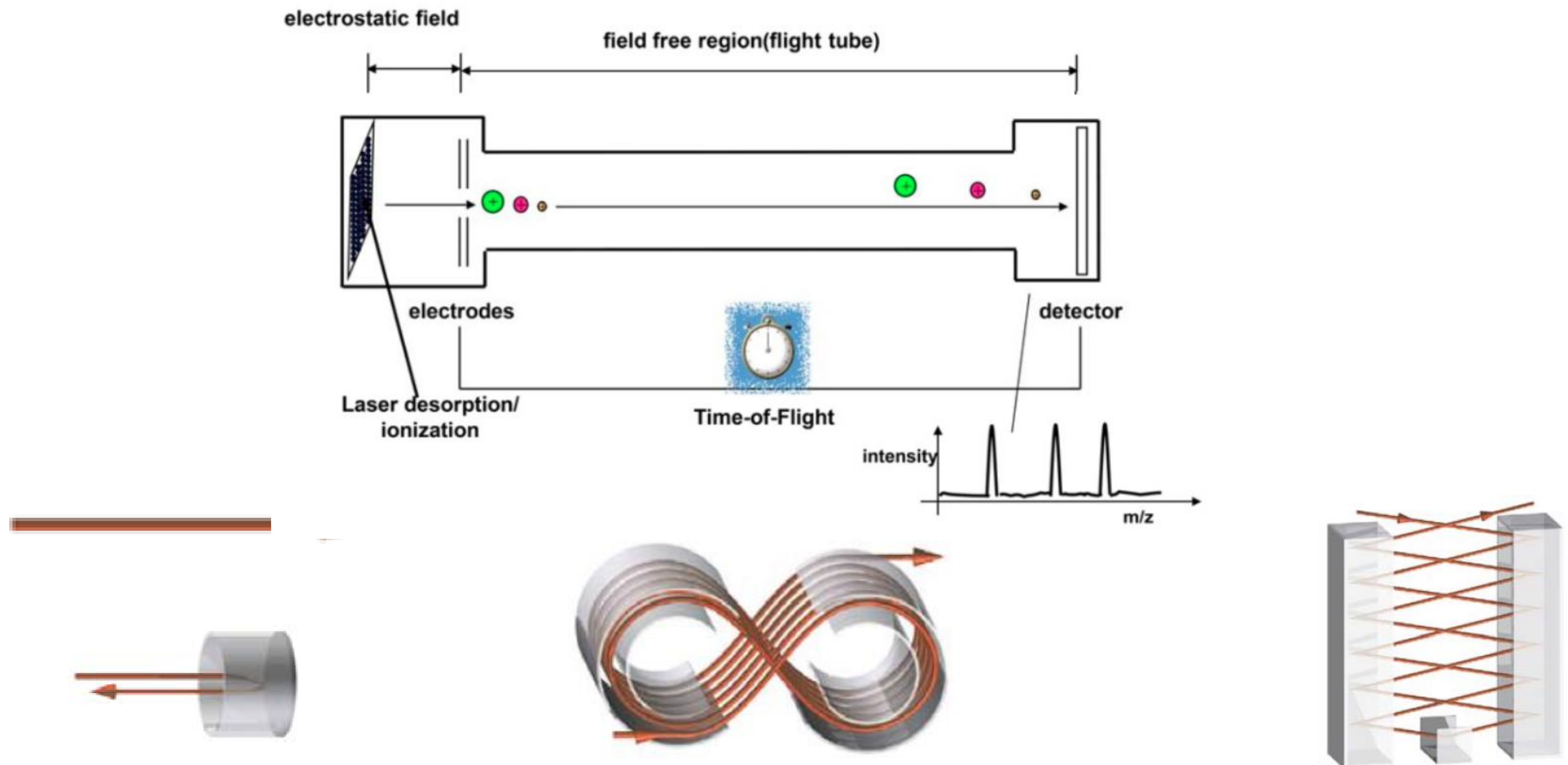
Analyzátor doby letu (TOF)

- Udělíme vzniklým iontům energii pomocí elektrických a magnetických polí
 - Mezi dvě mřížky se vloží vysoké napětí -> obrovské urychlení, zvýšení kinetické energie -> drift letovou trubicí
 - Měříme čas letu různých iontů
 - Malé rozdíly v době letu (ns) -> rozlišíme od sebe ionty lišící se m/z -> vážíme molekuly na nejpřesnějších analytických vahách



Spojení HPLC-MS

Analyzátor doby letu (TOF)

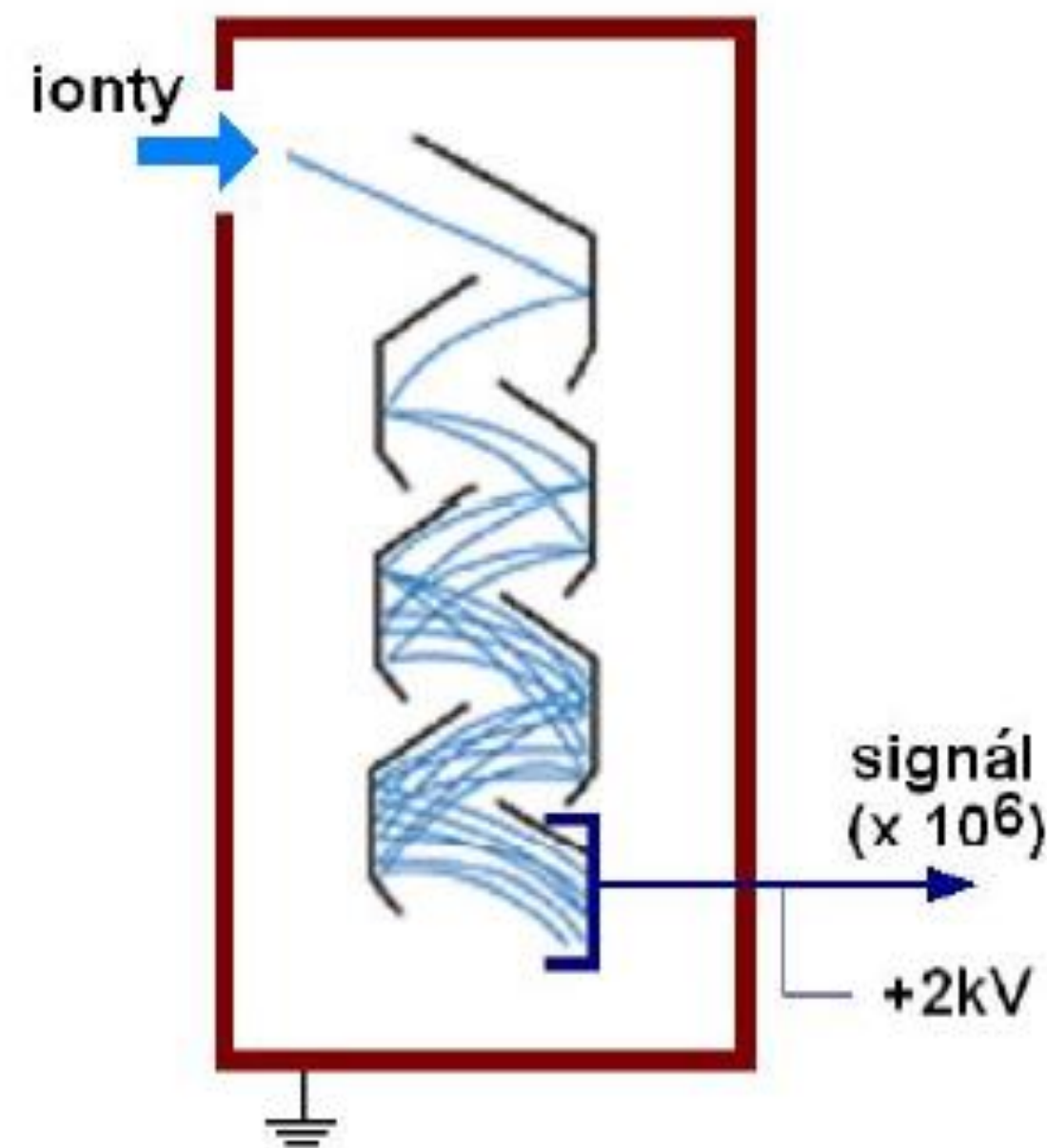


Spojení HPLC-MS

Detektor

ÚKOL: Zjistit, kolik je zde vytvořených iontů („počítadlo“)

- zařízení, které převádí proud nabitých částic (iontů) na měřitelnou veličinu (elektrický proud)



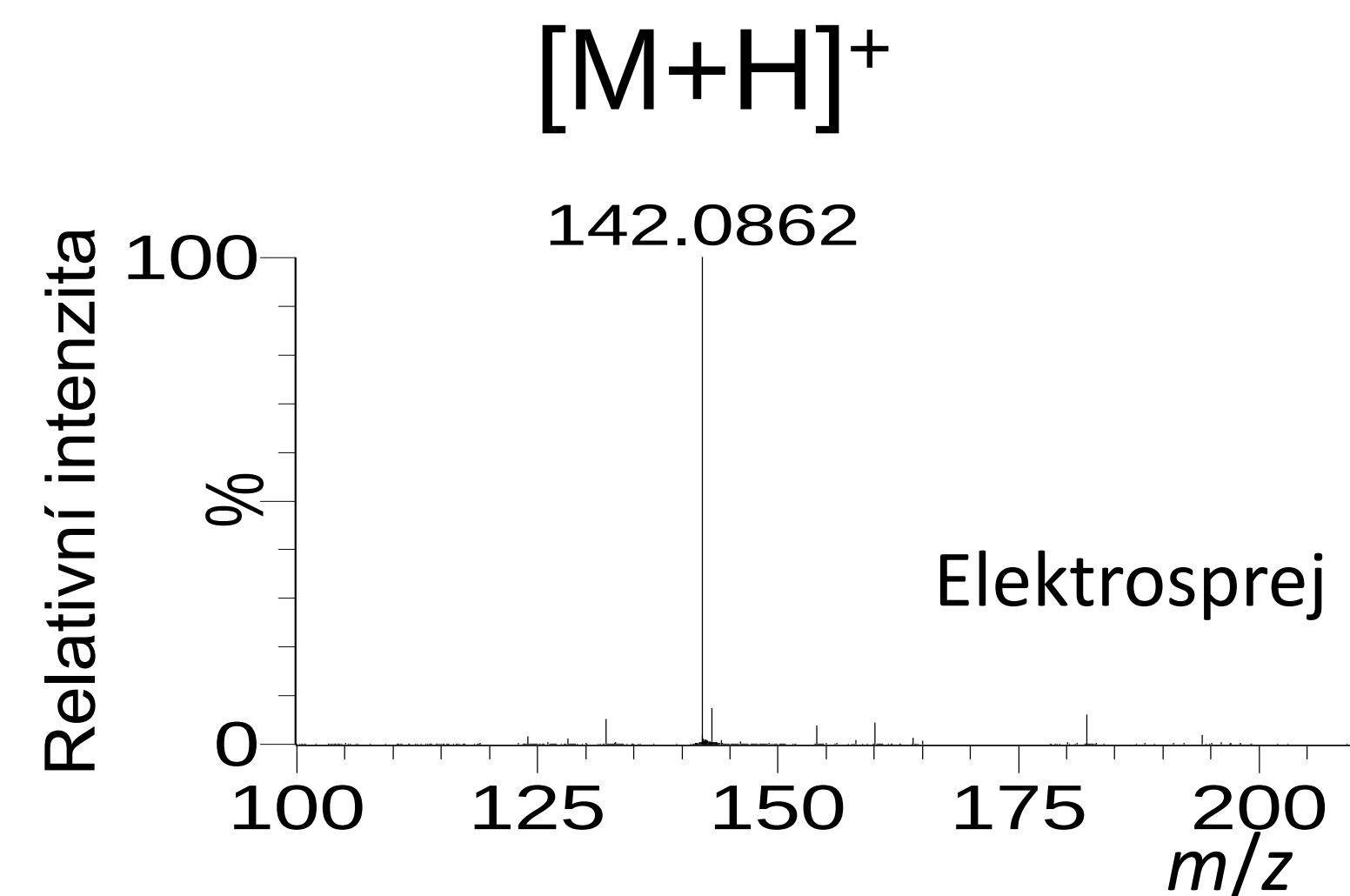
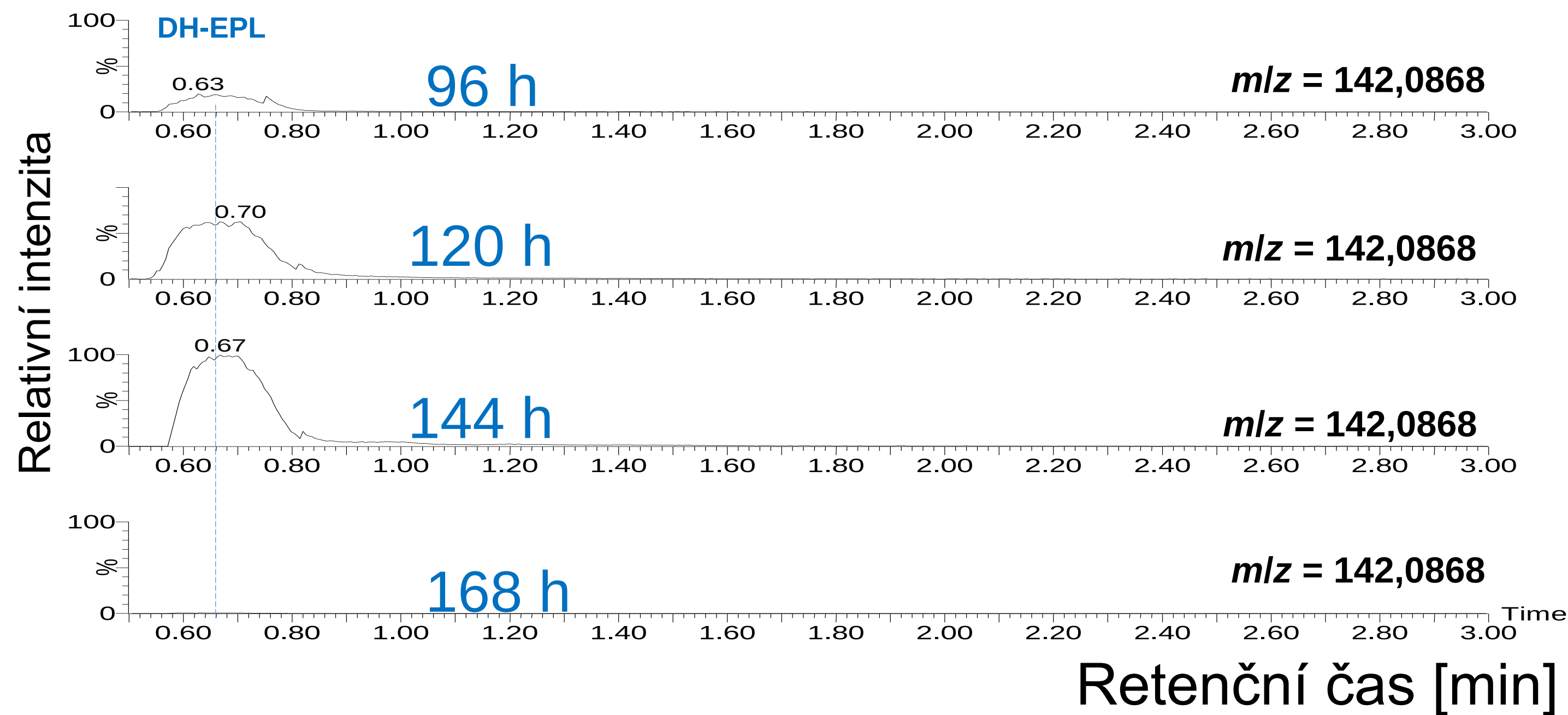
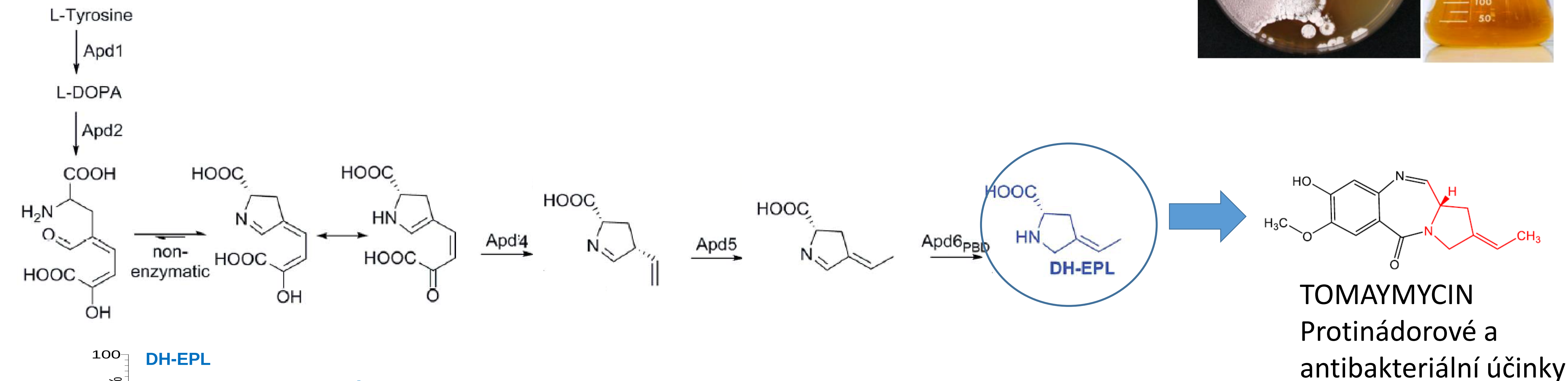
ELEKTRONOVÝ NÁSOBIČ

Kaskádovitým efektem vznikne obrovské množství elektronů, které jsou pak detekovány



Analýzy HPLC-MS

Studium metabolitů biosyntetické dráhy bakterií = metabolomika





Identifikace bakterií, kvasinek a plísni pomocí MALDI-TOF-MS

Nikoliv HPLC, ale samotný MS systém

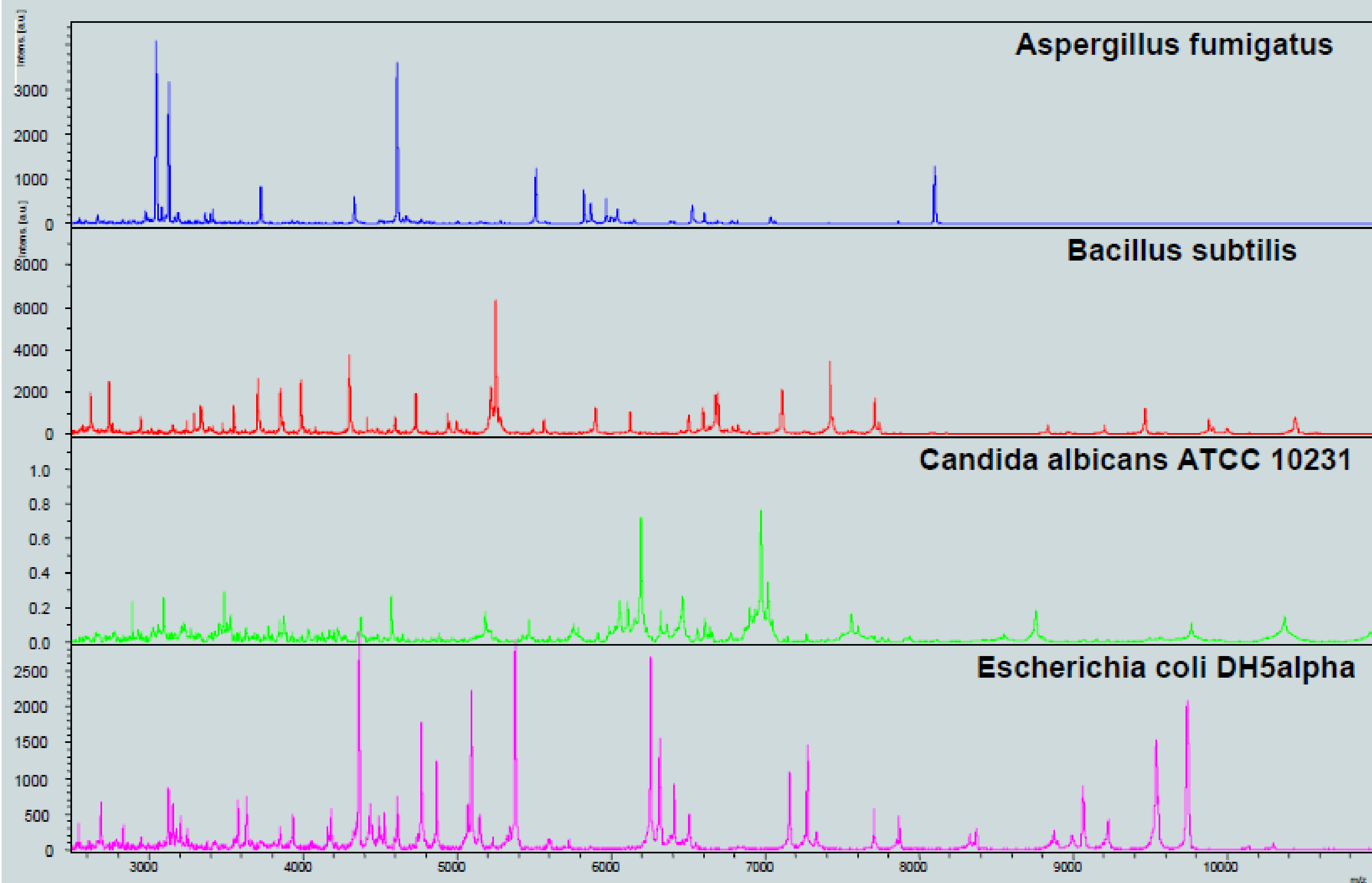


charakteristická spektra tzv. otisk prstu → porovnání s databází



Identifikace bakterií, kvasinek a plísní pomocí MALDI-TOF-MS

gram+ and gram- bacteria, yeasts, filamentous fungi

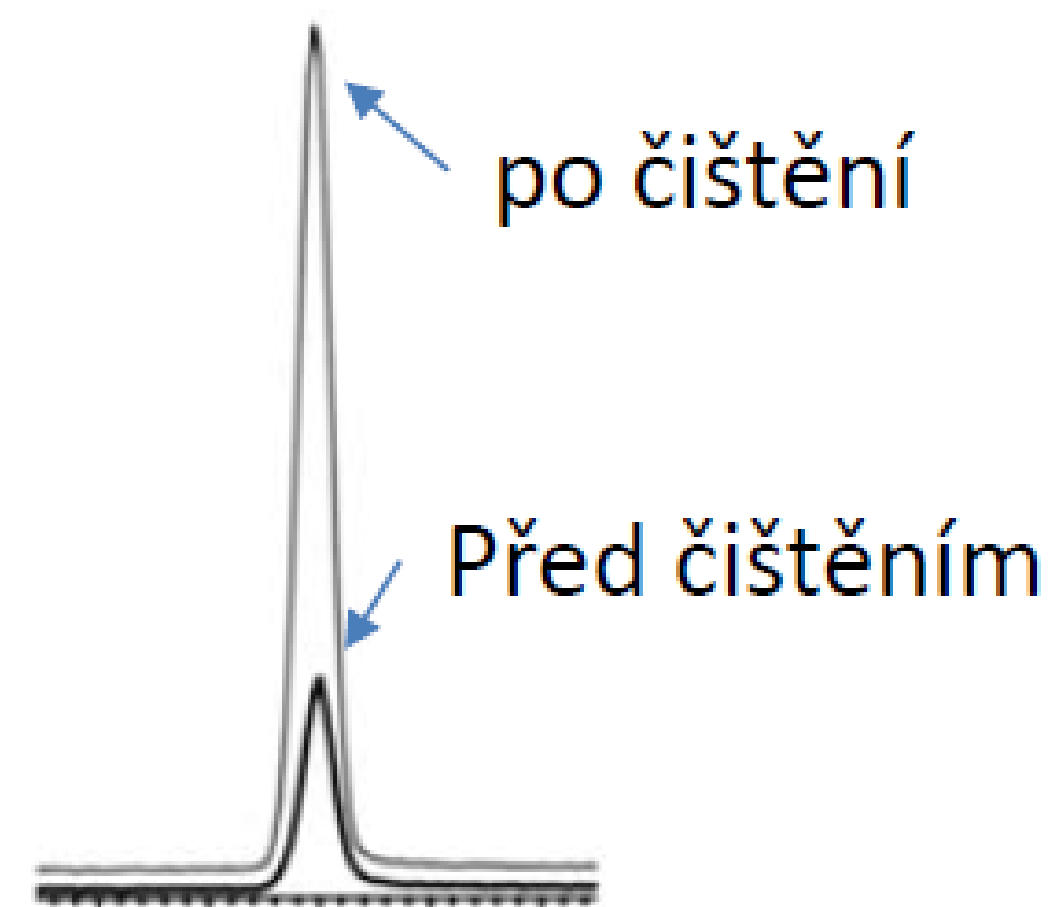
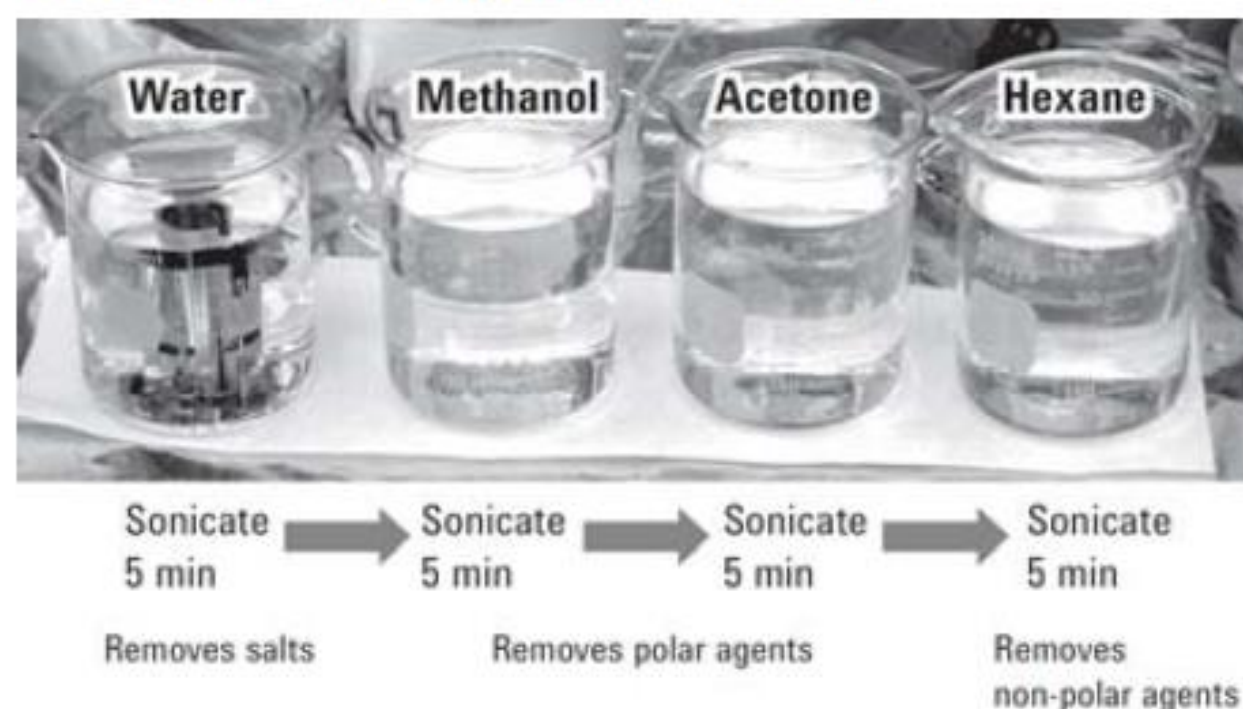


Čištění HPLC-MS systému

Čištění iontového zdroje

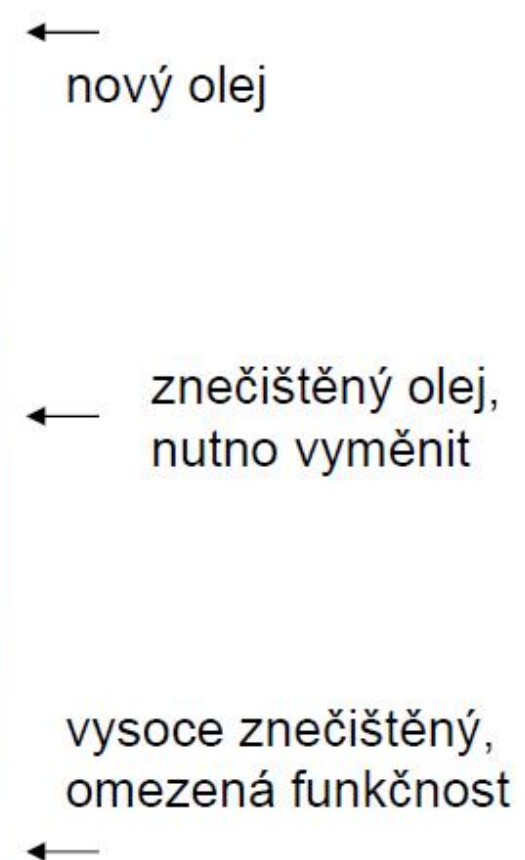
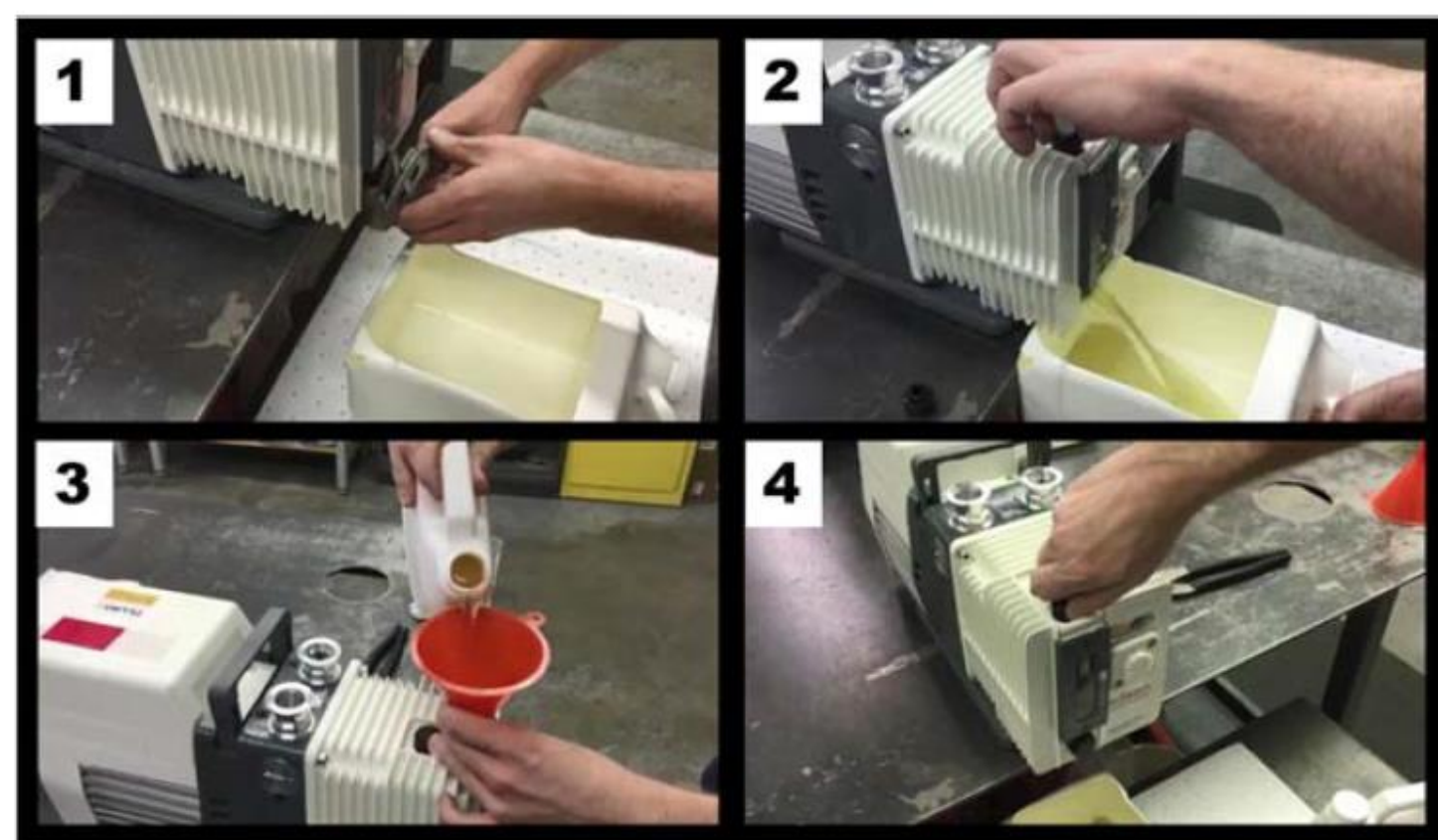
Ztráta citlivosti, příp. zhoršení tvaru MS signálů → čištění zdroje

sonikace v rozpouštědlech



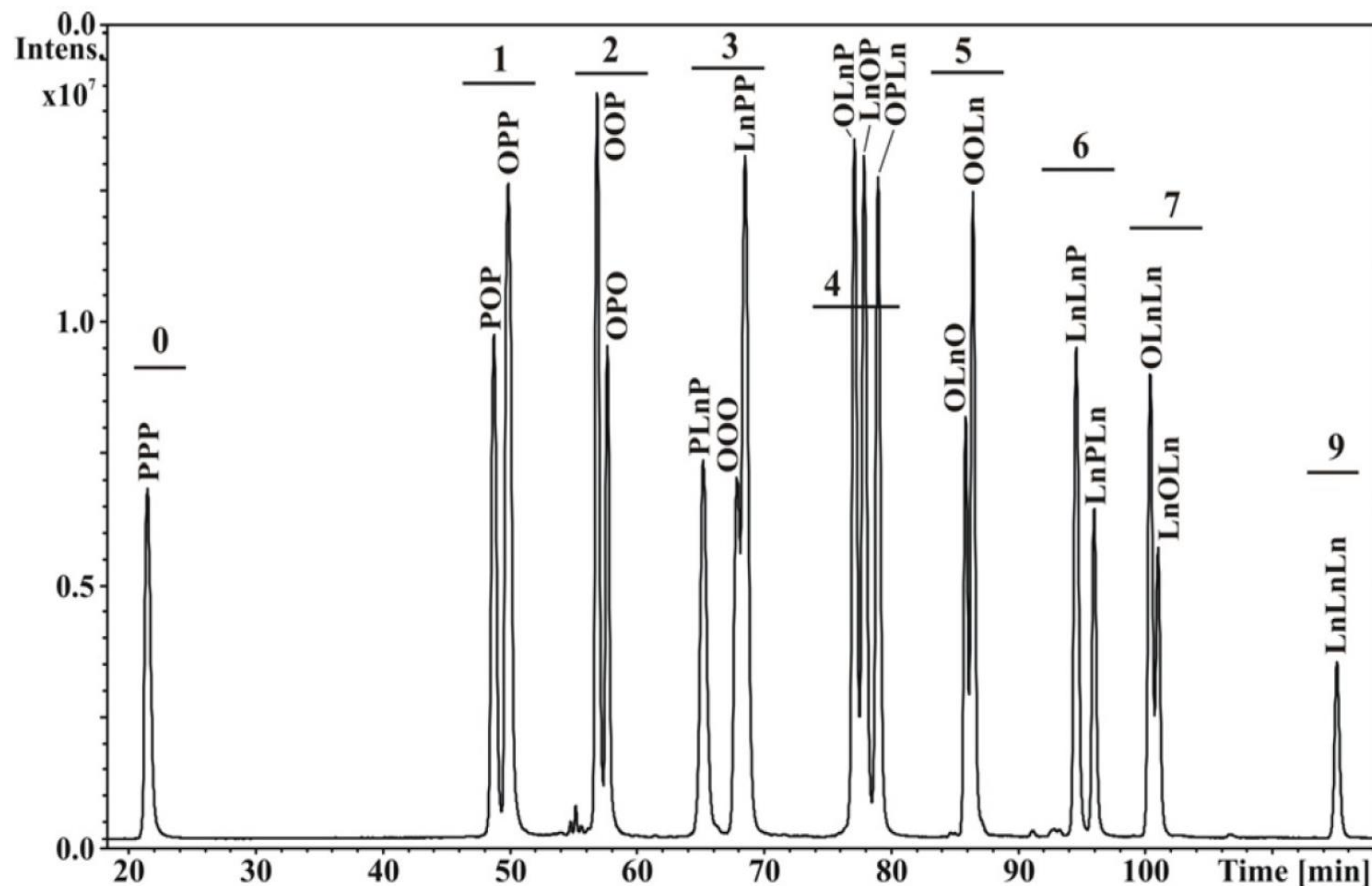
Výměna oleje v rotační vývěvě

Pravidelná kontrola a výměna oleje (olej se po čase oxidauje a kontaminuje látkami z analýz)



Kuriozity v HPLC

Argentační chromatografie (Ag-HPLC)



Separace triacylglycerolů

HPLC kolona na bázi silikagelu
nebo katexu obsahující ionty
stříbra (Ag^+)

Dělení na základě počtu (a
geometrie) **dvojných vazeb** v
alifatických řetězcích.

Využití pro separace lipidů

MC230P14

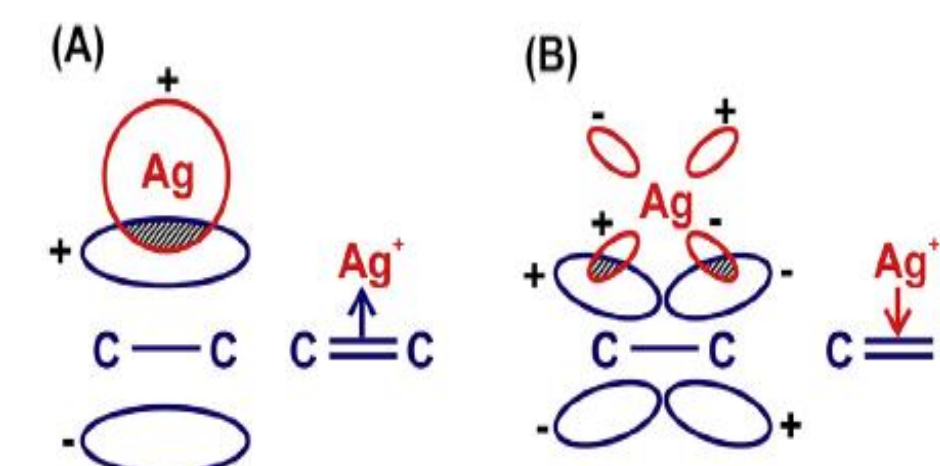
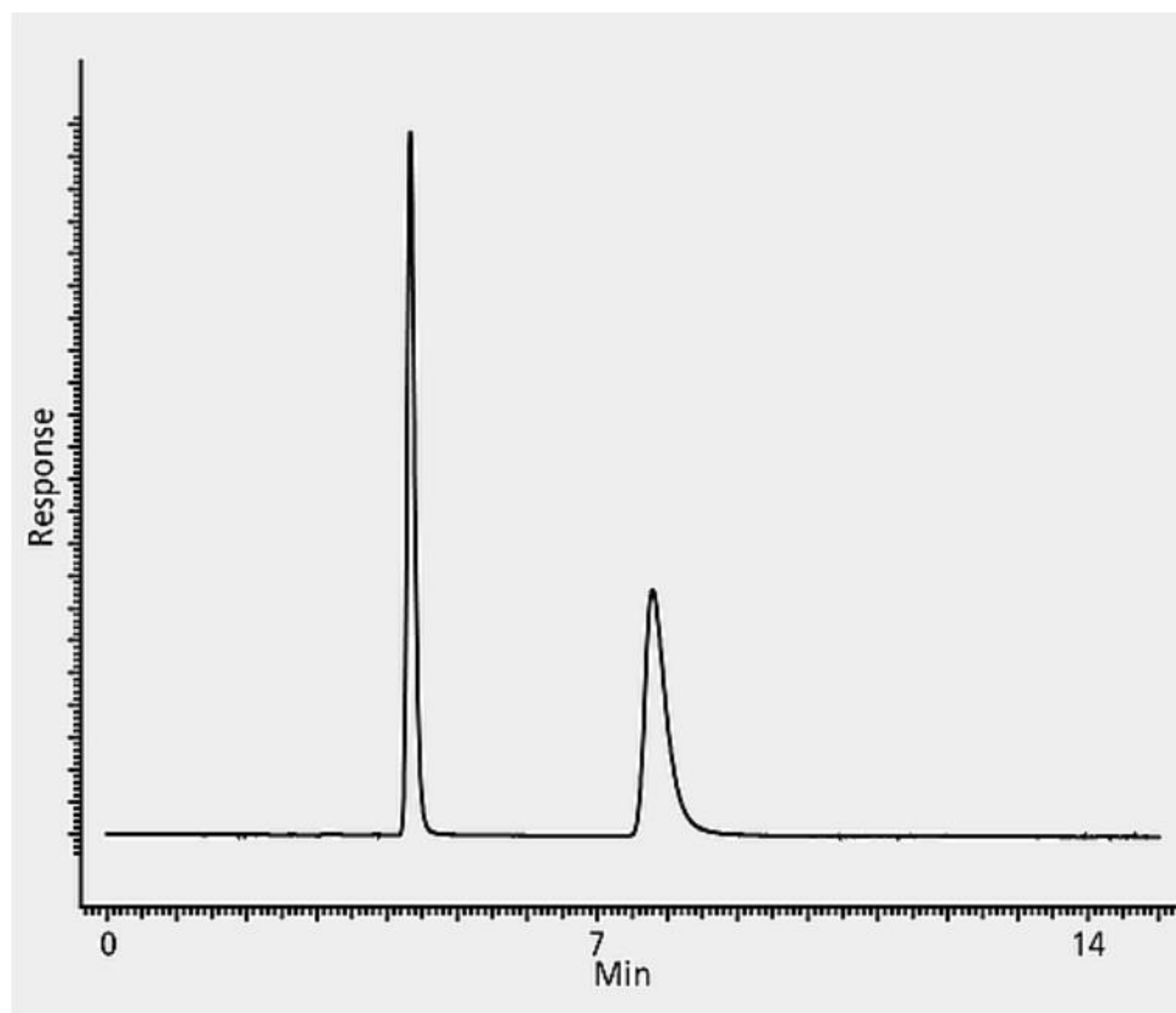


FIGURE 4.1

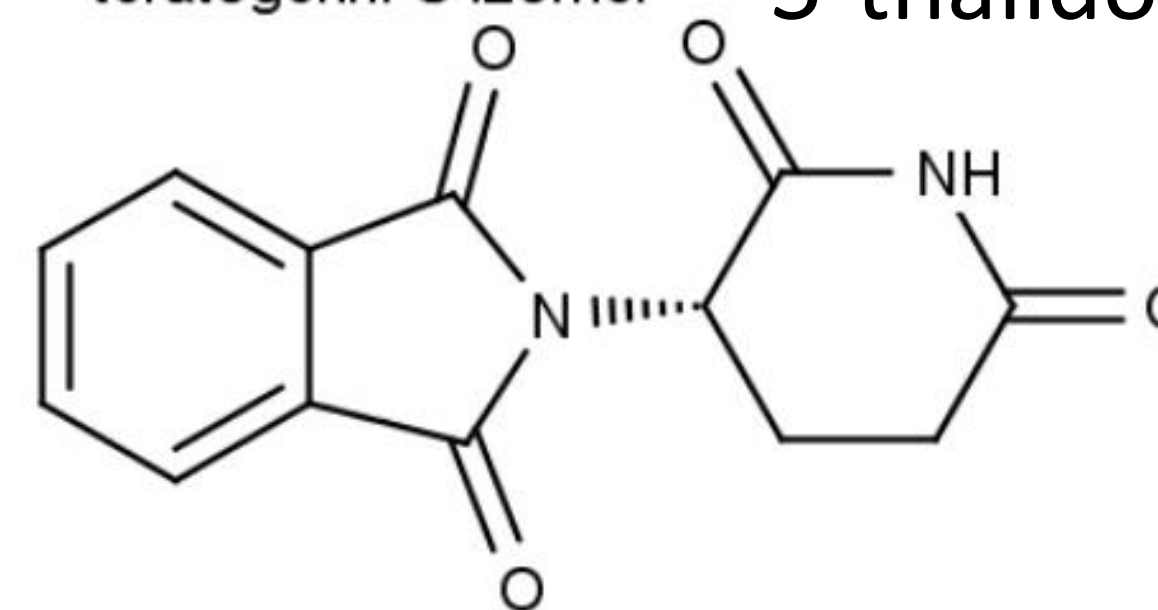
Description of complex bonding between silver ions and double bonds (DBs) by the Dewar-Chart-Duncanson model: (A) σ -donation and (B) π -back-bonding interactions between the metal and DB. Ag, silver ion.

Kuriozity v HPLC-(MS)

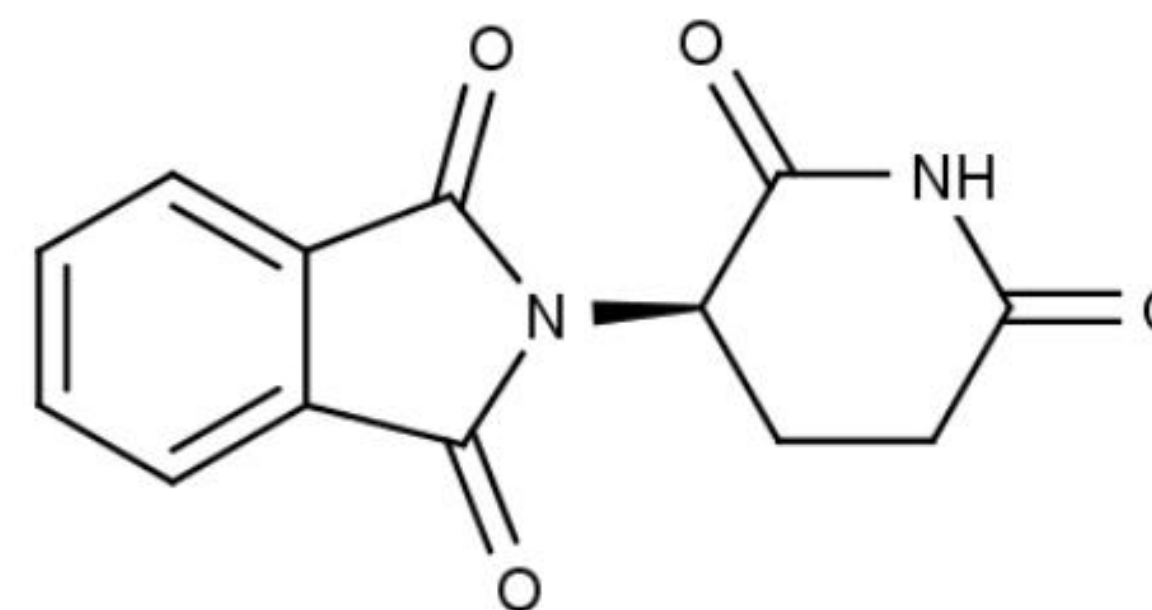
Chirální chromatografie



teratogenní S izomer S-thalidomid



neškodný R izomer R-thalidomid – analgetikum



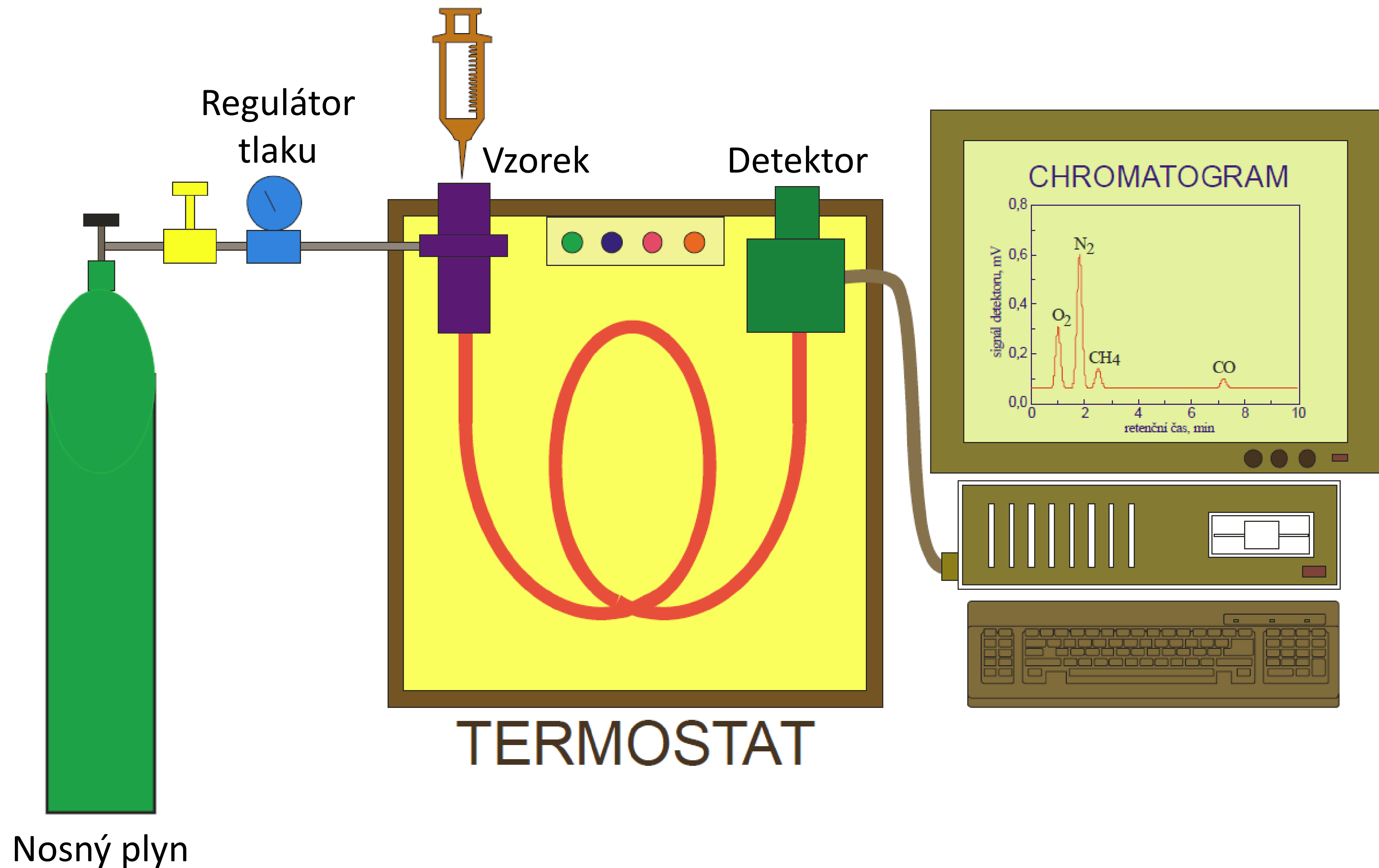
Plynová chromatografie (GC)

- fyzikálně-chemická metoda separace směsi látek na základě jejich rozdělování mezi dvě fáze, z nichž jedna je **plynná (mobilní fáze)** a druhá je pevná nebo kapalná (stacionární fáze)
- Široce využívaná metoda pro analýzu (separaci) těkavých sloučenin
použití pro látky, které lze snadno převést do plynného stavu
(derivatizace: cukry, mastné kyseliny – TMS)

Mobilní fáze (nosný plyn): H_2 , N_2 , Ar, CO_2

Stacionární fáze (několik metrů): kapilární, náplňové kolony

Instrumentace GC



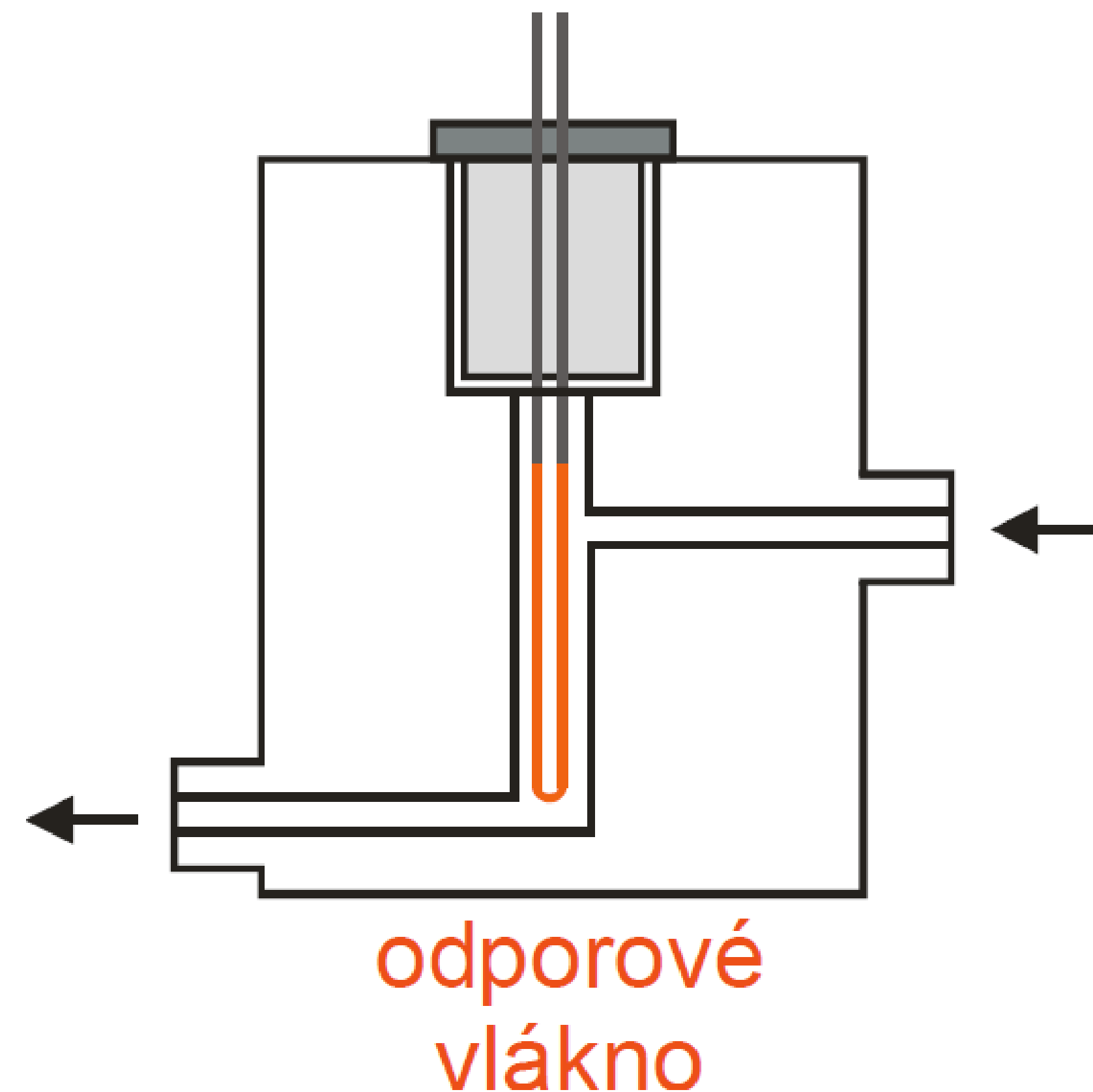
Detektory v GC

1) Tepelně vodivostní detektor (TCD) = KATAROMETR

všechny látky LIŠÍCÍ SE TEPELNOU VODIVOSTÍ od nosného plynu

- Analyzovaná látka přítomná v nosném plynu změní jeho tepelnou vodivost
- TCD zaznamená změnu tepelné vodivosti nosného plynu jako signál

Univerzální
Nedestruktivní
Středně citlivý



Detektory v GC

2) Plamenově ionizační detektor (FID)

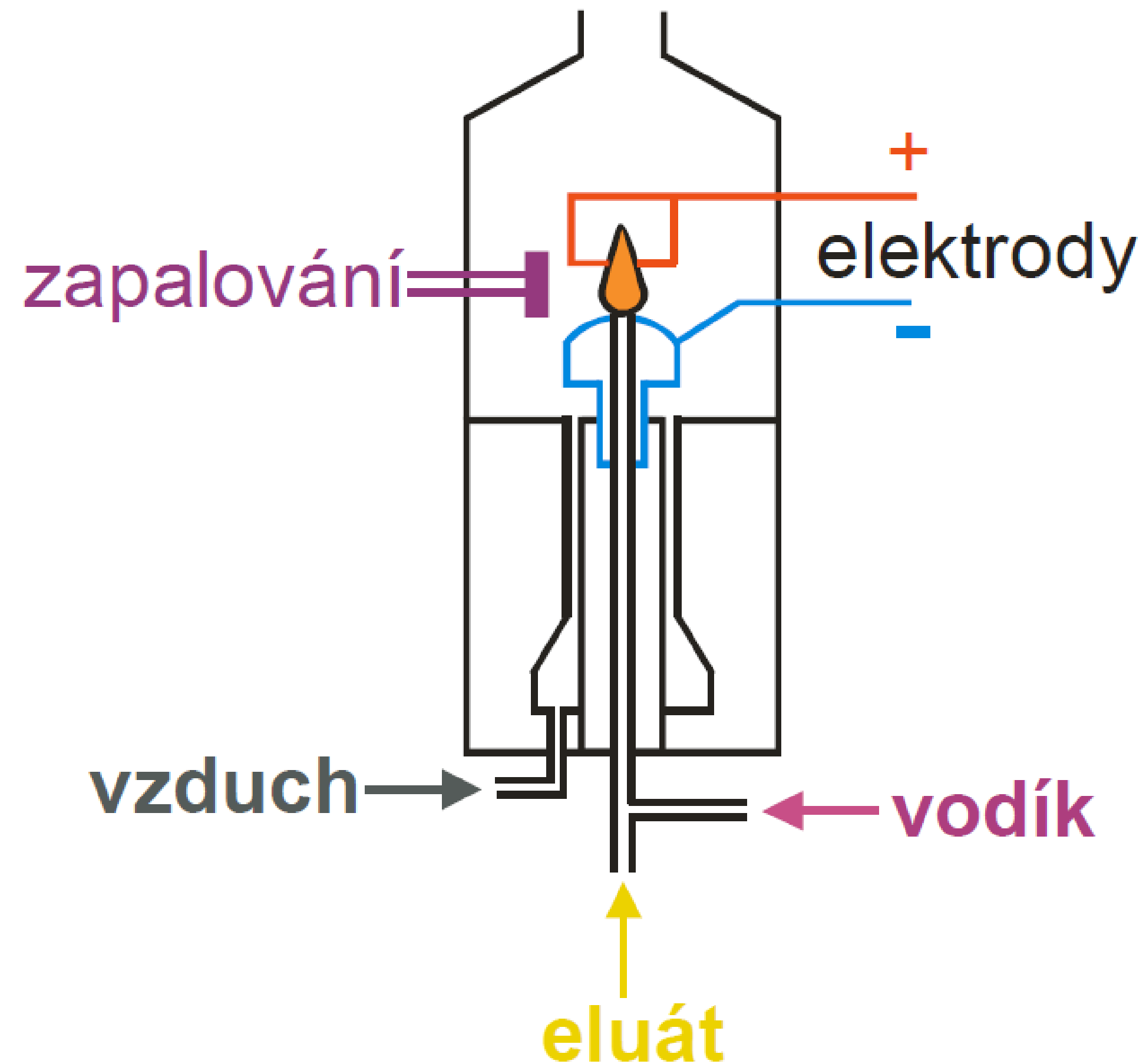
Pro UHLOVODÍKY

Analyzovaná organická látka shoří v plameni

→ je detekován proud mezi elektrodami

→ signál jako chromatografický pík

Selektivní
Destruktivní
Velmi citlivý

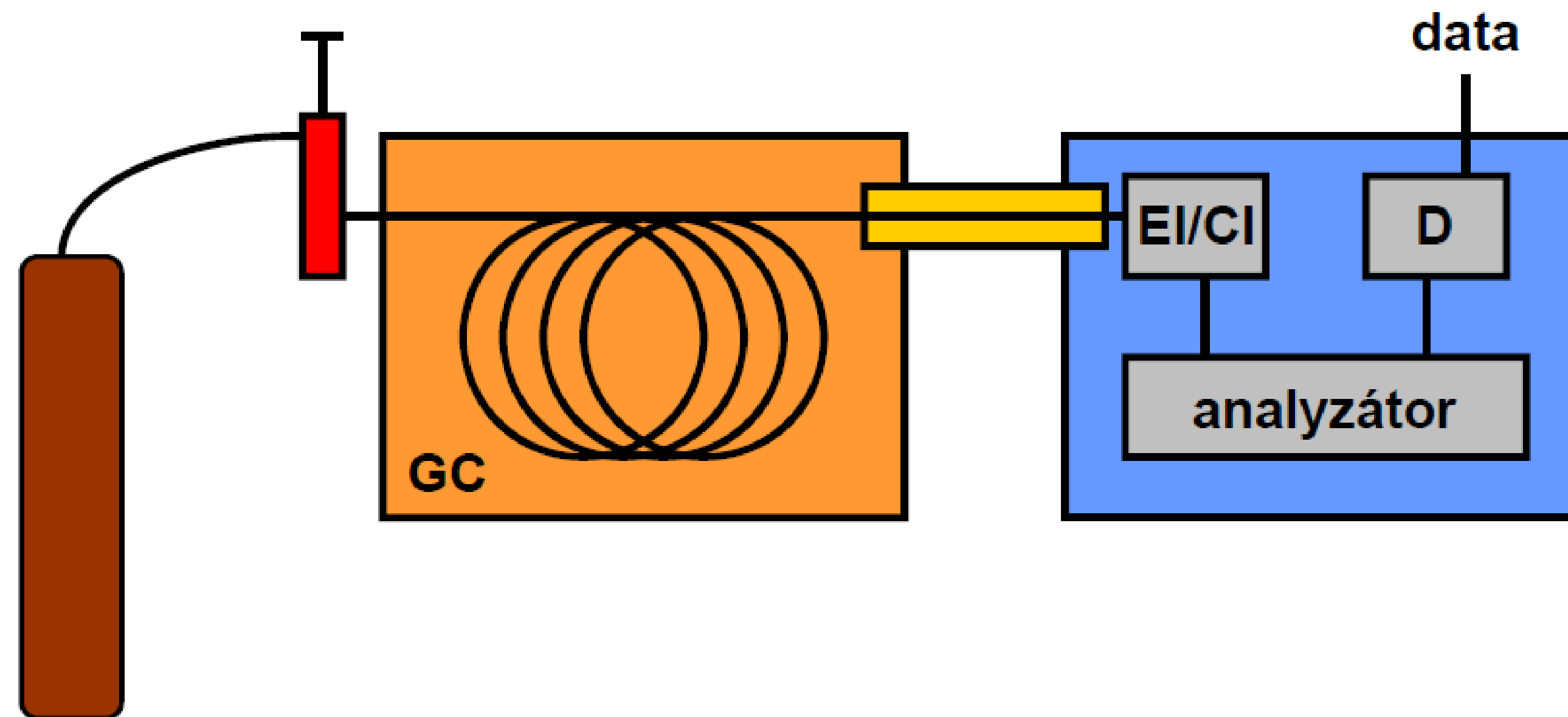


Detektory v GC

3) Hmotnostně-spektrický detektor (MS)

1957 – první spojení GC-MS

Vysoce specifický
Destruktivní
Velmi citlivý



- Technicky jednodušší (oproti HPLC-MS)
- Plynná mobilní fáze se zavádí přímo do iontového zdroje ve vakuu
- Vyšší teplota zabraňuje kondenzaci výše-vroucích analytů

GC-MS (ÚOCHB AV ČR)

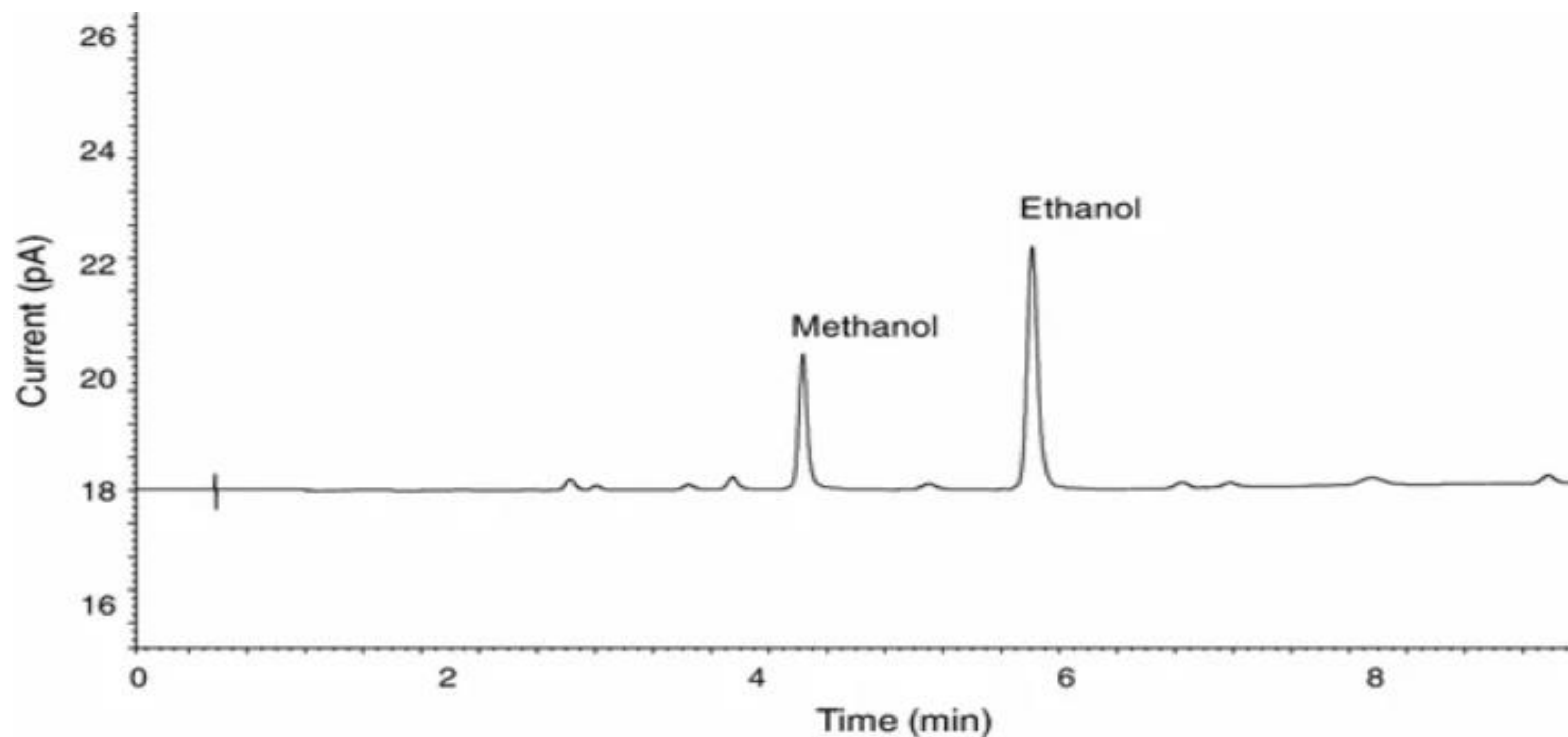


Agilent 5975C Inert MSD

Plynová chromatografie v praxi

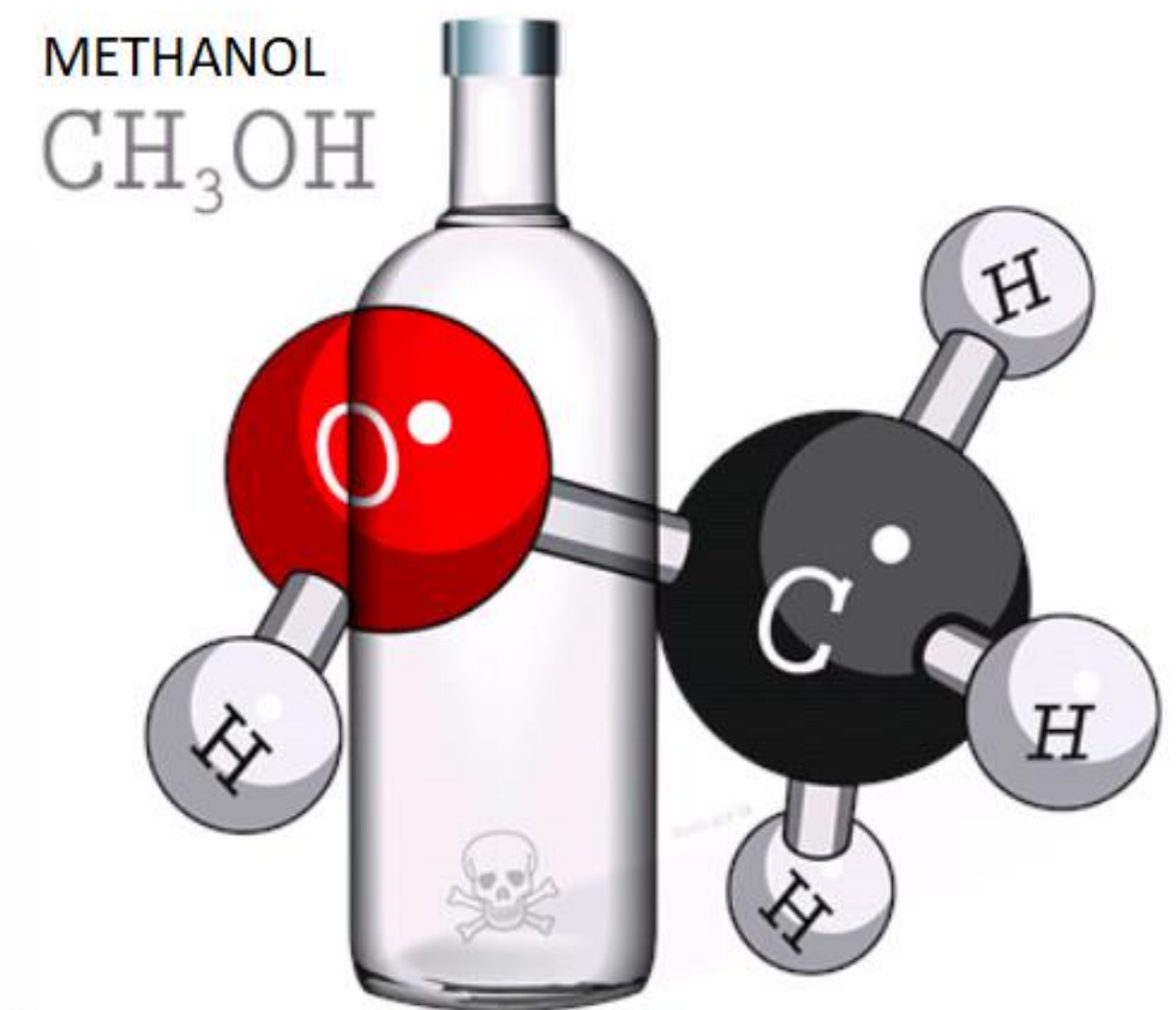
Analýza methanol vs. ethanol

- základní analýza intoxikace methanolem (methanolová aféra 2012)



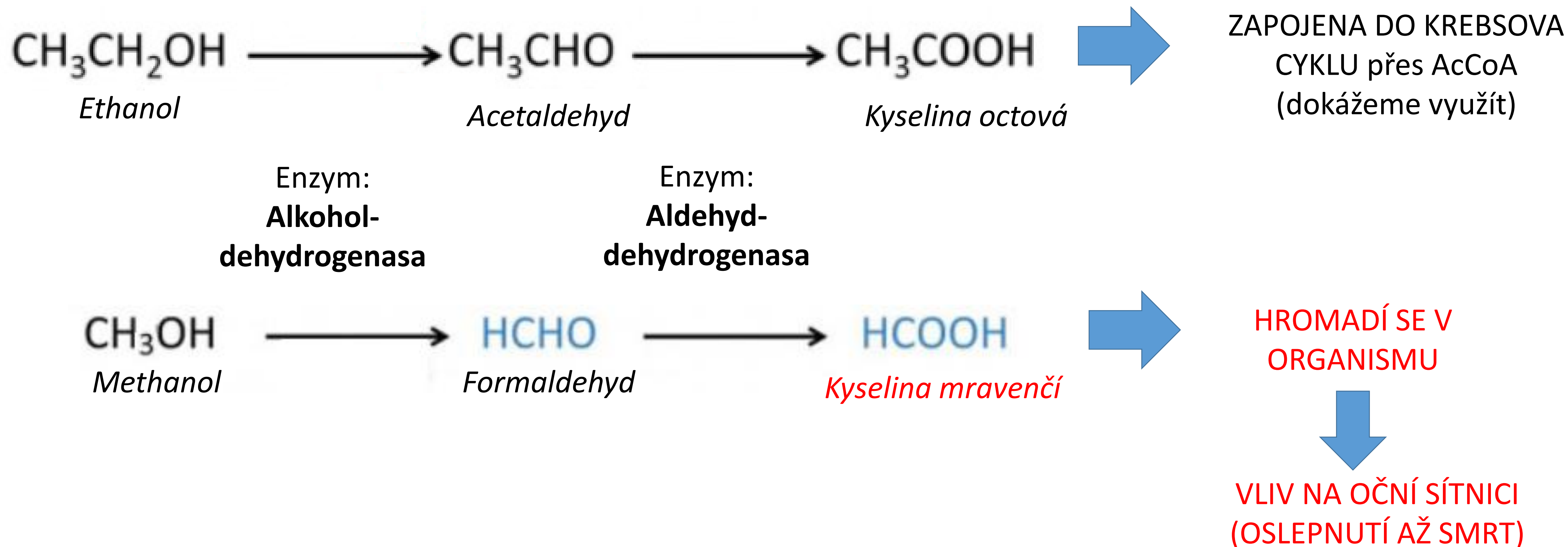
Kolona: 30 m x 320 μm ; 1,8 μm

Nosný plyn: Helium





Toxicita methanolu a ethanolu



Ethanol: Evolučně si lidé vyvinuli enzymové systémy ADH pro jeho odbourávání už v pravěku – lidé se cítili příjemně po konzumaci kvašených plodů (až 4% alkoholu)

Methanol: nikdy se v takové míře v přírodě nevyskytoval, enzymový systém ADH ho přeměňuje, pokud není dostatek ethanolu v organismu

Aplikace plynové chromatografie

Pro těkavé látky!



FARMACEUTICKÉ ANALÝZY

Antidepresiva
Stimulancia
Steroidy



KLINICKÉ A TOXIKOLOGICKÉ ANALÝZY

Alkohol v krvi
Glykoly
Drogy



PRŮMYSLOVÉ ANALÝZY

Benzín
Uhlovodíky



ENVIROMENTÁLNÍ ANALÝZY

Pesticidy
Herbicidy

GC

Uplatnění v analytické chemii

SPECIALISTA PRO VÝVOJ ANALYTICKÝCH METOD

Pracovní náplň:

- spolupráce na implementaci a udržování softwarového a systémového vybavení v rámci QC (aktuálně LIMS, Chromeleon)
- spolupráce na výzkumu a vývoji analytických metod
- provádění validací, ověřování, hodnocení a zavádění analytických metod v potřebném rozsahu
- provádění kontroly analytických výsledků v rámci kompetencí
- provádění vyšetřování v oblasti analytických postupů
- vyhodnocování HPLC a GC analýz, GC analýzy odpadních vod
- dodržování požadavků SVP a IMS

Ideální profil kandidáta:

- VŠ chemického nebo farmaceutického zaměření
- plynulá odborná znalost anglického jazyka
- zkušenost s GC-FID, s HSS-GC
- znalost SVP
- znalost principu validace analytických metod
- znalost dalších technik analytické laboratoře (HPLC, FTIR, UV)
- výhodou: orientace v CDS Chromeleon, GC-MS

Nabízíme:

- odpovídající finanční ohodnocení
- možnost účasti na odborných seminářích v ČR i zahraničí
- zajímavé firemní benefity – šest týdnů dovolené, systém čtvrtletních odměn, stravenkový paušál, penzijní příspěvek

Pokud Vás zaujala tato pozice, prosím zašlete nám svůj životopis v ČJ i AJ na email

HR@caymanpharma.cz

Cayman Pharma s.r.o., Ul. Práce 657, Neratovice

JSTE NEBO CHCETE BÝT ANALYTICKÝ CHEMIK? PŘIPOJTE SE K NÁM!

Studoval/a jste střední nebo vysokou školu chemického, potravinářského, farmaceutického nebo příbuzného směru? Chcete pracovat pro stabilní nadnárodní společnost, která svou činností pomáhá k ochraně životního prostředí, podílí se na kontrole léčiv a pomáhá hlídat kvalitu potravin? Pak je pro Vás práce v ALS Czech Republic ta správná volba!

Chcete se stát aktivní součástí Environmentální / FOOD nebo PHARMA laboratoře?

JAKÉ PORTFOLIO INSTRUMENTŮ JE VÁM BLIŽŠÍ? DEJTE NÁM VĚDĚTI

- LC-MS/MS, HPLC/FLD/UV a CE/UV
- GC/FID, GCHS/FID, HPLC/PDA, HPLC/RI
- GC/MS a GC/MS/MS
- AFS (ICP-MS, ICP-OES), IC
- GC/MS a GC/MS/MS, GC - FID/MS

JAKÁ BUDE VAŠE HLAVNÍ PRACOVNÍ NÁPLŇ?

- Měření, vyhodnocování a hodnocení analýz vzorků
- Servis a běžná údržba instrumentů
- Administrativní činnost spojená s měřením a vyhodnocováním vzorků, reporty výsledků
- Spolupráce s validačními specialisty při zavádění nových metod
- Spolupráce se supervizorem sekce a celým týmem v dalších oblastech činnosti sekce
- Práce v jednosměnném nebo i ve dvousměnném provozu
- Spolupráce na systému kontroly kvality a na zaškolování nových kolegů

Výzkumný pracovník – analytický chemik – LC/MS

Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i. nabízí pozici:

Výzkumný pracovník – analytický chemik – LC/MS

Profil pracovního místa:

- provádění náročných analýz v oboru analýzy potravin
- **vývoj, odzkoušení a zavádění nových metod chromatografických analýz včetně jejich validace**
- zajištění údržby a kontroly přístroje s cílem zajištění správné funkce
- vyhodnocování a správná interpretace získaných naměřených analytických dat
- publikování výsledků ve vědeckých publikacích
- přenos výsledků výzkumu do praxe (přednášky, poradenství, účast na konferencích národních i mezinárodních apod.)

Požadavky:

- VŠ vzdělání technického nebo přírodovědného směru, 2 roky praxe
- **znalost práce na HPLC, GC, zvláště pak HPLC/MS výhodou**
- proaktivní přístup, časovou flexibilitu, chuť se učit novým věcem, samostatnost
- dobré komunikační schopnosti, týmová spolupráce
- znalost anglického jazyka

Nabízíme:

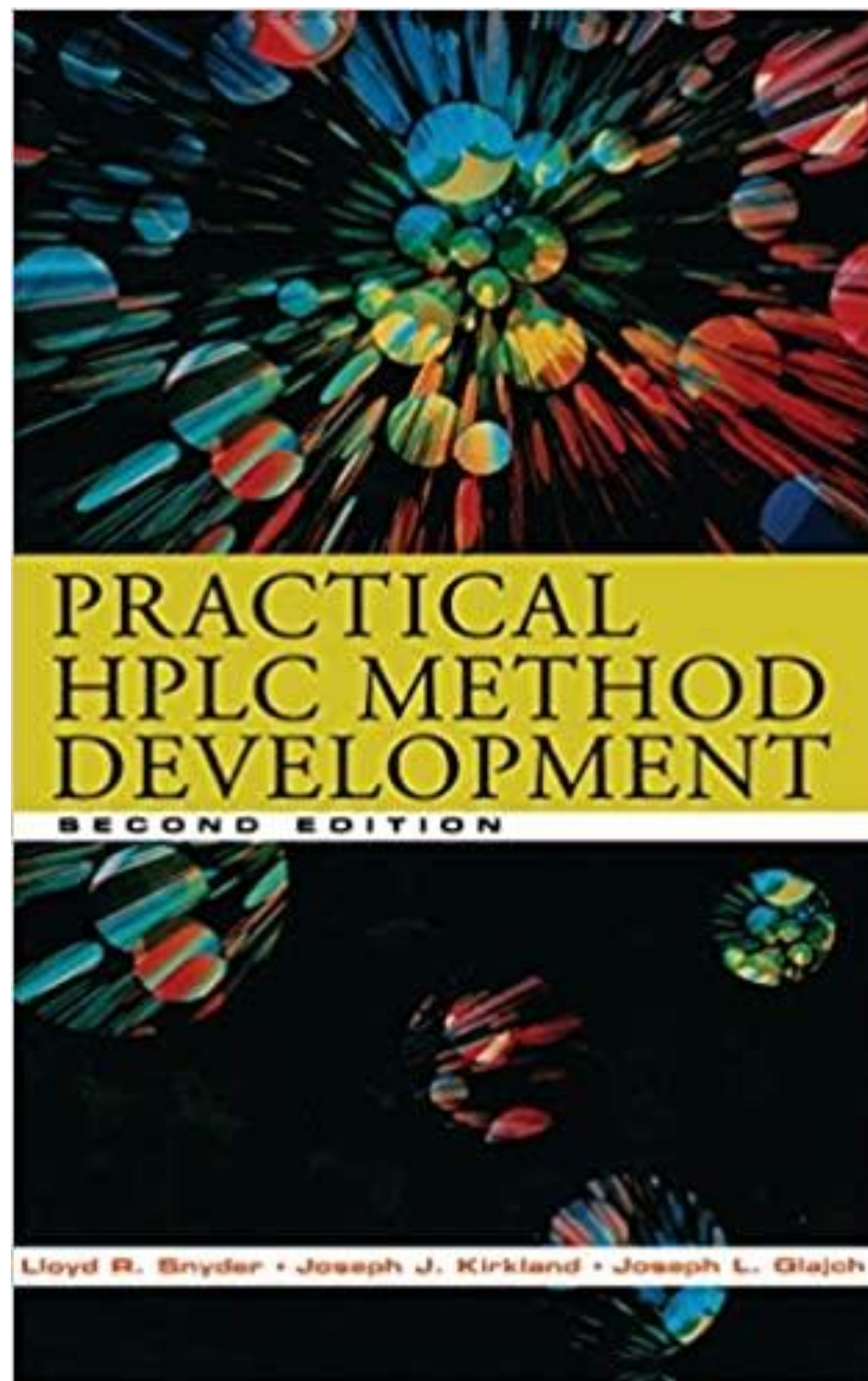
- zajímavou práci v oblasti analýzy potravin
- možnost profesního růstu a dalšího vzdělávání
- flexibilní pracovní doba
- 5 týdnů dovolené
- zaměstnanecké výhody (3 sick days, příspěvek na penzijní připojištění, Flexi/Relax Pass, příspěvek na závodní stravování, bezproblémové parkování)

Nástup možný ihned.

Zájemci doručí sekretariátu ředitele VÚPP, v.v.i. na adrese Radiová 1285/7, 102 00 Praha 10 – Hostivař nebo na mailovou adresu vupp@vupp.cz následující dokumenty: strukturovaný životopis s přehledem své dosavadní praxe a motivační dopis.

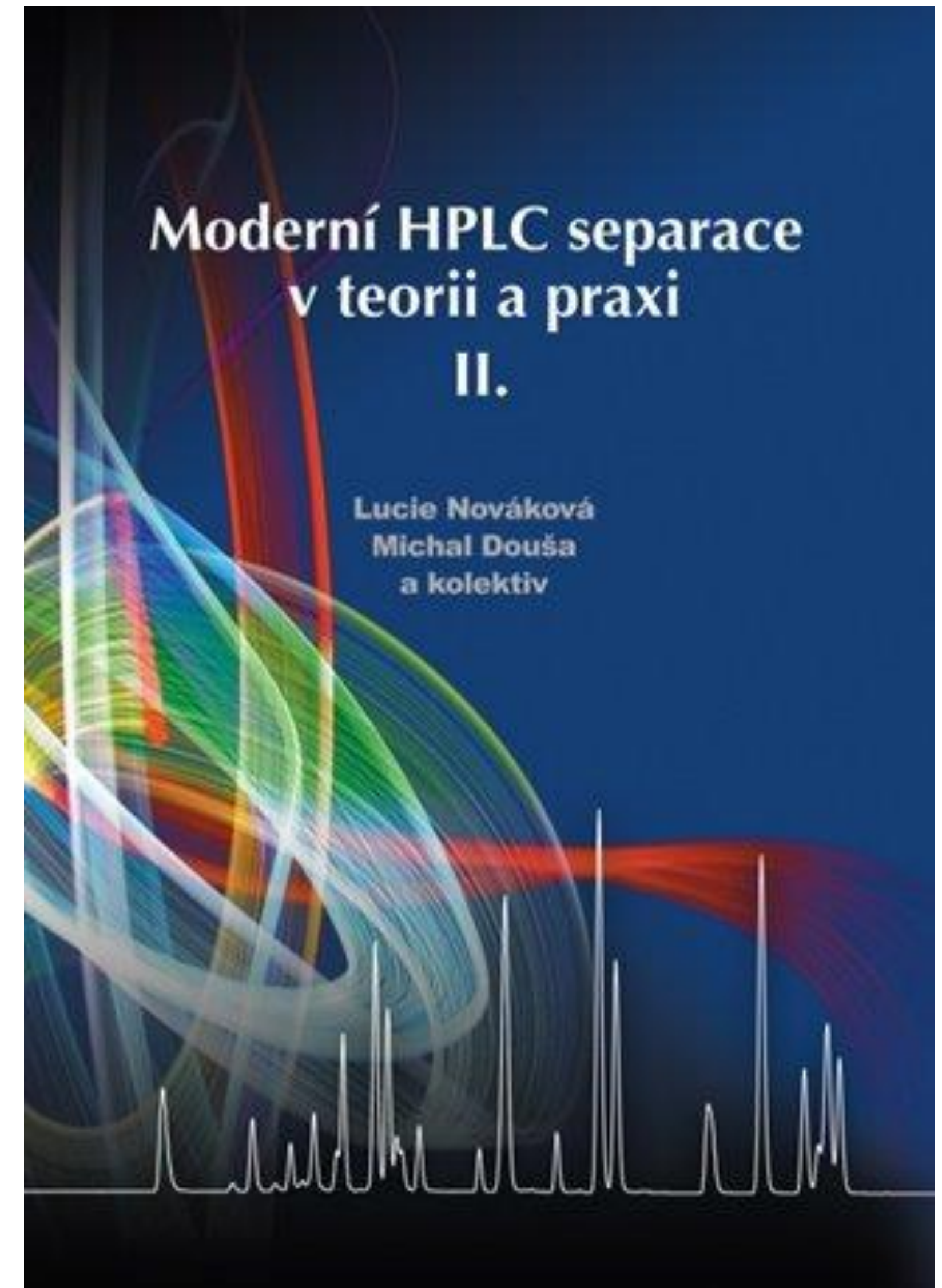
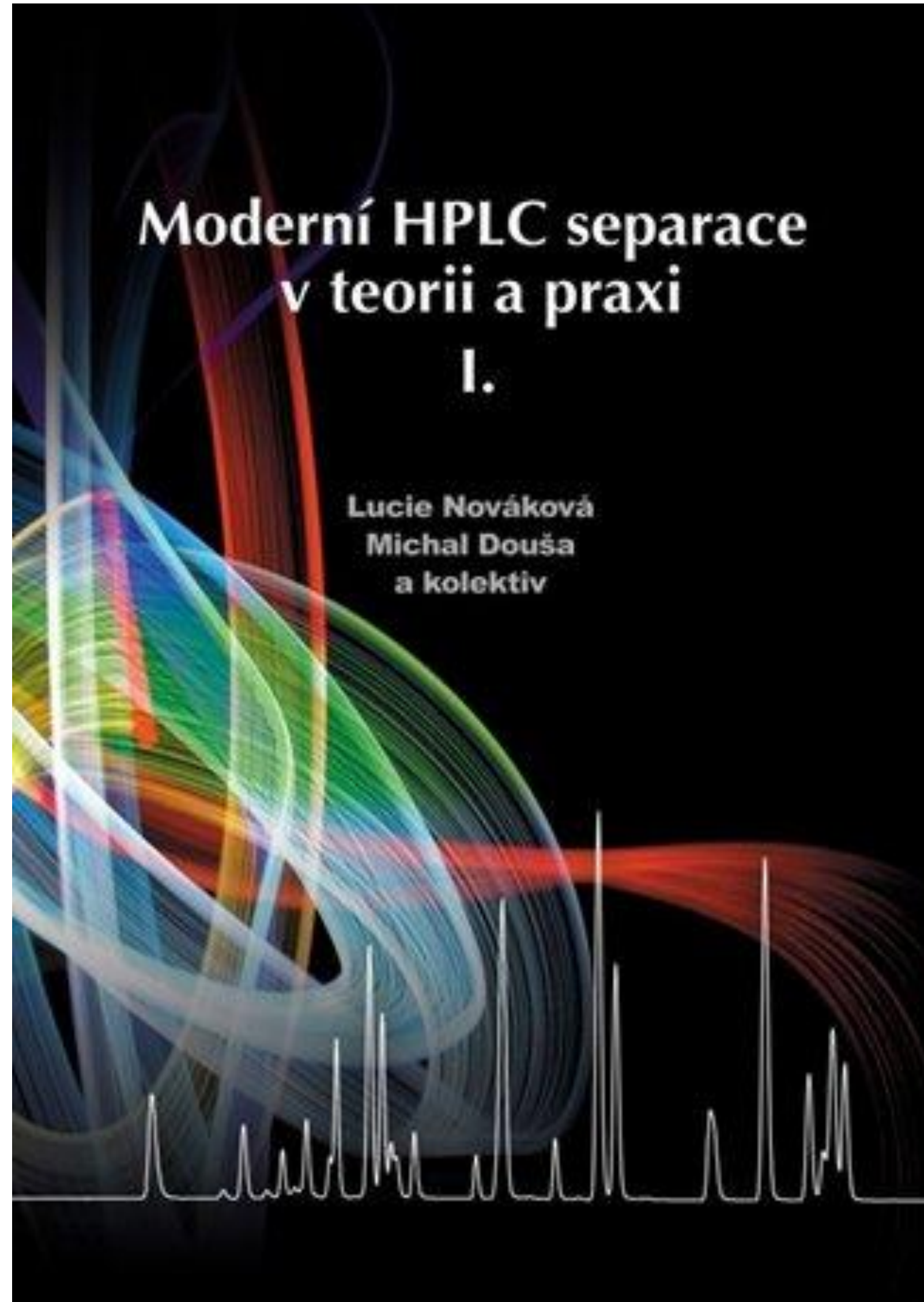
Zahraniční literatura

Lloyd R. Snyder a kol.: Snyder Practical HPLC Method Development 2nd Edition



Česká literatura

Nováková L. a kol.: Moderní HPLC v teorii a praxi (I a II. díl)



Tato prezentace je určena pouze pro výuku studentů.

This presentation has been scheduled for educational purposes only.

Pokud by měl někdo dojem, že použité obrázky jsou kryty copyrightem, necht' mi dá prosím vědět.

If somebody believes, that pictures or figures in this presentation are covered by copyright, please let me know.

cudlmanl@natur.cuni.cz