

Trendy v moderní HPLC

Josef Cvačka, 5.1.2011

CHROMATOGRRAFIE NA ČIPECH

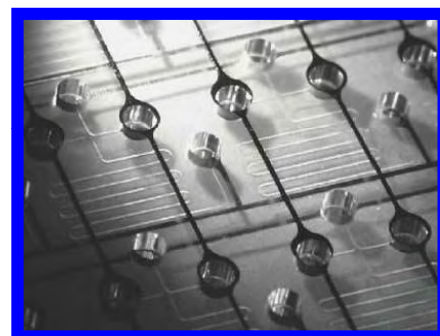
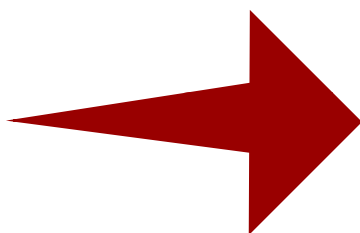
Miniaturování separačních systémů

Mikrofluidní čipy

Mikrofabrikace

Chromatografické mikrofluidní čipy s MS detekcí

Praktické využití čipové technologie



Miniaturizace separačních systémů

Proč miniaturizace ?

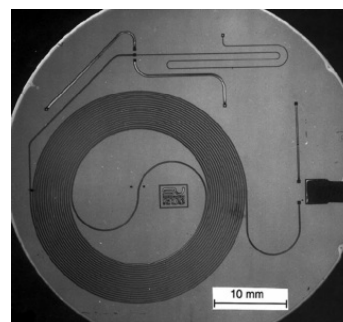
snížení objemu vzorku – velmi důležité např. u klinických vzorků (mozkomíšni mok, časté odběry u diabetiků apod.)

zkrácení doby analýzy – velmi rychlá diagnostika, větší množství analýz za časovou jednotku

další důvody: zmenšení instrumentace, snížení spotřeby činidel, rozpouštědel, snížení spotřeby elektrické energie, výroba přenosných přístrojů, finanční důvody

Laboratoř na čipu (lab on a chip)

zařízení, která integrují různé analytické procesy na jediném čipu o rozměrech několika mm² až cm². Čipy obsahují mikrofluidní kanály, směšovače, ventily, pumpy, dávkovací zařízení a pod. Jedním z prvních zařízení byl plynový chromatograf (Terry, 1975).

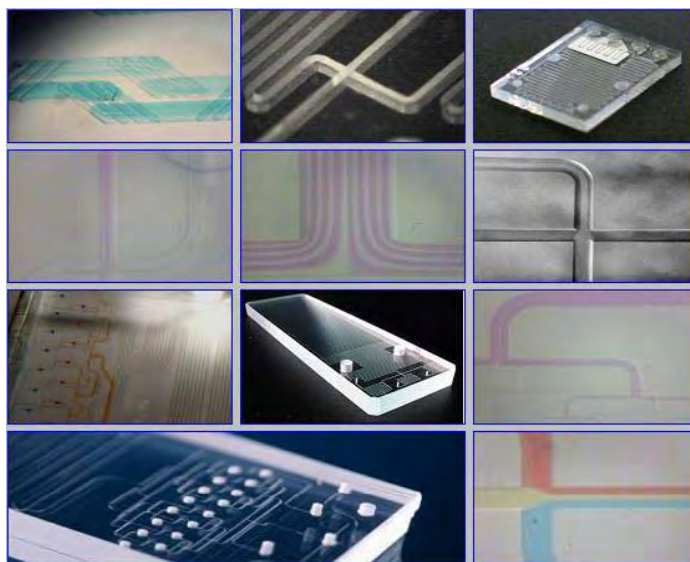


3

Mikrofluidní čipy

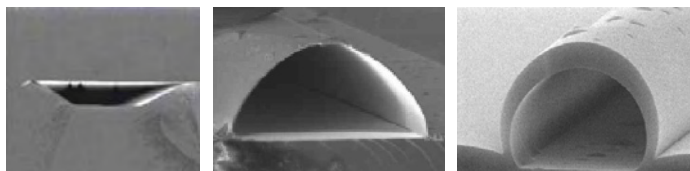
Mikrofluidika – věda, která se zabývá chováním a možnostmi manipulace mikrolitrových objemů vzorku. Vznikla před cca 20 lety s vývojem inkoustových tiskáren.

čerpání kapaliny → externím čerpadlem nebo tlakem plynu
 → elektrokineticky (elektroosmóza)



rozměry kanálků – průměr – mikrometry, délka - centimetry

materiály – sklo, plasty, křemík, diamant apod.

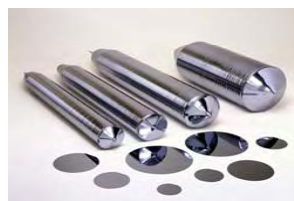


různé tvary mikrofluidních kanálů, průměr ~ 5 um

4

Mikrofabrikace

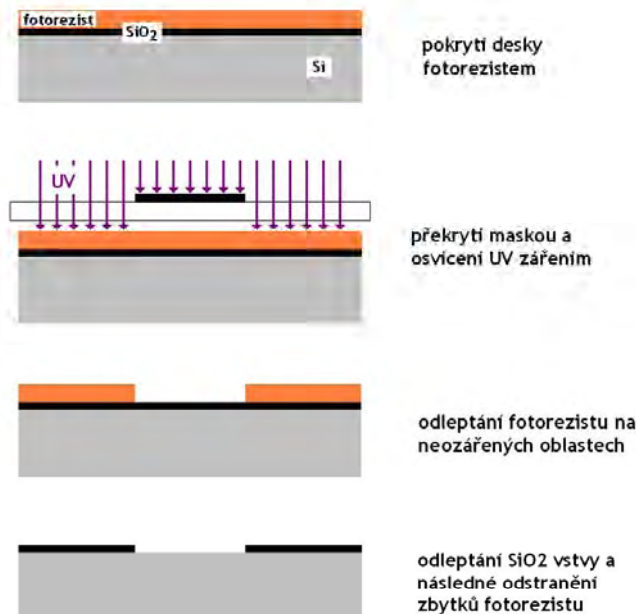
Mikrofabrikace – výroba struktur s rozměry v řádech mikrometrů. technologiemi převzatými z počítačového průmyslu



Fotolitografie: technika přenosu vzoru na povrch substrátu, nejčastěji křemík (možno i na sklo, kov atd)

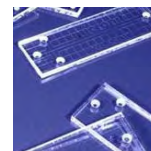
Křemíková deska pokrytá vrstvou oxidu křemičitého se ovrství tzv. fotorezistem. Ten se působením UV světla vytvrdí. Následnými chemickými procesy se postupně odmyje nevytvrzený fotorezist, odleptá se vrstva SiO_2 v přístupných oblastech (HF), a odstraní se zbytky fotorezistu (H_2SO_4)

FOTOLITOGRAFIE



5

Mikrofabrikace



Struktury na Si desce se mohou použít jako vzor pro otisk do plastu a výrobu mnoha replik. Lze použít lisování za tepla, případně přímou polymeraci na desce.



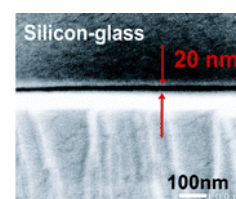
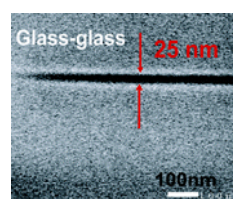
Uzavření kanálků

- spojení Si desky s vyleptanými nebo přenesenými strukturami s planární deskou

planární deska – sklo, polymer apod.

sklo-sklo nebo sklo-křemík lze spojit postupem zvaným "anodic bonding"

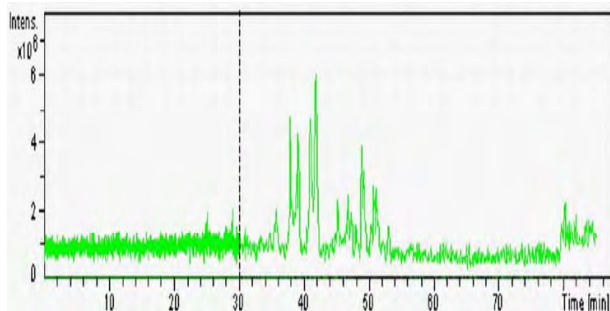
"SLEPENÍ ČIPU"



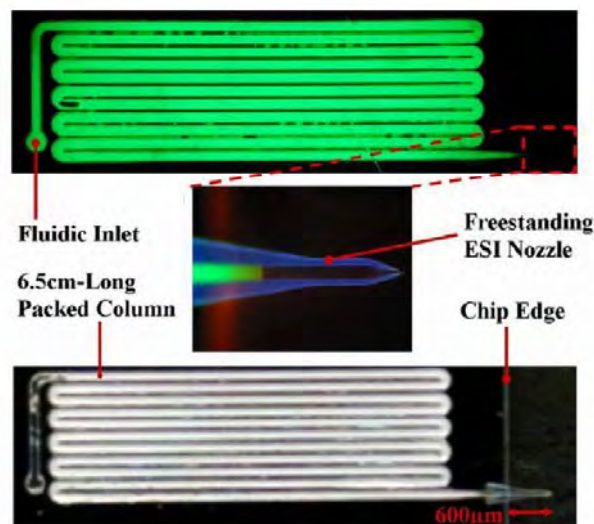
6

Chromatografické mikrofluidní čipy s MS detekcí

Separční kanál může být plněn sorbentem, případně monolitem. Mobilní fáze je čerpána externí pumpou (tlakem). Je možno využít i elektrokinetické čerpání fáze -> elektrochromatografické čipy.



Chromatogram tryptického digestu cytochromu C separovaného na čipu s on-line MS detekcí.

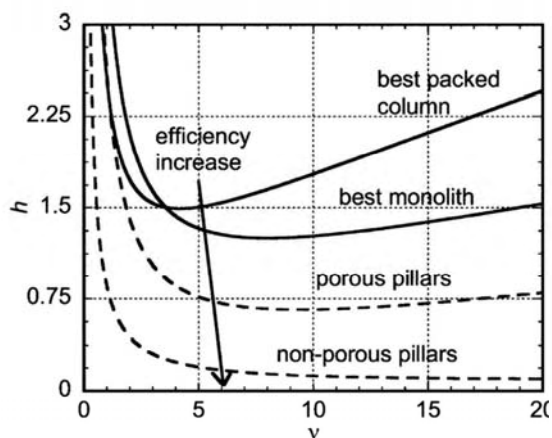


LC-ESI/MS čip s integrovanou HPLC kolonou, fritou a nanoESI sprejovací tryskou. Kolona – 65 x 0.1 x 0.025 mm, plněná 5 µm C18.

<http://research.cens.ucla.edu/>

7

Chromatografické mikrofluidní čipy s MS detekcí



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

příspěvek vířivé difúze, souvisí s uniformitou kanálků ve stac. fázi

Simulace Van Deemterovy rovnice pro různé geometrie stacionární fáze v koloně. Nejnižší výškový ekvivalent se dosáhne pro pravidelné struktury dosažitelné mikrofabrikací, např. sloupky.

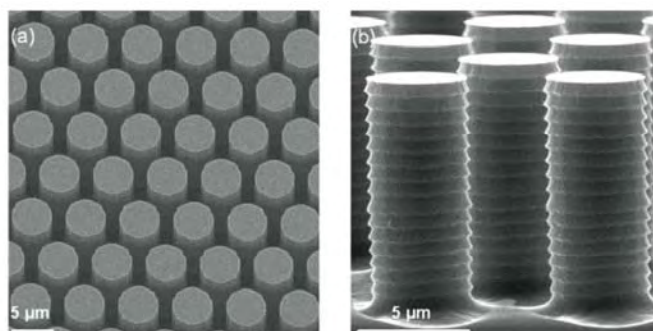


Fig. 2. (a) SEM image of the micromachined pillar array used by Eghbali *et al.* for on-chip reversed-phase LC; (b) SEM image of individual pillars with indentations caused by the Bosch[®] dry etching process. Image reproduced from ref. 18 with permission.

8

Praktické využití čipové technologie

Čip = mikrofabrikovaná chromatografická kolona

Kanály plněné 3- μm částicemi C18; mikrofabrikované struktury (hráze) na konci kanálů mají minimální mrtvý objem (13 μL)

Výhody: jednoduchá obsluha, minimální mrtvé objemy

Využití: analýza peptidů



cHiPLC column



eksigent



Dokovací stanice pro 3 čipy.

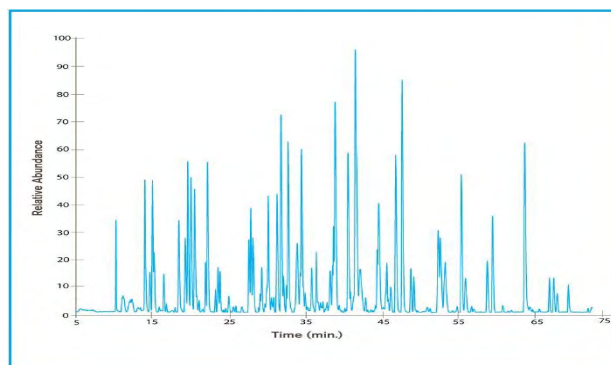


Figure 4. Separation of a BSA digest on a nano cHiPLC column of 15 cm x 75 μm , packed with ChromXP C18-CL 3 μm 300Å. Flowrate is 250 nL/min; gradient slope 0.5% Acetonitrile/min.

9

Praktické využití čipové technologie

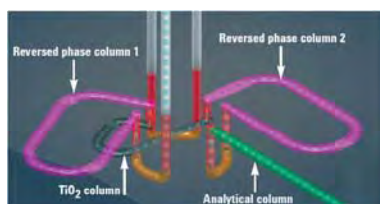
Čip = mikrofabrikovaná chromatografická kolona, spojovací kapilára a nanoelektrosprejer

Čipy různých provedení pro danou aplikaci; čipy na zakázku

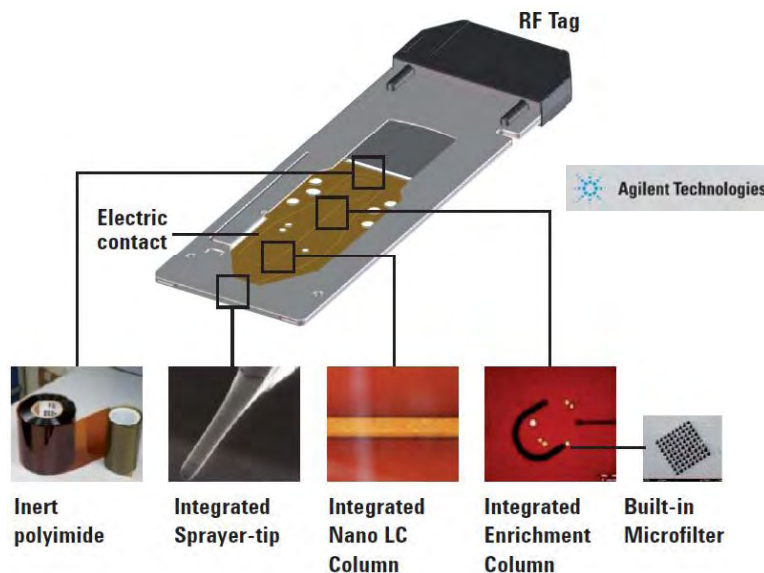
Aplikace:

Analýza peptidů a fosfopeptidů

Analýza malých molekul



The HPLC-Chip seamlessly integrates the sample enrichment and analytical columns with the intricate connections and spray tip directly on the polyimide chip.



10

APLIKACE HILIC CHROMATOGRRAFIE



HILIC

Aplikační oblast HILIC

Retenční pořadí v HILIC

HILIC aplikace

11

HILIC - Hydrophilic Interaction Chromatography

HILIC je druh chromatografie s normálními fázemi, využívající mobilní fáze mísitelné s vodou (aqueous normal phase chromatography)

Stacionární fáze je **polární** (silikagel, kyano, amino, diol, polární polymerní fáze)

Mobilní fáze obsahuje vysoké procento organické složky, typicky ACN (> 80%) a malé množství vody nebo roztoku pufru. Voda je silným, elučním solventem.

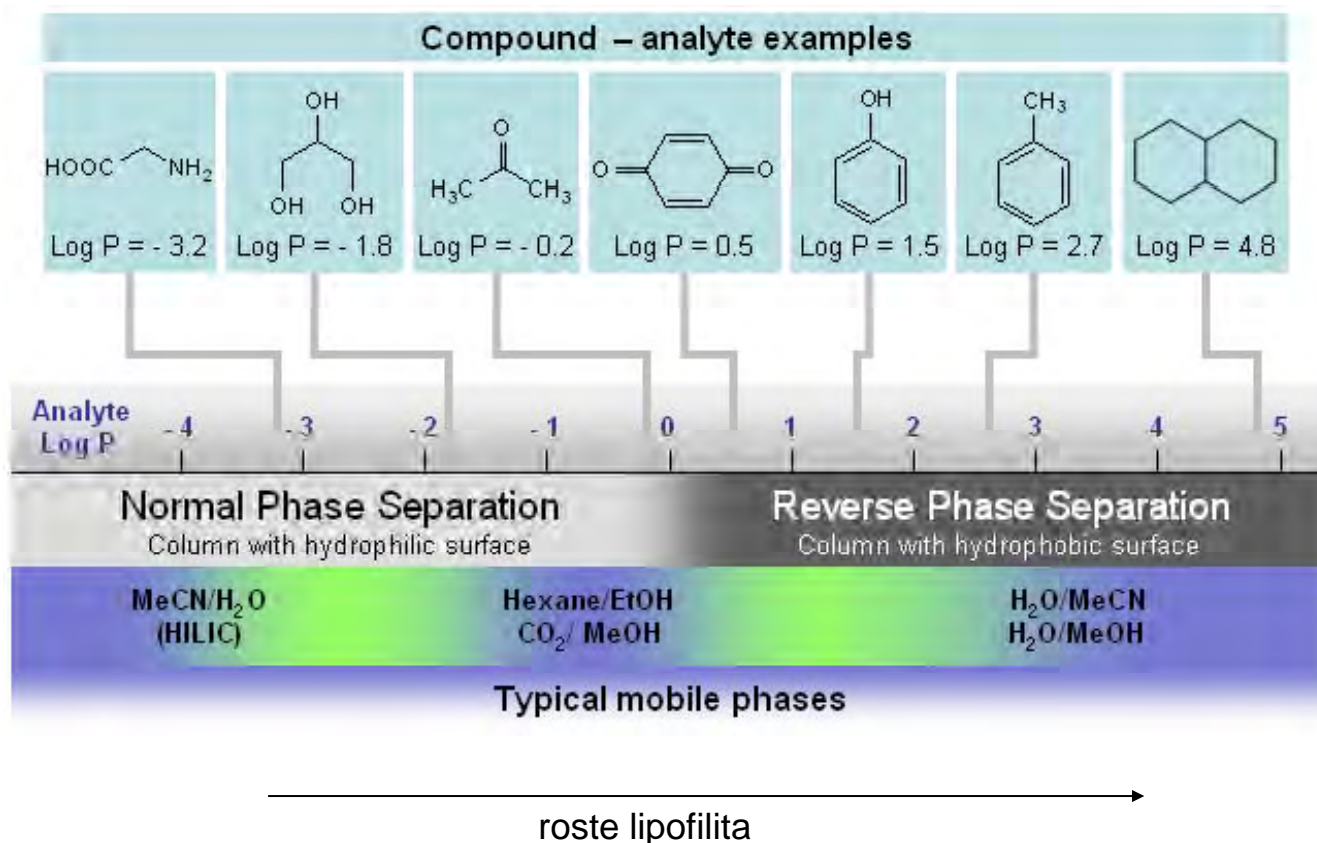


Na povrchu polární stacionární fáze se adsorbuje vrstva bohatá na vodu. Analyt se rozdělí (LL extrakce) mezi vodnou vrstvu na povrchu stacionární fáze a mobilní fázi s nízkým obsahem vody. Polárnější sloučeniny mají vyšší afinitu ke stacionární fázi.

Látky se separují na základě polarity.

12

Aplikační oblast HILIC



13

Retenční pořadí v HILIC

Eluční pořadí v HILIC je opačné než u RPLC. Látky, které v RPLC eluují v mrtvém čase mají v HILIC vysokou retenci (a naopak). Sloučeniny obtížně separovatelné v RPLC – kyseliny, báze, organické ionty, cukry se snáze dělí v HILIC.

Aplikační oblast HILIC se pro některé sloučeniny překrývá s RPLC, NPLC a IC (Iontová chromatografie).

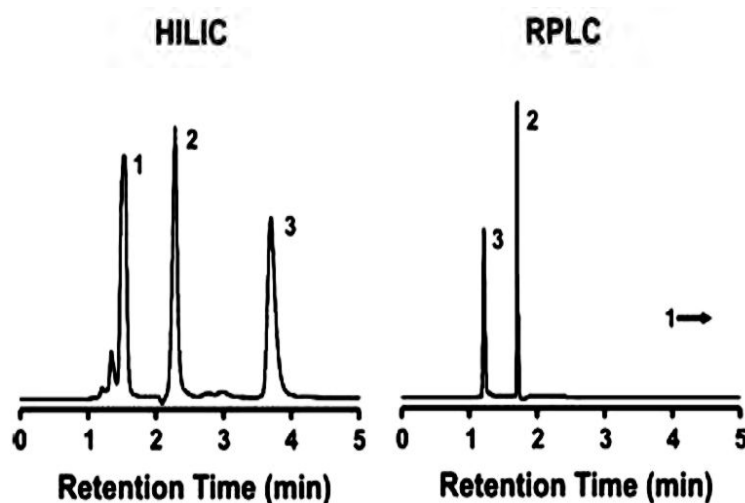
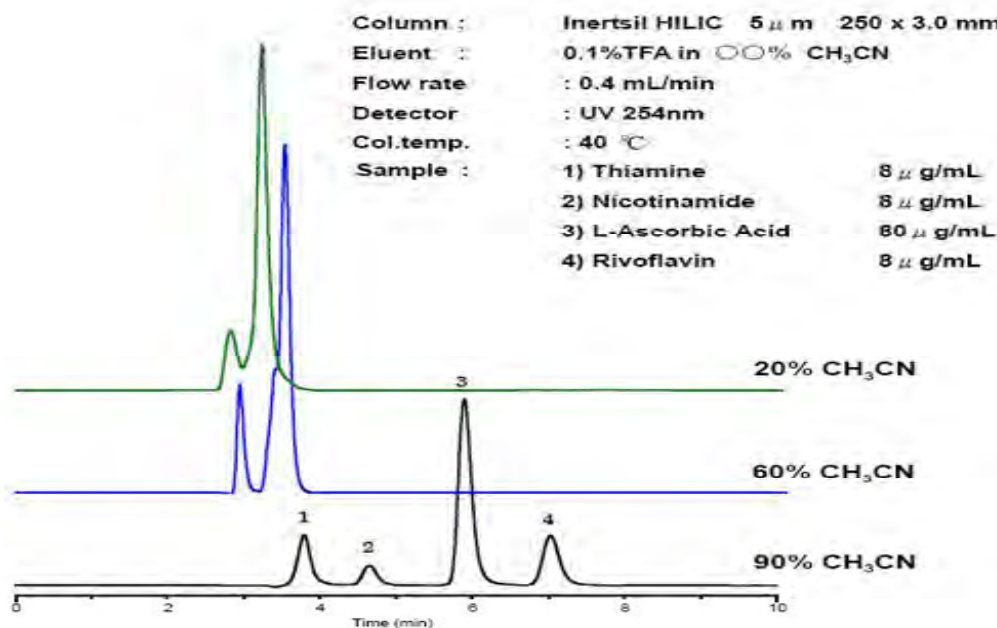


Figure 2: Separation of peptides under HILIC and RPLC conditions. Eluents; (HILIC) 60:40 acetonitrile / 10 mM ammonium acetate, pH 7, (RPLC) 5:95 acetonitrile / 10 mM ammonium acetate, pH 7. Legend; (1) Phe-Gly-Gly-Phe, (2) Leu-Gly-Gly, (3) Gly-Gly-Gly.

14

Retenční pořadí v HILIC

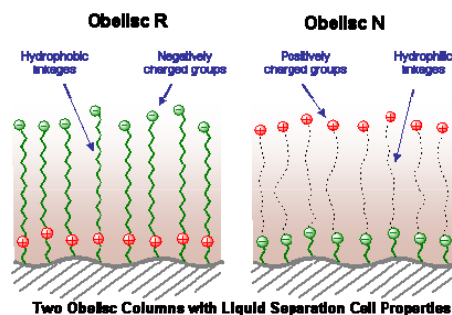
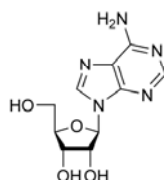
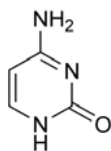
Retention behavior of HILIC mode



Voda je silným, elučním solventem. Vyšší množství organiky vede k prodloužení retenčních časů.

15

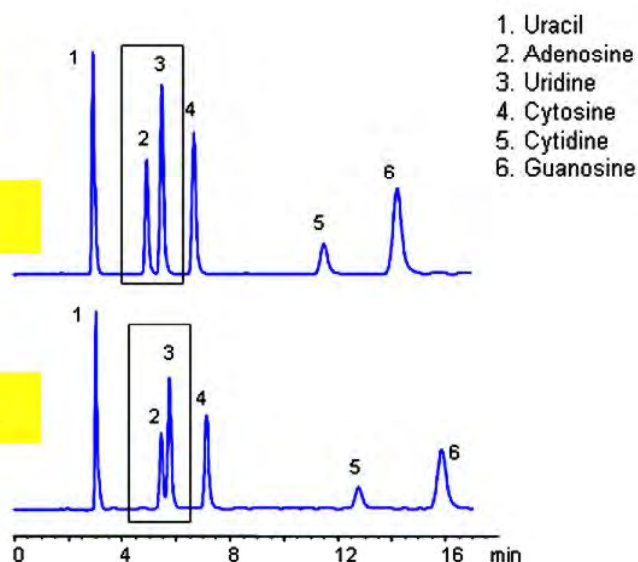
HILIC aplikace - nukleové báze



Column: Obelisc N
Size: 150 x 4.6 mm
Flow: 1.0 mL/min
Detection: UV 250 nm

Mobile phase: 90% MeCN,
 10mM AmAc pH 5.0

Mobile phase: 90% MeCN,
 10mM AmAc pH 4.0

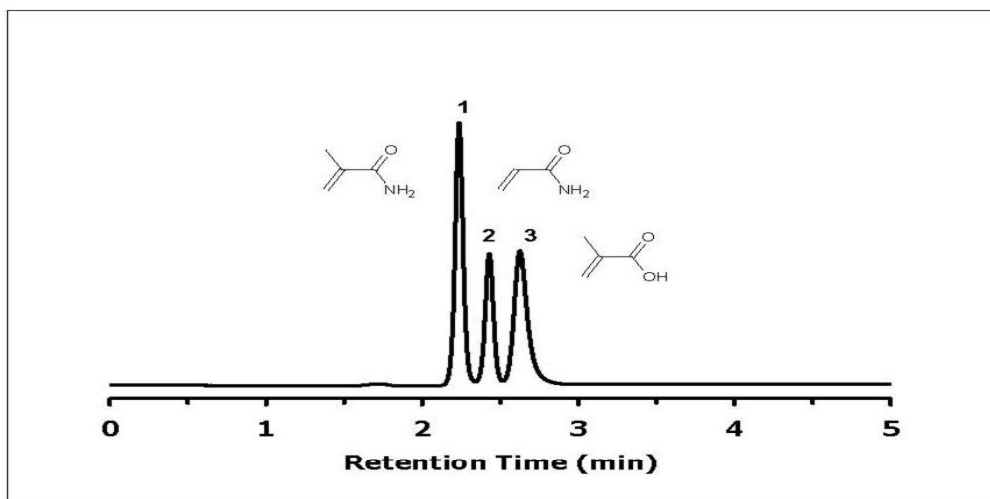


16

HILIC aplikace - methakrylamid, akrylamid, kyselina methakrylová

Chromatographic Conditions

Column: ZIC[®]-HILIC, PEEK 150 x 4.6 mm, 5 μ m, 200 Å (P/N 2712-155)
 Injection: 5.0 μ L
 Detection: UV @ 210 nm (UFS 1.0 V)
 Pressure Drop: 8.0 MPa
 Flow Rate: 1.0 mL/min
 Mobile Phase (v/v): 95%, Acetonitrile
 5%, Acetic Acid 50 mM

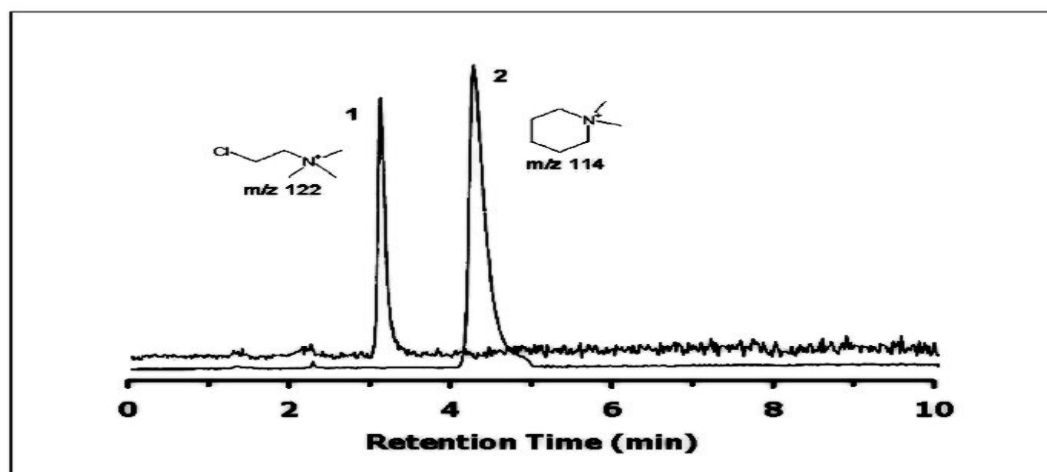


17

HILIC aplikace - Chlormequat a Mepiquat

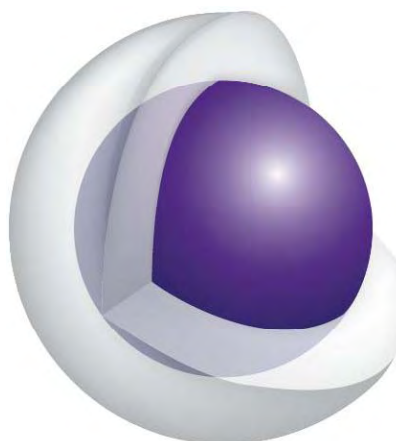
Chromatographic Conditions

Column: ZIC[®]-HILIC, PEEK 100 x 2.1 mm, 3.5 μ m, (P/N 2702-102)
 Injection: 20 μ L in mobile phase
 Detection: Electrospray-MS in positive mode (ESI+)
 Single ion monitoring (SIM) at m/z 114 and 122
 Flow Rate: 0.2 mL/min
 Mobile Phase (v/v): 80%, Acetonitrile
 20%, Ammonium Acetate 25 mM
 Temperature: Ambient



18

STACIONÁRNÍ FÁZE S PEVNÝM JÁDREM



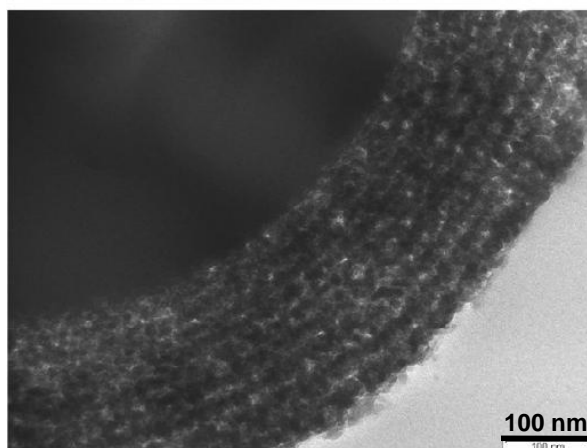
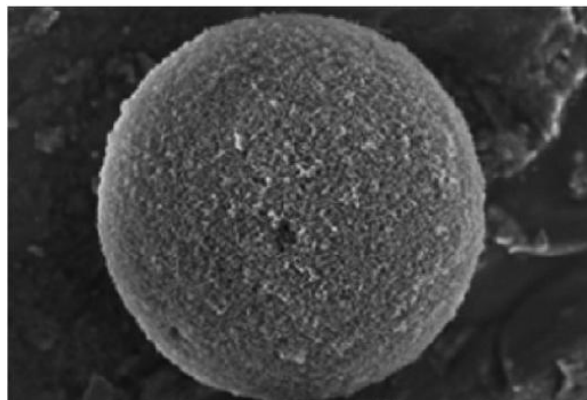
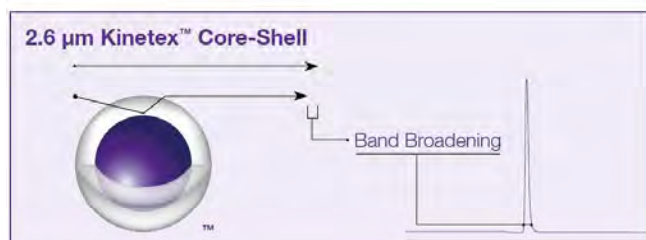
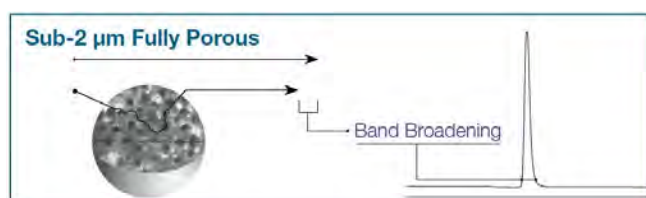
Vlastnosti stacionárních fází s pevným jádrem

19

Vlastnosti fáze KINETEX™

Pravidelné kulové částice (2 či 3 μm) tvořené pevným jádrem a porézním obalem (obojí silikagel)

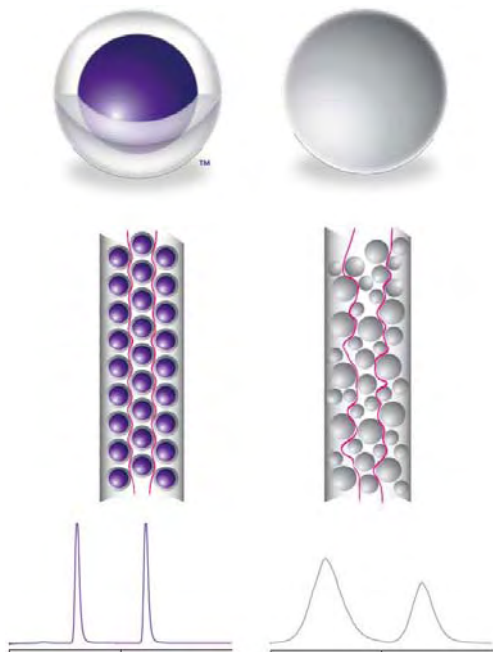
Vysoká účinnost díky rychlejšímu přenosu hmoty:



20

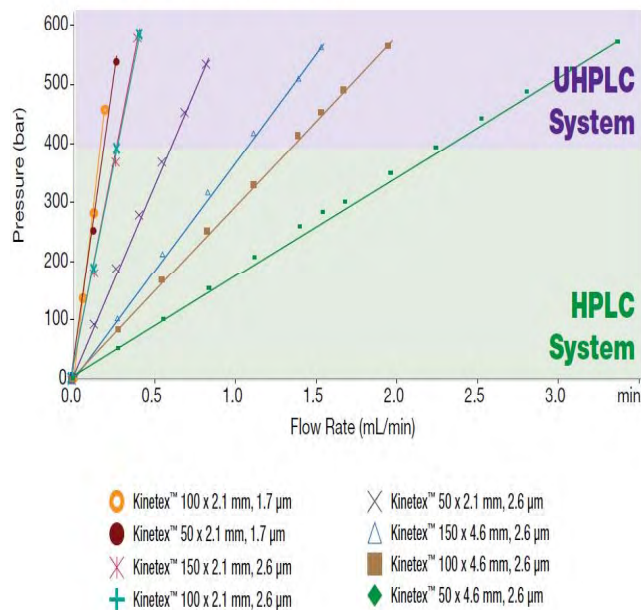
Vlastnosti fáze KINETEX™

Vysoká účinnost díky velmi úzké distribuci velikostí částic (minimalizace vířivé difúze):



Výrazně nižší zpětný tlak:

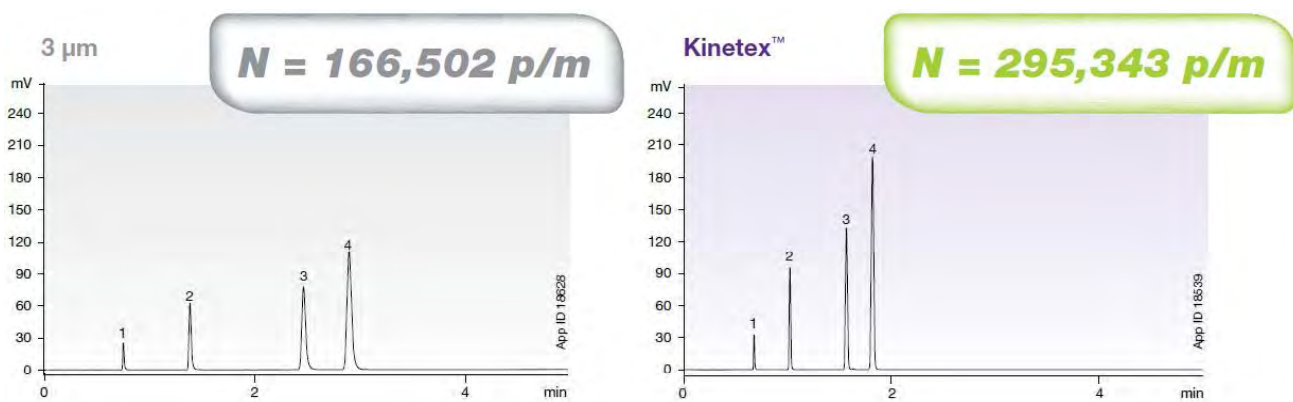
60:40 (Methanol:Water)



21

Vlastnosti fáze KINETEX™

Srovnání účinnosti klasických částic a částic s pevným jádrem:

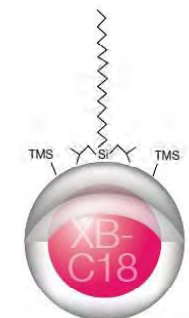


1. uracil
2. acetofenon
3. toluen
4. naftalen

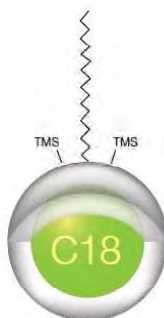
acetonitril/voda 70:30, 1,8 ml/min., kolona 150 x 4,6 mm

22

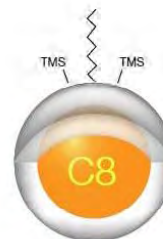
Aplikační využití fází KINETEX™



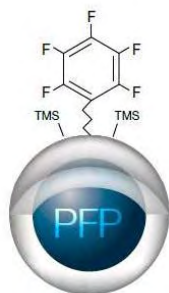
pH Range: 1.5 – 10*
USP Classification: L1
Particle Sizes: 2.6 µm & 1.7 µm
Carbon Load: 12 %



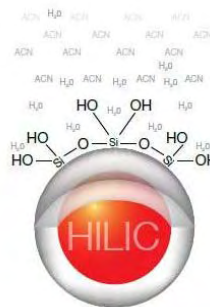
pH Range: 1.5 – 10*
USP Classification: L1
Particle Sizes: 2.6 µm & 1.7 µm
Carbon Load: 12 %



pH Range: 1.5 – 10*
USP Classification: L7
Particle Sizes: 2.6 µm & 1.7 µm
Carbon Load: 10 %



pH Range: 1.5 – 8
USP Classification: L43
Particle Sizes: 2.6 µm & 1.7 µm
Carbon Load: 9 %



pH Range: 2.0 – 7.5
USP Classification: L3
Particle Sizes: 2.6 µm & 1.7 µm