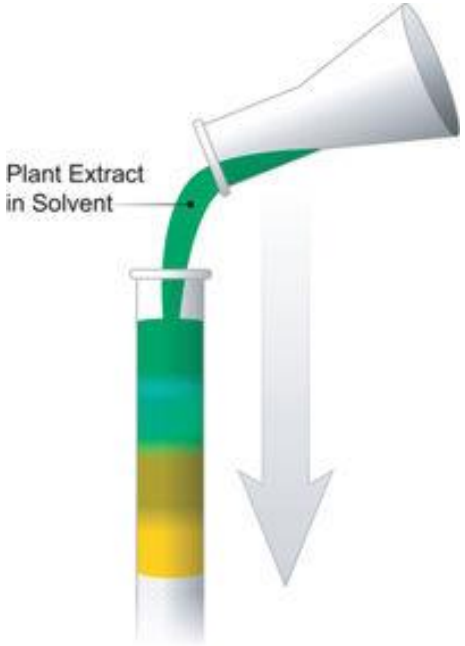
Hrvatska komora
medicinskih biokemičara

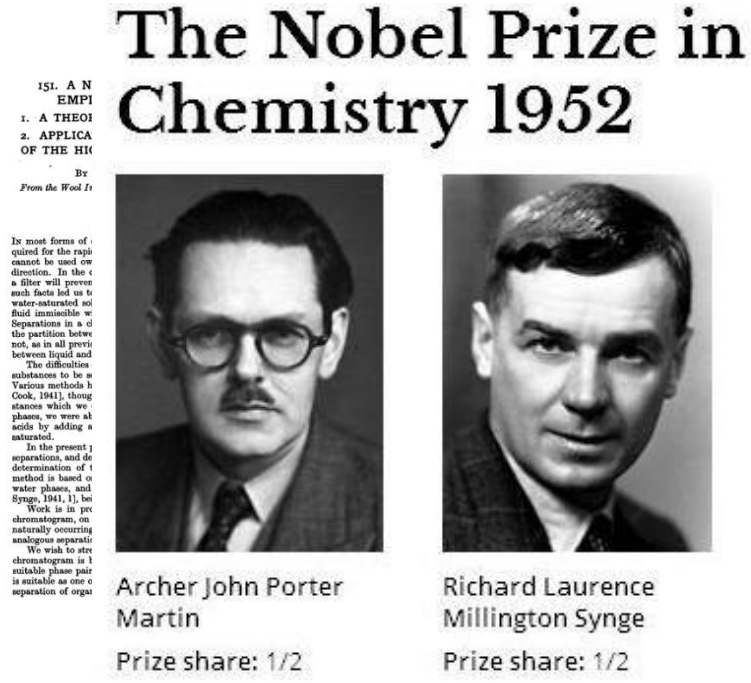
Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju: elektroforetske i kromatografske separacije

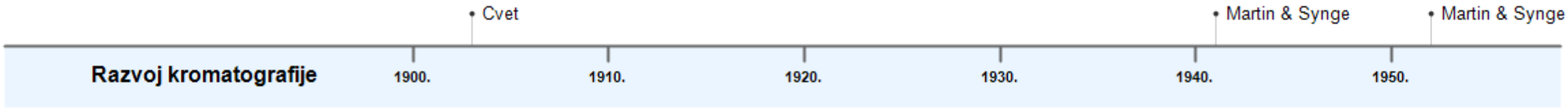
Uvod u kromatografske separacije

Dario Mandić, KBC Osijek

1. Povijest kromatografije







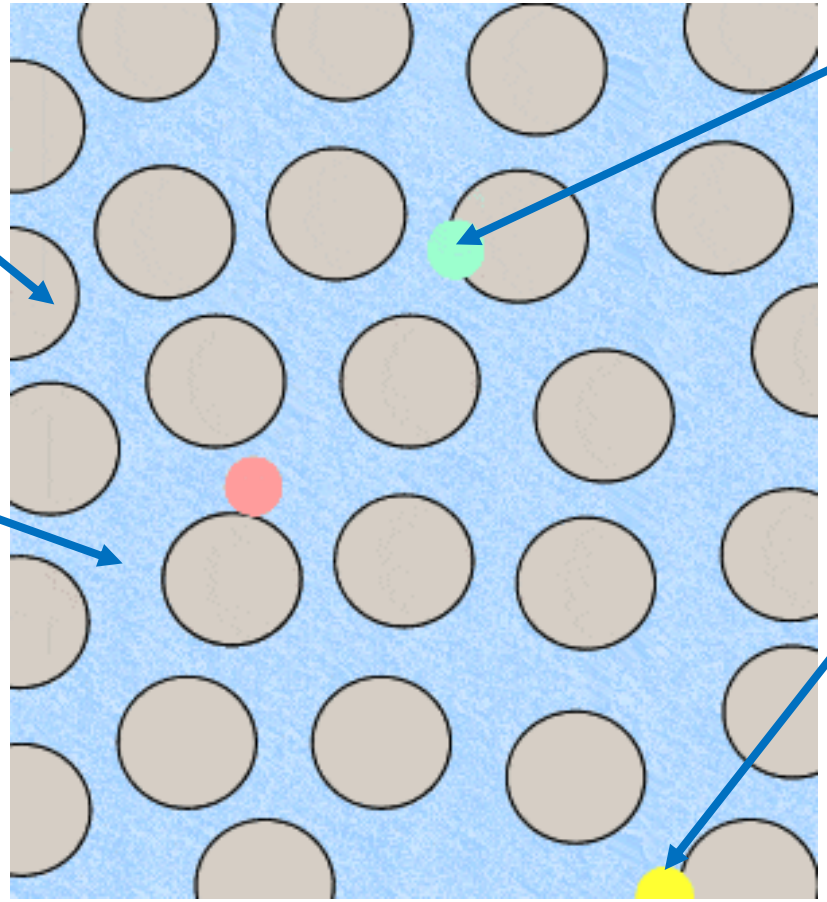
chroma & *graphein* = *KROMATOGRAFIJA*

2. Kromatografija – osnovni pojmovi

- **KROMATOGRAFIJA** - metoda razdvajanja smjese na osnovu različite raspodjele između stacionarne i mobilne faze

Stacionarna faza

Mobilna faza

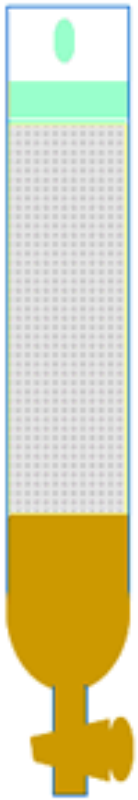


Komponenta smjese koja se najviše zadržava na SP

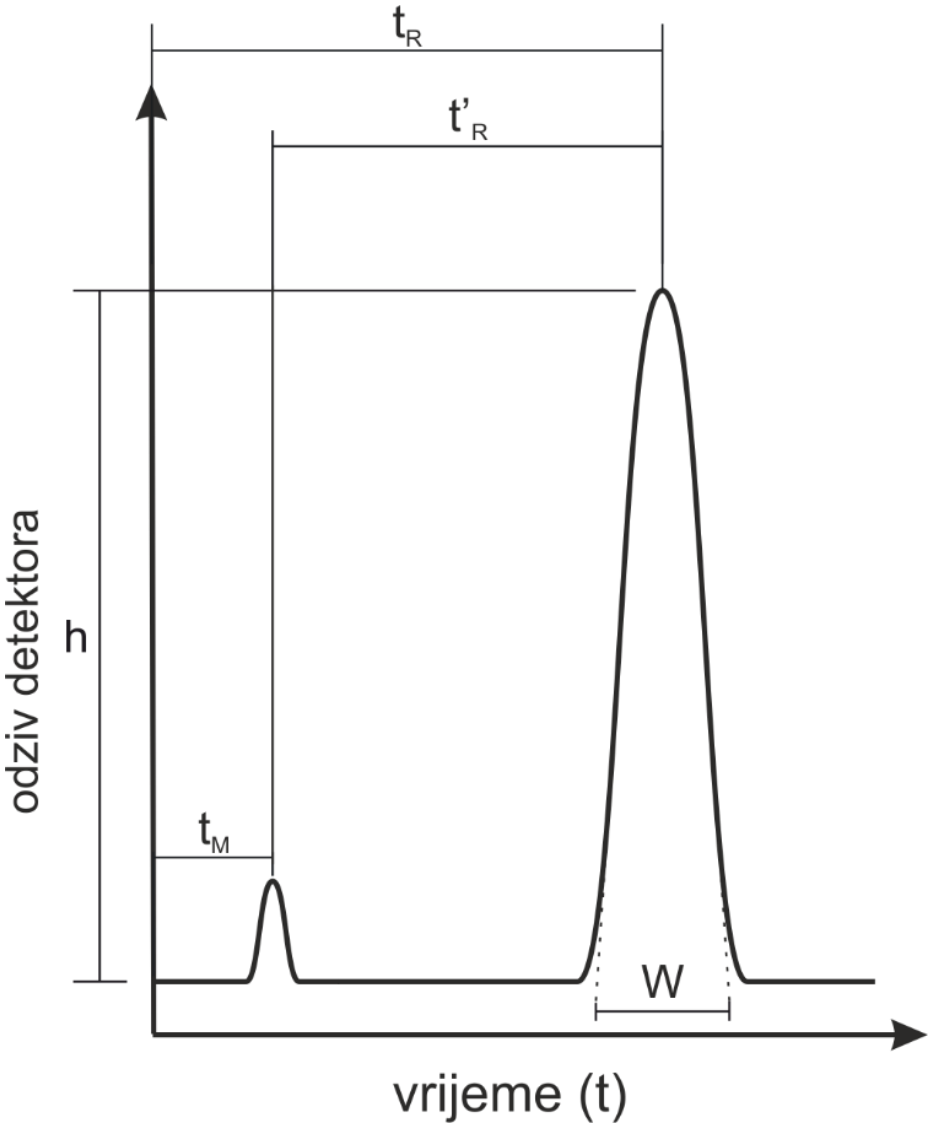
Komponenta smjese koja se najmanje zadržava na SP

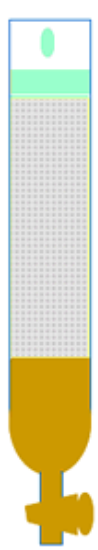
$$Analit_{mobilna\ faza} \overset{K}{\leftrightarrow} Analit_{stacionarna\ faza}$$

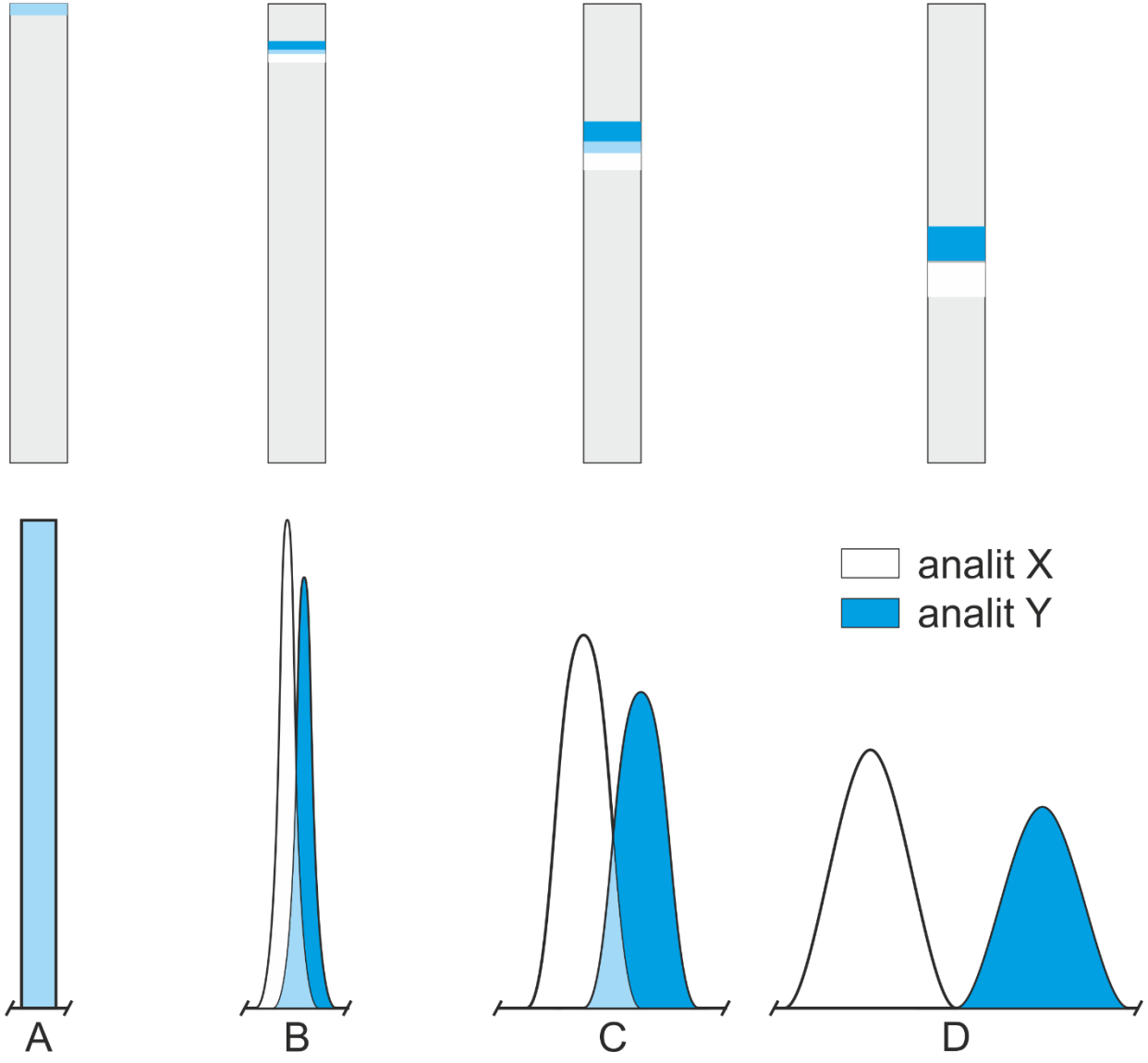
$$K = \frac{c_S}{c_M}$$



2. Kromatografija – osnovni pojmovi



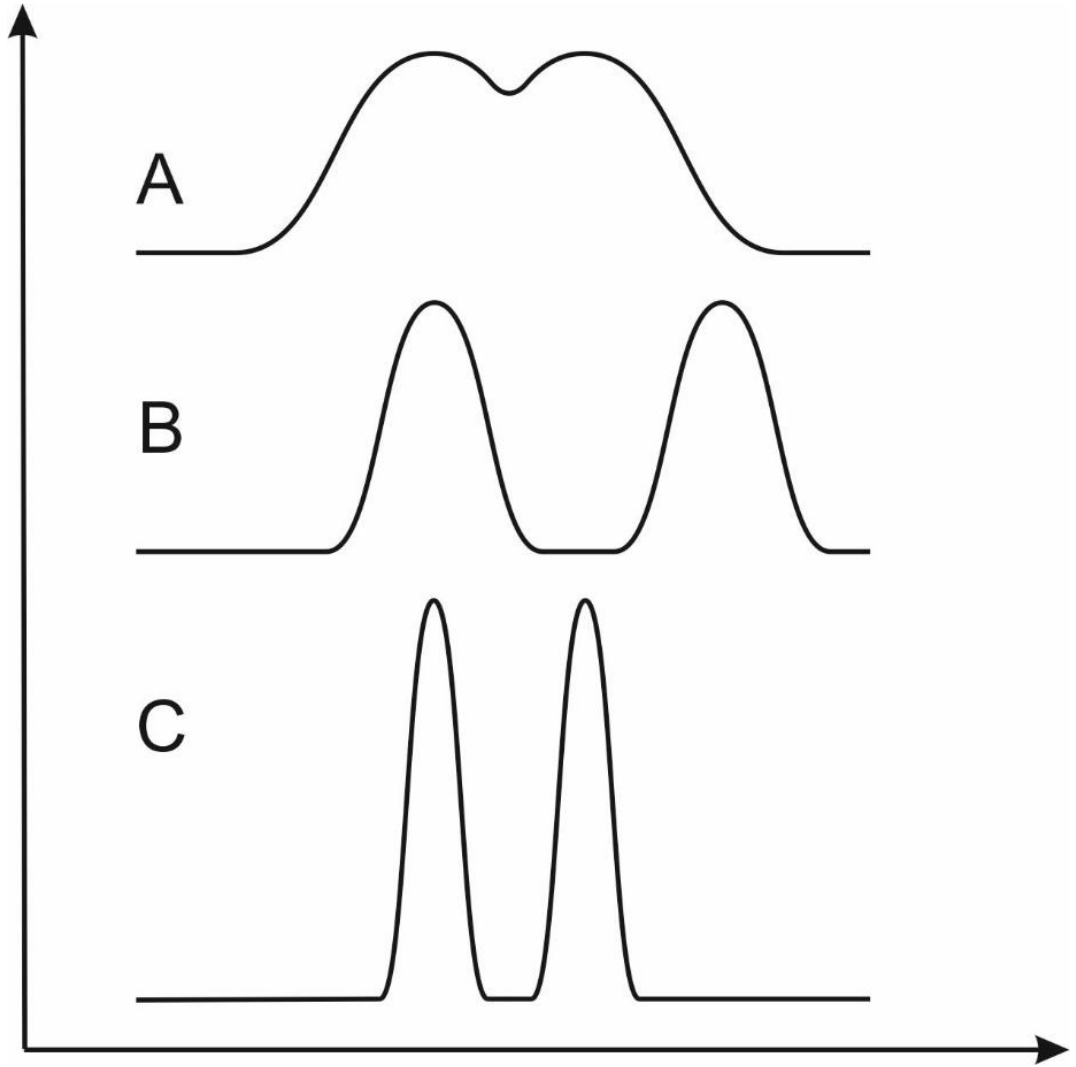




3. Fizikalno-kemijske osnove kromatografije

Načini poboljšanja separacije:

- povećanje selektivnosti (brzina odjeljivanja) → **B**
- povećanje djelotvornosti (širenje zona) → **C**



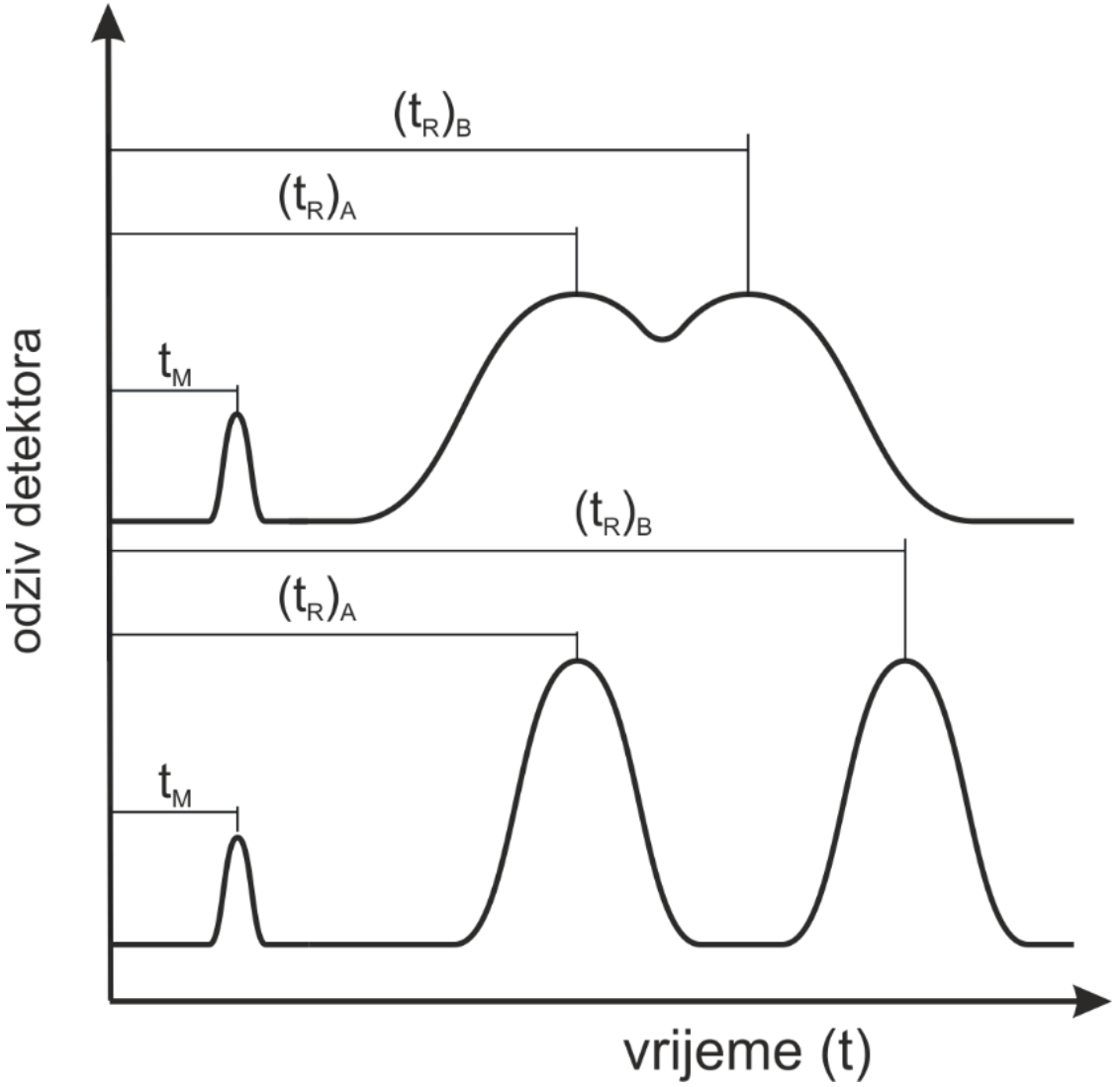
3.1. Selektivnost kromatografske separacije

- selektivnost → razlika u brzini gibanja analita
  - **faktor zadržavanja (retencije) (k)** odnosno **faktor kapaciteta (k')** → **idealno 1-5**

$$k = k' = \frac{q_S}{q_M} = \frac{c_S V_S}{c_M V_M} \qquad k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

  - **koeficijent selektivnosti (α)**

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k_B}{k_A} \qquad \alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} = \frac{(t'_R)_B}{(t'_R)_A}$$



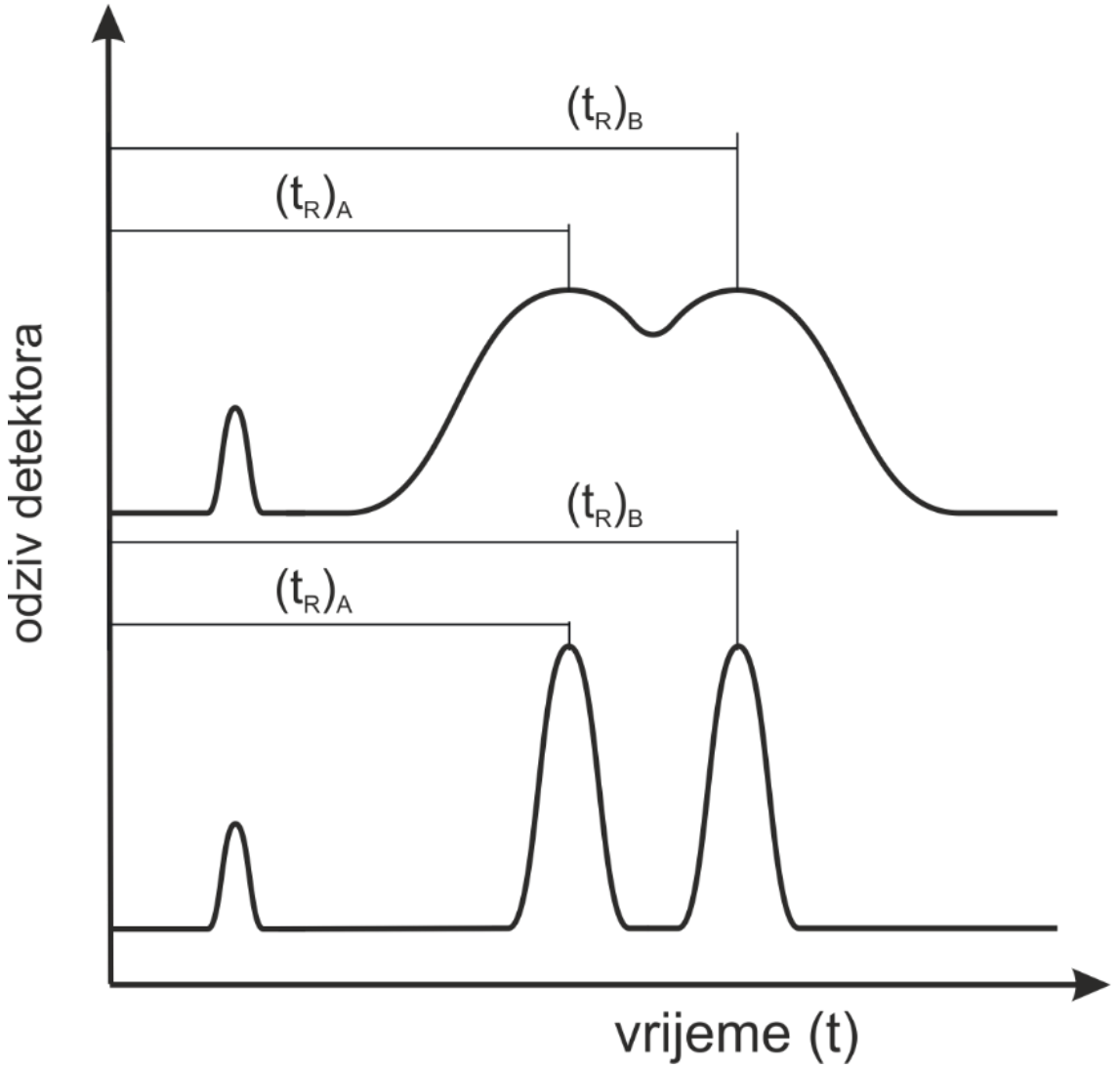
3.2. Djelotvornost kromatografske separacije

- **djelotvornost** → stupanj širenja kromatografskih vršaka (zona)
  - **broj teorijskih tavana (N) i visina teorijskog tavana (H)**

$$N = \frac{L}{H}$$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W}\right)^2$$

$$H = \frac{LW^2}{16t_R^2}$$



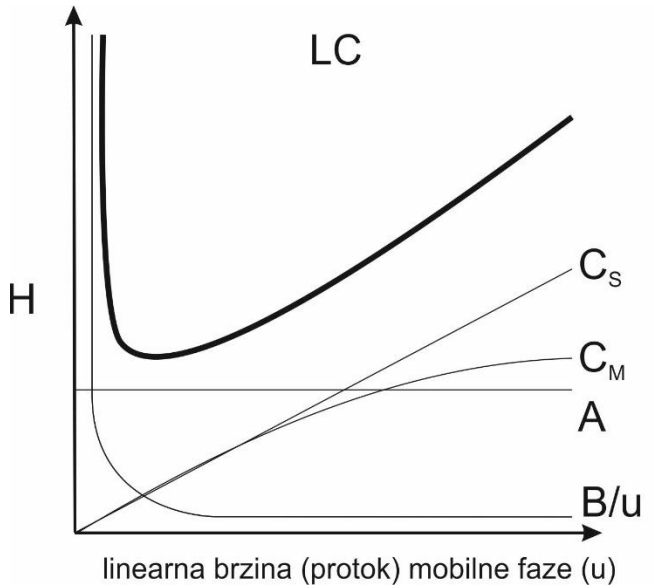
3.2. Djelotvornost kromatografske separacije

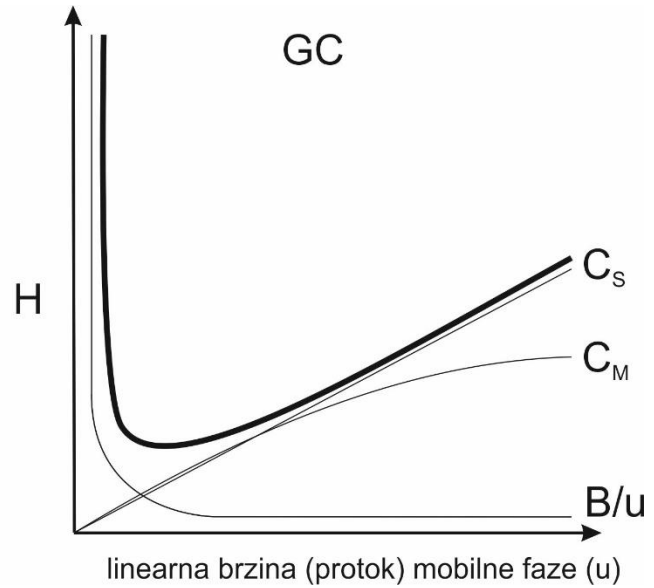
- **Van Deemterova jednadžba → djelomice objašnjava pojavu širenja kromatografskih zona (gubitak djelotvornosti kolone) gibanjem kroz kolonu**

$$H = A + \frac{B}{u} + C_S u + C_M u$$

Varijable koje utječu na djelotvornost kolone

linearna brzina mobilne faze (brzina protoka)	u
koeficijent difuzije analita u mobilnoj fazi	D_M
koeficijent difuzije analita u stacionarnoj fazi	D_S
faktor zadržavanja analita	k
promjer zrna punila stacionarne faze	d_p
debljina tekućeg sloja na stacionarnoj fazi	d_f





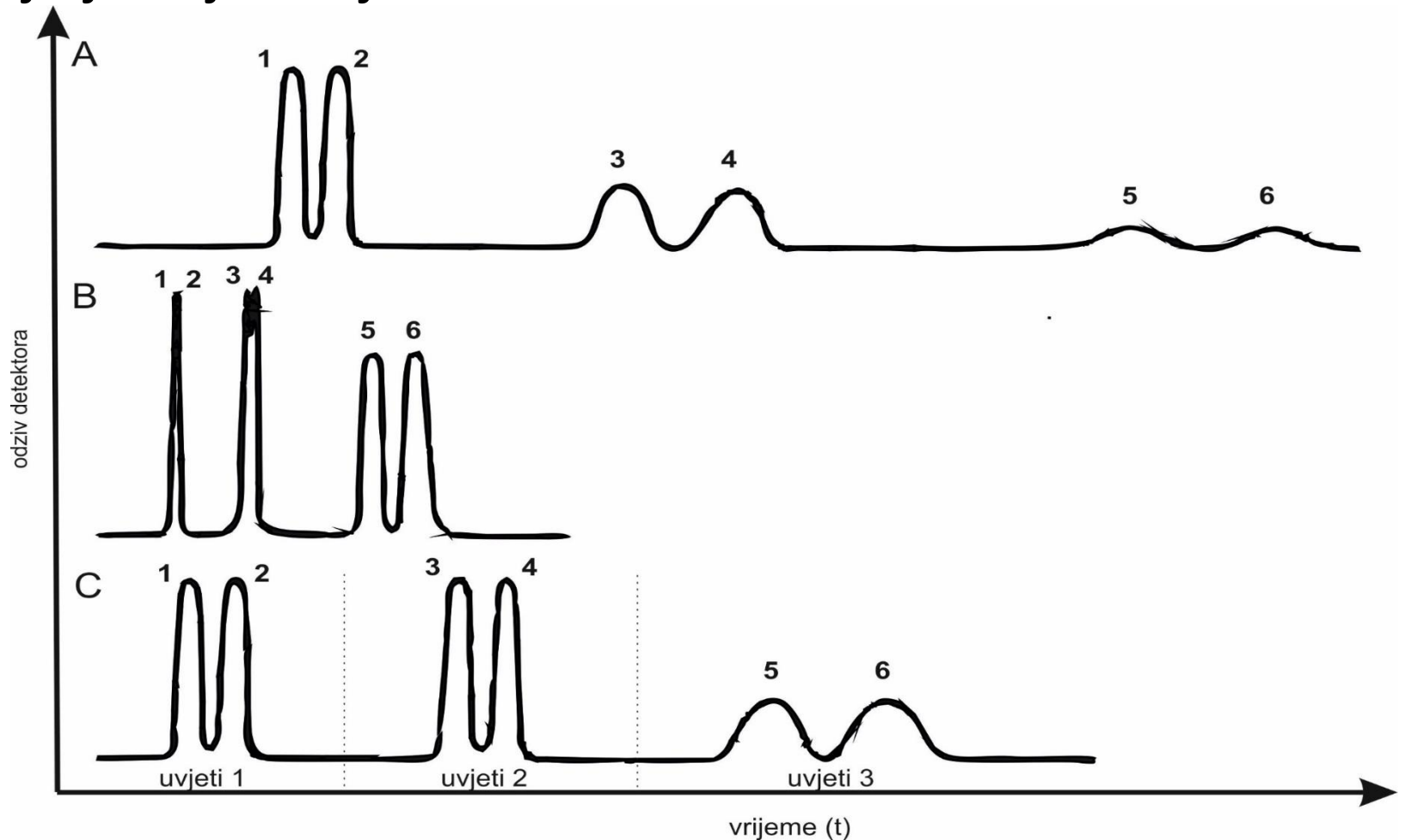
4. Optimizacija kromatografske separacije

Razlučivanje → mjera odjeljivanja dvaju analita

$$R_S = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k'_B}{1 + k'_B}\right)$$

- **opći problem eluacije**



4. Kromatografske analize

Kromatografske analize

Kvalitativne
t_R, detektor (MS)

Kvantitativne
visina (h), površina (A)

Vanjska kalibracija

Unutarnja kalibracija

derivatizacija

biološki uzorci

unutarnji standard

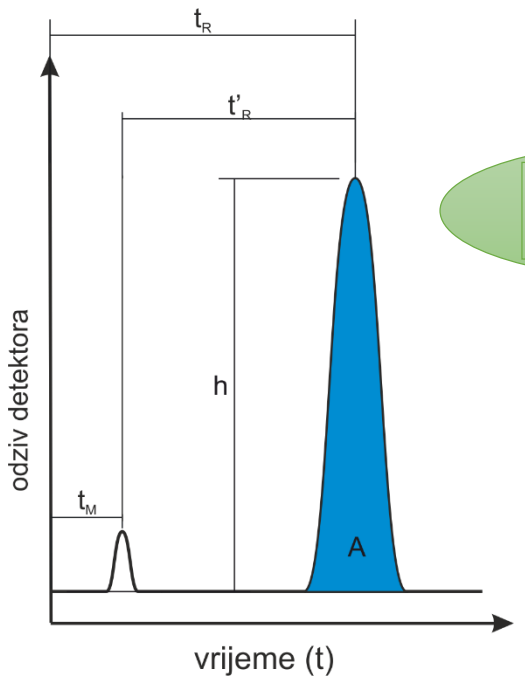
Priprema!

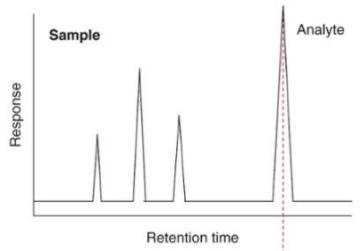
taloženje proteina (PPT)

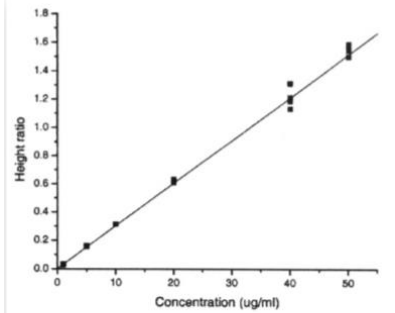
ekstrakcija tekuće-tekuće (LLE)

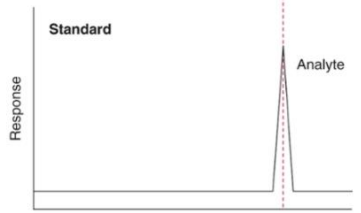
ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE)

online SPE





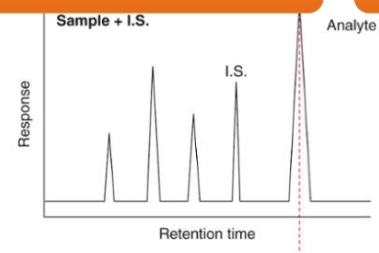


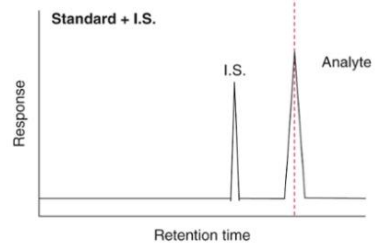


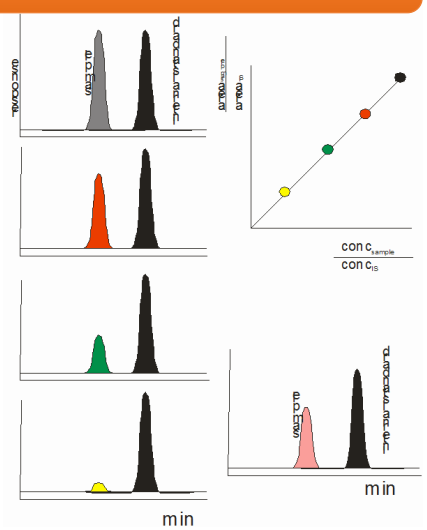
Concentration (ug/ml)	1	5	10	20	40	50
Average	0.96	5.16	10.20	20.28	39.39	50.33
SD	0.02	0.10	0.01	0.33	2.42	1.19
Slope	0.0307					
Interception	0.01					
r^2	0.9997					
P value	<0.0001					

Matriks kalibratori

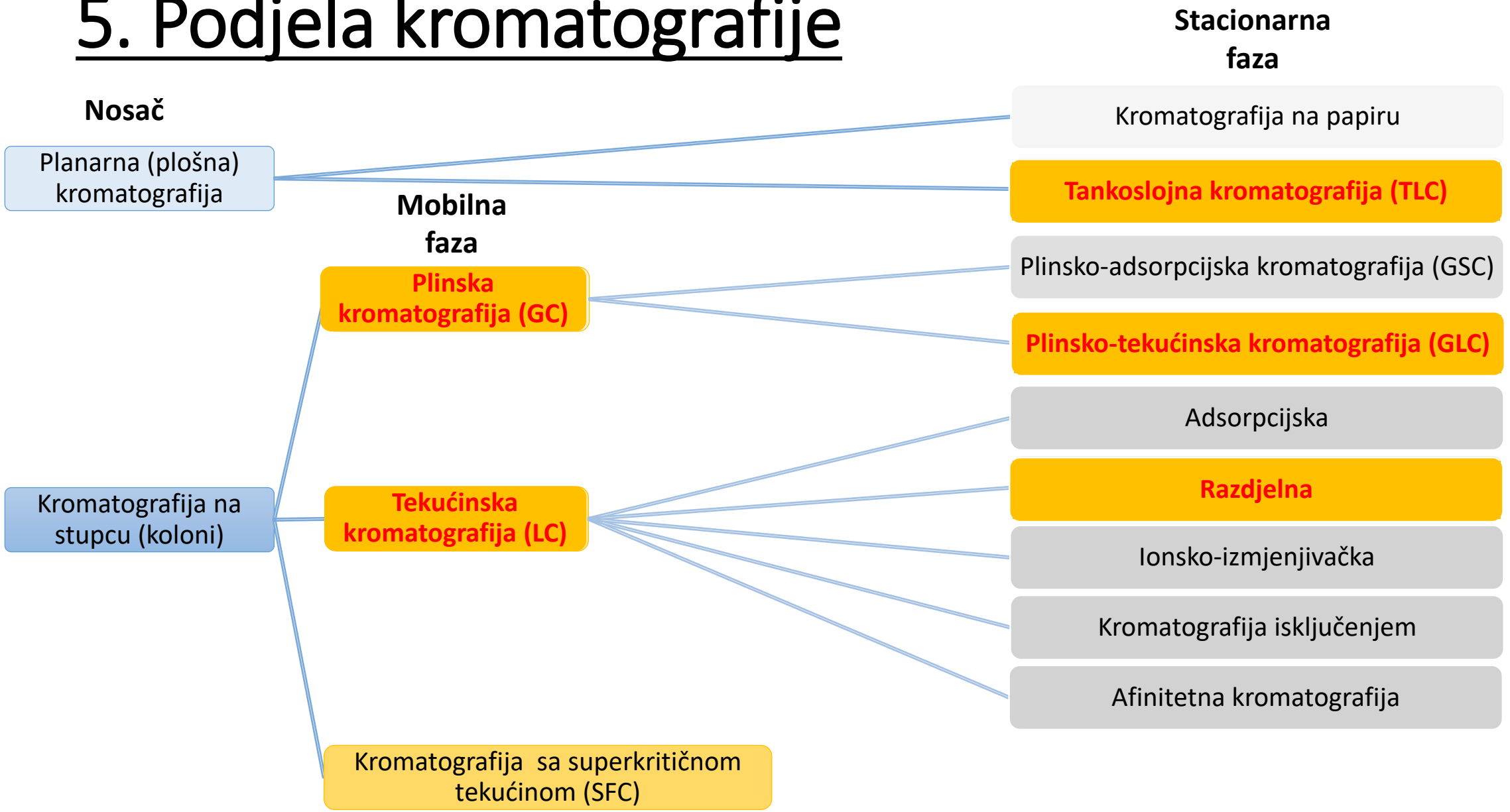
Matriks kontrole





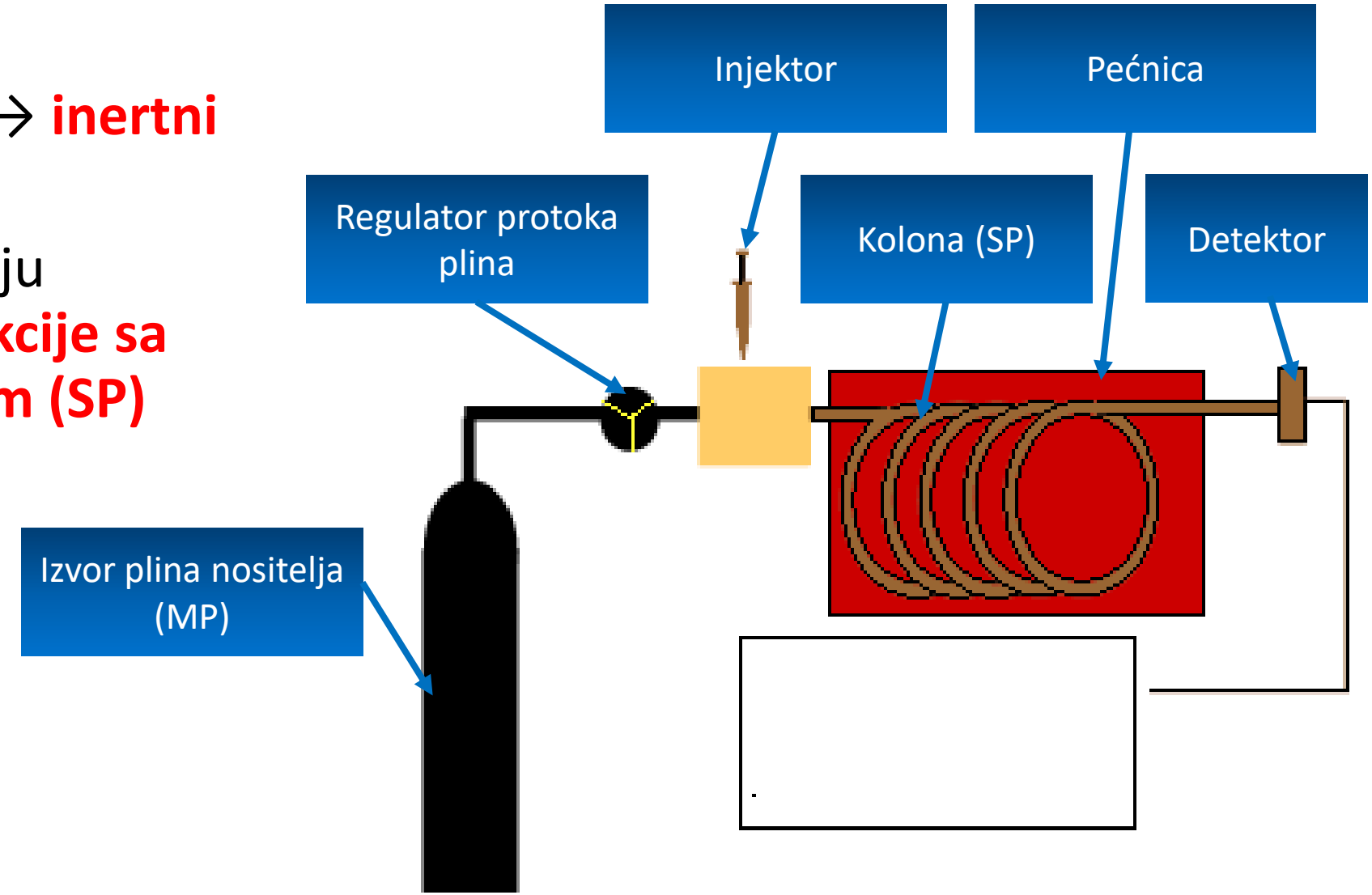


5. Podjela kromatografije



5.1. Plinska kromatografija

- mobilna faza (MP) → **inertni plin** (N_2, He, Ar, H_2)
- separacija na temelju **hlapljivosti** i **interakcije sa stacionarnom fazom (SP)**



5.1. Plinska kromatografija

INJEKTOR

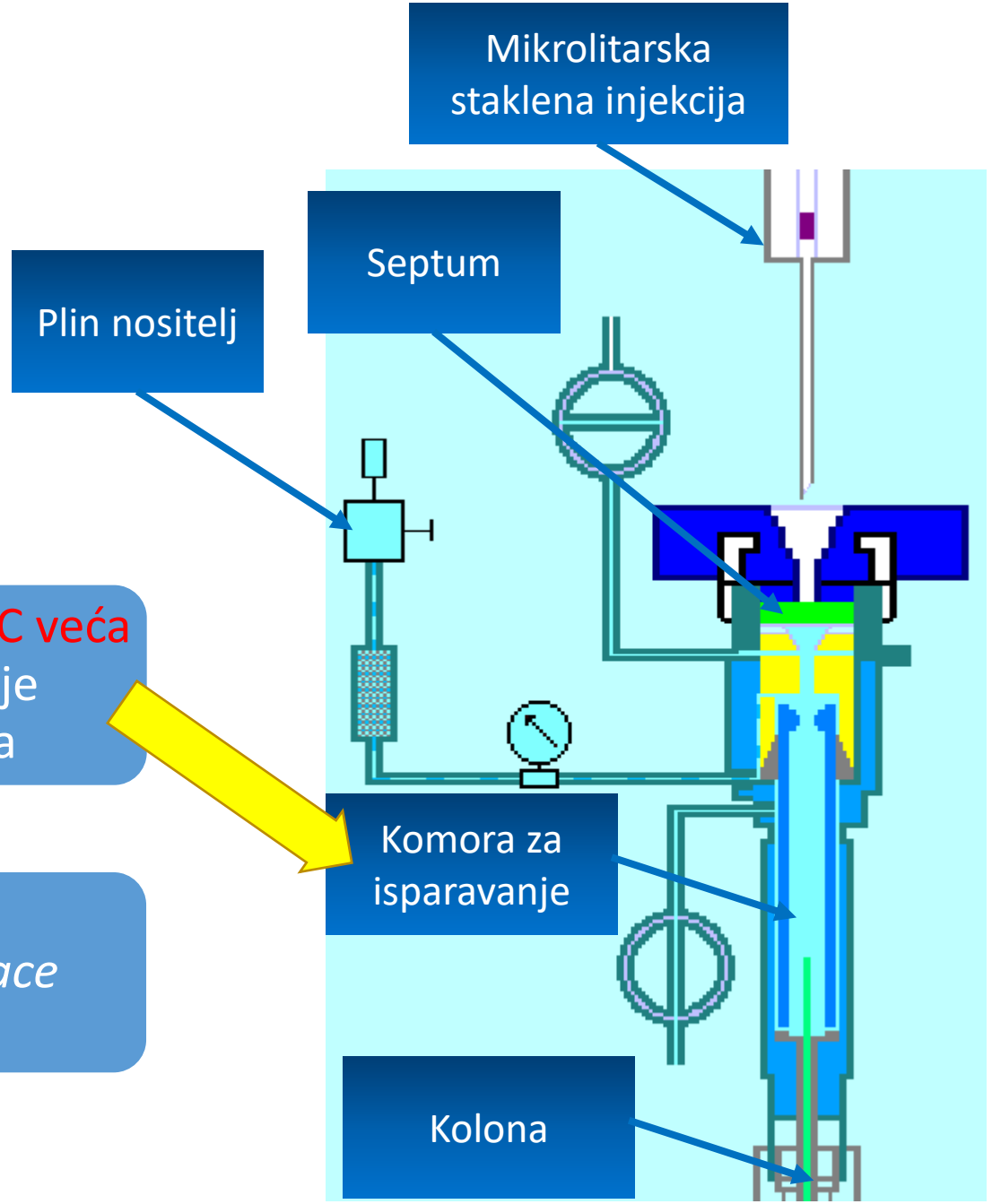
prevodi hlapljive sastojke uzorka u plinovito stanje

temperatura → 30-50°C veća od vrelišta najmanje hlapljivog sastojka

split/splitless

programabilni (PTV)

headspace



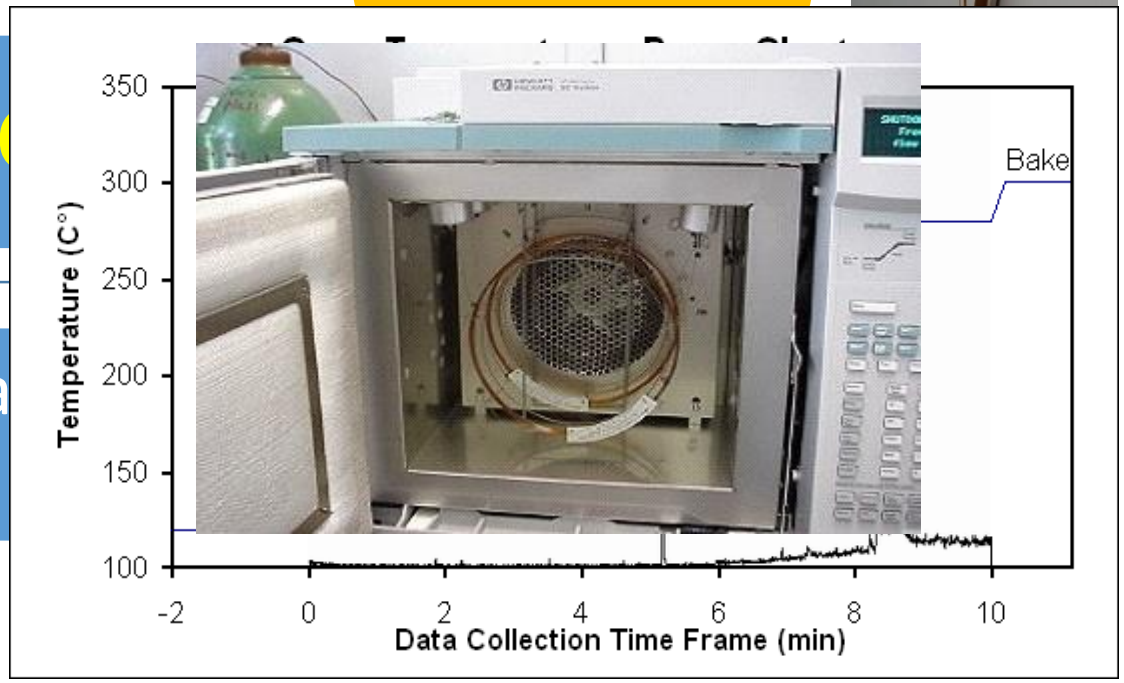
5.1. Plinska kromatografija

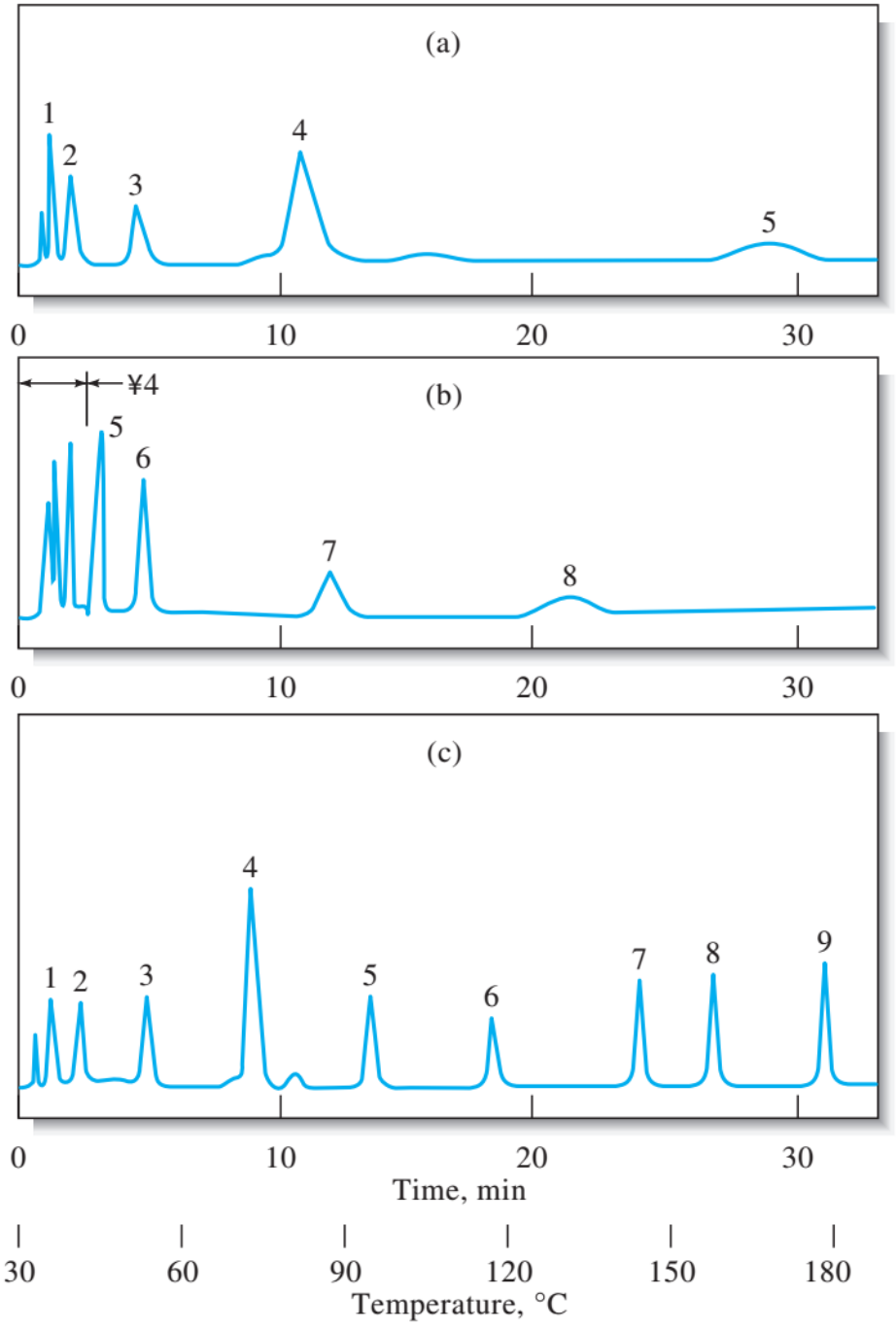
KOLONE

- Punjene (*packed*)
- Kapilarne (*capillary*)

PEĆNI

- Izotermalna eluacija





5.1. Plinska kromatografija

vrsta detek	granica tekcije
detektor to vodljivosti	^{9} g
plameno io detektor (F	^{12} g jika
detektor ap elektrona (	^{15} - 10^{-13} g
spektrome	^{12} - 10^{-11} g

analiza alkohola i drugih lakohlapljivih analita

sveobuhvatni toksikološki probir i identifikacija lijekova, sredstava ovisnosti i njihovih metabolita

5.2. Tekućinska kromatografija

- mobilna faza (MP) → **tekućina** (eluens)
- separacija na temelju **interakcije sa stacionarnom fazom (SP)** i **mobilnom fazom (MP)**

Razdjelna kromatografija

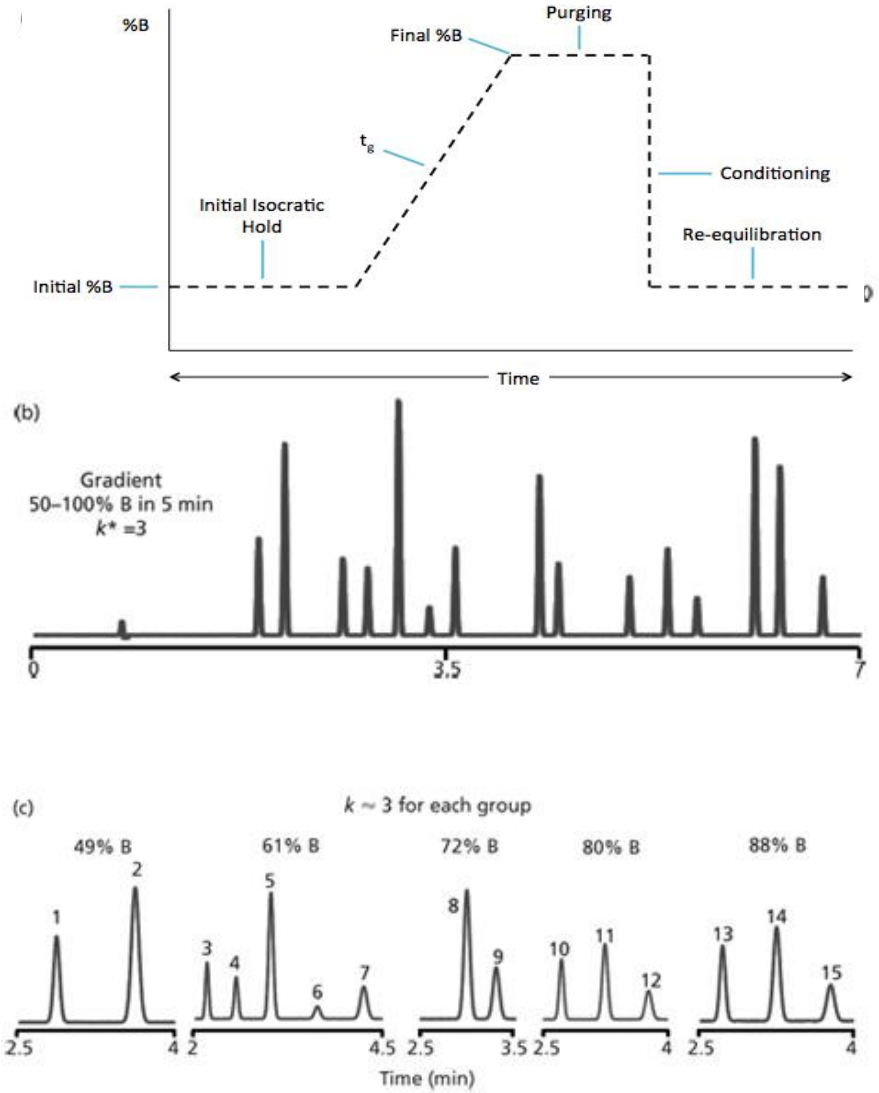
- Reverzna (*reverse phase*)
  - SP nepolarna, MP polarna
    - C_{18}, C_8, C_6, C_4…
- Normalna (*normal phase*)
  - SP polarna, MP nepolarna

5.2. Tekućinska kromatografija

Izokratična eluacija

Gradijentna eluacija

promjena sastava mobilne faze

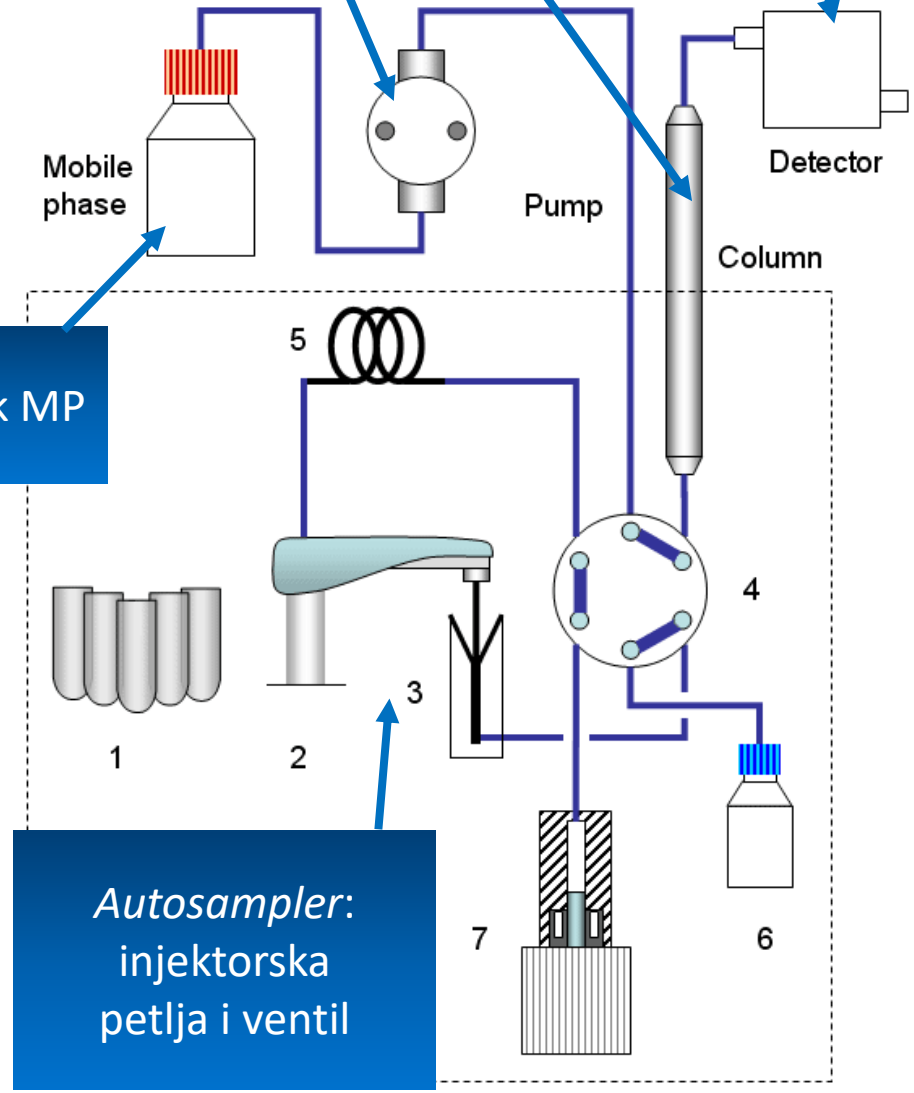


Pumpa

Pećnica i kolona (SP)

Detektor

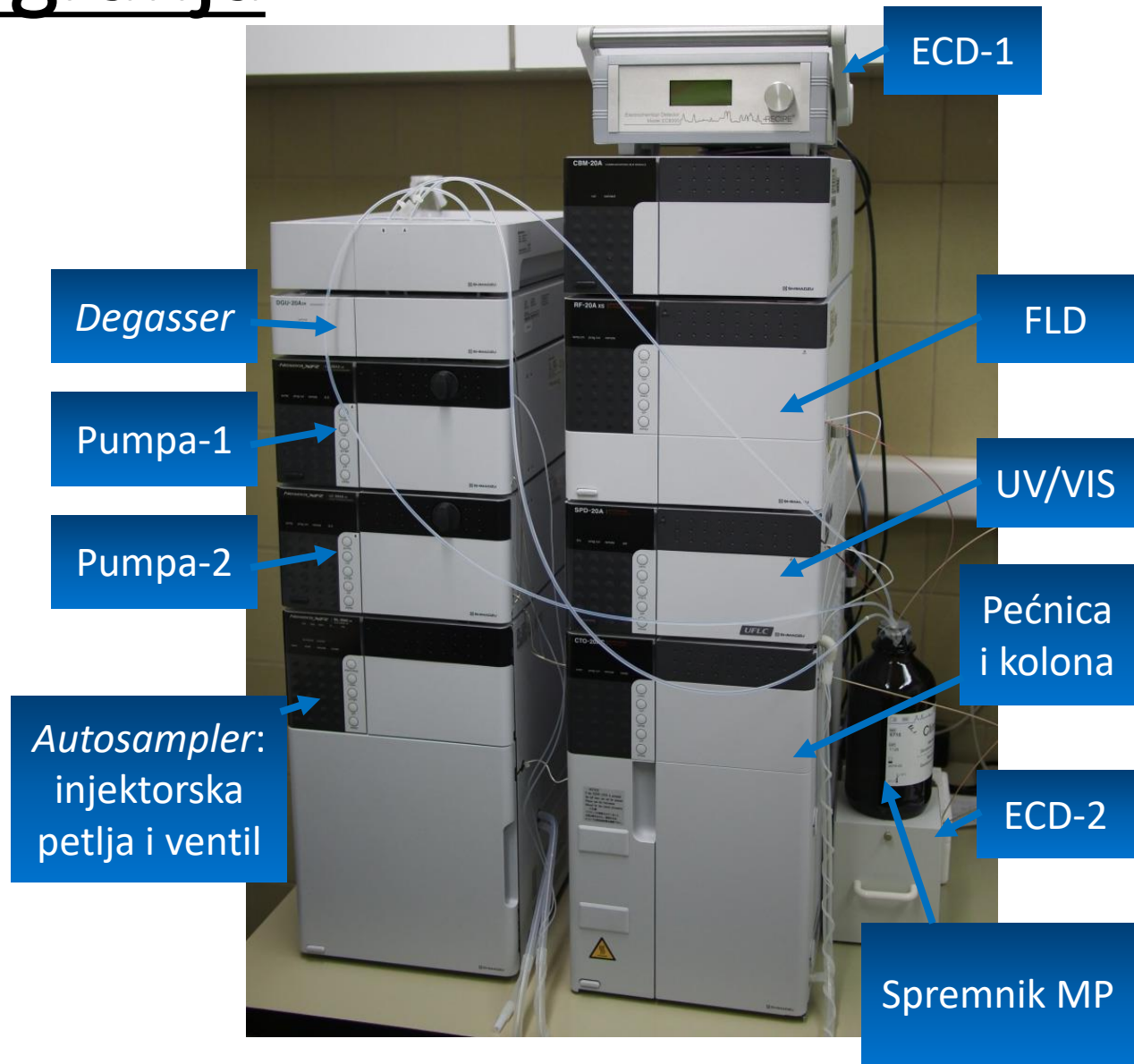
Spremnik MP



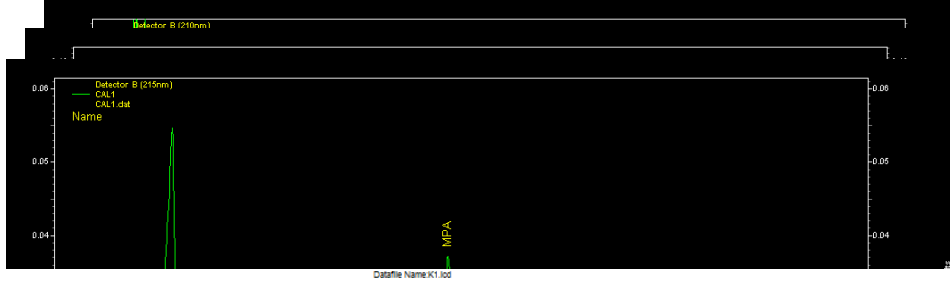
Autosampler: injektorska petlja i ventil

5.2. Tekućinska kromatografija

vrsta detektora	primjena	granica detekcije
detektor apsorbancije (UV/VIS, PDA)	analiti koji sadrže kromofore koji apsorbiraju svjetlost u UV ili vidljivom području	10^{-10} g
detektor fluorescencije (FLD)	analiti koji sadrže fluorofore	10^{-12} g
elektrokemijski detektor (ECD)	elektrokemijski aktivni analiti	10^{-11} g

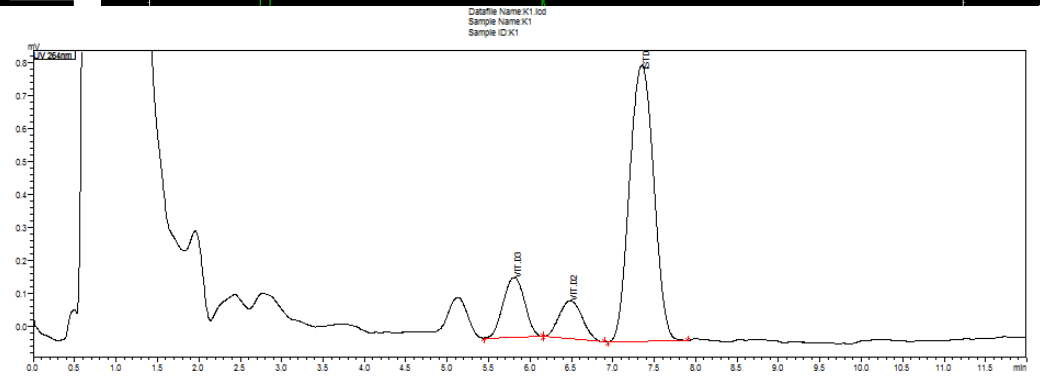


5.2. Tekućinska kromatografija



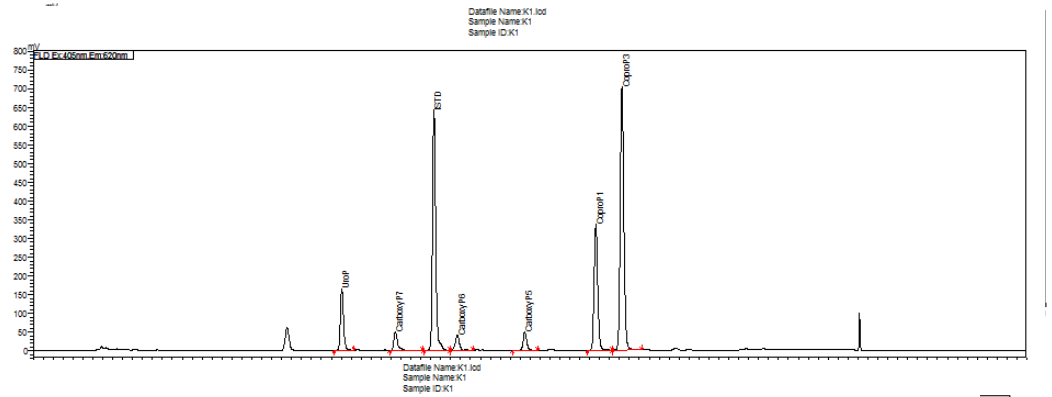
detektor apsorbancije

- hemoglobinske varijante
- oksalati, citrati
- lijekovi i metaboliti lijekova
- vitamin D



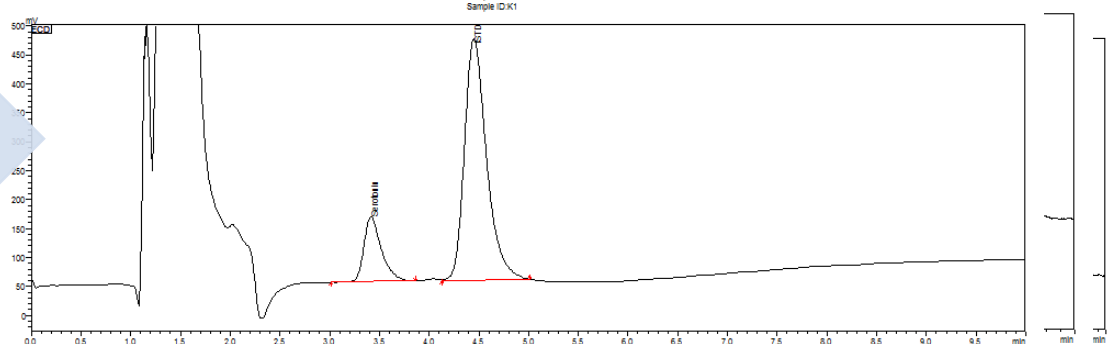
detektor fluorescencije

- vitamini
- lijekovi
- DPD
- porfirini



elektrokemijski detektor

- kateholamini
- primarni metaboliti kateholamina
- sekundarni metab. kateholamina
- serotonin i metabolit



5.2. Tekućinska kromatografija

maseni detektor

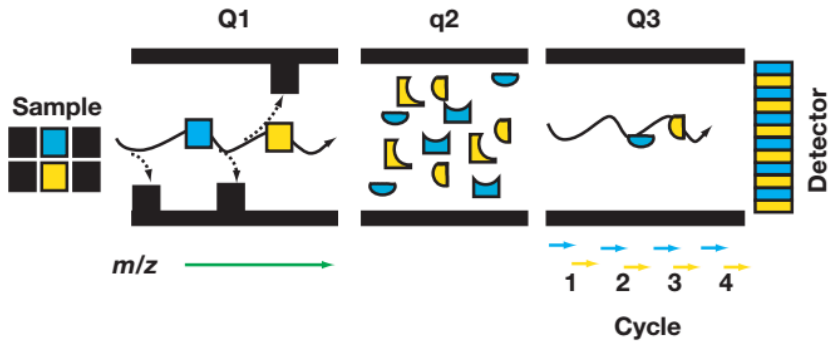
LC-MS/MS

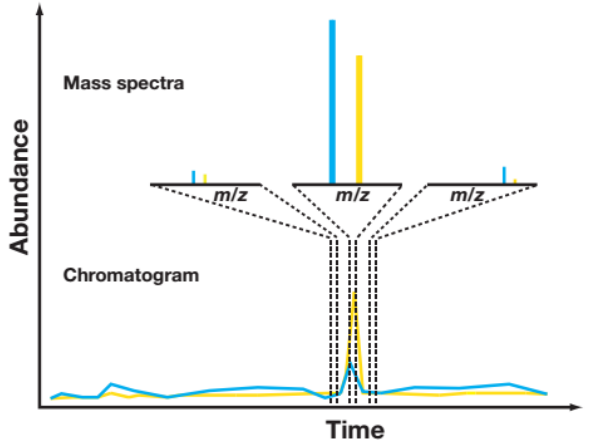
- TDM (AED, BZO, NL, AD, TCA, imunosupresivi, antibiotici…)
- metanefrini u plazmi
- MMA
- vitamin D
- steroidni hormoni
- toksikologija

HPLC → IONIZACIJA → MASENA ANALIZA → DETEKCIJA

IONIZACIJA: ESI, APCI

MASENA ANALIZA: QQQ





Kromatografija u kliničkom laboratoriju?

- osjetljivost
- specifičnost
- raznovrsnost
- simultano određivanje više analita odjednom
- mogućnost samostalnog razvoja metoda
- cijena? (po analizi)

- cijena instrumenta
- nedostatak *random-access* načina rada
- TAT? (priprema uzorka + analiza + obrada podataka) → automatizacija!
- osoblje

HVALA NA PAŽNJI!