

Metody chromatograficzne (rozdzielcze)
w analizie materiału biologicznego
(GC, HPLC)



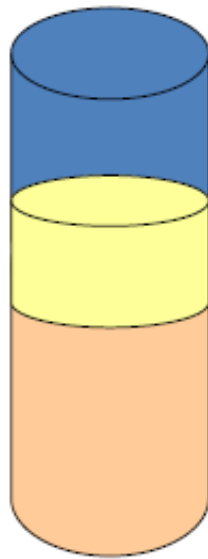
Chromatografia jest fizykochemiczną metodą rozdzielania składników jednorodnych mieszanin w wyniku ich różnego podziału między **fazę ruchomą i nieruchomą** układu chromatograficznego.

Fazą ruchomą może być gaz, ciecz lub płyn w stanie nadkrytycznym, a fazą nieruchomą (stacjonarną) - ciało stałe lub ciecz.

Chromatografia



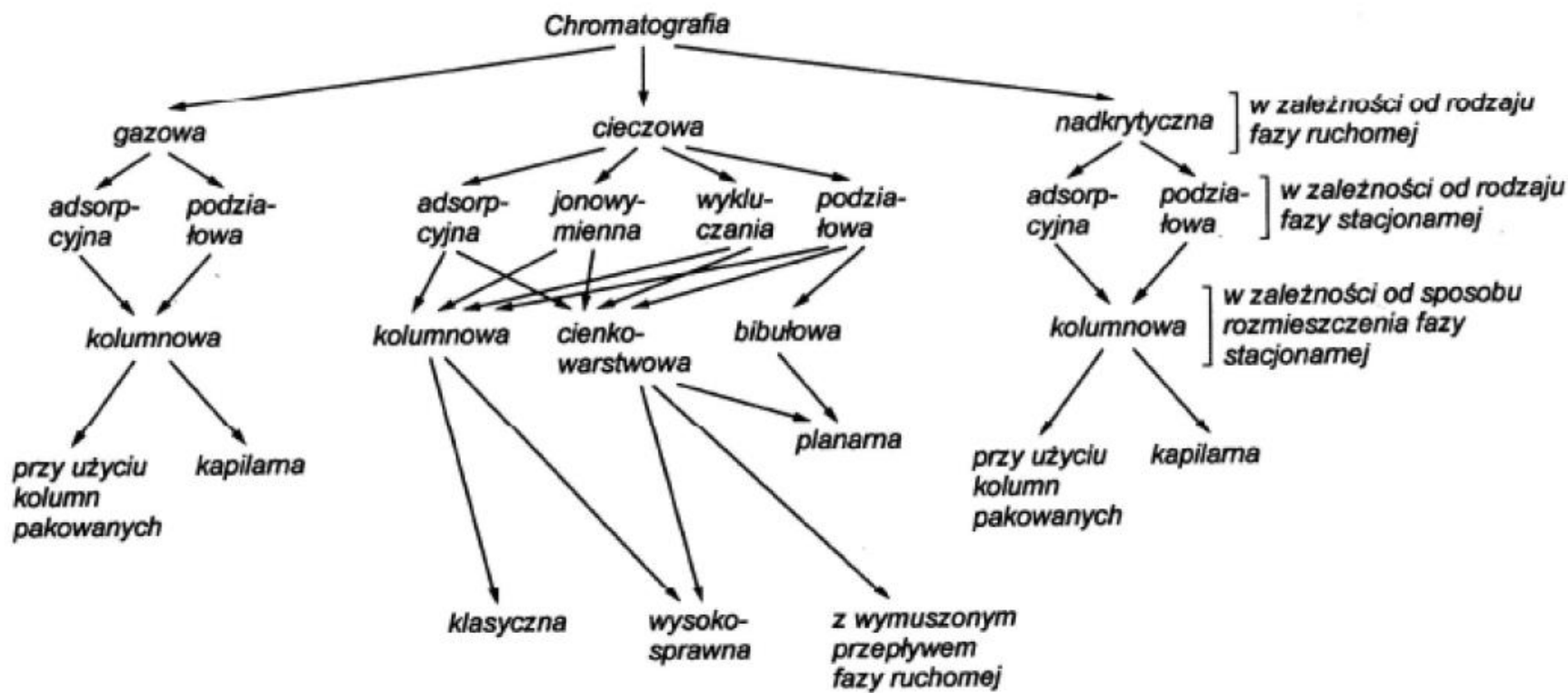
kolumnowa



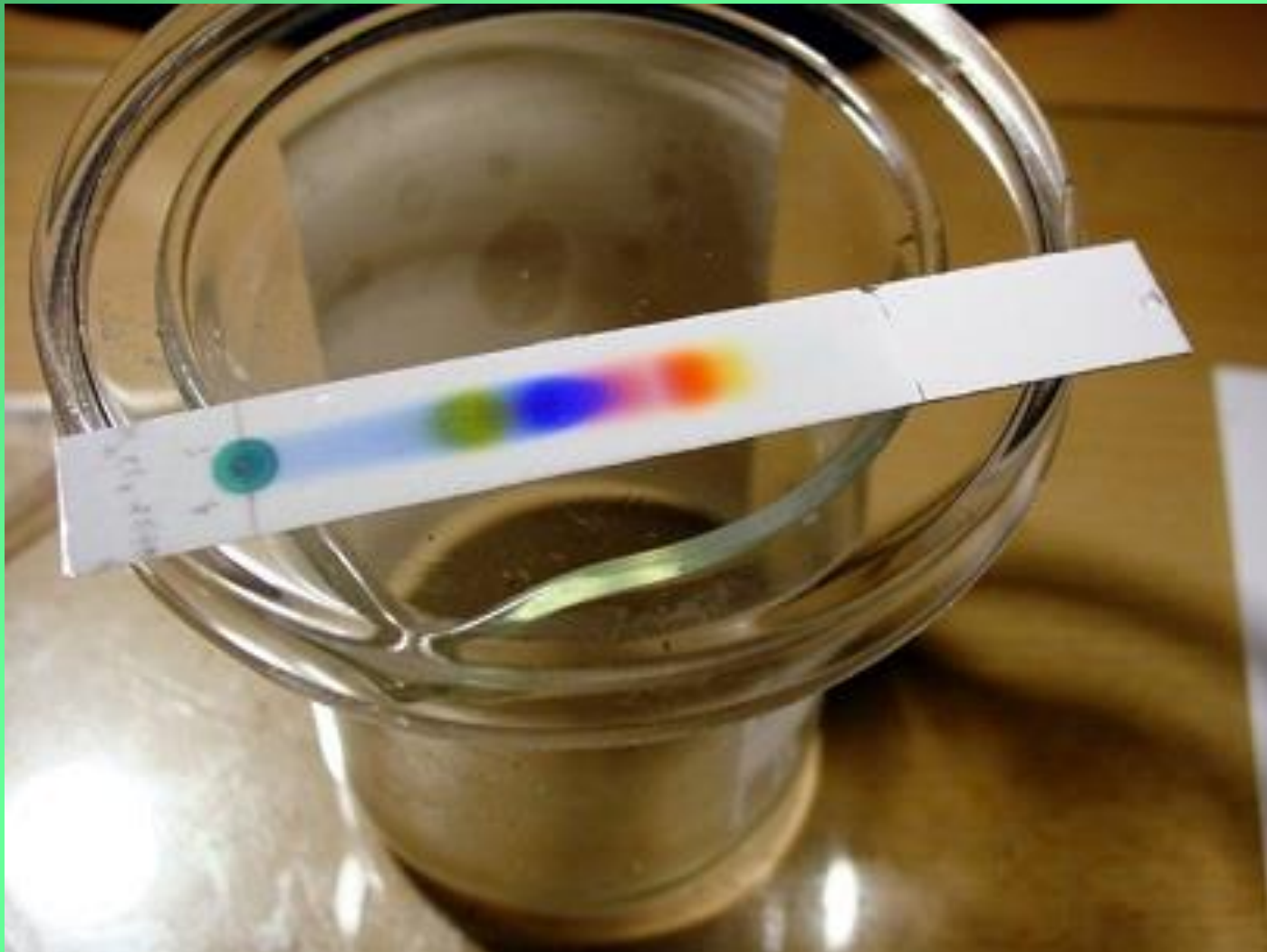
planarna



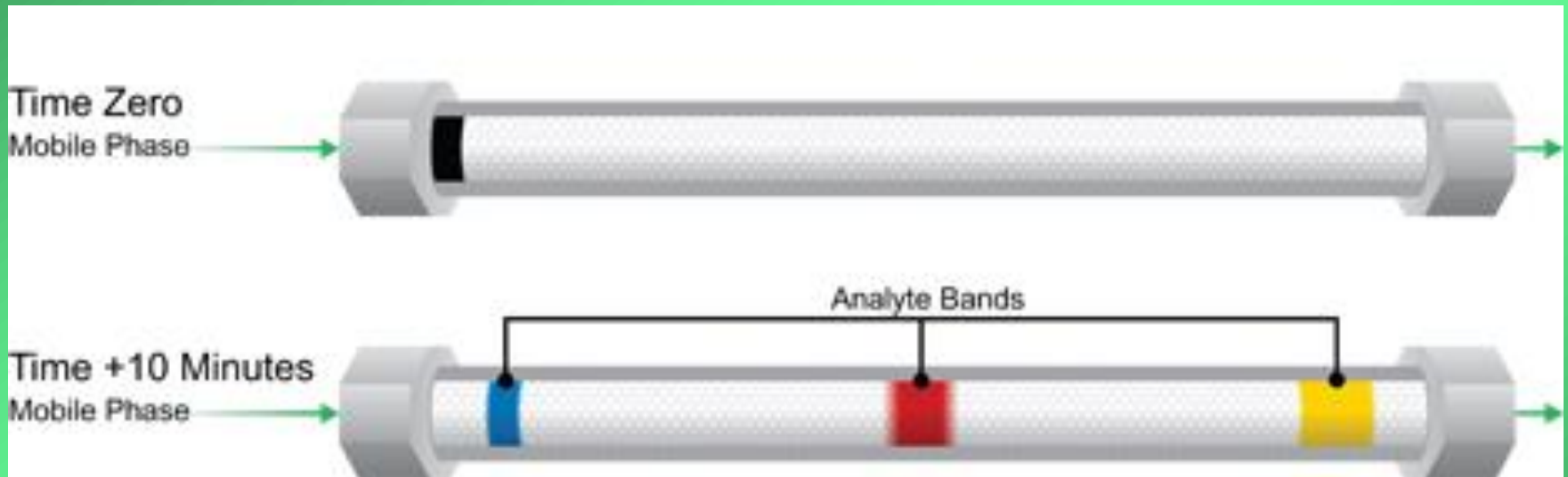
Klasyfikacja technik chromatograficznych



Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)



Chromatografia kolumnowa



Przykładowe rodzaje metod chromatograficznych

- **Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)**
- **Ekstrakcja z fazy stałej (SPE)**
- **Chromatografia gazowa (GC)**
- **Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)**
- **Elektroforeza kapilarna (CE)**

To też jest technika chromatograficzna...

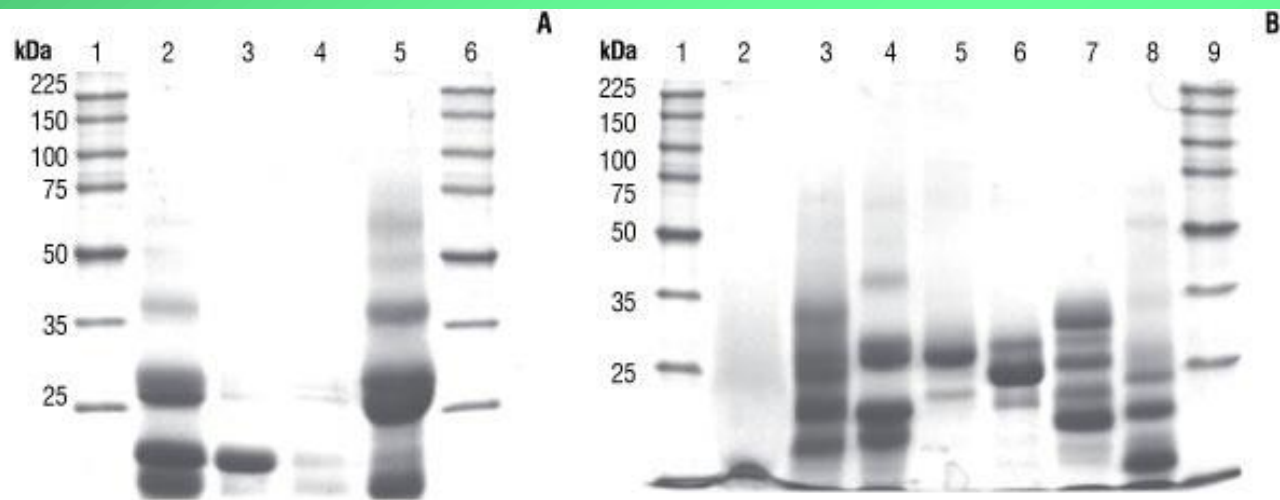
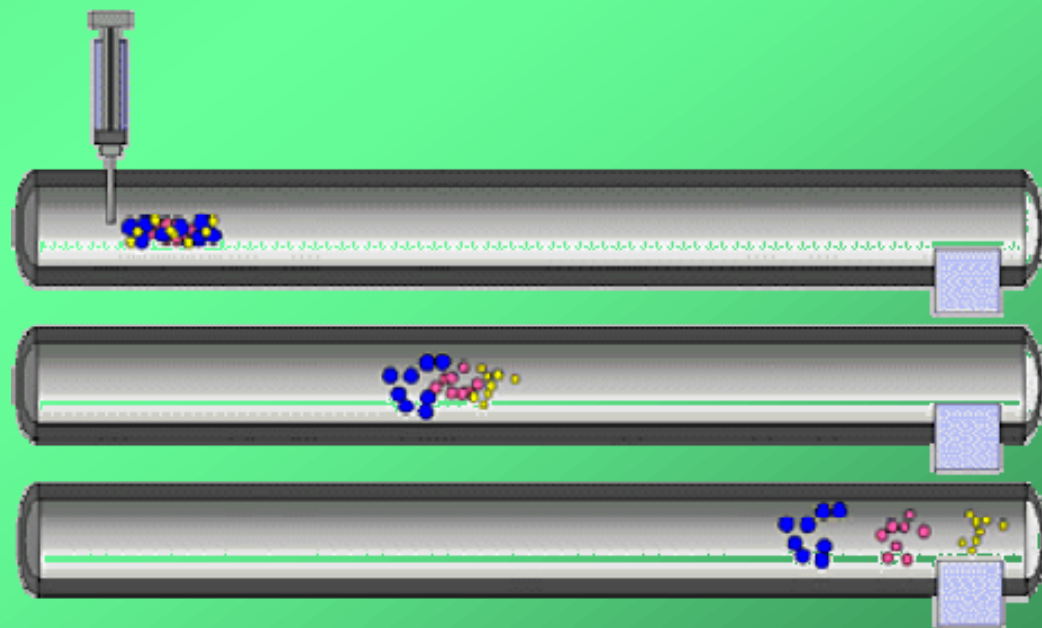


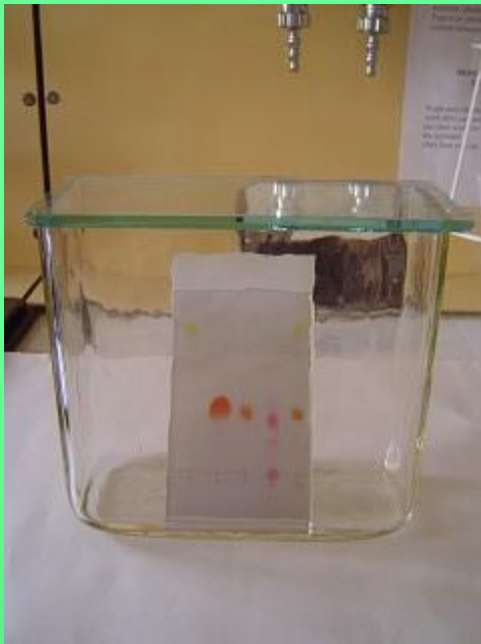
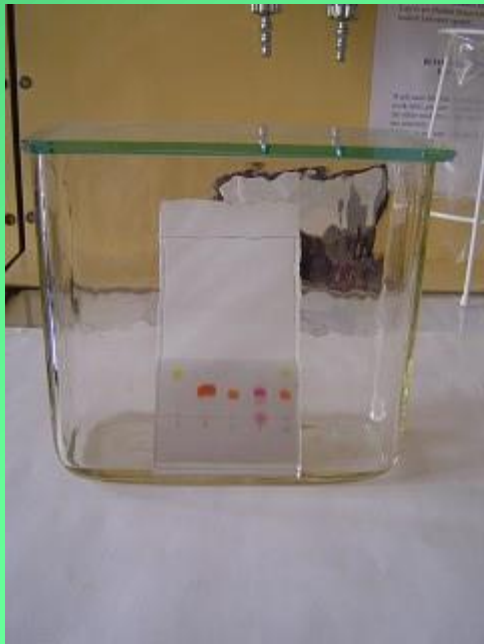
Figure 3. SDS-PAGE of *Swartzia* protein fractions in the presence of β -mercaptoethanol. A, *Swartzia laevicarpa*. Lane (3), DEAE-PI (- AHE); Lane (4), DEAE-PII (+ AHE); Lane 5, DEAE-PIII (hemolysis). B, Lanes 1 and 9, molecular weight markers; Protein profiles of *Swartzia* extracts: *S. argentea* (2), *Swartzia ingifolia* (3), *Swartzia laevicarpa* (4), *Swartzia longistipitata* (5), *Swartzia pendula* (6), *Swartzia polyphylla* (7) and *Swartzia sericea* (8). Samples were electrophoresed on 12.5% SDS polyacrylamide gel under reducing conditions.

Każdy proces chromatograficzny składa się z trzech etapów

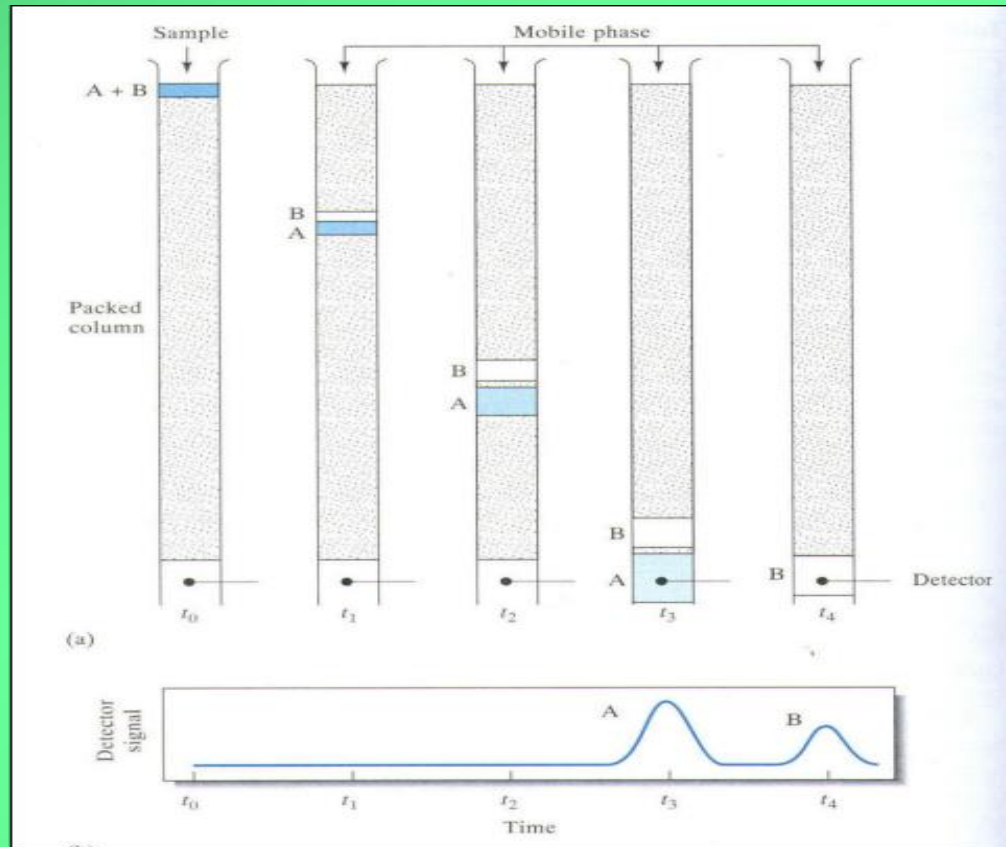
- dozowanie próbki
- rozdział składników
- detekcja rozdzielonych składników



detektor

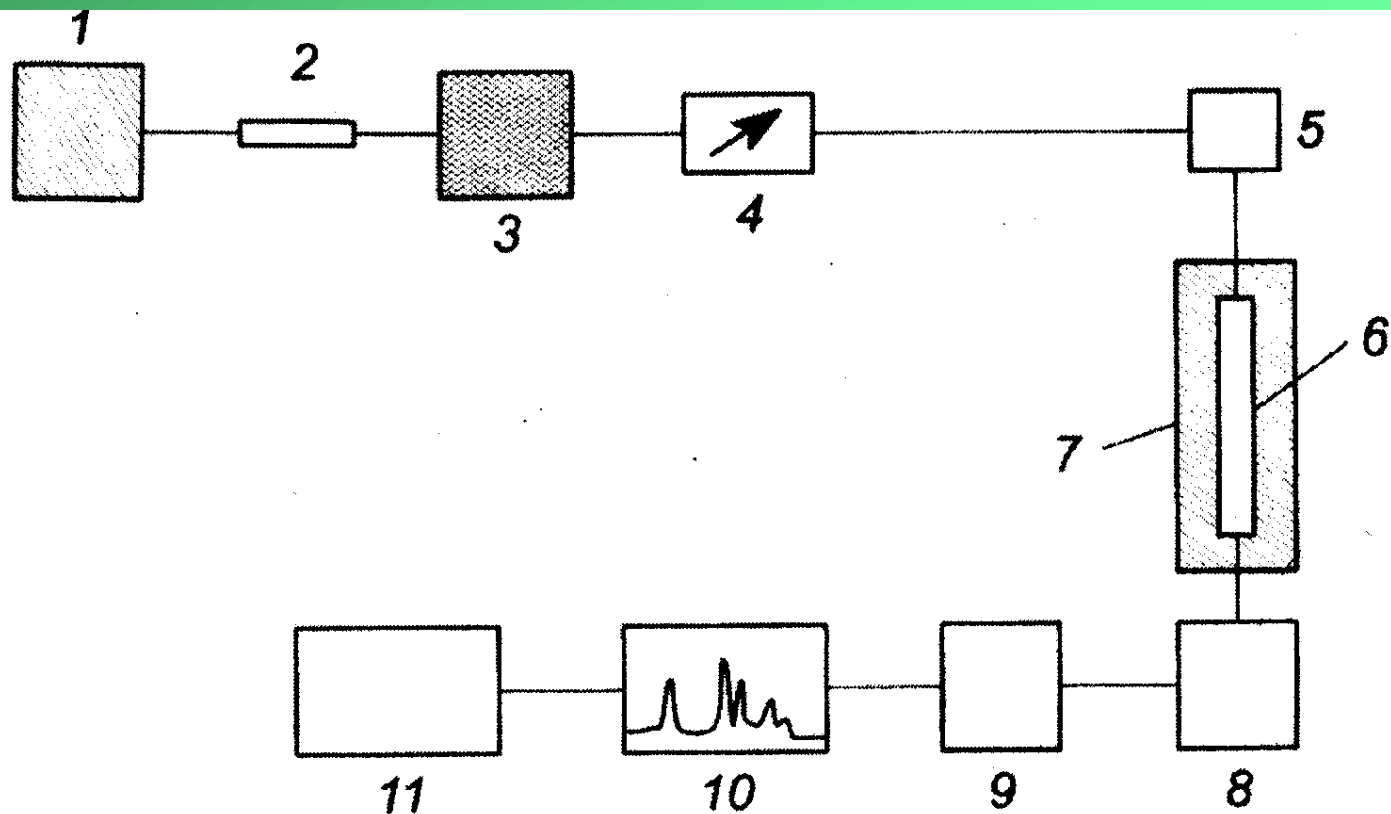


Wynikiem rozdziału chromatograficznego jest **chromatogram**

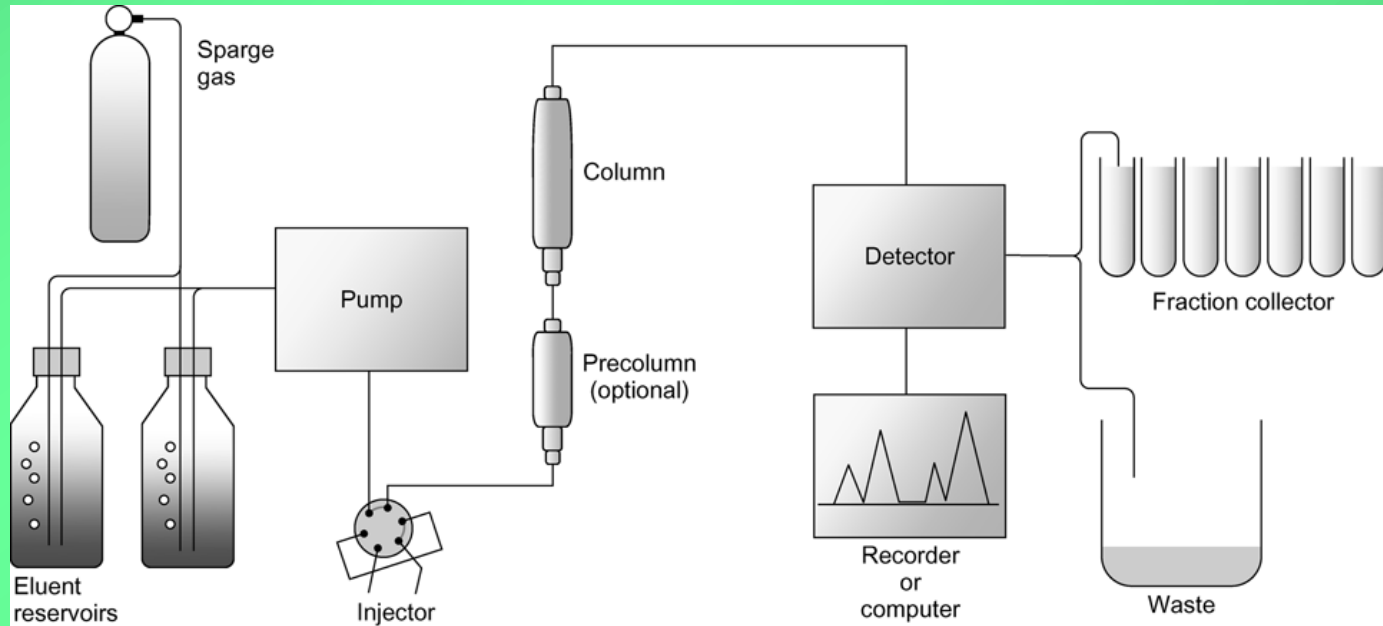
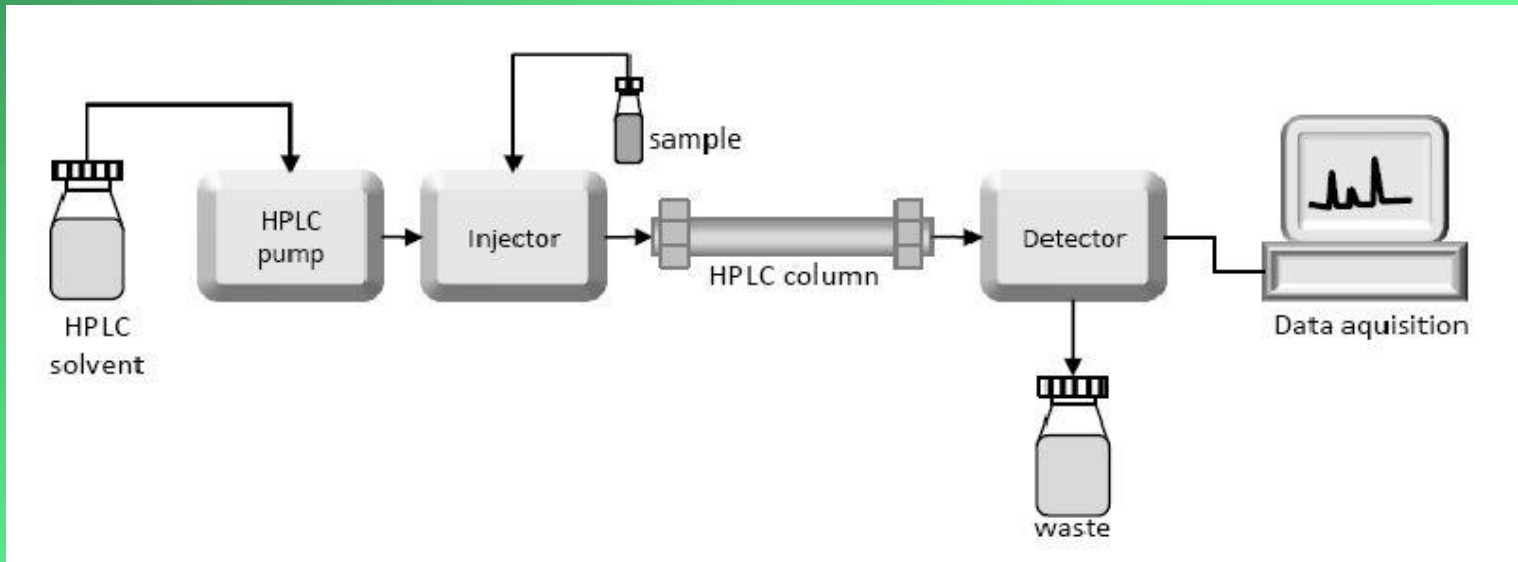


Wysokosprawna (wysokociśnieniowa) chromatografia cieczowa (HPLC)

HPLC



Schemat blokowy chromatografu cieczowego: 1 - zbiornik fazy ruchomej, 2 - filtr, 3 - pompa, 4 - manometr, 5 - dozownik, 6 - kolumna, 7- termostat, 8 - detektor, 9 - wzmacniacz, 10 - rejestrator, 11 - komputer



Zestaw do wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej



Od prawej: komputer sterujący aparatem i rejestrujący dane, pompa z zaworem dozującym, kolumna wewnątrz termostatu i różnego rodzaju detektory rozdzielanych substancji, np. UV-vis, fluorescencyjny, MS-MS.

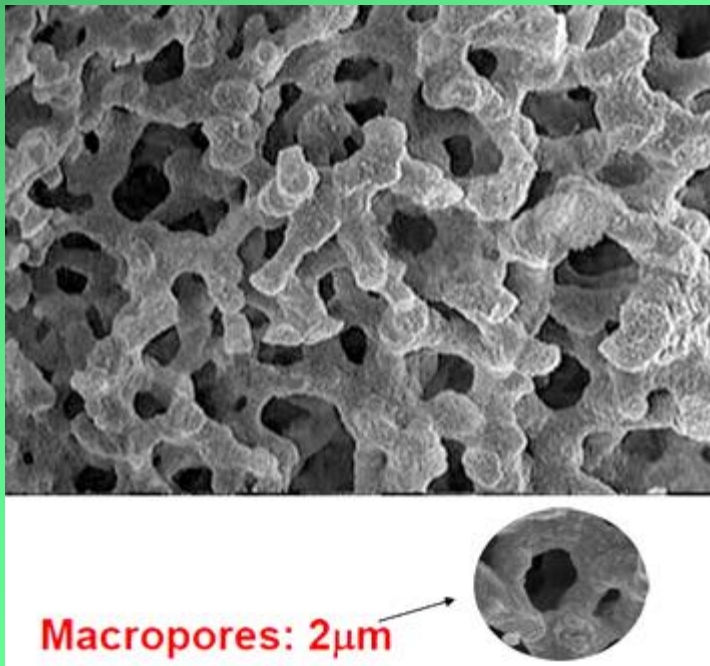
HPLC - rozdział składników



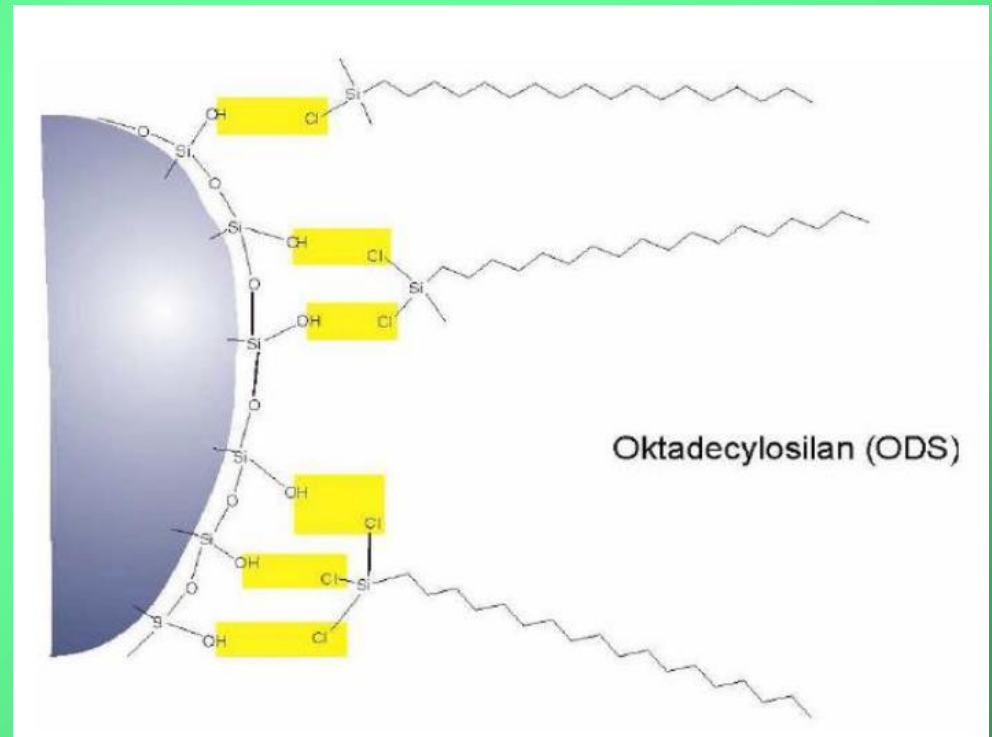
Kolumny chromatograficzne

Żel krzemionkowy

Faza normalna



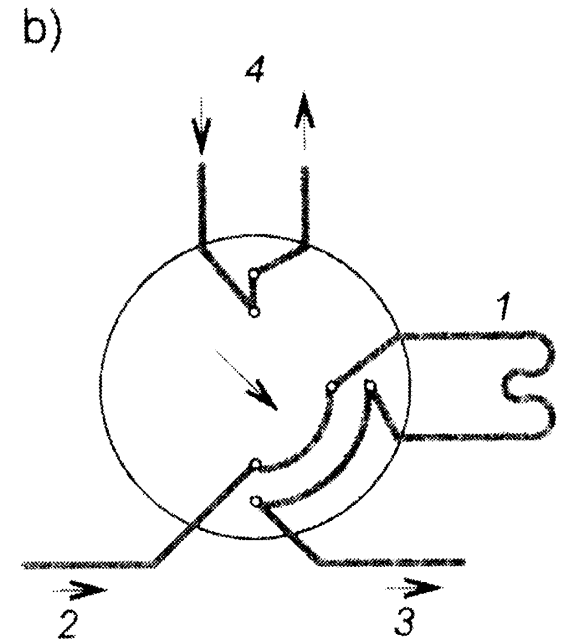
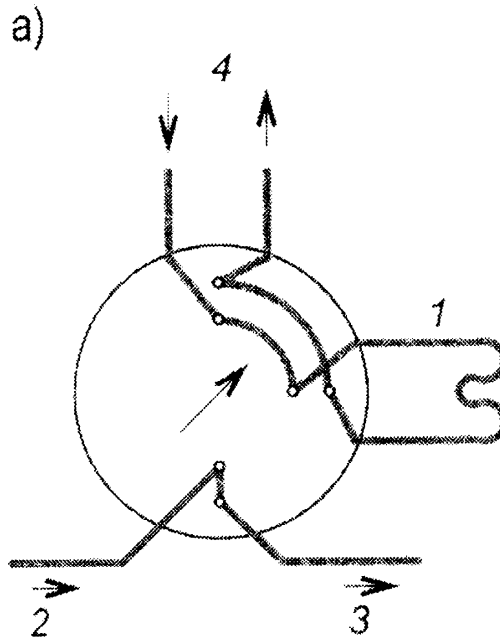
Faza odwrócona



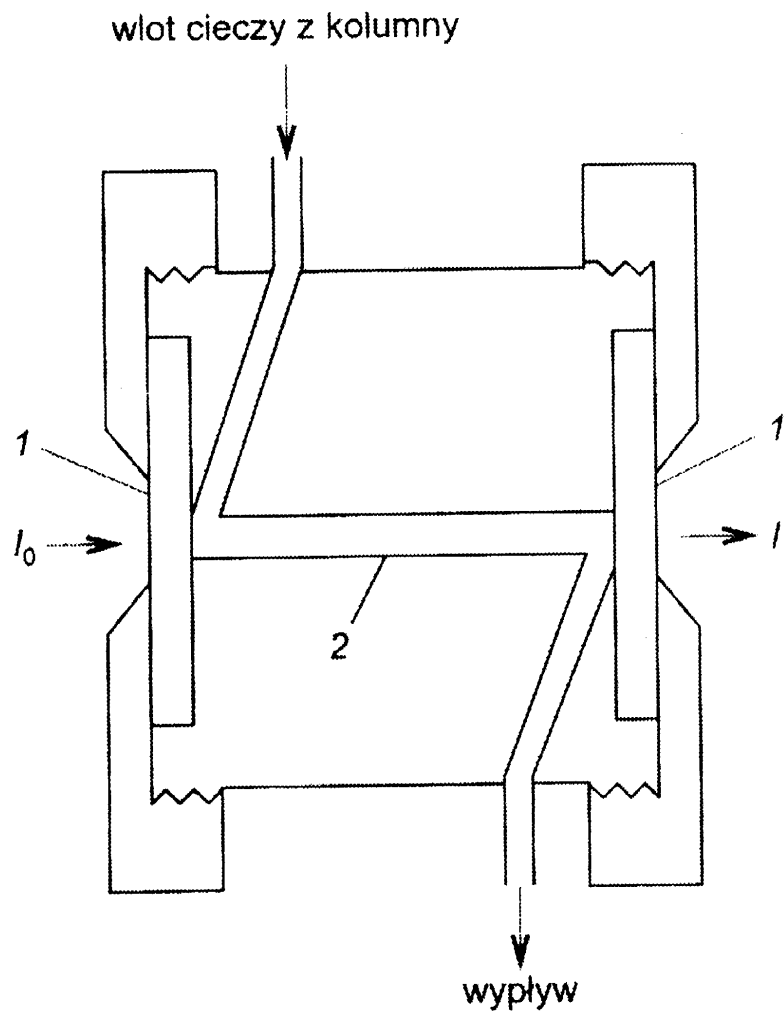
HPLC – dozowanie próbki

Dozownik HPLC typu zaworu z pętlą

a) napełnianie pętli, b) wstrzykiwanie na kolumnę; 1 - pętla, 2 - wlot fazy ruchomej, 3 - wylot fazy ruchomej do kolumny, 4 - wprowadzenie próbki

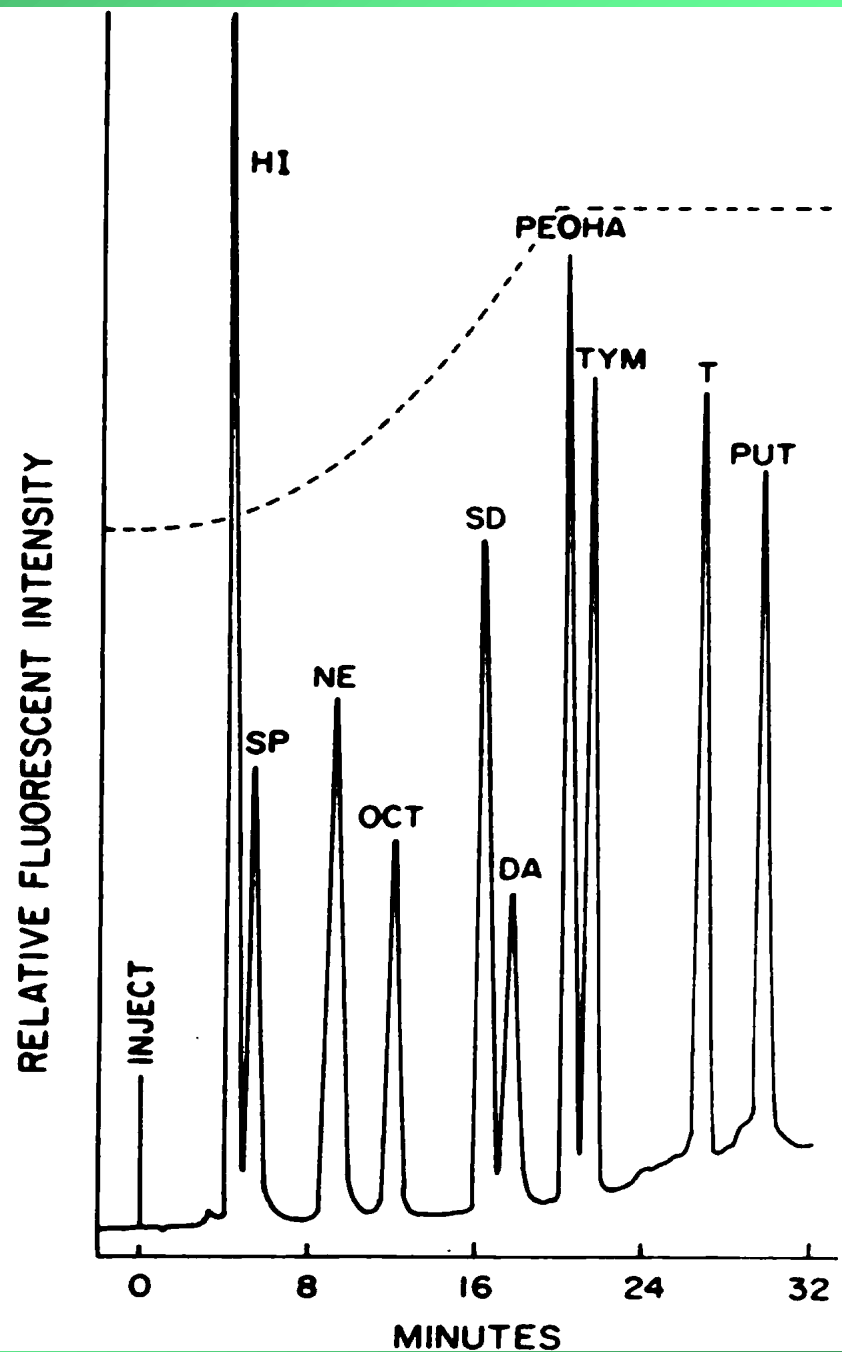


HPLC - detekcja składników

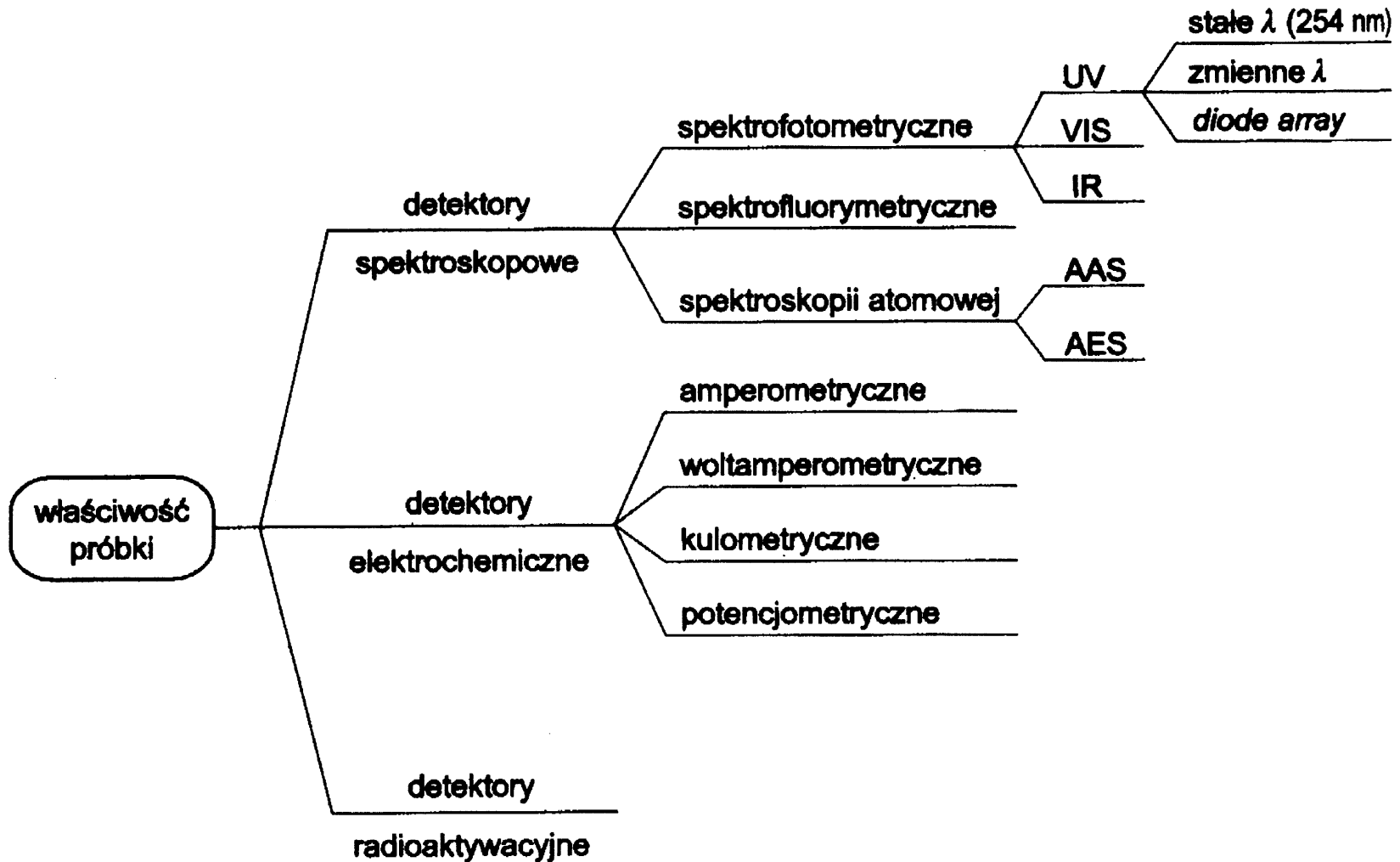


Schemat przepływowej komory pomiarowej detektora UV—Vis;
1 — okienka kwarcowe, 2 — droga optyczna

Przykładowy chromatogram
uzyskany metodą HPLC
(detektor fluorescencyjny)



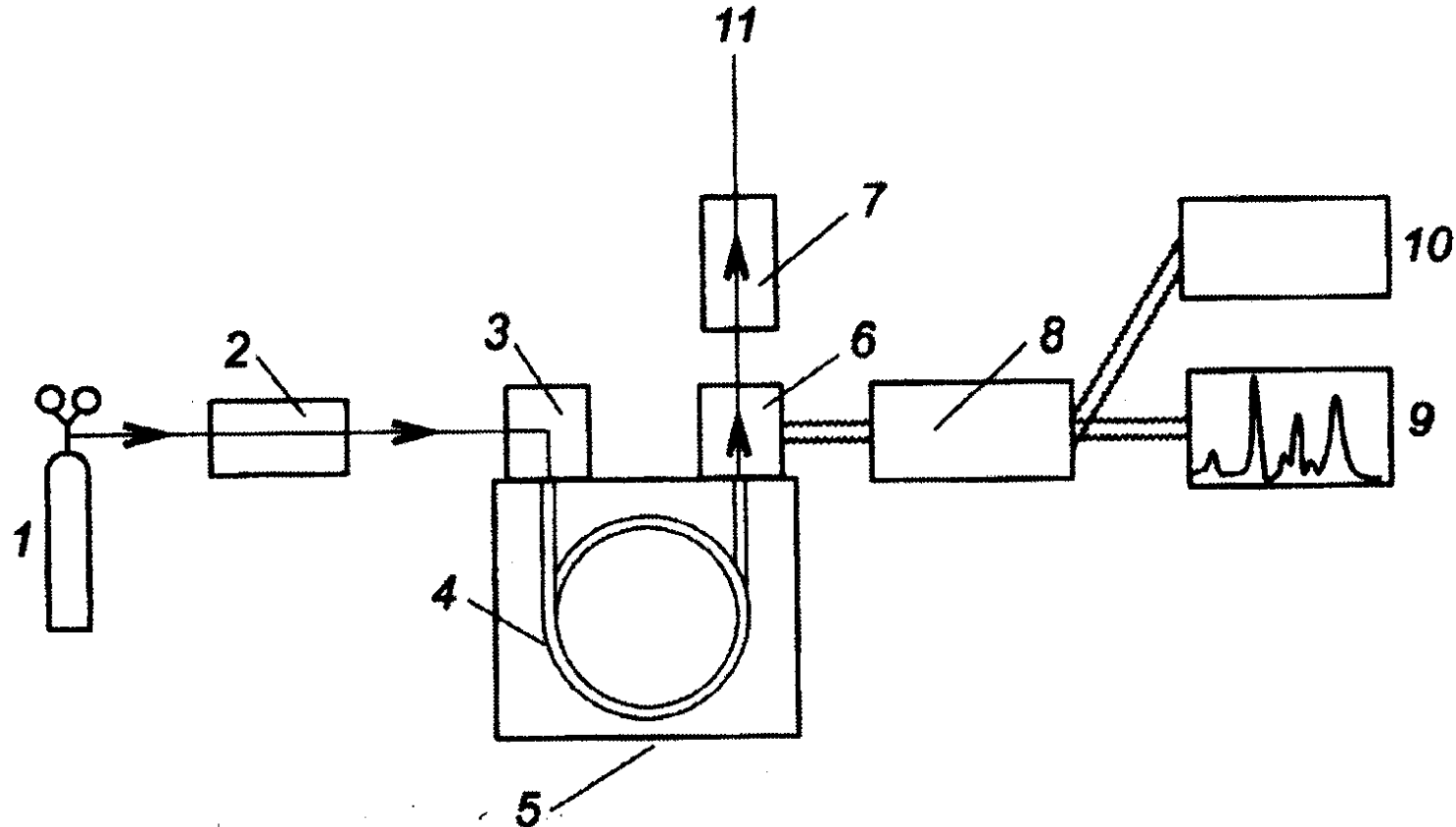
HPLC - detekcja składników



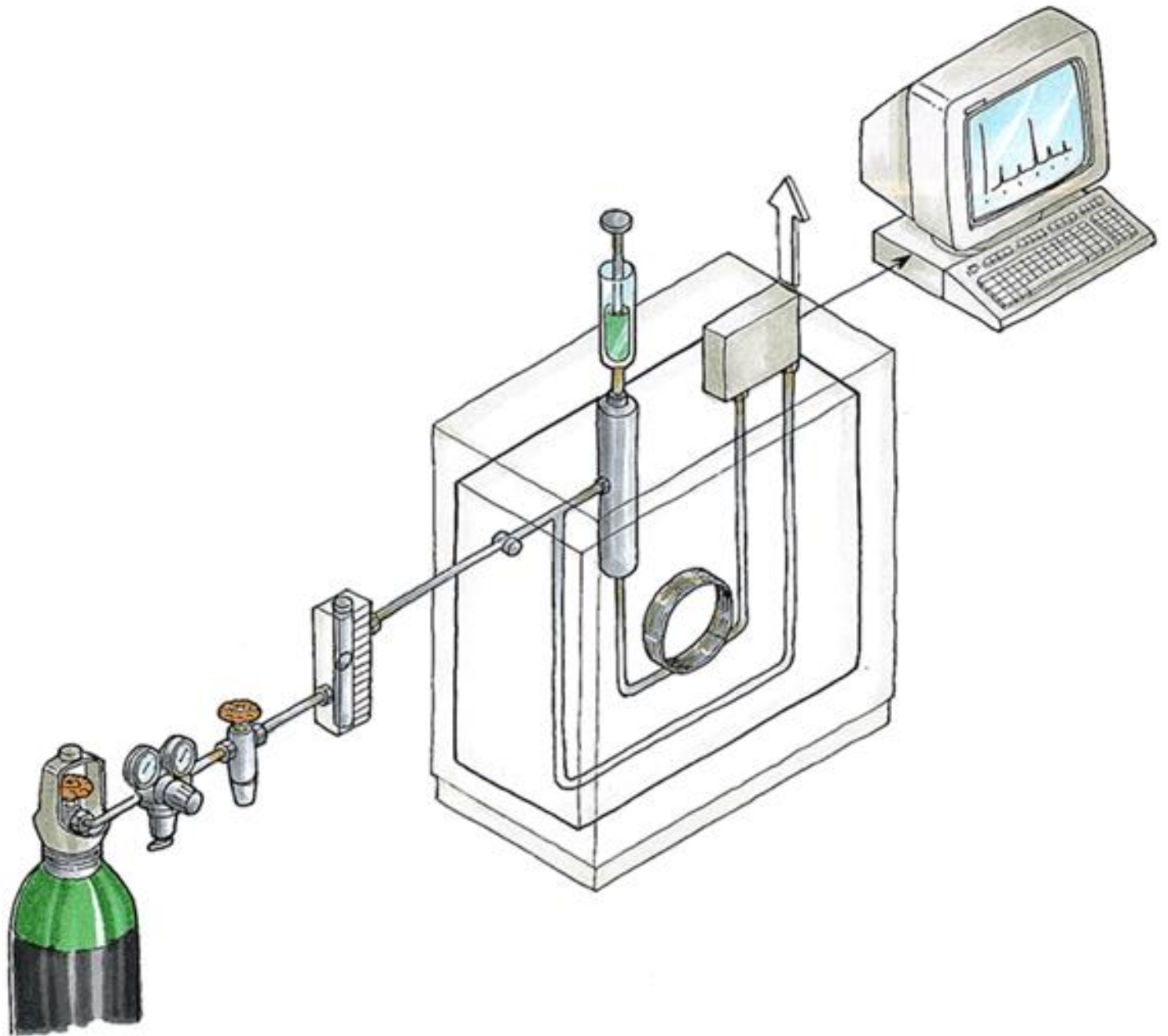
Detektory stosowane w HPLC

Chromatografia gazowa - GC

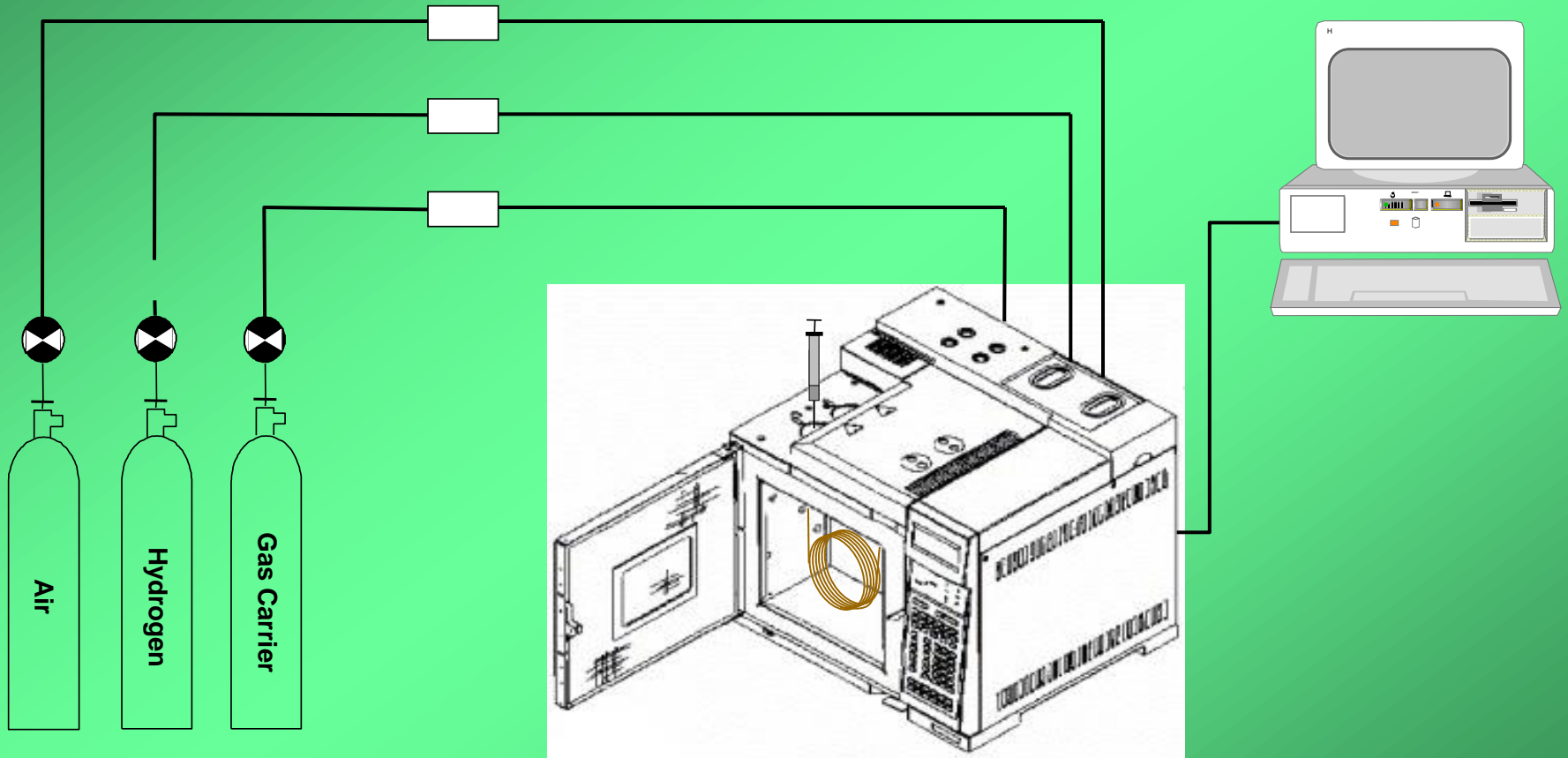
Chromatografia gazowa - GC

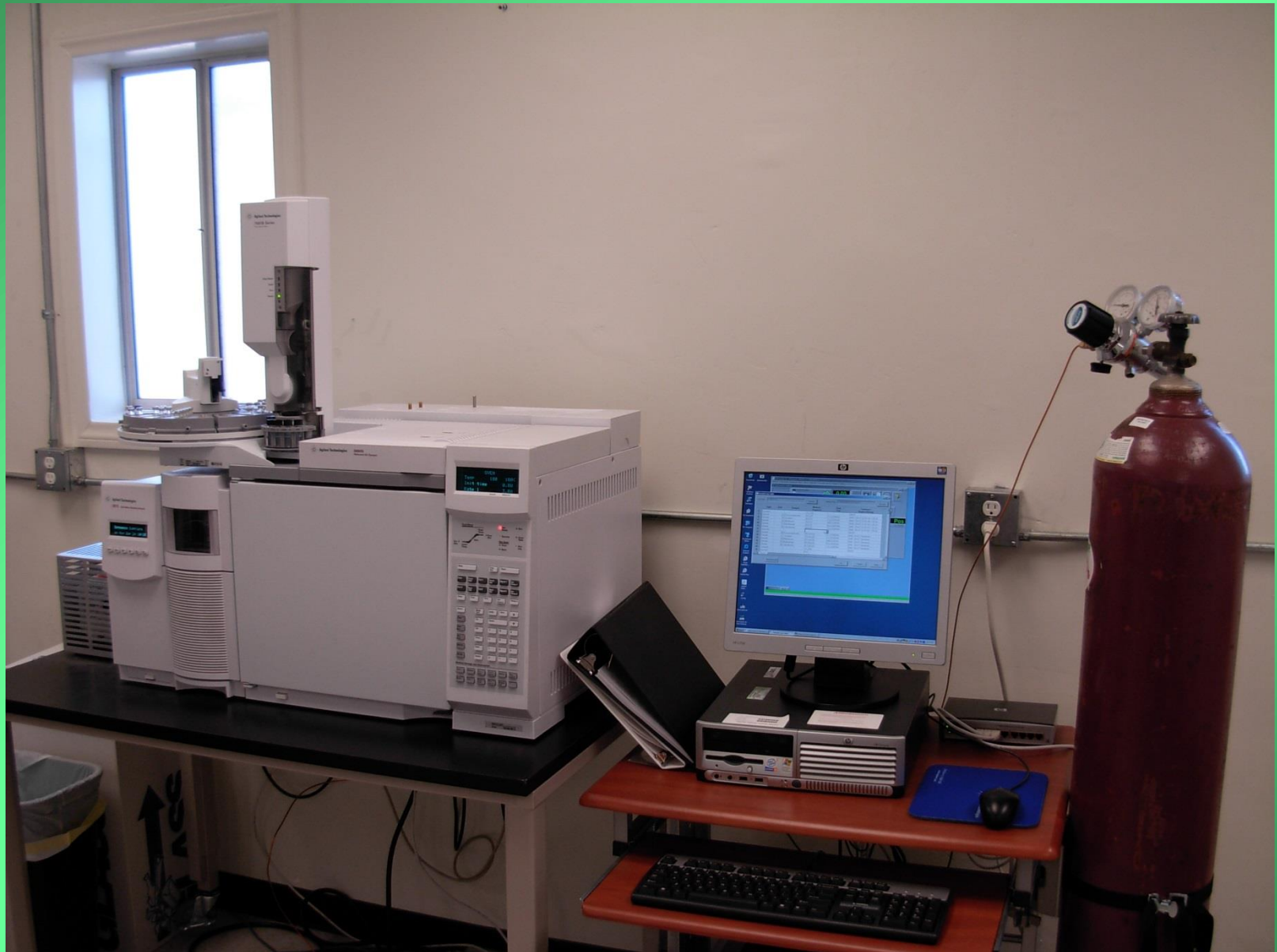


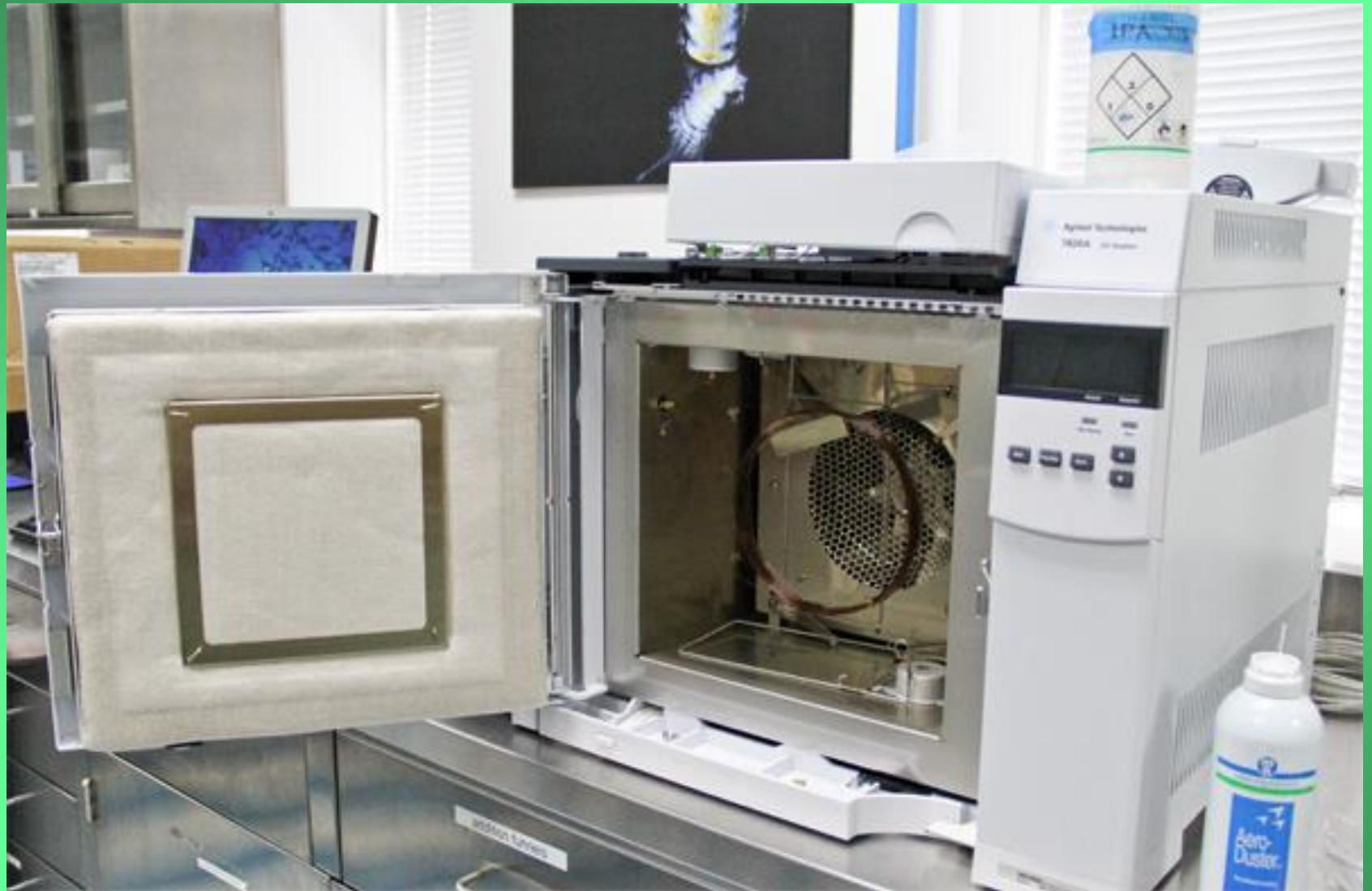
Schemat chromatografu gazowego: 1 - zbiornik gazu nośnego, 2 - regulator przepływu gazu, 3 - dozownik, 4 - kolumna, 5 - termostat, 6 - detektor, 7 - przepływomierz, 8 - wzmacniacz, 9 - rejestrator, 10 - integrator, 11 - wylot gazów



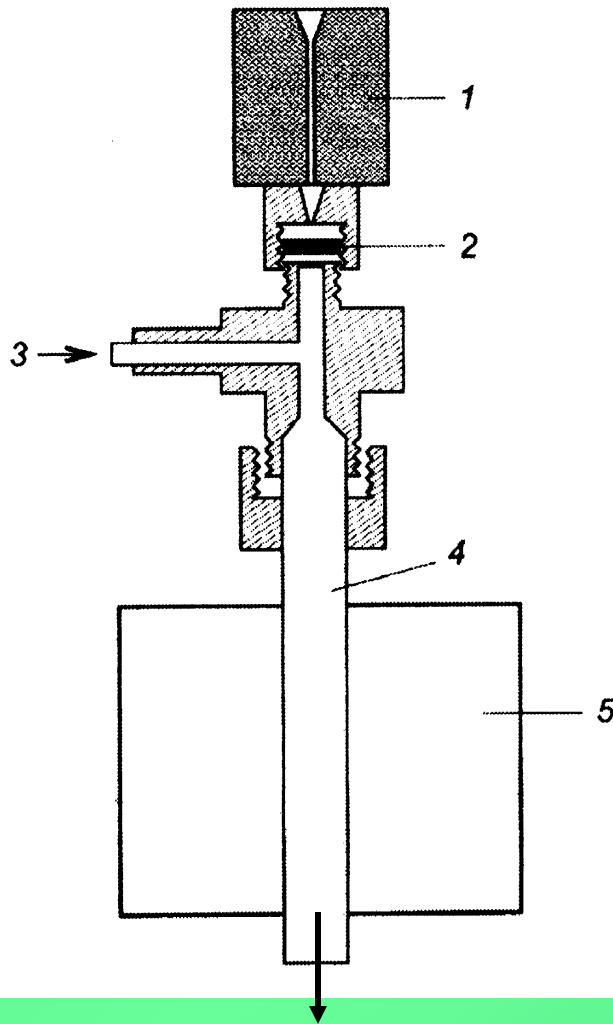
Chromatografia gazowa - GC







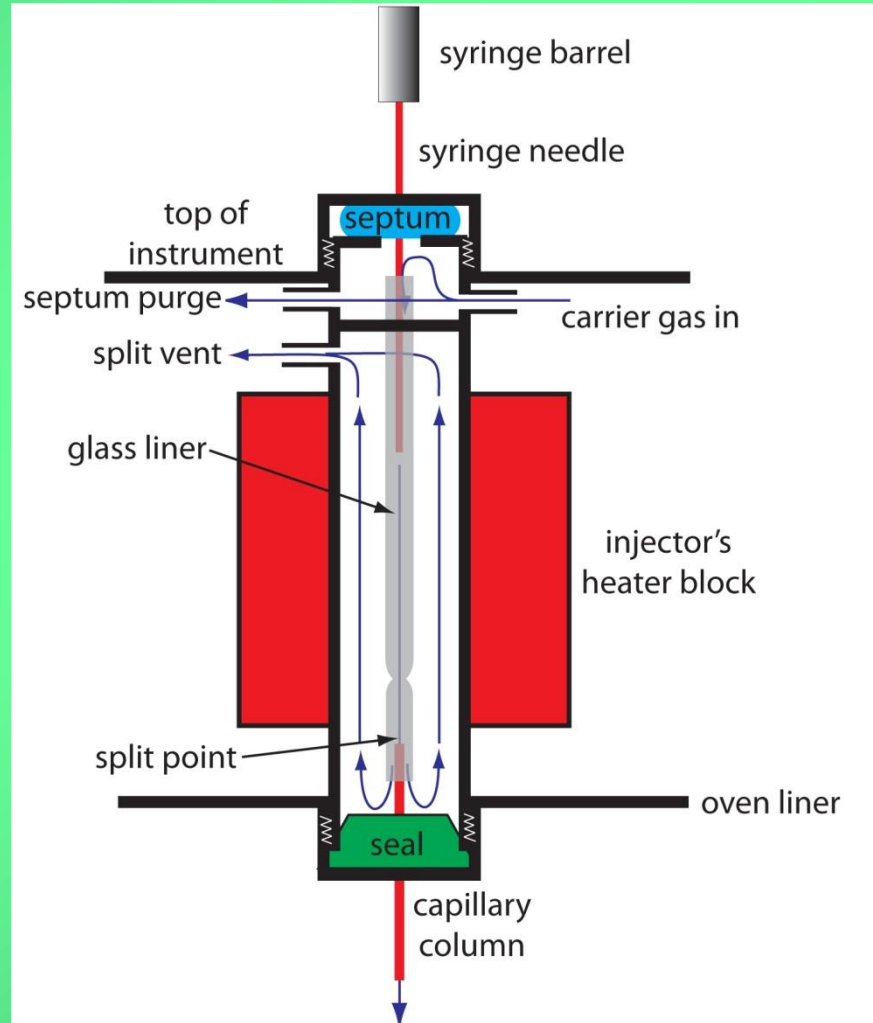
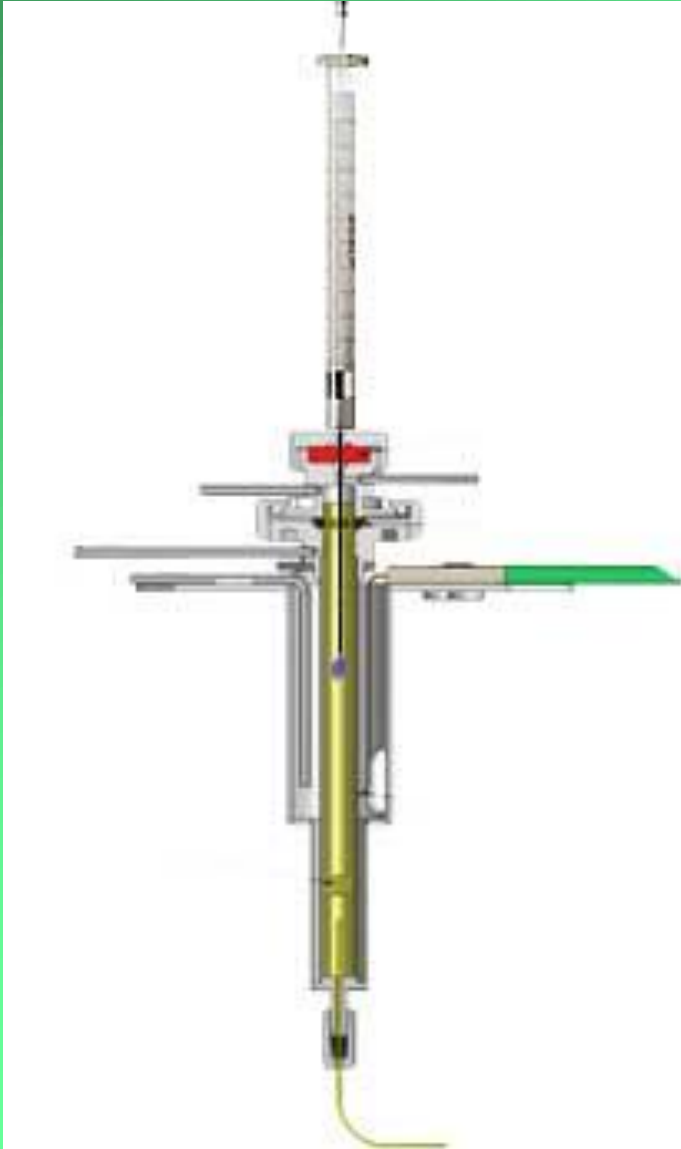
GC – dozowanie próbki

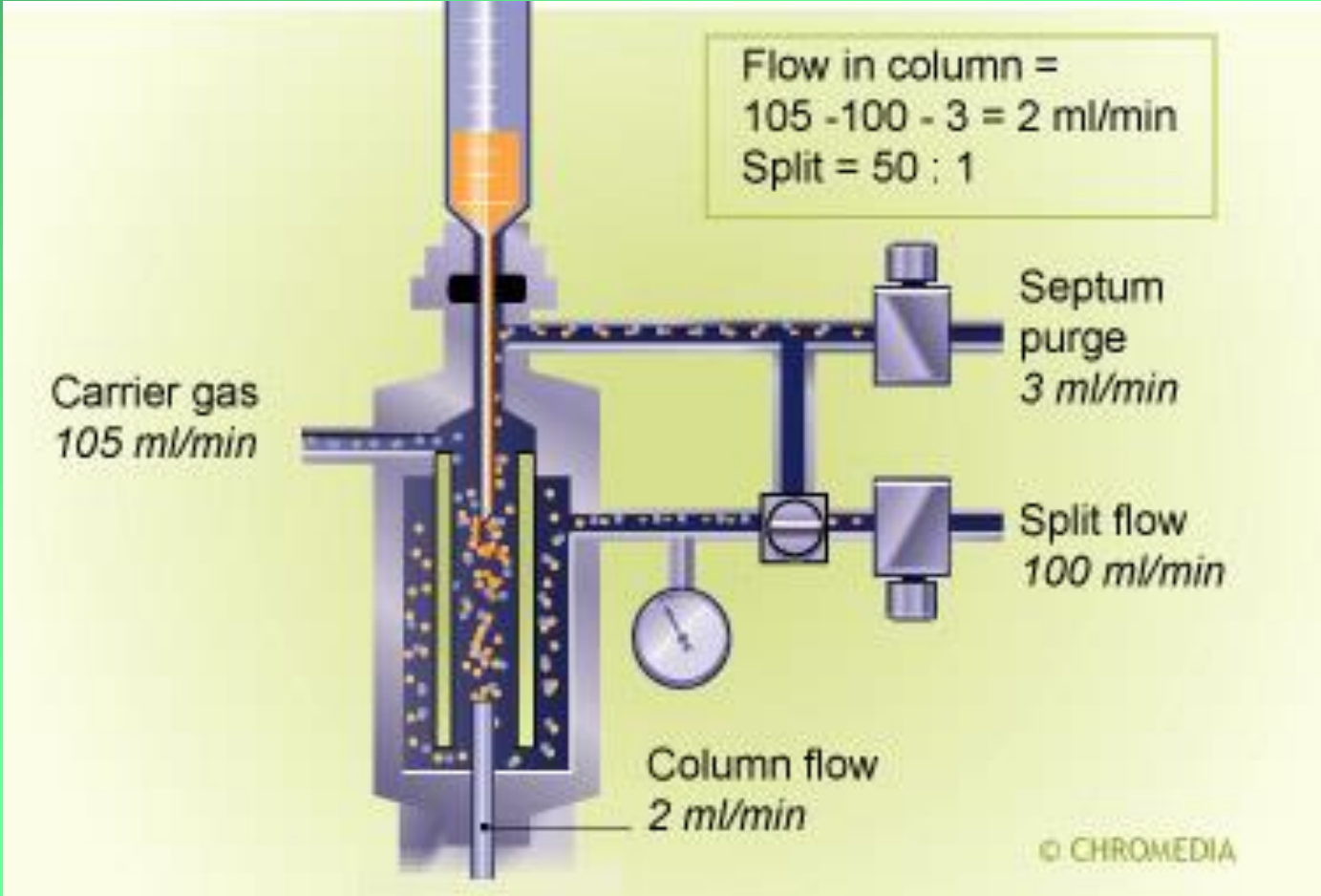


Schemat dozownika membranowego GC

1 - prowadnica igły strzykawkowej, 2 - membrana gumowa, 3 - przewód doprowadzający gaz nośny, 4 - kolumna chromatograficzna, 5 - blok grzewczy

Kolumna





Kolumny kapilarne stosowane w chromatografii gazowej

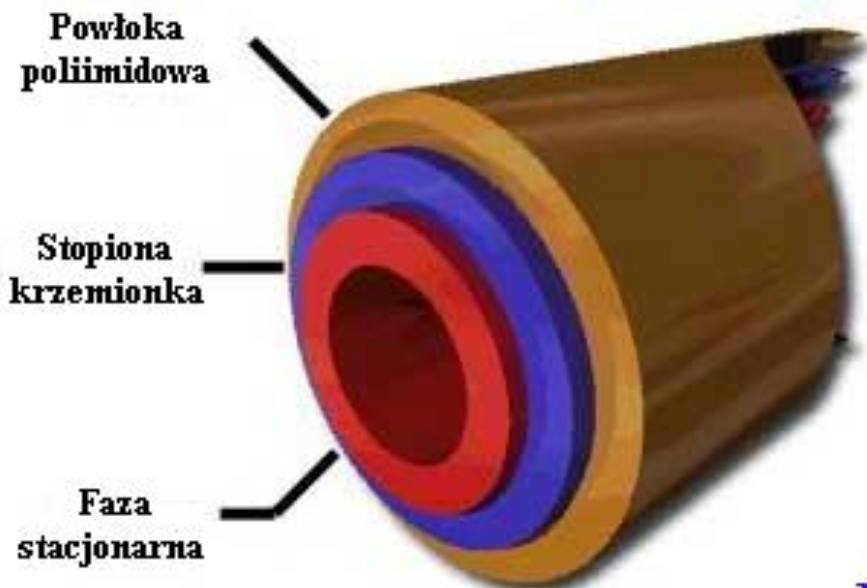


Stopiona krzemionka
pokryta aluminium

Wysoka temperatura
stopiona krzemionka

Stal
nierdzewna

Stopiona krzemionka pokryta poliimidem



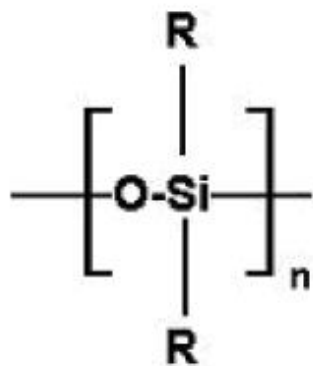
Kolumna ze stali nierdzewnej



**Przekroje kolumn do
GC w powiększeniu**

Fazy stacjonarne w kolumnach kapilarnych

Najbardziej znanym typem faz stacjonarnych są polisiloksany. Każdy atom krzemu w łańcuchu zawiera dwie grupy funkcyjne. Typ i ilość grup decyduje o właściwościach fazy stacjonarnej, a tym samym kolumny.



R = CH₃

R = CH₂CH₂CN

R = CH₂CH₂F₃

R =



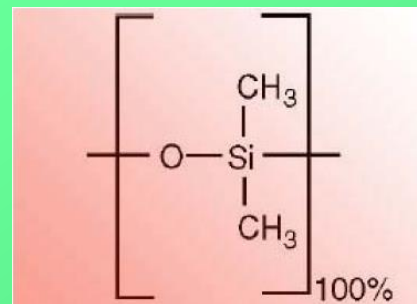
Metyl

Cyjanopropyl

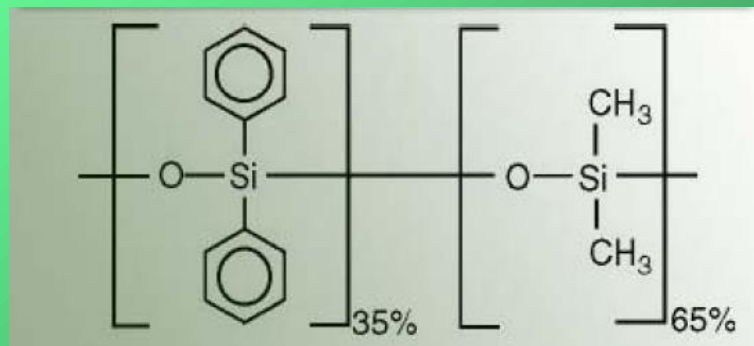
Trifluoropropyl

Fenyl

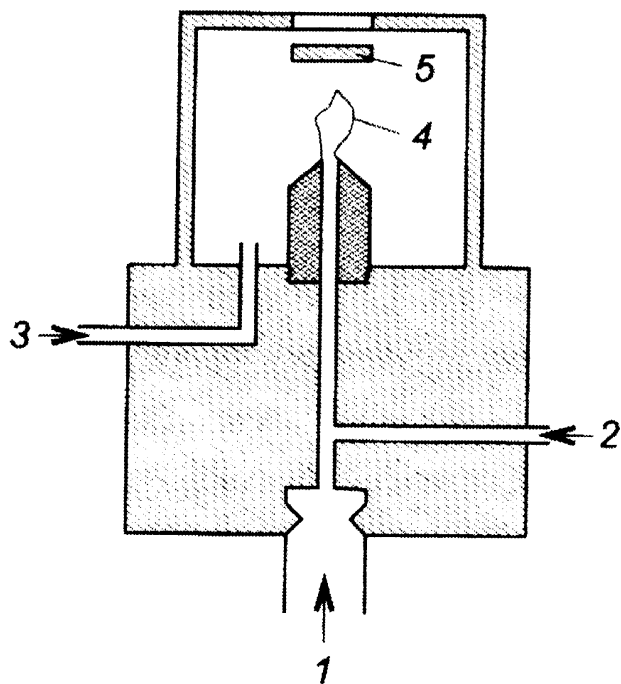
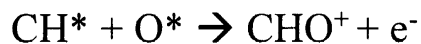
Poli(dimetylosiloksan)



Poli(35% - difenylo- 65% dimetylosiloksan)



GC - detekcja składników - FID

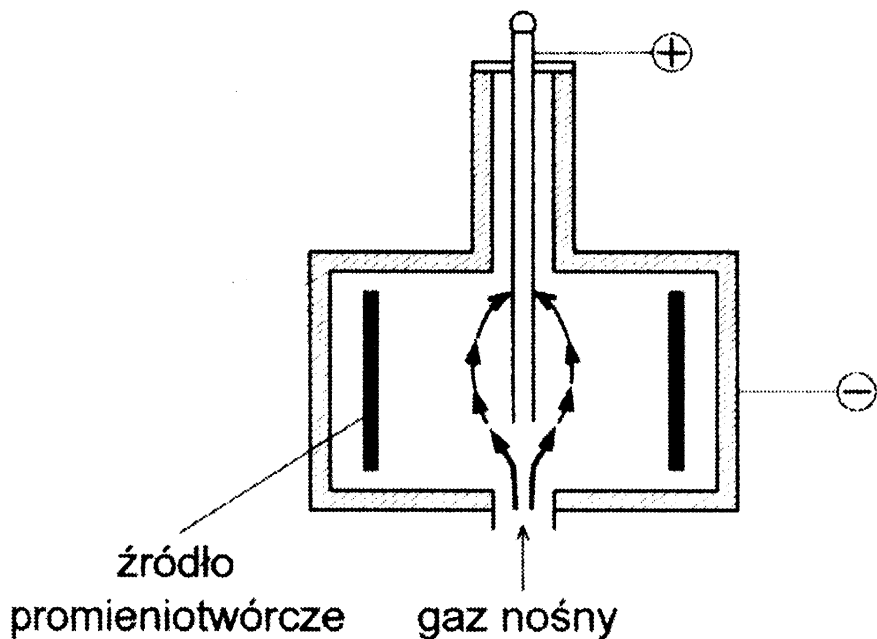
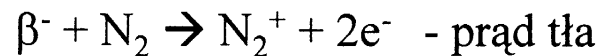


Schemat detektora płomieniowo-jonizacyjnego: 1 — wlot gazu z kolumny, 2 — doprowadzenie wodoru, 3 — doprowadzenie tlenu, 4 — płomień wodorowy, 5 — kolektor (elektroda)

Względna czułość detektora płomieniowo-jonizacyjnego w stosunku do różnych związków organicznych

Nazwa związku	Wzór	Względna czułość	Liczba atomów C
Metan	CH ₄	1,00	1
Etan	C ₂ H ₄	2,05	2
Acetylen	C ₂ H ₂	2,03	2
Propan	C ₃ H ₈	3,15	3
Heksan	C ₆ H ₁₄	6,60	6
Chloroform	CHCl ₃	0,89	1
Czterochlorek węgla	CCl ₄	0,67	1
Tlenek węgla	CO	0,0	1
Dwutlenek węgla	CO ₂	0,0	1
Nitrometan	CH ₃ NO ₂	0,49	1

GC - detekcja składników - ECD



Schemat detektora wychwytywania elektronów

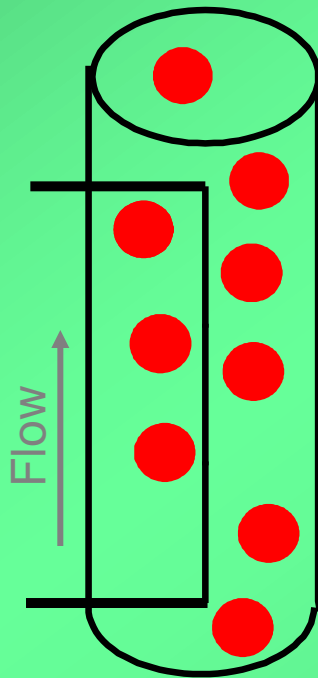
Względna czułość detektora wychwytywania elektronów (ECD) w stosunku do różnych związków organicznych

Węglowodory	1
Etery, estry	10
Alifatyczne alkohole, ketony, aminy, związki mono Cl, i mono F	100
Związki mono Br, di Cl, I, di F	1000
Anhydrydy i związki tri Cl	10000
Związki mono I, di Br, poli Cl i poli F	100000
Związki di I, tri Br, i poli F	1000000

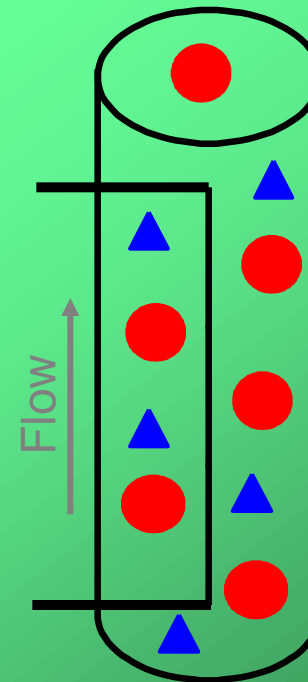
GC - detekcja składników - TCD

Uniwersalny detektor cieplno-przewodnościowy (TCD)

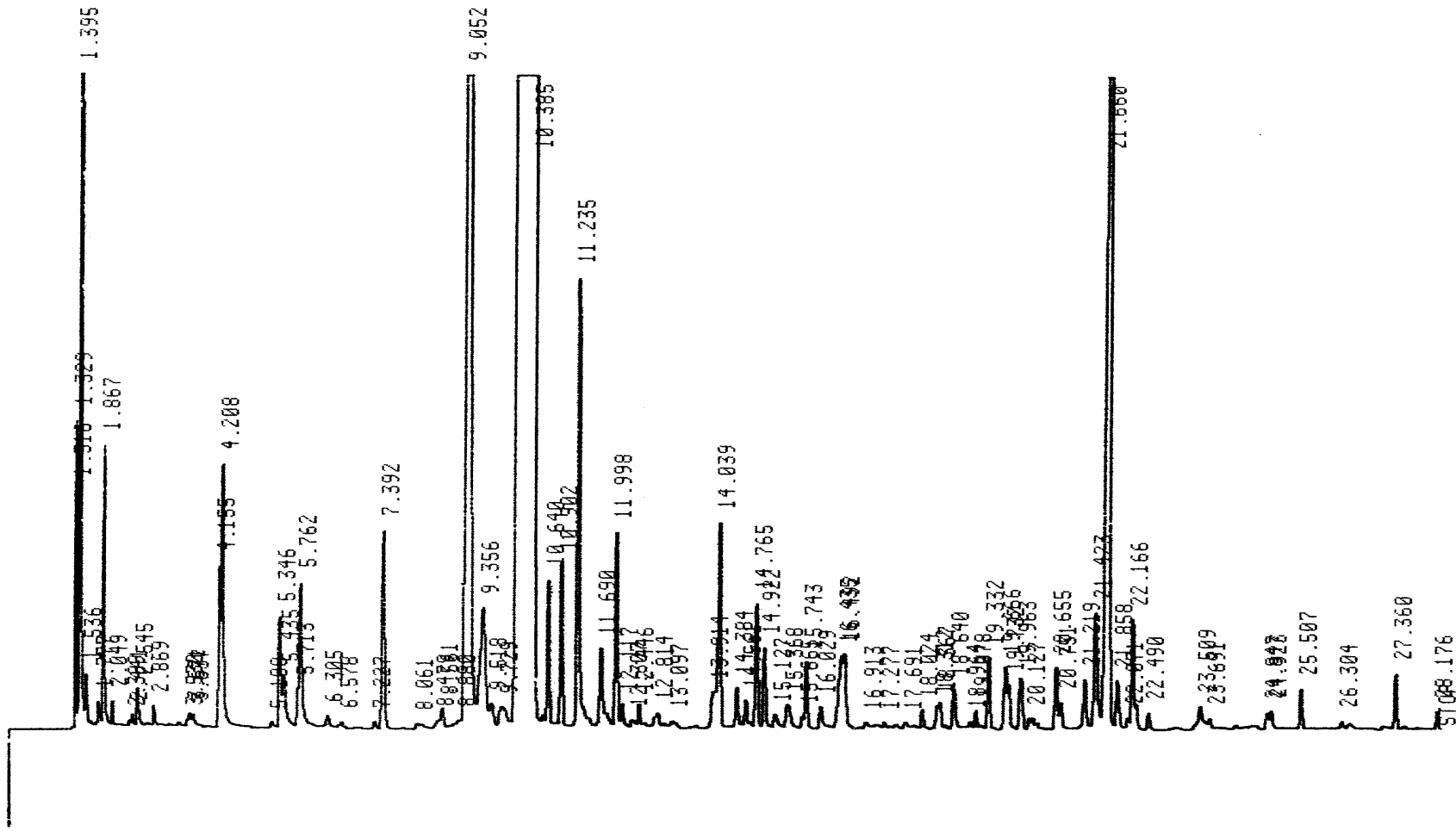
Drut oporowy wewnątrz detektora jest chłodzony przez przepływający gaz nośny ●



Kiedy w gazie nośnym pojawia się inna substancja ▲, właściwości chłodzące gazu nośnego się zmieniają. Generuje to powstawanie sygnału w detektorze



* RUN # 176 AUG 1, 2001 23:25:55
START

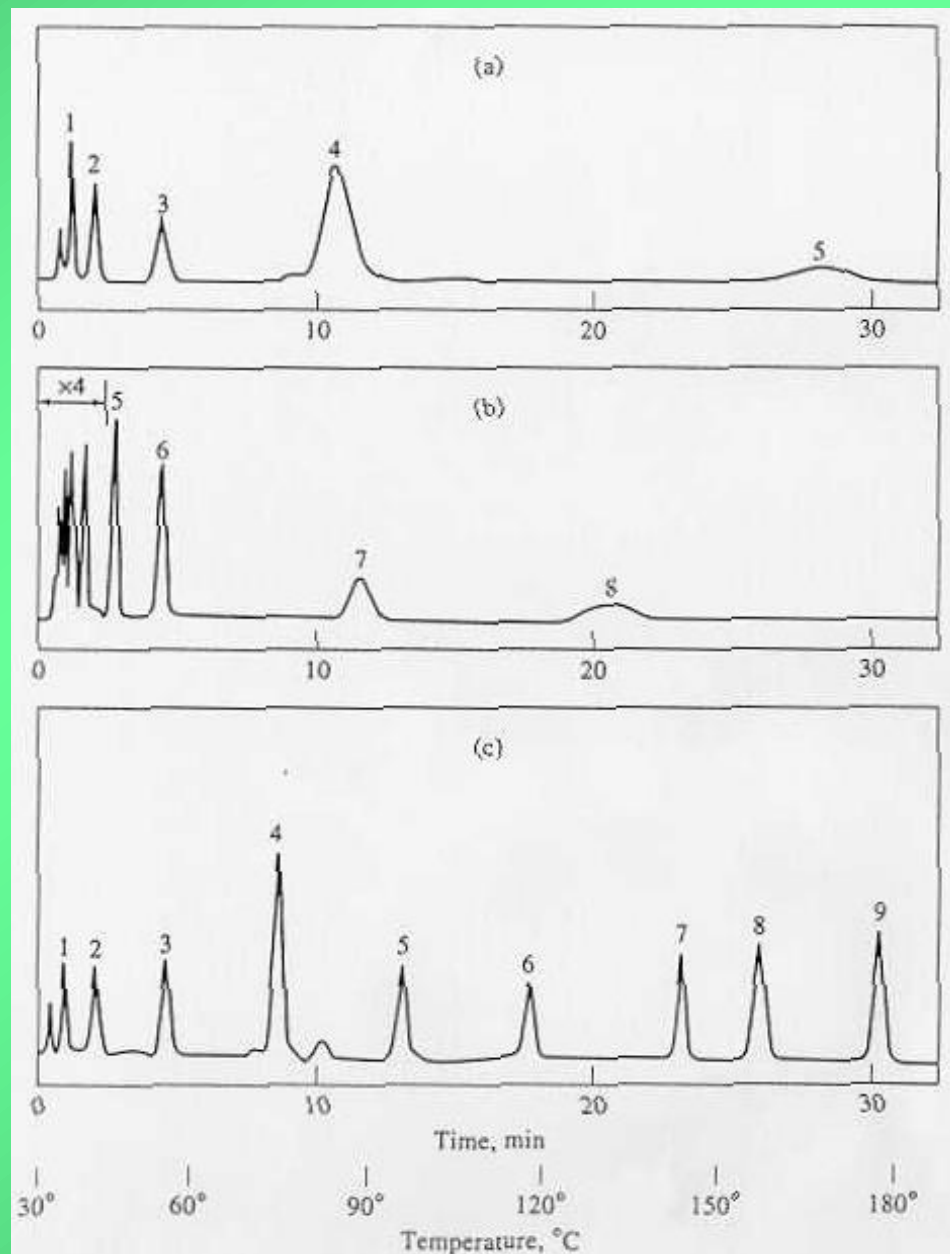


Chromatogram GC składników soku z pomarańczy

Wpływ warunków termicznych na rozdział w GC

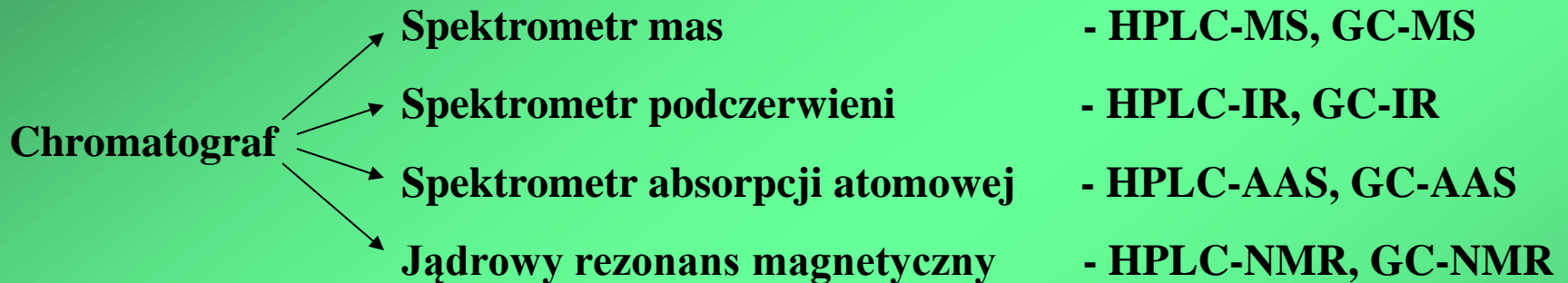
Warunki rozdziału:

- (a) izotermiczny w 45°C
- (b) izotermiczny w 145°C
- (c) programowany w 30°C do 180°C



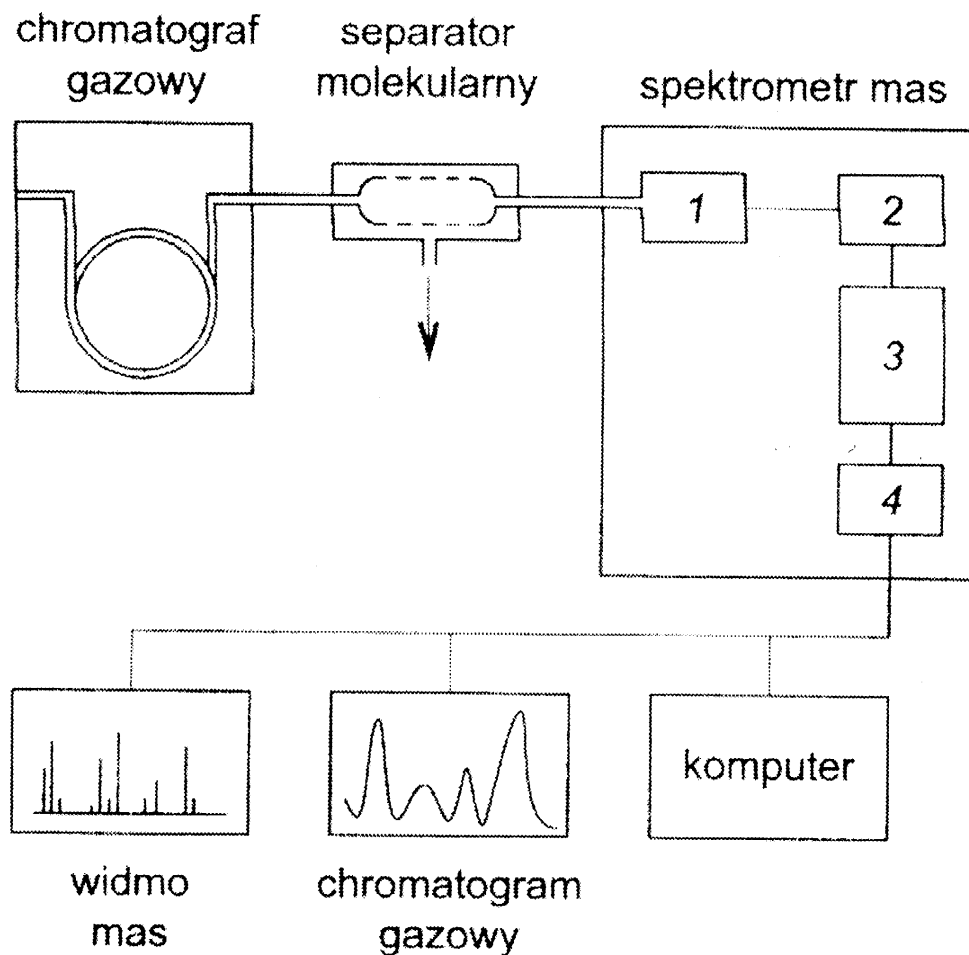
Techniki łączone

Zastosowanie instrumentalnych technik analitycznych do detekcji w chromatografii gazowej i HPLC (techniki łączone)

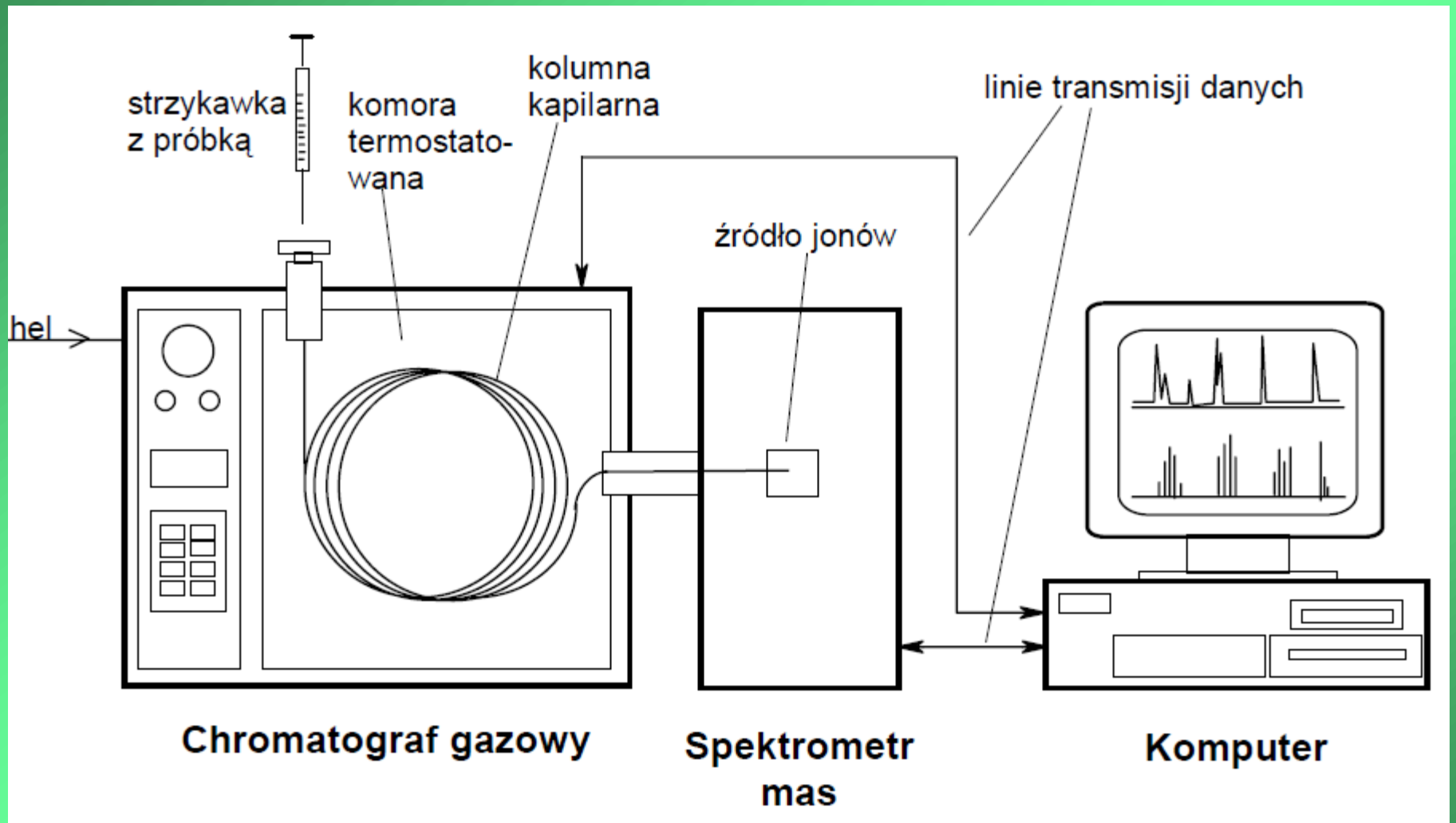


Techniki instrumentalne nie tylko wykrywają obecność substancji, ale również dokonują jej analizy, przez co potwierdzają autentyczność mierzonej substancji w danym szczycie sygnału.

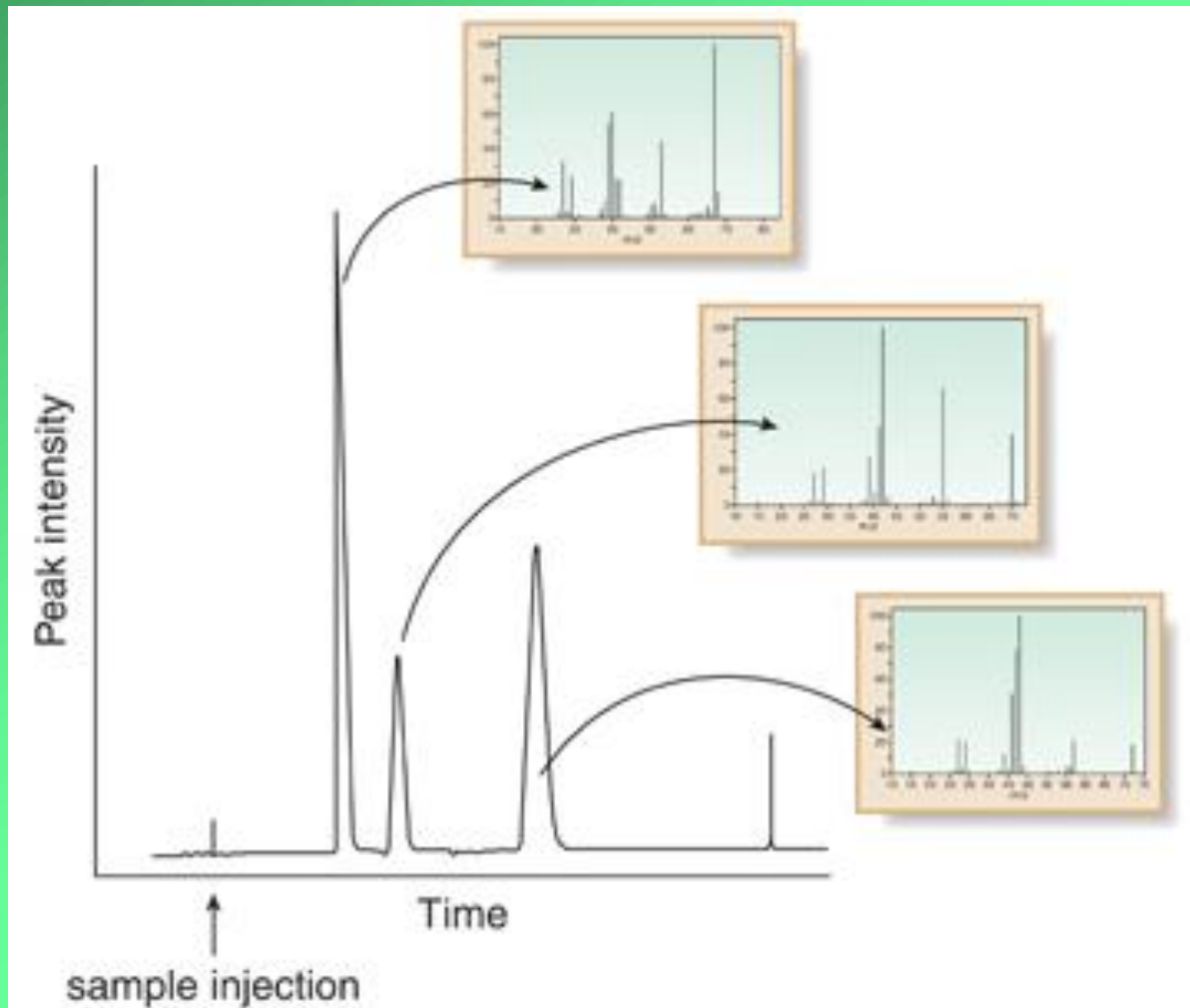
Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas



Chromatograf gazowy sprzężony z spektrometrem masowym GC-MS: 1 — komora jonizacyjna, 2 — komora przyspieszająca, 3 — analizator, 4 — detektor



Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas

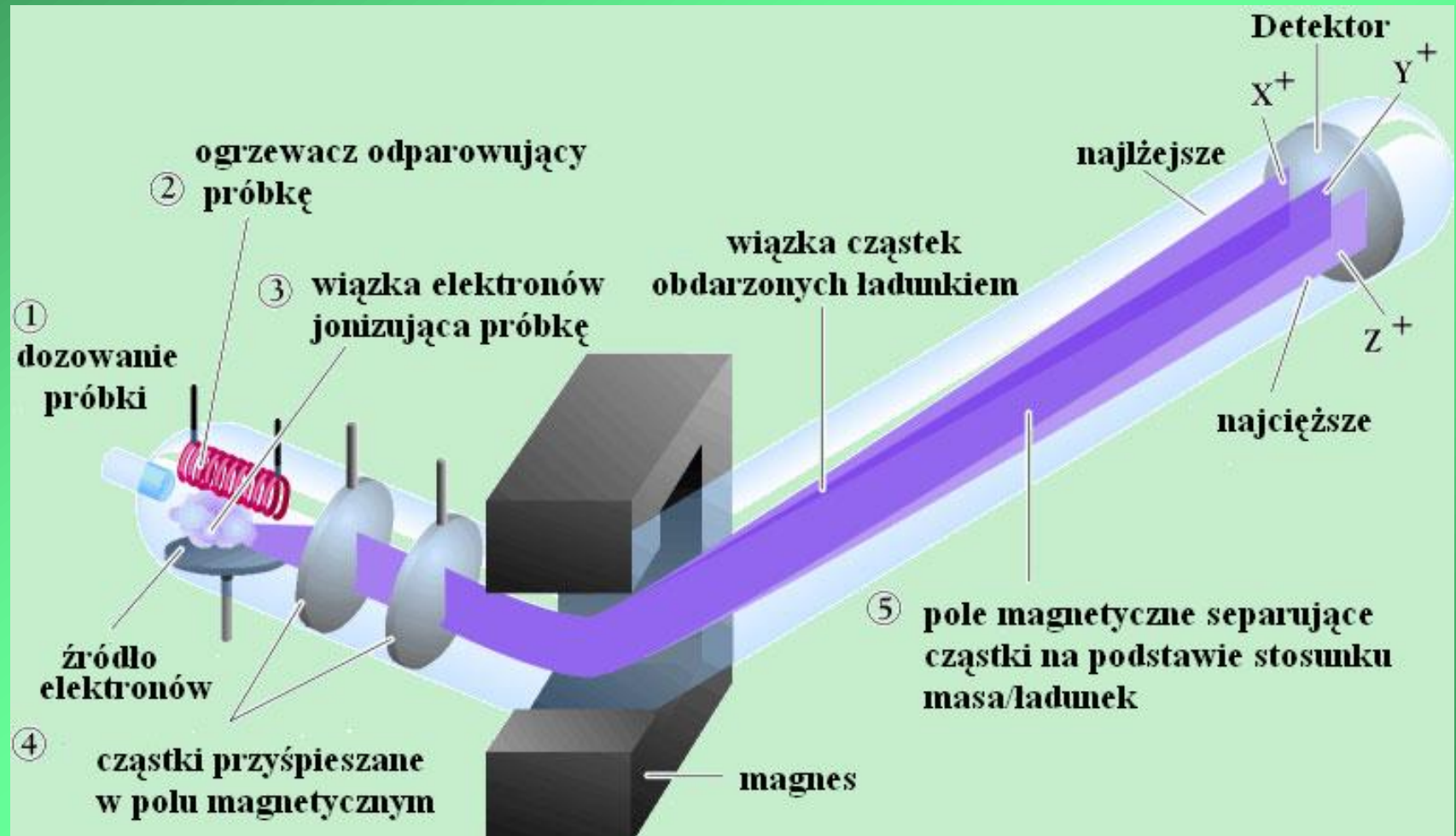


- Detektor wykonuje co sekundę widmo masowe (skan) wycieku z kolumny.
- Analizowane są jony o masach większych niż jony gazu nośnego.
- Każda substancja ma charakterystyczne dla siebie widmo mas.

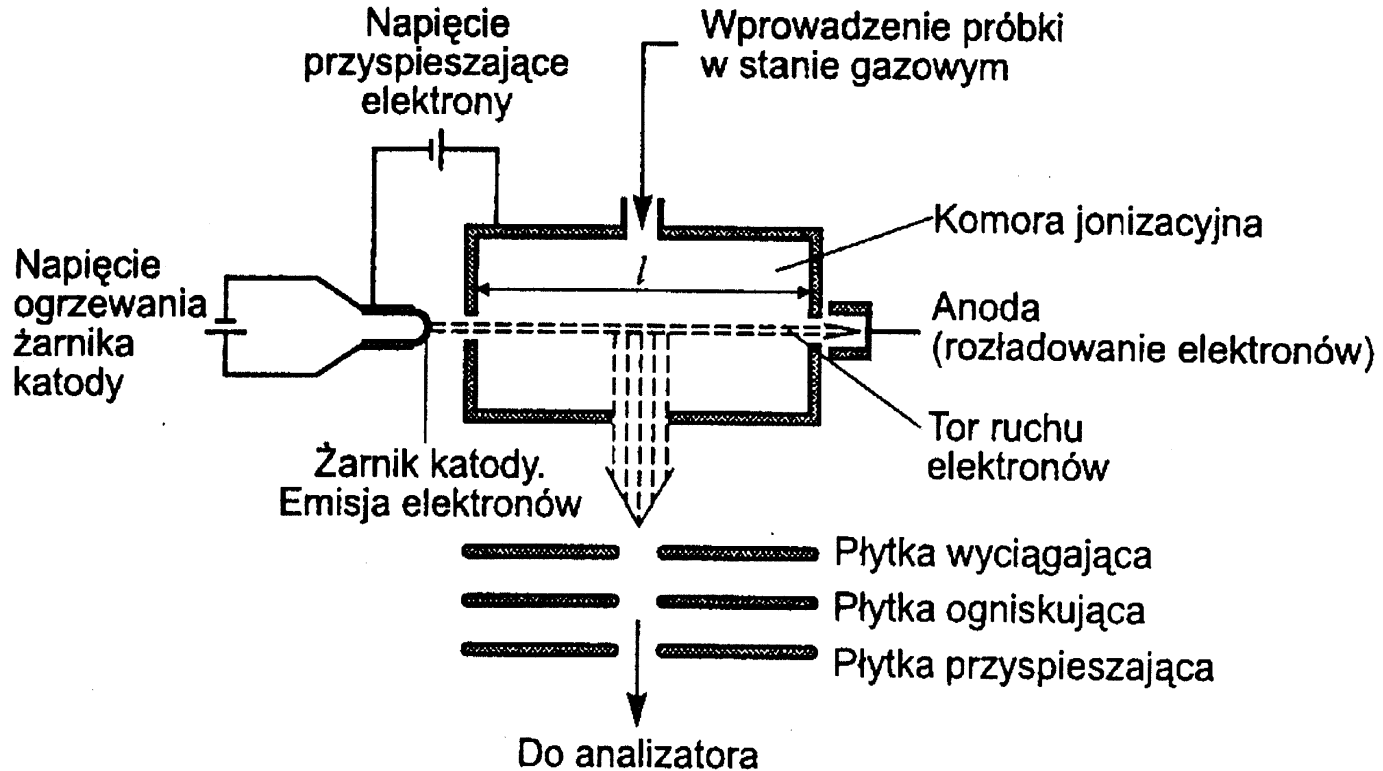
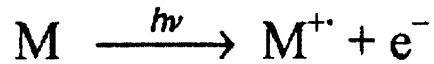
Spektometria mas

Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas

Zasada działania spektrometru masowego



Schemat źródła jonów z jonizacją elektronami

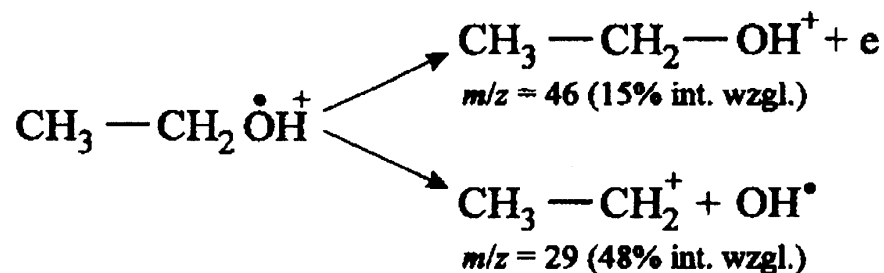
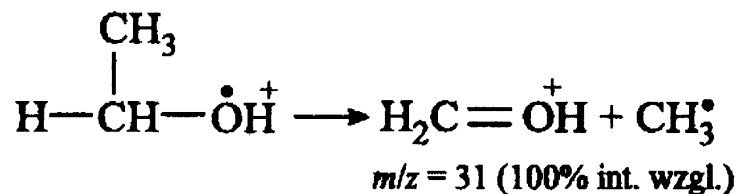
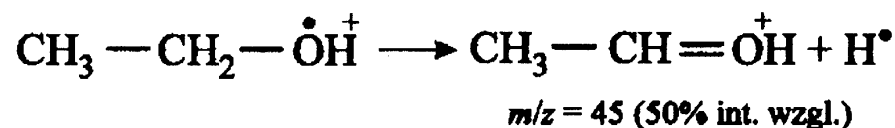
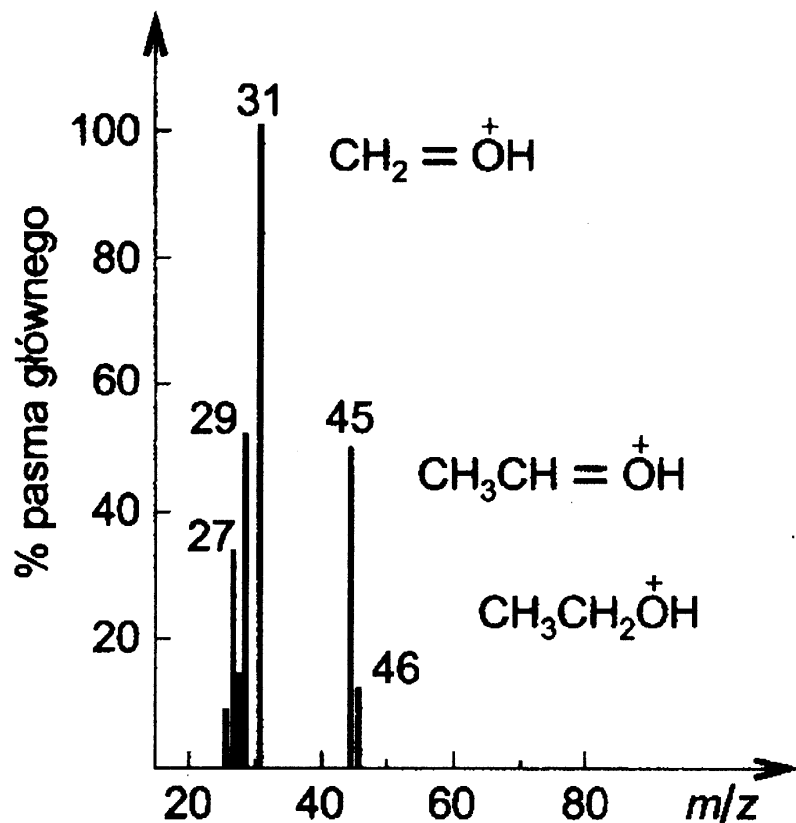


Schemat powstawania jonów w źródle:

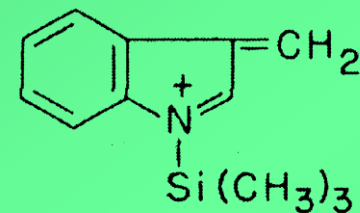
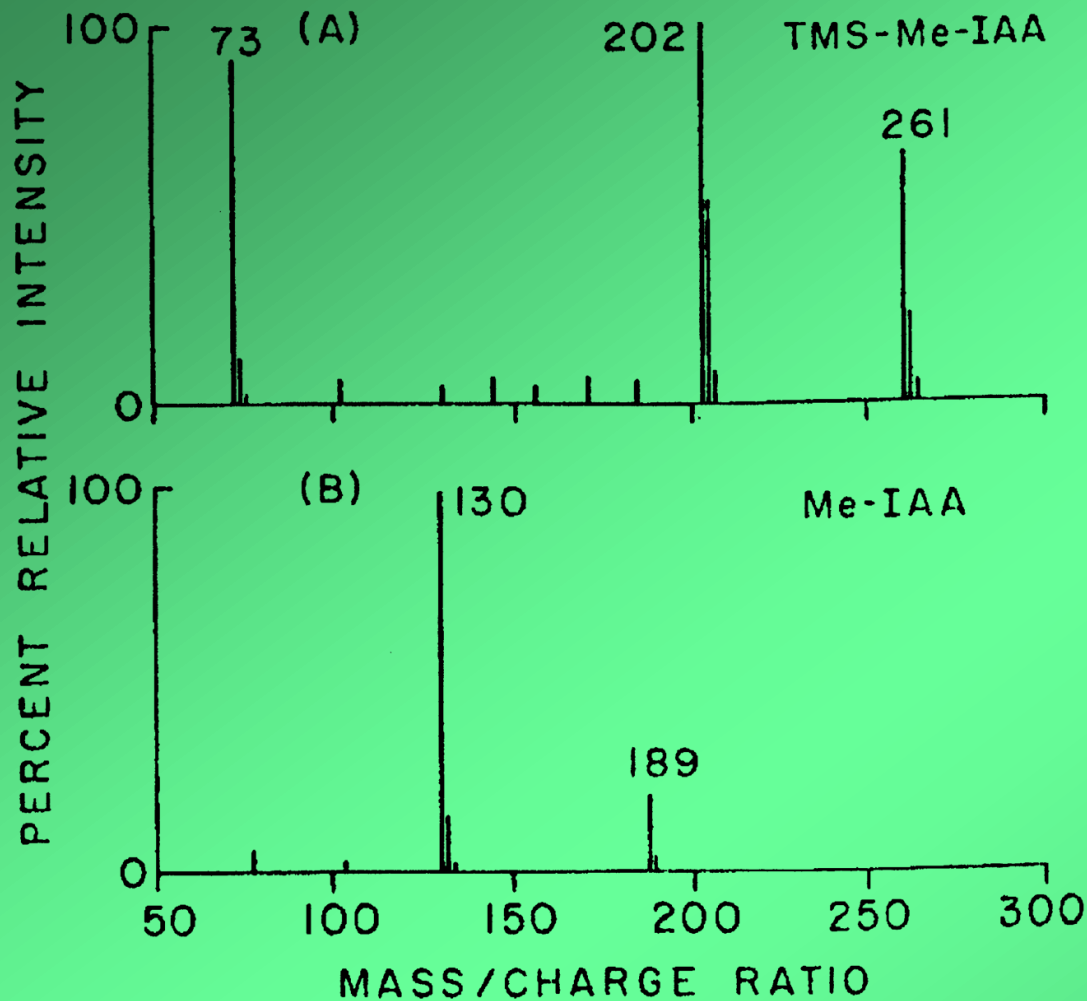
- $ABC + e^{-} \rightarrow ABC^{+*} + 2e^{-}$ (tworzenie jonu)
- $ABC^{+*} \rightarrow AB^{+} + C^{*}$; $AB^{+} \rightarrow A^{+} + B$ (fragmentacja)
- $ABC^{+*} \rightarrow BC^{+} + A^{*}$
- $ABC^{+*} \rightarrow AC^{+} + B^{*}$ (fragmentacja z przegrupowaniem)

Schemat powstawania jonów w źródle:

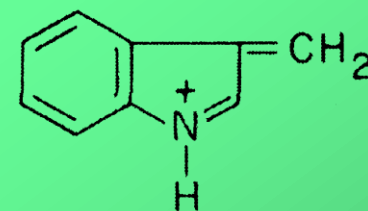
- $ABC + e^- \rightarrow ABC^{+*} + 2e^-$ (tworzenie jonu)
- $ABC^{+*} \rightarrow AB^+ + C^*$; $AB^+ \rightarrow A^+ + B$ (fragmentacja)
- $ABC^{+*} \rightarrow BC^+ + A^*$
- $ABC^{+*} \rightarrow AC^+ + B^*$ (fragmentacja z przegrupowaniem)



Jonizacja, rozpad i widmo mas cząsteczki etanolu



100 % TMS-Me-IAA
m/z 202

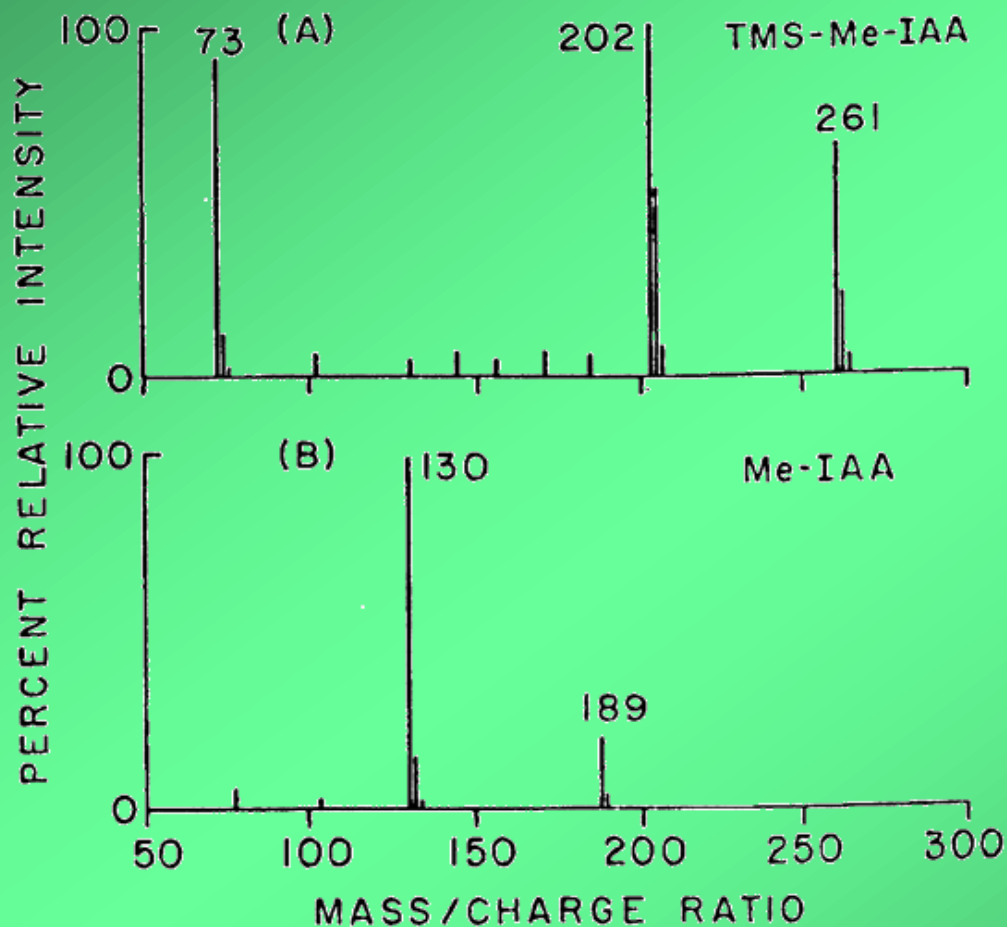


100 % Me-IAA
m/z 130

Widmo masowe pochodnej metylowej (B) i metylowo-sililowej (A) kwasu indolilo-3-octowego (IAA) oraz (po prawej) - najintensywniejsze jony danego widma.

A jak zinterpretować obecność w widmie jonów o $m/z = 189$ i 261 ?

Interpretacja obecności w widmie jonów o $m/z = 189$ i 261



Masa cz. IAA = 175

Reszta Me = 15

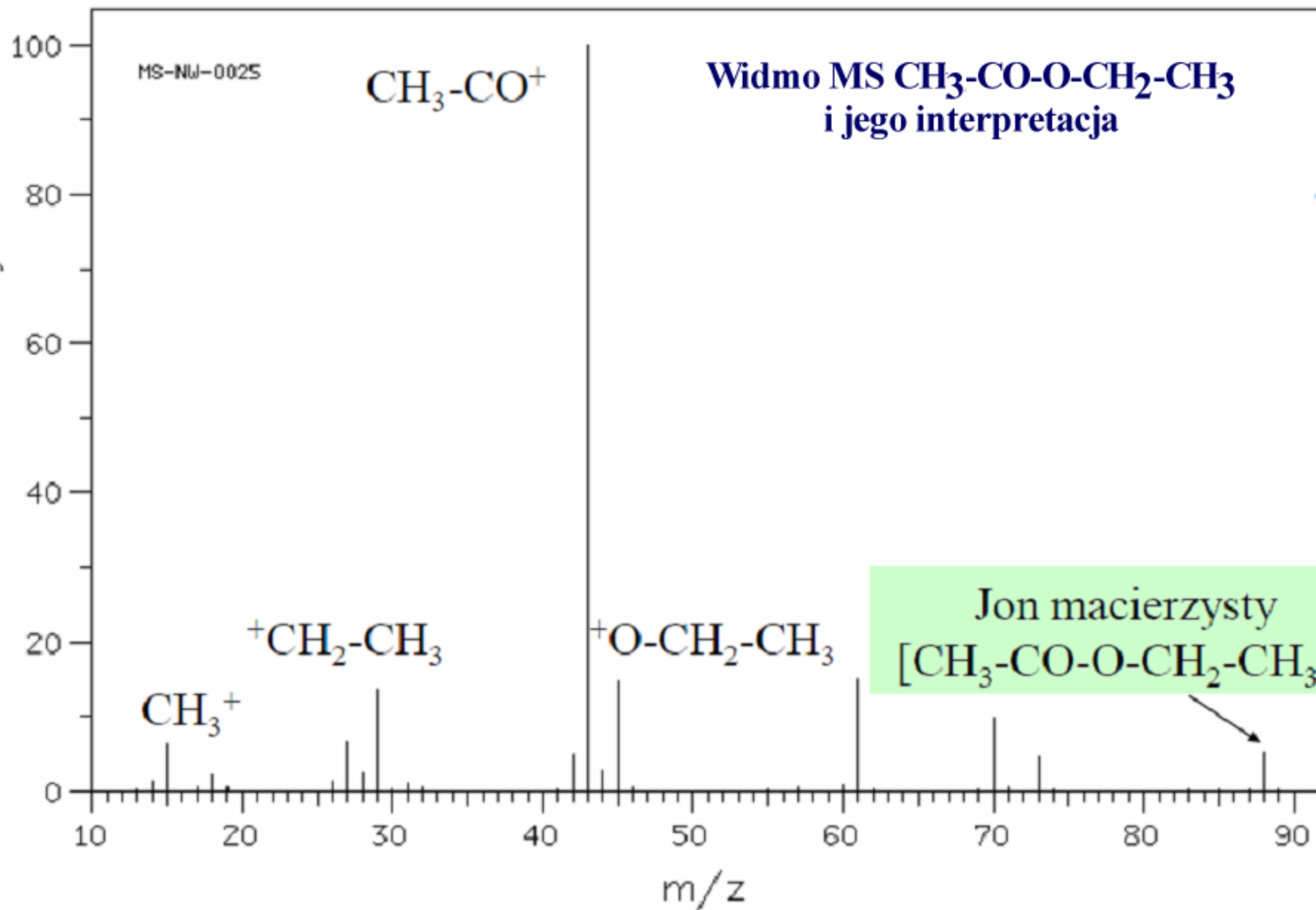
Reszta TMS = 73

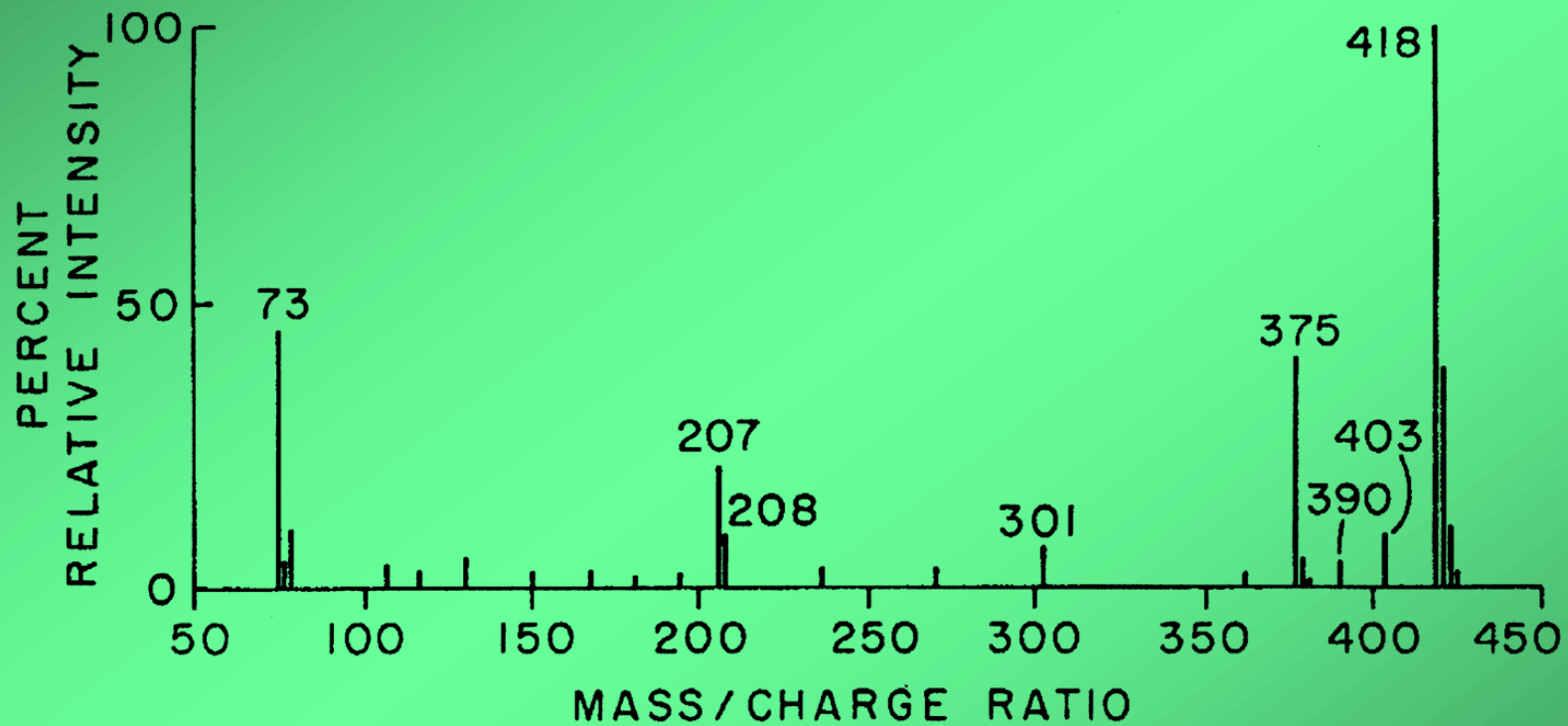
Masa cz. H = 1

IAA + TMS + Me - 2H = 261

IAA + Me - H = 189

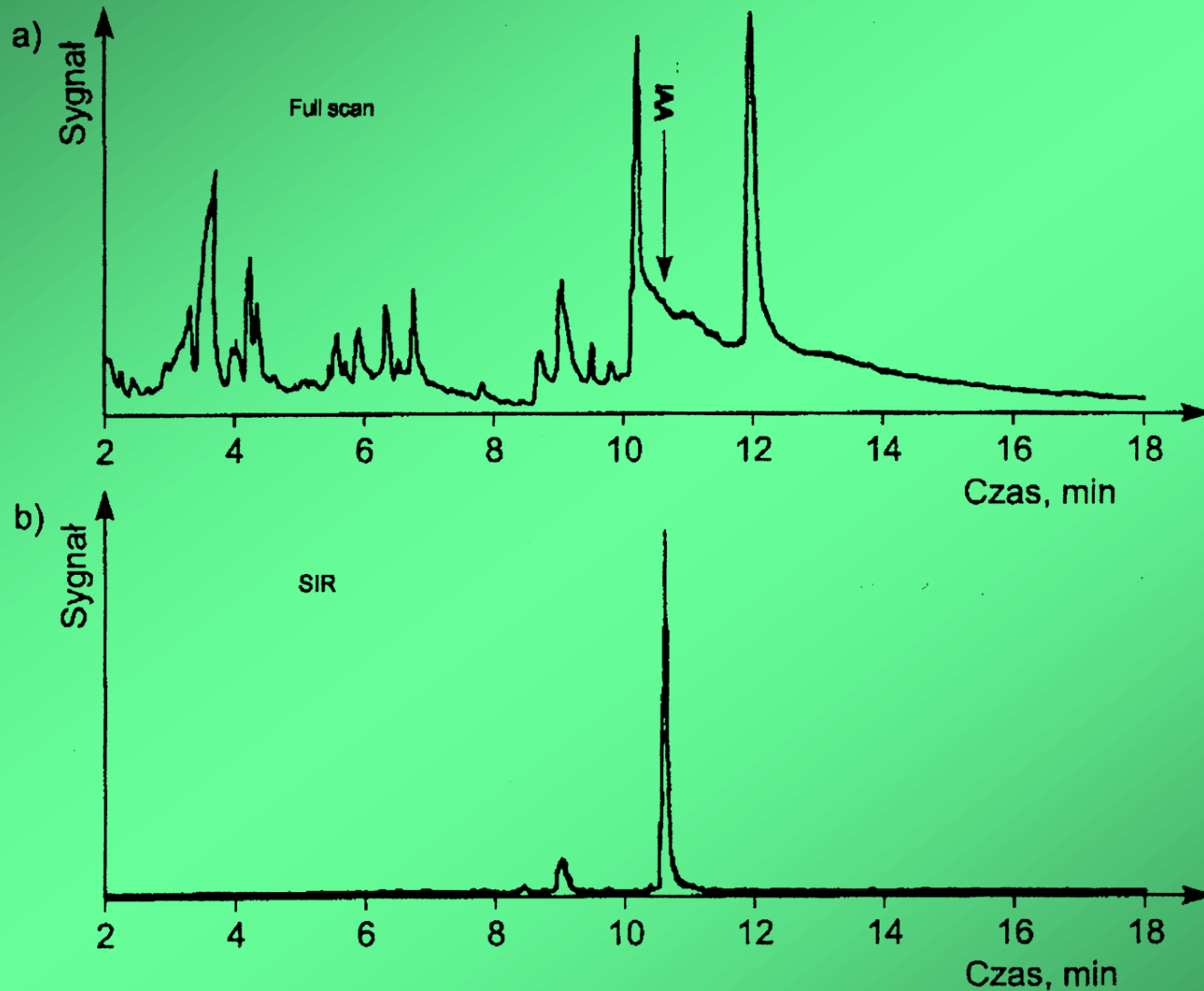
Relative Intensity





Widmo masowe metylo-sililowej pochodnej GA20

Dodatkowe zalety detektora ze spektrometrem mas



Oznaczanie IAA w próbce ekstraktu z pożywki pochodzącej bakterii wykonane techniką MS-Full scan i MS-SIR

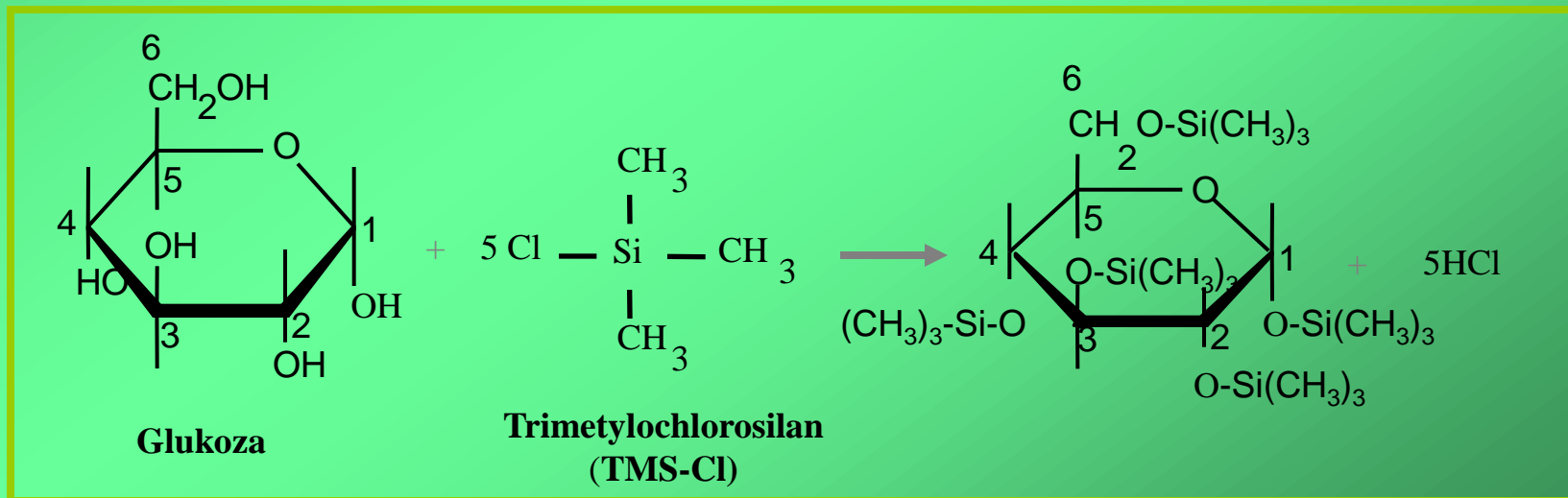
Wytwarzanie lotnych pochodnych (derywatywacja)

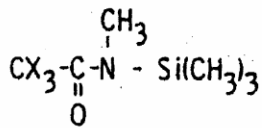
Wytwarzanie lotnych pochodnych związków organicznych

Aby możliwa była analiza GC substancji organicznych należy przeprowadzić je w stan gazowy. Jednakże ogromna większość z tych substancji to ciała stałe o wysokiej temperaturze wrzenia. Nielotność tych substancji wywołana jest złożonością budowy (wysoka masa cząsteczkowa) i w dużej mierze obecnością w cząsteczkach polarnych grup funkcyjnych: $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}_2$, $-\text{OH}$. Zablokowanie tych grup wydatnie obniża temperaturę wrzenia i zwiększa trwałość związków organicznych.

Metody blokowania grup funkcyjnych:

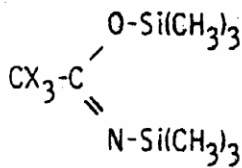
- pochodne TMS (sililowe)





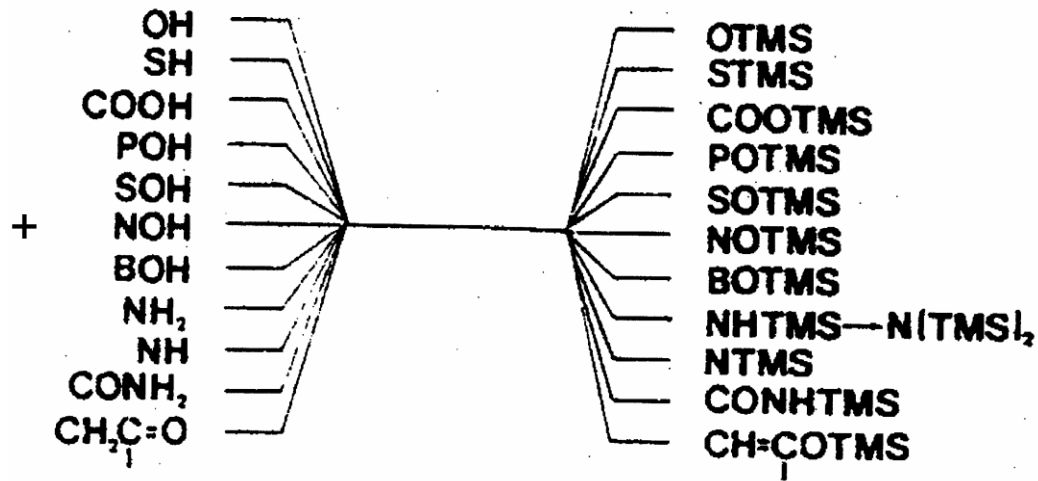
X = H, N-methyl-N-(trimethylsilyl)acetamide (MSTA)

X = F, N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA)



X = H, N,O-bis-(trimethylsilyl)acetamide (BSA)

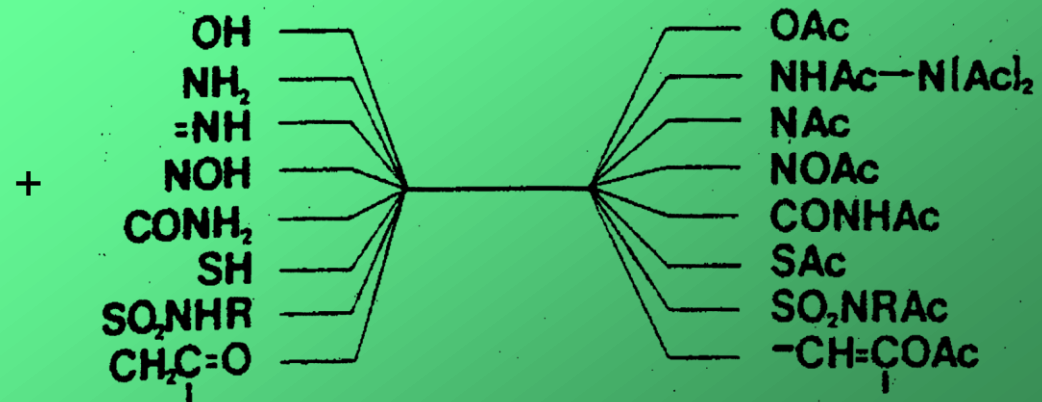
X = F, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA)



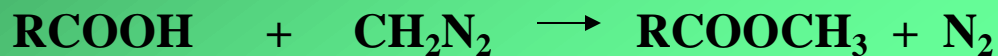
- uzyskiwanie pochodnych sililowych

- uzyskiwanie pochodnych acetylowych (acylowych)

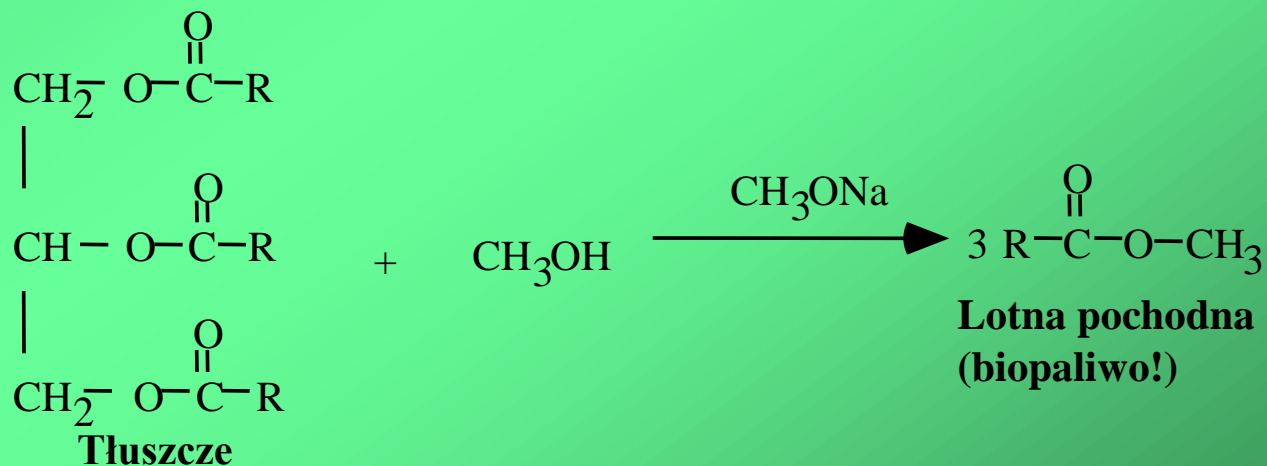
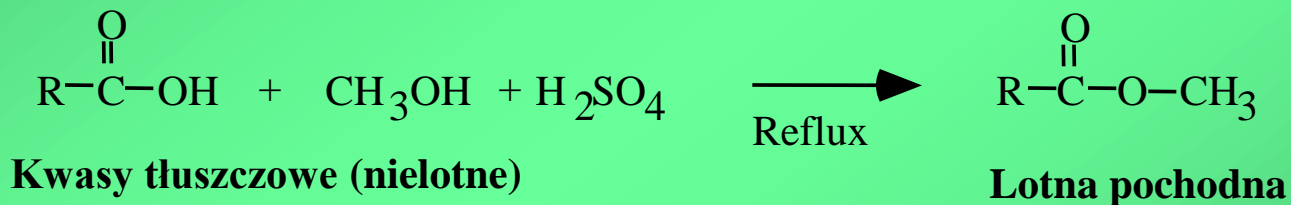
Bezwodnik kwasu
octowego



- pochodne (estry) alkilowe



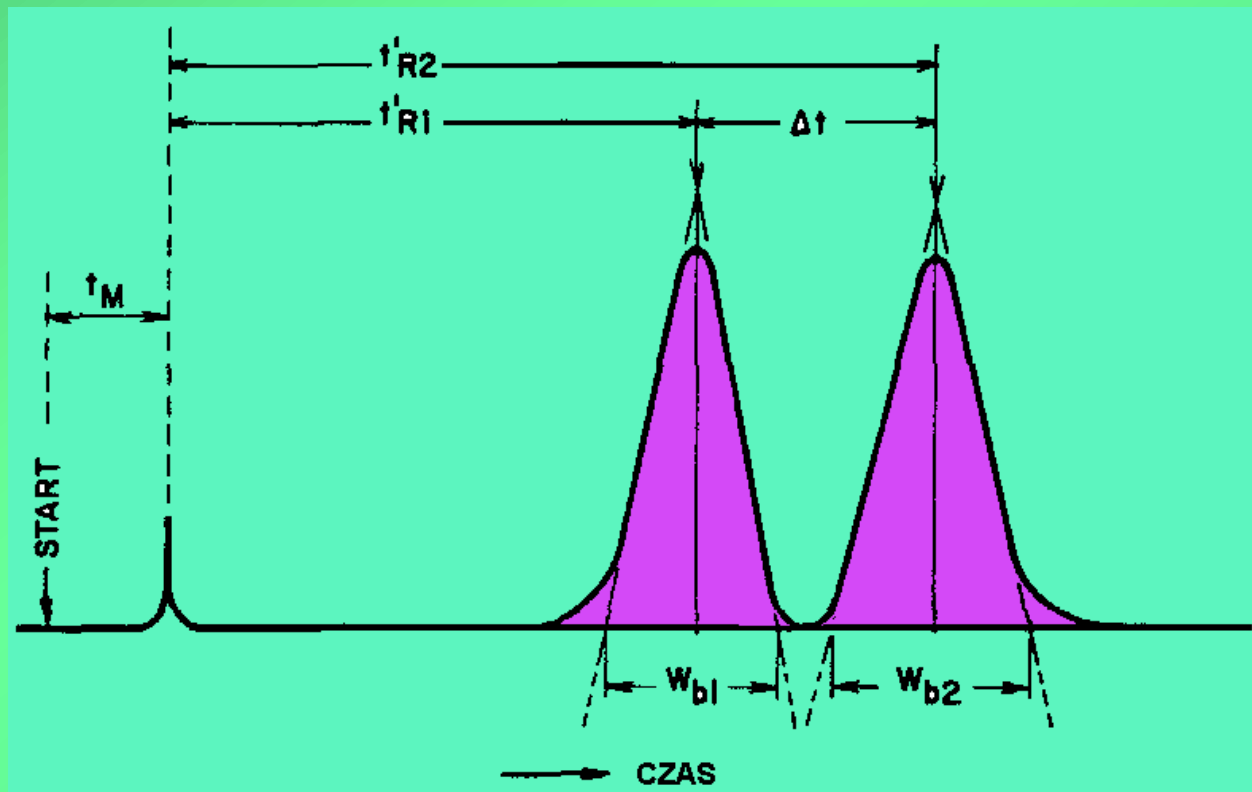
reakcja z diazometanem



Analizy jakościowa i ilościowa w GC i HPLC

Podstawy analizy jakościowej i ilościowej w GC i HPLC

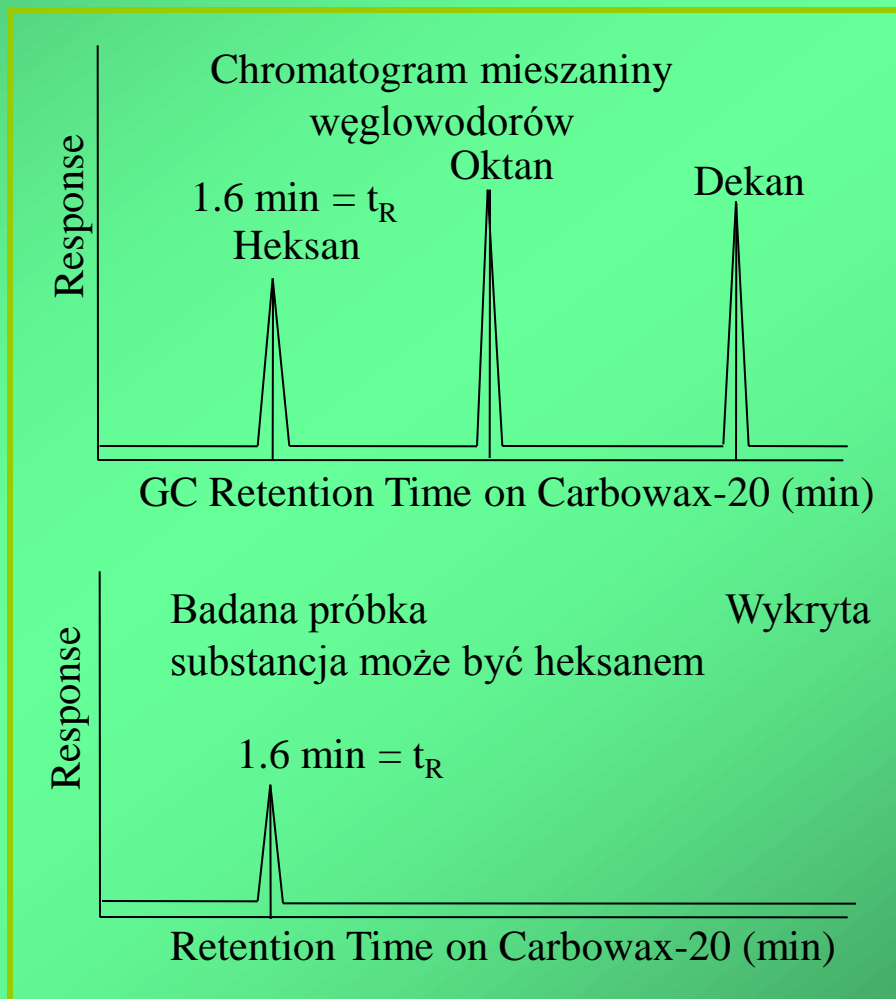
Czas, w którym substancja przechodzi przez kolumnę nazywany jest czasem retencji (t_R). Czas retencji przypisany jest pikowi odpowiadającemu danej substancji. Jest to więc podstawowy parametr identyfikujący substancję w analizie GC i HPLC.



Podstawy analizy jakościowej i ilościowej w GC i HPLC

Analiza jakościowa

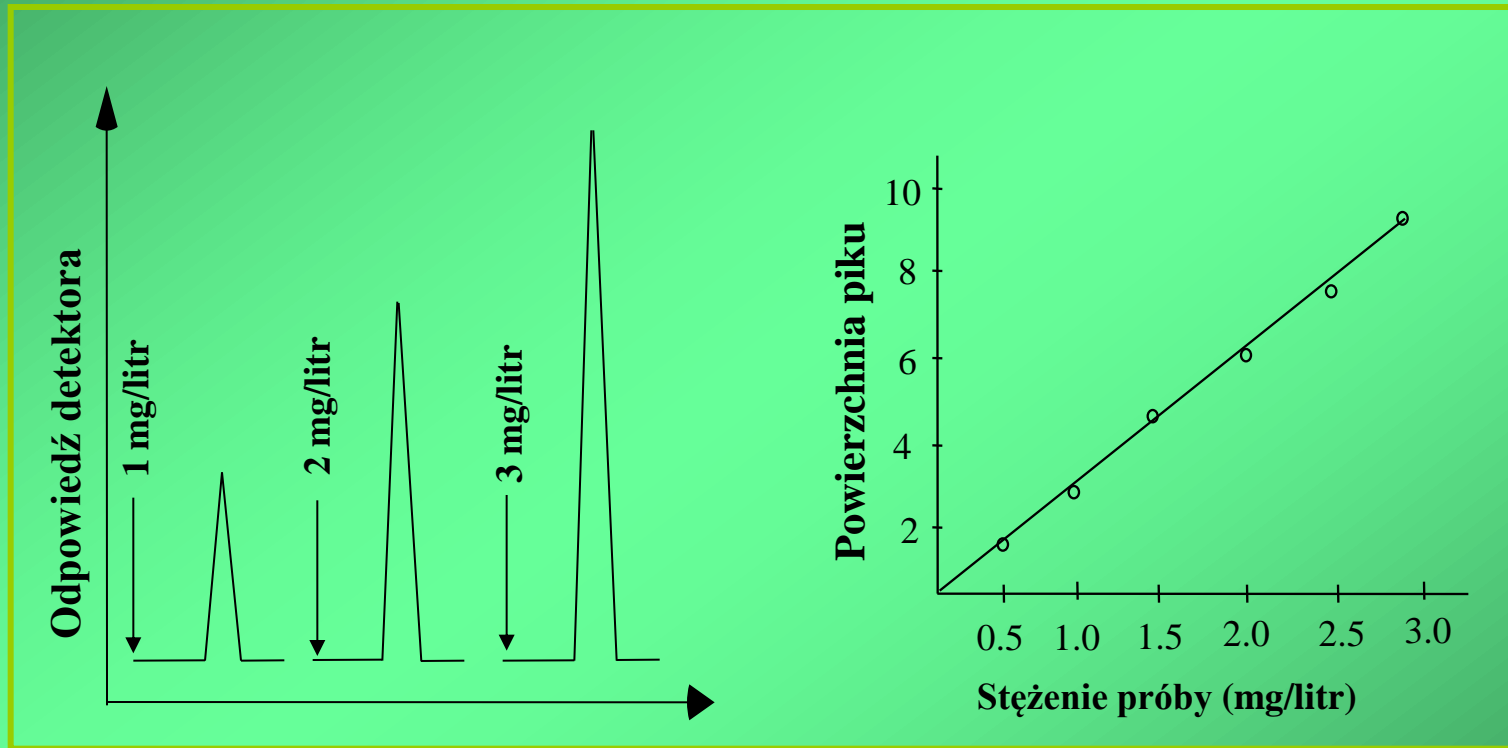
Identyfikacja substancji na podstawie czasu retencji



Podstawy analizy jakościowej i ilościowej w GC i HPLC

Analiza ilościowa

- wyznaczanie stężenia substancji na podstawie krzywej wzorcowej

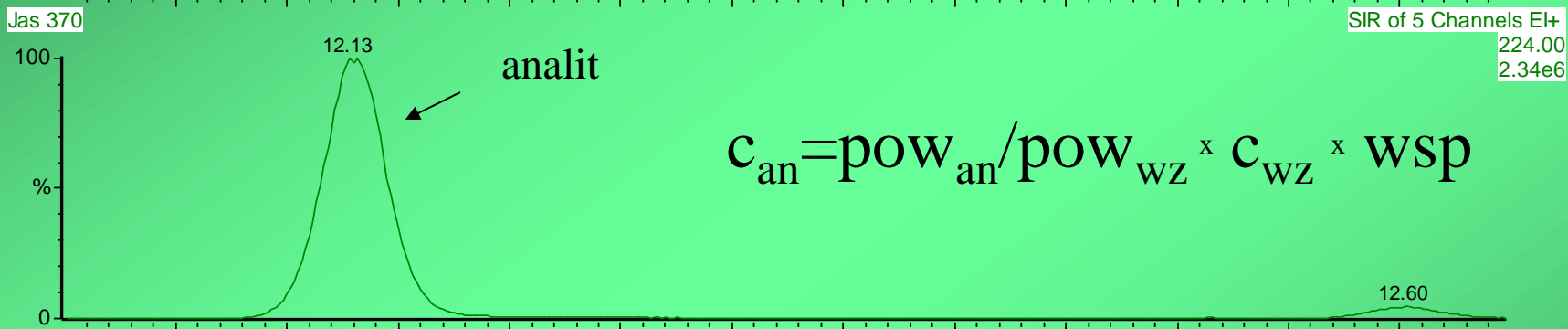
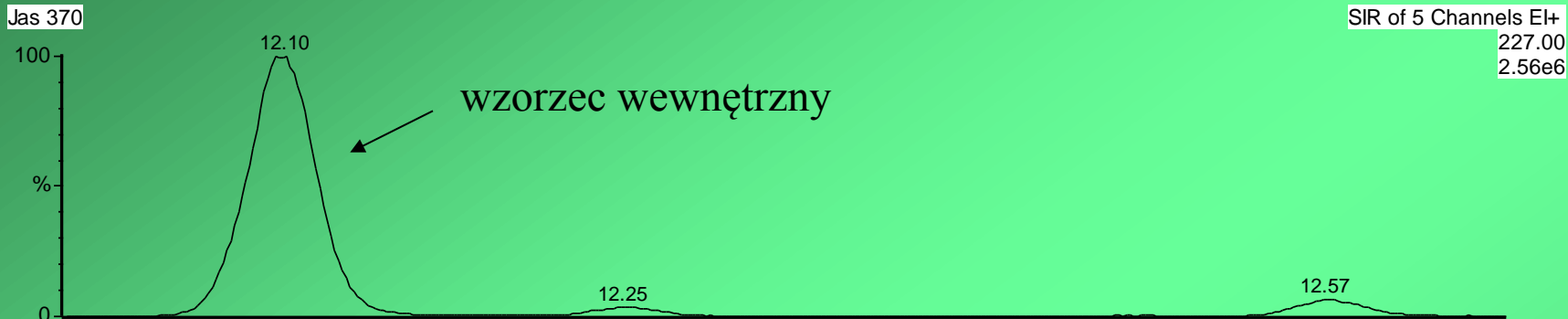


- Wyznaczanie stężenia substancji na podstawie wzorca wewnętrznego
- Wyznaczanie stężenia substancji na podstawie znakowanego wzorca wewnętrznego (w GC-MS)

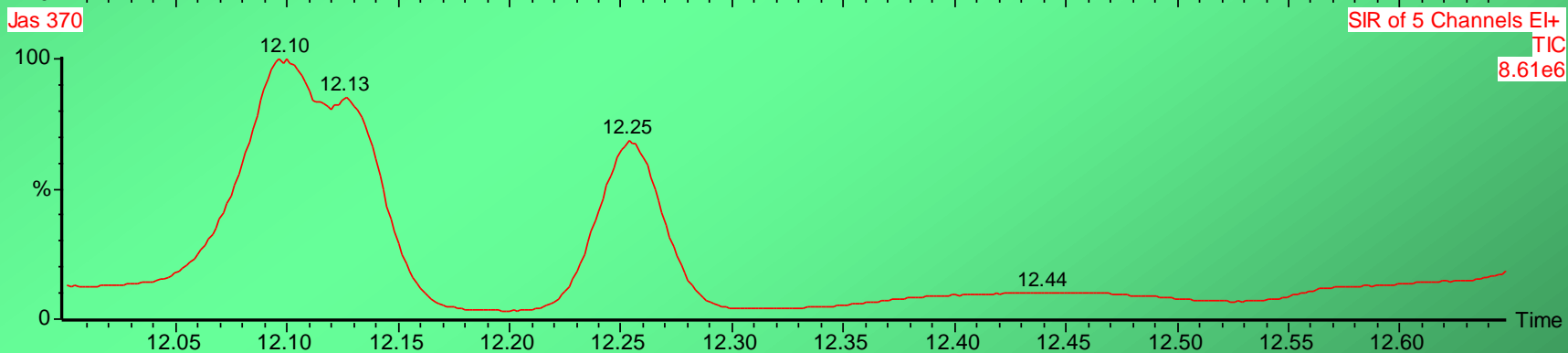
Technika rozcieńczenia izotopowego w GC-MS

- Specyficzna odmiana techniki dodatku wzorca. Specyficzność ta polega na tym, iż w tym przypadku dodawaną substancją jest znana ilość związku, który różni się od analitu jedynie składem izotopowym
- W trakcie analizy ilościowej wyznaczane są stosunki sygnałów dla odpowiednich jonów masowych (co najmniej dwóch) uzyskanych w trakcie analizy próbki rzeczywistej, próbki wzorca oraz próbki rzeczywistej z dodatkiem wzorca
- Do określenia zawartości analitu w badanej próbce potrzebna jest jedynie znajomość ilości izotopowo znaczonego analitu dodanego do próbki

Metoda rozcieńczenia izotopowego



$$C_{an} = \text{pow}_{an} / \text{pow}_{wz} \times C_{wz} \times \text{wsp}$$



Chromatogram JA-Me, d3-JA-Me, H2JA-Me z użyciem techniki SIM. A – analiza jonu o m/z 227 Th; B – analiza jonu o m/z 224 Th; C – analiza sumy jonów o m/z 151,153,224,226 i 227 Th.

Metoda rozcieńczenia izotopowego

1 ng d3JM 1ul (550 V, rep 6)

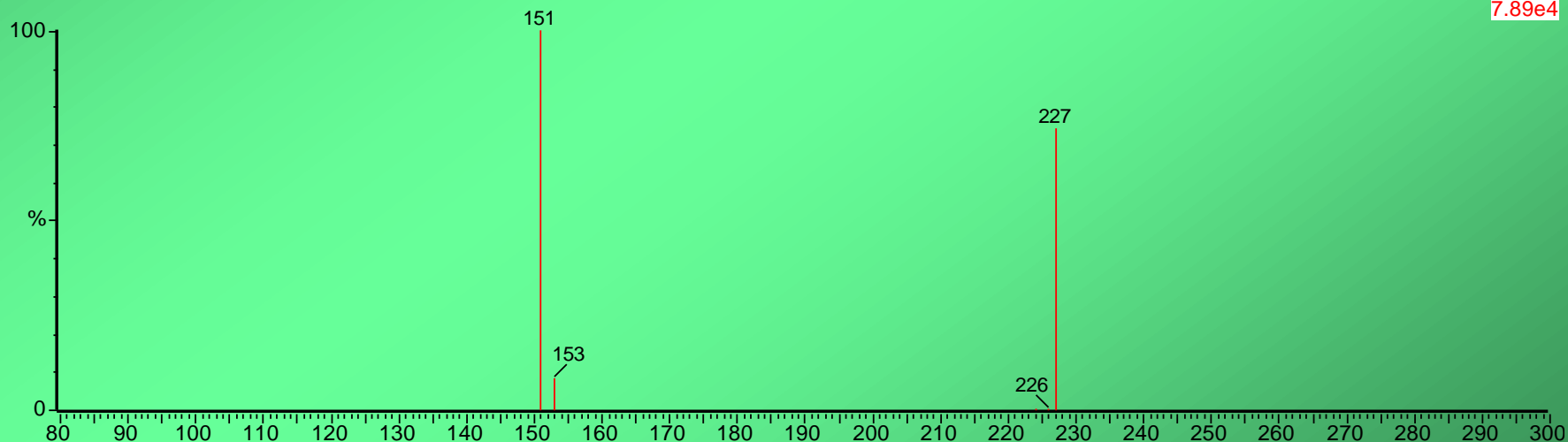
Jas 179 761 (11.271) Cm (758:764-(664:699+883:922))

SIR of 5 Channels EI+
6.11e5



Jas 181 734 (11.226) Cm (729:737-(626:646+801:864))

SIR of 5 Channels EI+
7.89e4

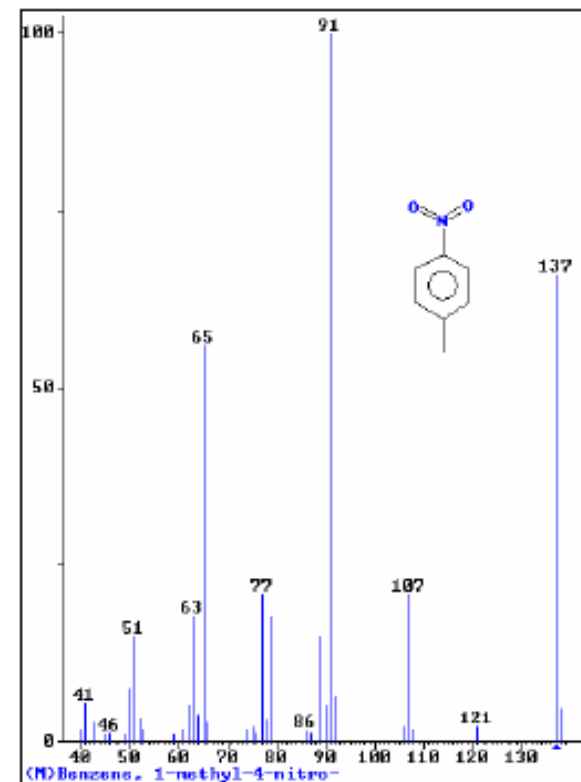
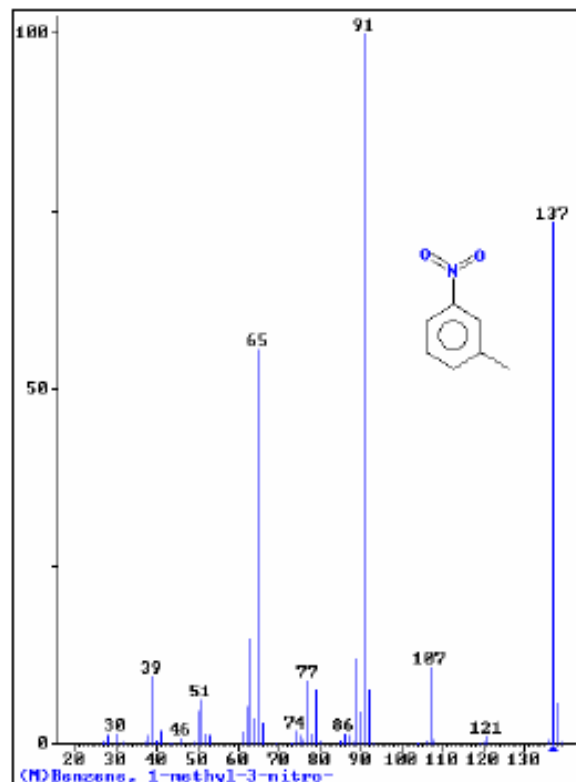
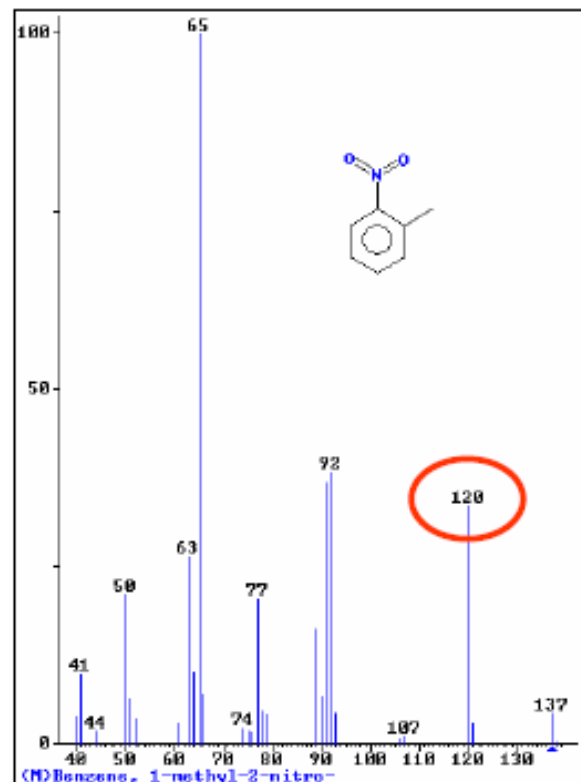
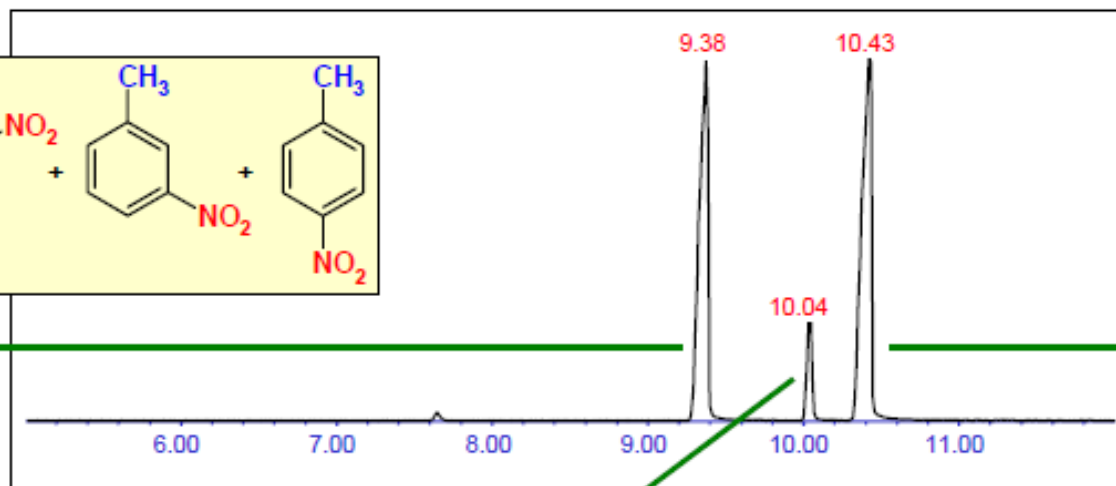
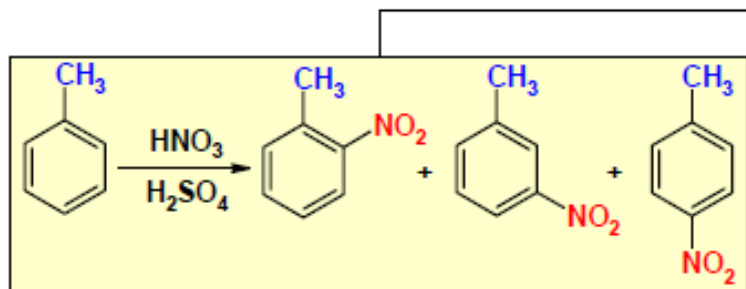


Porównanie intensywności wybranych jonów (m/z 151, 153, 224, 226, 227) estru metylowego kwasu jasmonowego (JA-Me) (A) oraz standardu wewnętrznego d3JA-Me (B)

Zastosowania techniki GC/MS

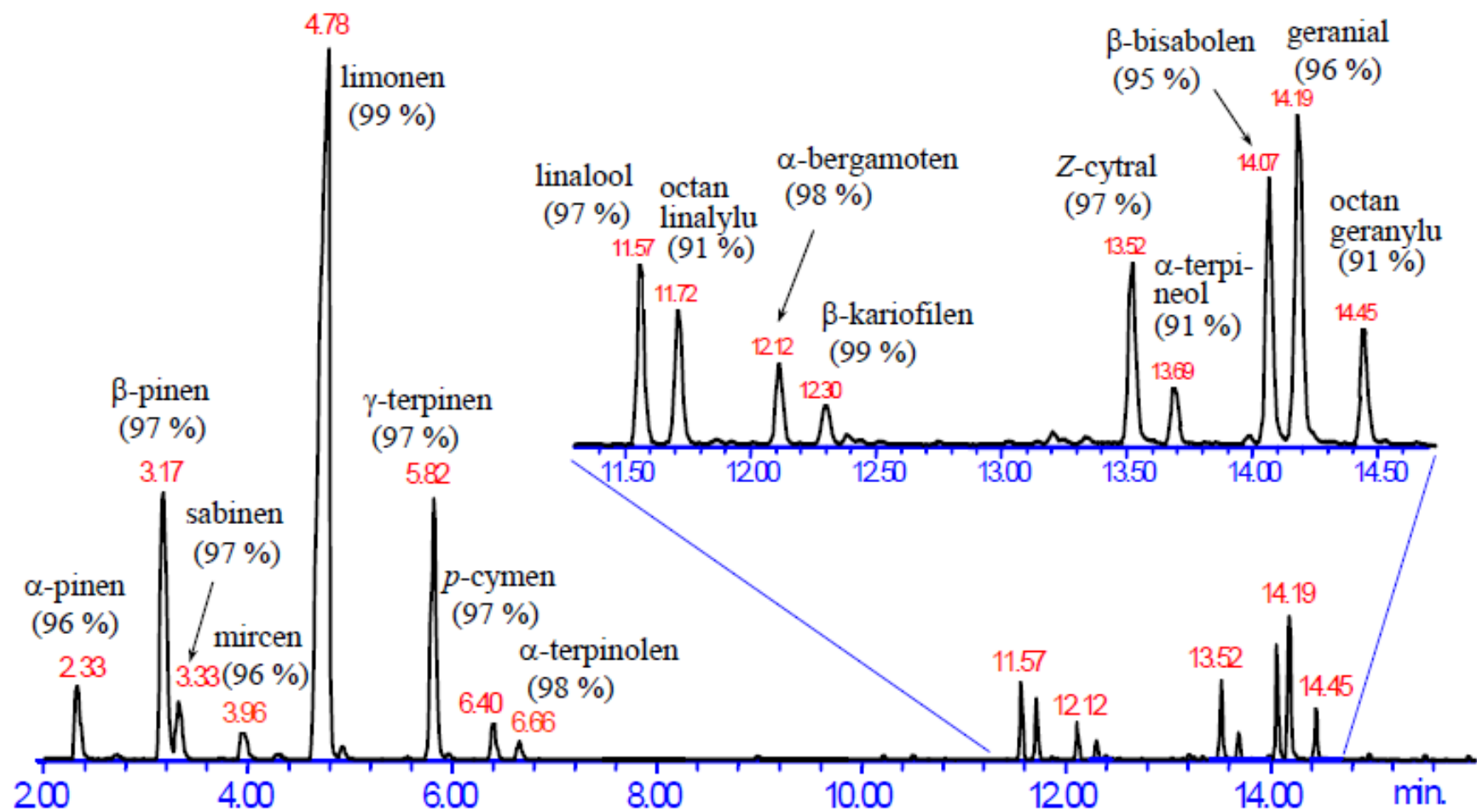
- Analiza składu mieszanin poreakcyjnych
- Analiza produktów naturalnych (np. olejki zapachowe)
- Badania reakcji chemicznych w fazie gazowej
- Identyfikacja zanieczyszczeń w lekach, kosmetykach, artykułach pożywczych itp.
- Analizy antydopingowe
- Analizy kryminalistyczne (np. identyfikacja producentów narkotyków)
- Analizy zanieczyszczeń środowiska

Analiza mieszaniny nitrotoluenów



Chromatogram GC/MS olejku cytrynowego.

Składniki zidentyfikowano na podstawie biblioteki widm Wiley'a



Typowy schemat przygotowania próbki do analizy GC i LC

