

OBSAH:

1	PRAXE V MODERNÍ HPLC	11
1.1	PŘÍPRAVA A POUŽITÍ MOBILNÍ FÁZE.....	11
1.1.1	Obecné zásady při přípravě mobilní fáze.....	11
1.1.2	Odplynění mobilní fáze.....	14
1.1.3	Pufrované mobilní fáze.....	14
1.2	PŘÍPRAVA A POUŽITÍ CHROMATOGRFICKÉ KOLONY	18
1.2.1	Obecné použití kolony.....	19
1.2.2	Ekvilibrace kolony.....	20
1.2.3	Instalace kolony a spojovacích kapilár.....	22
1.2.4	Použití předkolon a filtrů.....	25
1.2.5	Regenerace kolony.....	26
1.2.6	Regenerace kolony kontaminované proteiny.....	28
1.2.7	Regenerace kolony kontaminované lipidy.....	28
1.2.8	Regenerace kolony kontaminované kovovými ionty.....	29
1.3	PRAVIDELNÁ ÚDRŽBA KAPALINOVÉHO CHROMATOGRAFU.....	29
1.3.1	Zařízení pro úpravu mobilní fáze	29
1.3.2	Čerpadlo mobilní fáze	30
1.3.3	Dávkovací zařízení.....	30
1.3.4	Kolonový termostat.....	30
1.3.5	Detektor.....	31
2	VÝVOJ A OPTIMALIZACE METODY	32
2.1	ANALÝZA FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ VZORKU A URČENÍ CÍLE METODY	32
2.2	VÝBĚR ZPŮSOBU DETEKCE ANALYTŮ.....	36
2.2.1	Detekční přístupy v HPLC.....	36
2.2.2	Volba podmínek při UV detekci.....	37
2.2.3	Volba podmínek při fluorescenční detekci.....	40
2.2.4	Volba podmínek při detekci aerosolovými detektory	42
2.2.5	Volba podmínek při elektrochemické detekci.....	43
2.2.6	Volba podmínek při MS detekci.....	45
2.3	VOLBA CHROMATOGRFICKÉHO SYSTÉMU.....	56
2.3.1	Nízkomolekulární látky.....	57
2.3.2	Cukry.....	58
2.3.3	Anorganické ionty.....	59
2.3.4	Polymery	60
2.3.5	Peptidy	60
2.3.6	Proteiny.....	61
2.3.7	Nukleové kyseliny.....	62
2.3.8	Lipidy.....	62

2.4	VOLBA STACIONÁRNÍ A MOBILNÍ FÁZE	64
2.4.1	Stacionární fáze	65
2.4.2	Rozměry kolony	69
2.4.3	Velikost částic	70
2.4.4	Velikost pórů	71
2.4.5	Mobilní fáze	71
2.5	PŘEDBĚŽNÉ EXPERIMENTY S VYUŽITÍM STANDARDNÍCH LÁTEK	72
2.5.1	Obecné zásady volby výchozích podmínek a postupu optimalizace metody	72
2.5.2	Systematický přístup k vývoji metody	73
2.6	VLASTNÍ OPTIMALIZACE METODY	75
2.6.1	Optimalizace pH mobilní fáze na reverzních fázích	76
2.6.2	Optimalizace selektivity pomocí gradientové eluce	79
2.6.3	Objem vzorku dávkovaný do HPLC systému	82
2.6.4	Průtok mobilní fáze	85
2.6.5	Optimalizace teploty separace	85
2.6.6	Výpočet a optimalizace doby analýzy	87
2.7	ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ SEPARACE PŘI VÝVOJI METODY	88
2.8	SPECIFICKÉ OPTIMALIZAČNÍ PŘÍSTUPY	89
2.8.1	Sekvenční metody	90
2.8.2	Simultánní metody	91
2.8.3	Využití chromatografických optimalizačních softwarů pro vývoj metod	95
3	PŘÍPRAVA VZORKŮ K CHROMATOGRAFICKÉ ANALÝZE	98
3.1	KONVENČNÍ ZPŮSOBY ÚPRAVY VZORKŮ	100
3.1.1	Přímá extrakce	100
3.1.2	Srážení proteinů	105
3.1.3	Extrakce z kapaliny do kapaliny	107
3.1.4	Extrakce na tuhou fázi	110
3.2	MODERNÍ TRENDY V TECHNIKÁCH PRO ÚPRAVU VZORKŮ	115
3.2.1	Mikroextrakce	117
3.2.2	On-line extrakční techniky	121
3.2.3	Extrakční techniky s vysokou selektivitou	126
4	VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKŮ V HPLC	128
4.1	KVALITATIVNÍ HODNOCENÍ	128
4.2	KVANTITATIVNÍ HODNOCENÍ	128
4.2.1	Metoda vnějšího standardu	129
4.2.2	Metoda přidavku standardu	131
4.2.3	Metoda vnitřního standardu	136
4.2.4	Metoda vnitřní normalizace	139

5	VALIDACE METOD V HPLC	141
5.1	DEFINICE METROLOGICKÝCH POJMŮ	141
5.2	VALIDAČNÍ PARAMETRY	142
5.3	PRAKTICKÉ PROVEDENÍ VALIDACE	143
5.3.1	<i>Správnost metody (accuracy)</i>	143
5.3.2	<i>Přesnost metody (precision)</i>	146
5.3.3	<i>Linearita a rozsah metody</i>	149
5.3.4	<i>Mez detekce a mez stanovitelnosti</i>	151
5.3.5	<i>Selektivita metody</i>	152
5.3.6	<i>Robustnost metody</i>	155
5.4	LÉKOPISNÉ NEBO NORMOVANÉ METODY	159
5.5	TEST ZPŮSOBILOSTI CHROMATOGRAFICKÉHO SYSTÉMU	160
6	KVALIFIKACE HPLC SYSTÉMU	162
6.1	OBEČNÉ PODMÍNKY CHROMATOGRAFICKÝCH TESTŮ	162
6.2	TLAKOVÝ TEST SYSTÉMU	163
6.3	TEPLOTA AUTOSAMPLERU (SPRÁVNOST A LINEARITA)	163
6.4	TEPLOTA KOLONOVÉHO TERMOSTATU (SPRÁVNOST A LINEARITA)	164
6.5	HPLC ČERPADO	164
6.5.1	<i>Správnost průtoku</i>	164
6.5.2	<i>Opakovatelnost průtoku</i>	165
6.5.3	<i>Linearita průtoku</i>	165
6.5.4	<i>Správnost složení gradientu</i>	165
6.5.5	<i>Přesnost míchání mobilních fází</i>	166
6.5.6	<i>Linearita gradientu</i>	167
6.6	HPLC AUTOMATICKÝ DÁVKOVAČ (AUTOSAMPLER)	168
6.6.1	<i>Linearita a citlivost nastřikovaného objemu</i>	168
6.6.2	<i>Opakovatelnost nastřikovaného objemu</i>	168
6.6.3	<i>Detekce pozice vialky v karuselu</i>	169
6.6.4	<i>Křížová kontaminace</i>	169
6.7	HPLC DETEKTORY	169
6.7.1	<i>Linearita UV detektoru</i>	169
6.7.2	<i>Správnost nastavení vlnové délky PDA detektoru</i>	170
6.7.3	<i>Linearita fluorescenčního detektoru</i>	170
6.7.4	<i>Správnost nastavení vlnové délky fluorescenčního detektoru</i>	171
6.7.5	<i>Linearita RI detektoru</i>	171
6.7.6	<i>Citlivost RI detektoru</i>	171
6.7.7	<i>Opakovatelnost odezvy RI detektoru</i>	172

7 ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ V HPLC (TROUBLESHOOTING)	173
7.1 ZÁKLADNÍ LINIE	174
7.1.1 Šum a drift základní linie	174
7.1.2 Cyklický průběh základní linie	178
7.1.3 Necyklický průběh základní linie	179
7.2 RETENČNÍ ČAS	182
7.2.1 Kolísavý retenční čas	182
7.2.2 Zvyšující nebo snižující se retenční čas	182
7.2.3 Změna retenčního času o novou hodnotu (konstantu)	182
7.3 TVAR A PLOCHA PÍKU	183
7.3.1 Dvojitý pík	183
7.3.2 Frontující pík	187
7.3.3 Chvostující pík nebo deformovaný pík	188
7.3.4 Negativní pík(y) (jeden nebo více)	191
7.3.5 Uřezaný pík	192
7.3.6 Snížení účinnosti	194
7.3.7 Změna plochy píku	195
7.4 PROBLÉMY SYSTÉMOVÉHO TLAKU	195
7.4.1 Vyšší tlak než obvykle	195
7.4.2 Nižší tlak než obvykle	196
7.4.3 Kolísající tlak	197
7.5 CHROMATOGRAM	198
7.5.1 Více píků než očekáváme	198
7.5.2 Méně píků než očekáváme	203
7.5.3 Neobvyklý profil chromatogramu	204
8 LITERATURA	206
9 UŽITEČNÉ TABULKY V HPLC DENNÍ PRAXI	217
9.1 MÍŠITELNOST ORGANICKÝCH ROZPOUŠTĚDEL POUŽÍVANÝCH V HPLC	217
9.2 DYNAMICKÁ VIZKOZITA η SMĚSÍ ACETONITRIL - VODA A METHANOL - VODA	218
9.3 HODNOTY ABSORPČNÍCH MAXIM A MOLÁRNÍCH EXTINKČNÍCH KOEFICIENTŮ TYPICKÝCH FUNKČNÍCH SKUPIN ORGANICKÝCH SLOUČENIN	219