

Slaidis 1

Šķidrumu hromatogrāfija- masspektrometrija.

Metožu pielietojums
augu hormonu, metabolītu un citu
savienojumu analīzē

Dr. ķīm., Ilva Nakurte

ilva.nakurte@gmail.com

Slaidis 2

KAS IR HROMATOGRĀFIJA?



Jautra izklaide ar
filtrpapīru un
flomāsteriem?



<http://www.flickr.com/photos/polapix/2928279573/sizes/z/in/photostream/>

KAS IR HROMATOGRĀFIJA?



<http://scifun.chem.wisc.edu/homeexpts/HOMEEXPTS.HTML>

**Jautrība ar krāsainām
konfektēm..**



...vai rudens lapām, vai...

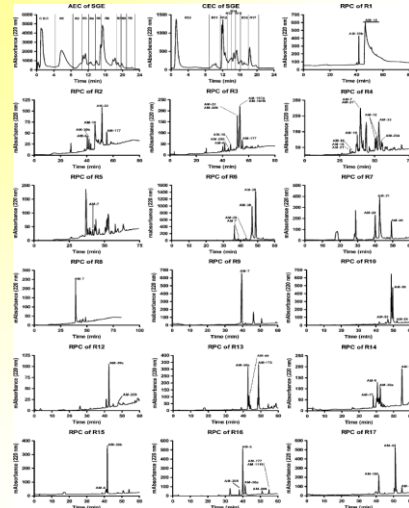
<http://www.monroetwplibrary.org/simplescience>

KAS IR HROMATOGRĀFIJA?

...zinātne???



<http://www2.binghamton.edu/case/facilities.html>



[Insect Biochemistry and Molecular Biology
Volume 38, Issue 1](#)

Slaidis 5

HROMATOGRĀFIJA IR

vielu atdalīšanas process, kurā parauga maisījums sadalās starp divām fāzēm, no kurām viena ir kustīga. Otra fāze ir nekustīgs sorbenta slānis, kas var atrasties kolonnā vai plaknē.

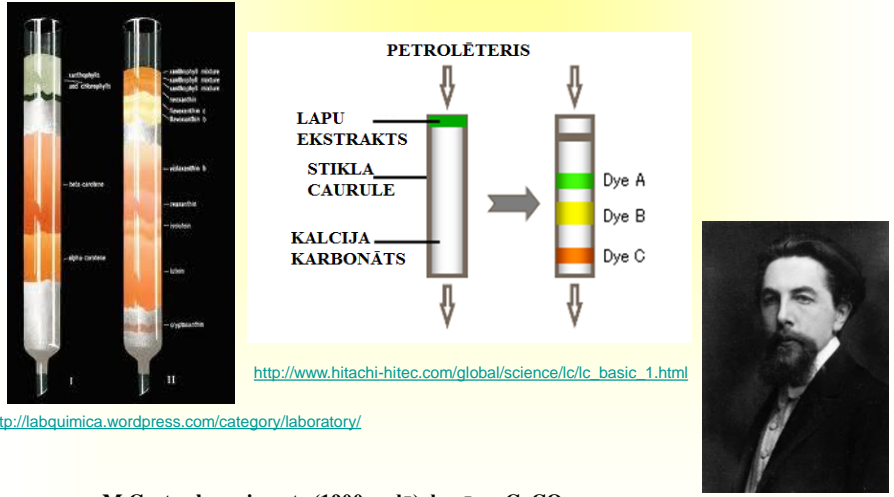
Slaidis 6

HROMATOGRĀFIJA

- No Grieķu valodas:
- χρώμα *chroma* «krāsa»
- γράφειν *graphein* «rakstīt»

Pierakstīt krāsu

VĒSTURE



The diagram illustrates the chromatography setup. On the left, a glass tube labeled 'PETROLĒTERIS' contains 'LAPU EKSTRAKTS' (leaf extract) on top of 'KALCIJA KARBONĀTS' (calcium carbonate). The tube is labeled 'STIKLA CAURULE' (glass tube). An arrow points to the right, showing the separated components: 'Dye A' (green), 'Dye B' (yellow), and 'Dye C' (orange). To the right is a portrait of Mihails Cvets (1870-1919), a professor of botany at the University of Warsaw.

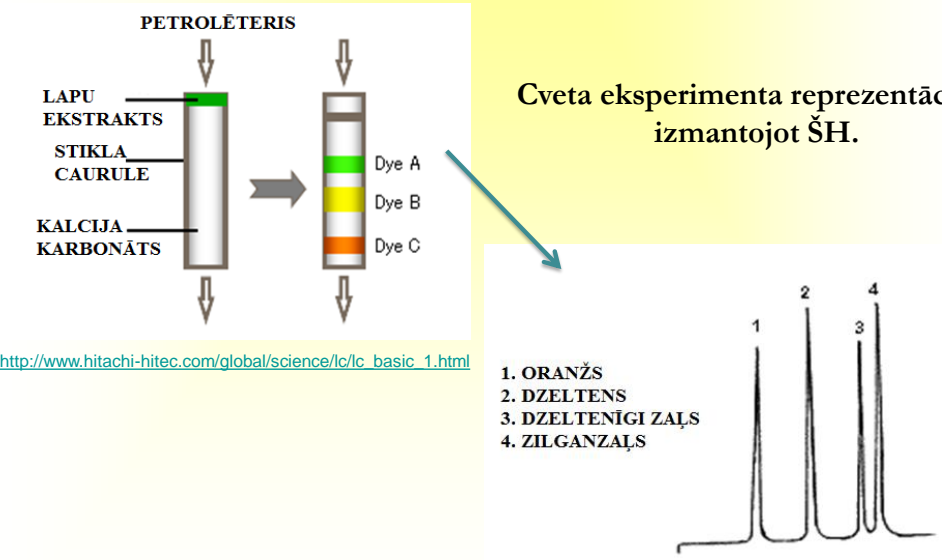
http://www.hitachi-hitec.com/global/science/lc/lc_basic_1.html

<http://labquimica.wordpress.com/category/laboratory/>

M. Cveta eksperiments (1900. gadā), kurā ar CaCO_3 kolonnu, tai skalojot cauri lapu ekstraktu petrolēterī, izdevās iegūt vairākas dažādu krāsu joslas, kas atbilda hlorofilam, ksantofilam un karotīniem .

**Mihails Cvets (1870-1919)
Varšavas Universitātes
botānikas profesors**

VĒSTURE



The diagram shows the chromatography setup and the resulting chromatogram. The setup is identical to the one on slide 7. The chromatogram shows four distinct peaks labeled 1, 2, 3, and 4. An arrow points from the chromatogram to the legend.

Cveta eksperimenta reprezentācija, izmantojot ŠH.

**1. ORANŽS
2. DZELTENS
3. DZELTENĪGI ZAĻS
4. ZILGANZAĻS**

<http://www.shodex.com/english/kouzaa.html>

NOZĪMĪGUMS

Hromatogrāfiju izmanto visās eksakto zinātņu nozarēs-

FIZIKĀ;
ĶĪMIJĀ;
BIOLOĢIJĀ

12 Nobela Prēmijas tika iegūtas laika posmā no 1937.-
1972. gadam.



<http://sandwalk.blogspot.com/2009/11/nobel-laureates-archer-martin-and.html>

NOZĪMĪGUMS

How can it happen, one may ask, that something
apparently so common place as a separation
method should be rewarded by a Nobel Prize?

The answer is that from the
very beginnings of chemistry
until our own time, methods
for separating substances have
occupied a key position in this
science.



<http://sandwalk.blogspot.com/2009/11/nobel-laureates-archer-martin-and.html>

SAĪSINĀJUMI

Angļu valodā

HPLC-*high performance liquid chromatography*;

LC-*liquid chromatography*;

MS-*mass spectrometry*;

GC-*gass chromatography*;

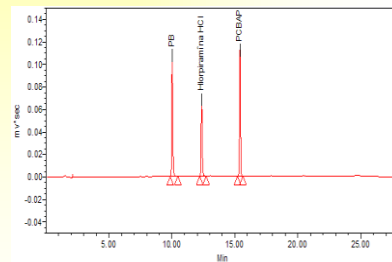
TLC – *thin layer chromatography*.

LC-MS; LC-MS/MS; GC-MS etc.

NOSAUKUMI

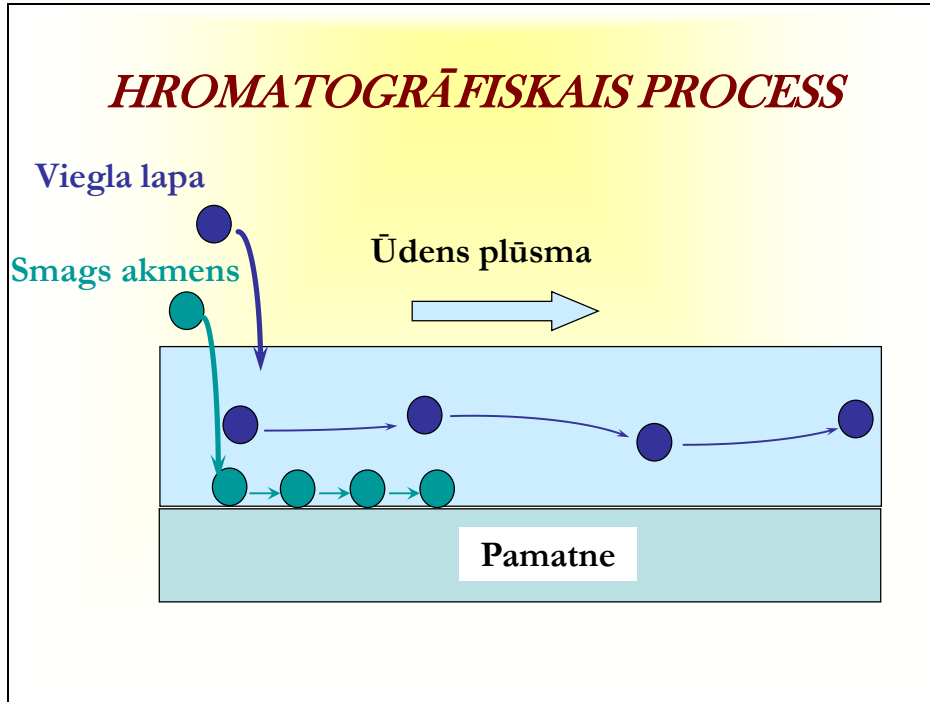
HROMATOGRĀFIJA–analītiska metode– **CHROMATOGRAPHY**

HROMATOGRĀFS– iekārta -**CHROMATOGRAPH**

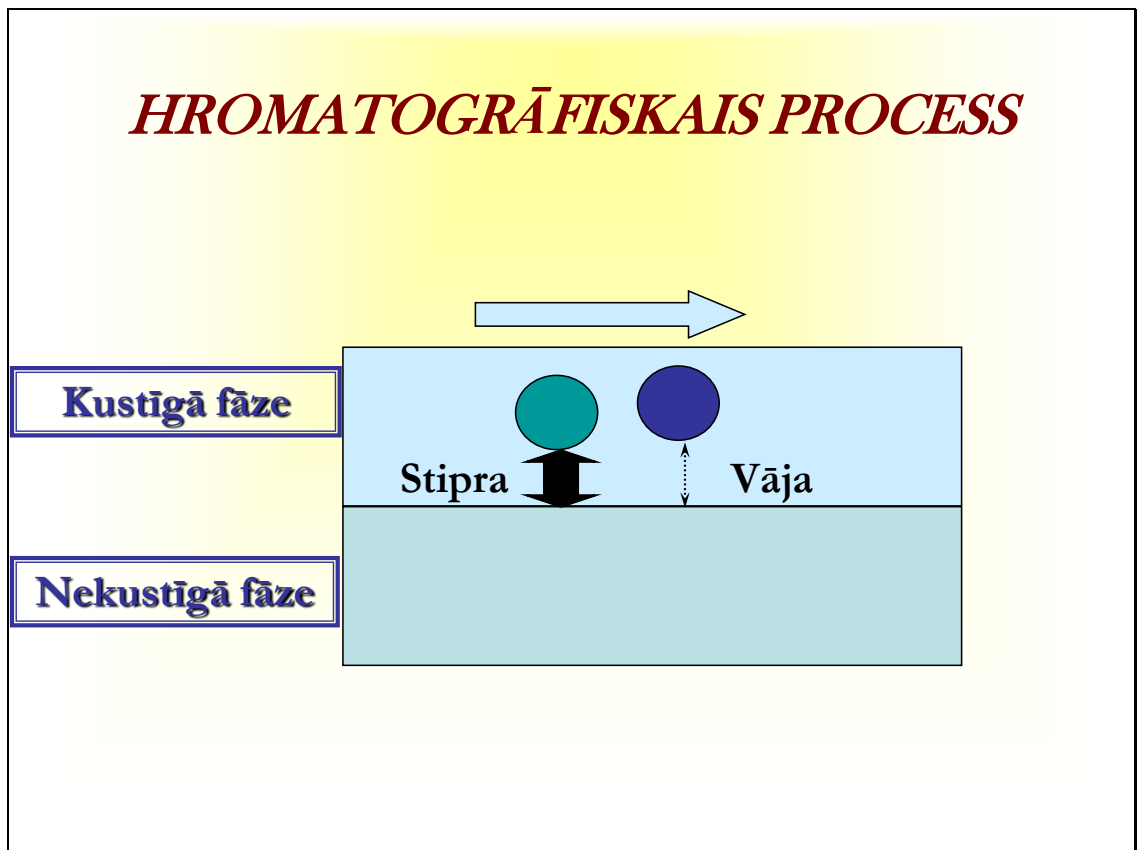


HROMATOGRAMMA-iegūtais attēls-**CHROMATOGRAM**

Slaidis 13

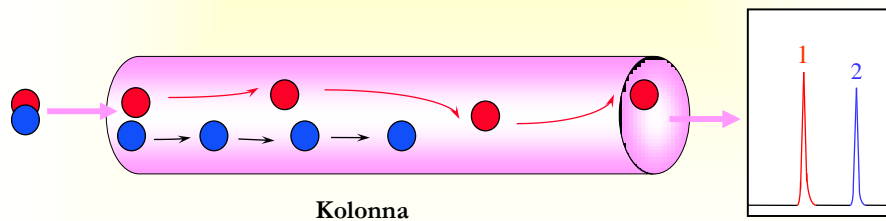


Slaidis 14



HROMATOGRĀFISKAIS PROCESS

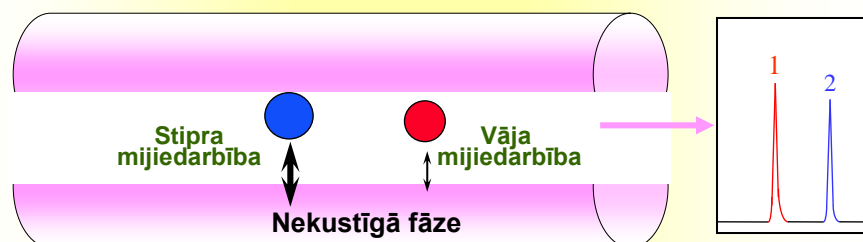
Savienojumus ir iespējams atdalīt, jo molekulas kolonnā pārvietojas ar dažādiem ātrumiem



<http://pharmacy2011foru.blogspot.com/>

HROMATOGRĀFISKAIS PROCESS

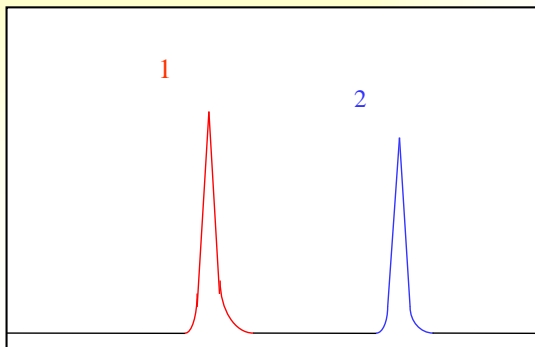
Kustīgā fāze →



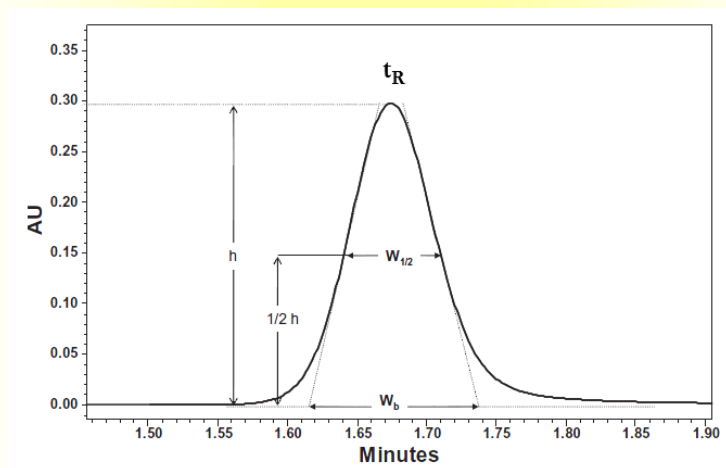
<http://pharmacy2011foru.blogspot.com/>

HROMATOGRAMMA UN TĀS BŪTĪBA

Eluējamos savienojumus kustīgā fāze pārvieto uz detektoru, kas to īpašības pārveido Gausa līknēs, kurām ir zvanveida forma. Līknes mēdz saukt par joslām un joslu kopumu no viena parauga – par hromatogrammu:



HROMATOGRAMMA UN TĀS BŪTĪBA

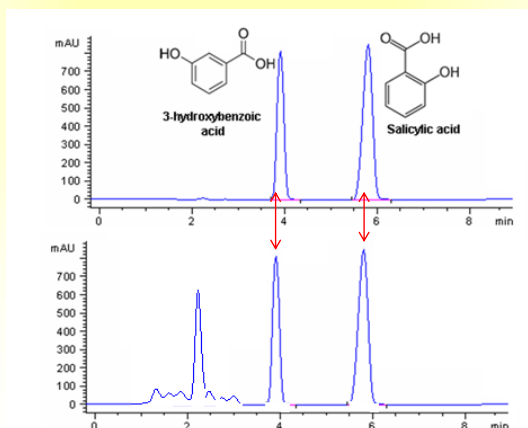


HROMATOGRAMMAS KVALITATĪVĀS ĪPAŠĪBAS

- Komponenta izdalīšanas laiks t_R vienmēr ir nemainīgs lielums vienādos hromatogrāfiskos apstākļos.
- Izdalīšanas laiks ir laika periods, kas paiet starp parauga ievadīšanu un maksimālās signāla intensitātes sasniegšanu.
- Hromatogrāfiskos apstākļus veido kolonnas izmēri, nekustīgās fāzes daba, kustīgās fāzes sastāvs un plūsmas ātrums, parauga lielums un kolonnas termostata temperatūra.

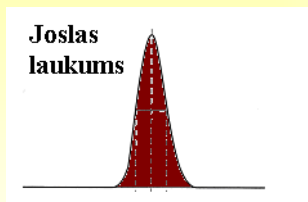
HROMATOGRAMMAS KVALITATĪVĀS ĪPAŠĪBAS

Joslai atbilstošu vielu var noteikt, ievadot standartvielu tādos pašos apstākļos un salīdzinot izdalīšanas laikus:



HROMATOGRAMMAS KVANTITATĪVĀS ĪPAŠĪBAS

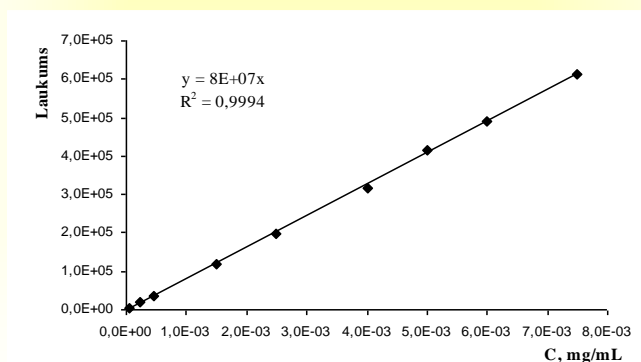
• *Joslās laukums un augstums ir proporcionāli ievadītā parauga daudzumam.*



• **Joslās lielums, ko rada komponents zināmā koncentrācijā, ir izmantojams nezināmas koncentrācijas parauga noteikšanai.**

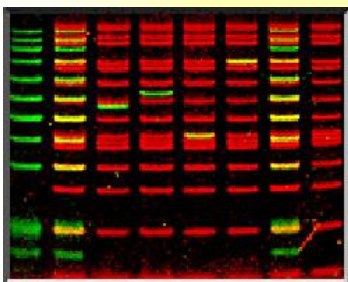
HROMATOGRAMMAS KVANTITATĪVĀS ĪPAŠĪBAS

Kalibrācijas grafiku var iegūt no joslu laukumiem vai augstumiem, tos izmērot šķīdumiem ar precīzi zināmu koncentrāciju:



HROMATOGRĀFIJAS VEIDI

Plānslāņa hromatogrāfija ir analītiska metode, kuru izmanto, lai analizētu un izdalītu savienojumus, kuri ir vai spēj būt krāsaini (piemēram, pigmenti).



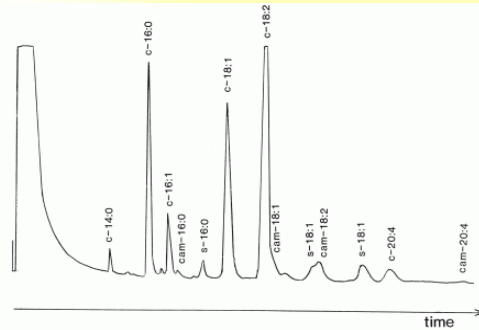
DNS joslas atdalītas, izmantojot PH



<http://www.chem.fsu.edu/chemlab/chm1050lmanual/chromatography/index.html>

HROMATOGRĀFIJAS VEIDI

Gāzu hromatogrāfija ir analītiska metode, kuru izmanto, lai analizētu un izdalītu tādus savienojumus, kurus viegli pārvērst gāzes fāzē vai tvaikos, bez to struktūras sadalīšanās.

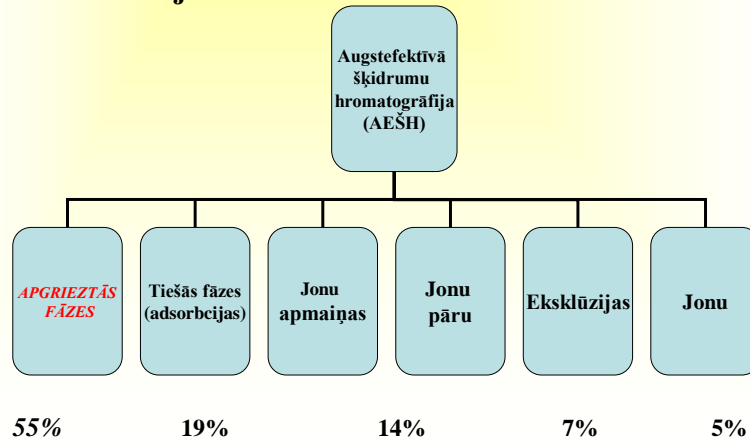


Nepiesātinātās taukskābes, atdalītas, izmantojot GH.

Bogaard et al., *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Mar. 1986, p. 523-530

HROMATOGRĀFIJAS VEIDI

Šķidrumu hromatogrāfija ir vispopulārākā hromatogrāfiskā metode, kuru izmanto, lai analizētu un izdalītu daudz un dažādus savienojumus.



KĀPĒC HROMATOGRĀFIJA?

- **Daudzpusīga** – iespējams izmantot daudz un dažādu paraugu analīzēm;
- **Ātra** – vienas analīzes ilgums var būt pat tikai 1min;



- **Atkārtojama** – pareizi izstrādātu un validētu metodi iespējams adaptēt ikvienā laboratorijā;
- **Jūtīga** - iespējams noteikt savienojumus *pg, ng* utt.

HROMATOGRĀFIJA PRAKSĒ

- **Farmācija** – antibiotikas, vitamīni, pretsāpju un nomierinošie līdzekļi, steroīdi;
- **Bioķīmija** - aminoskābes, proteīni, ogļhidrāti, tauki;
- **Kriminālistika** – narkotiskās vielas, indes, alkohols asinīs;
- **Klīnika** – žultskābes, zāļu metabolīti, estrogēni, urīna analīzes;
- **Pārtikas produkti** – saldinātāji, antioksidanti, piedevas, vitamīni, aflatoksīni;
- **Industrija** – policikliskie ogļūdeņraži, virsmas aktīvās vielas, krāsvielas;
- **Piesārņojums**- pesticīdi, herbicīdi, fenoli, polihlorētie bifenili.

*Augsti efektīvā šķidrumu
hromatogrāfija*

AEŠH

HPLC

AEŠH iekārtas



LC - Waters Alliance



LC-MS Waters Alliance

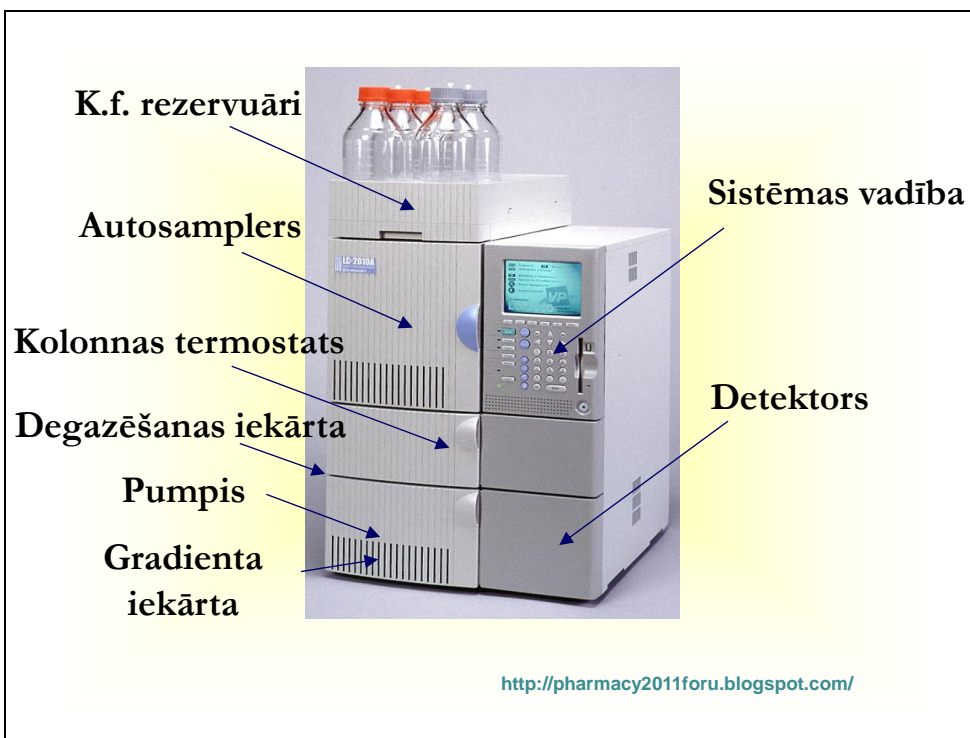
AEŠH iekārtas



Finningan Control

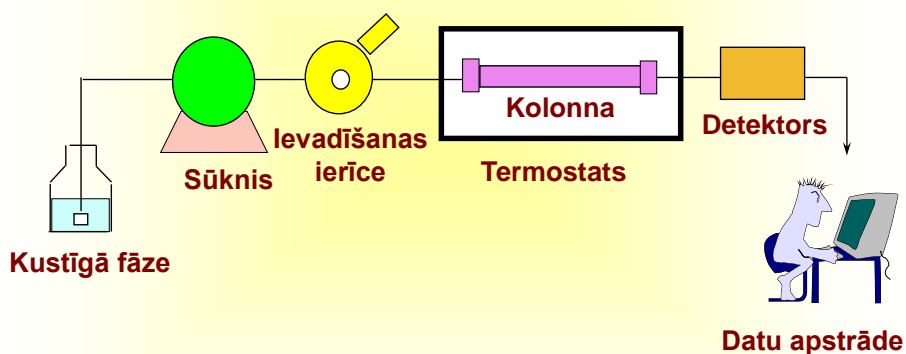


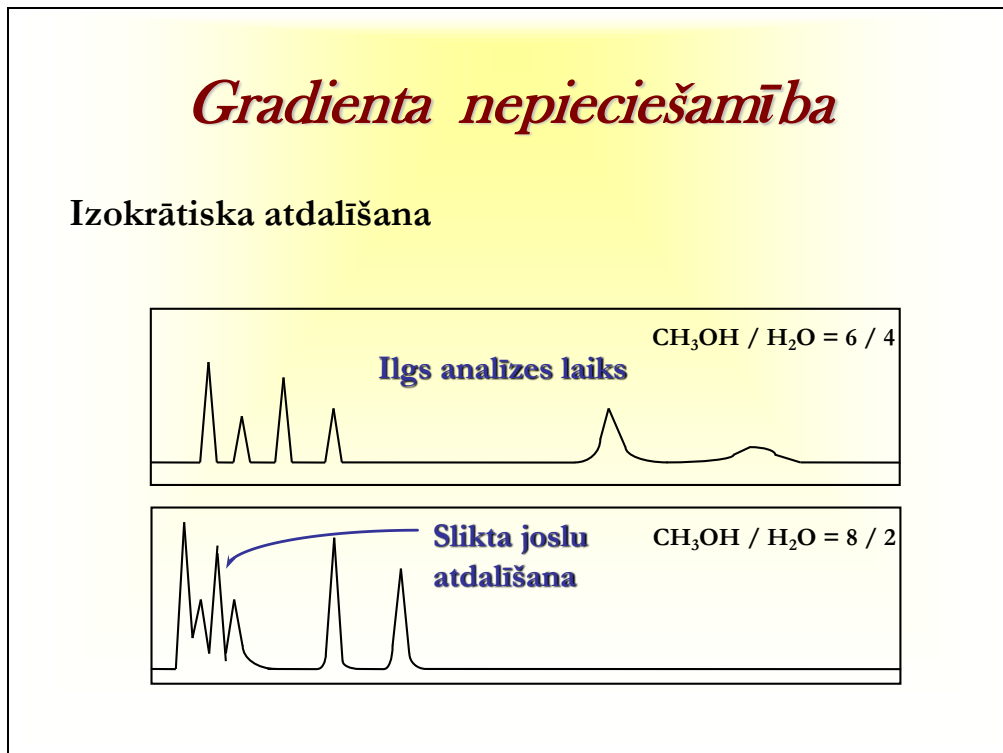
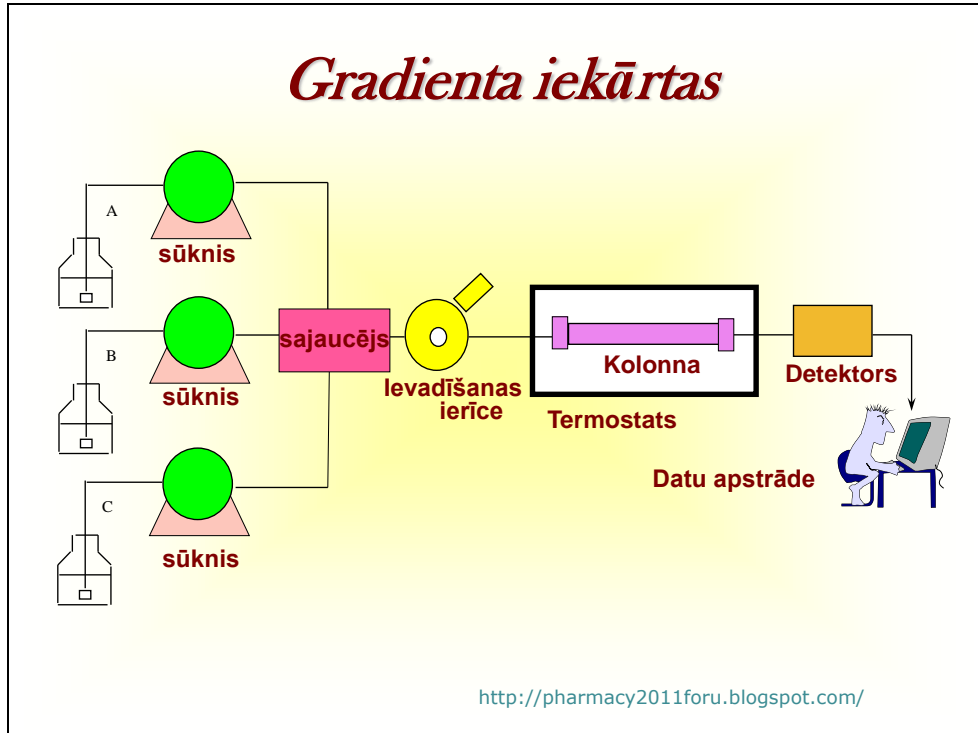
Agilent



- Sekmīga atdalīšana ir atkarīga no pareizi izvēlētas kustīgās fāzes (*eluenta*), tādēļ svarīgas ir tādas tās īpašības kā **stiprums**, **selektivitāte**.
- Tā kā ir liels skaits šķīdinātāju un no tiem iespējams iegūt vēl lielāku skaitu šķīdumu, racionālai izvēlei nepieciešama to klasifikācija atbilstoši būtiskajām īpašībām.

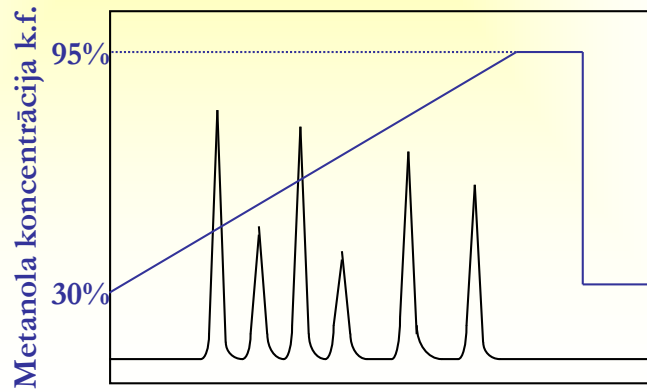
Izokrūtiskās iekārtas



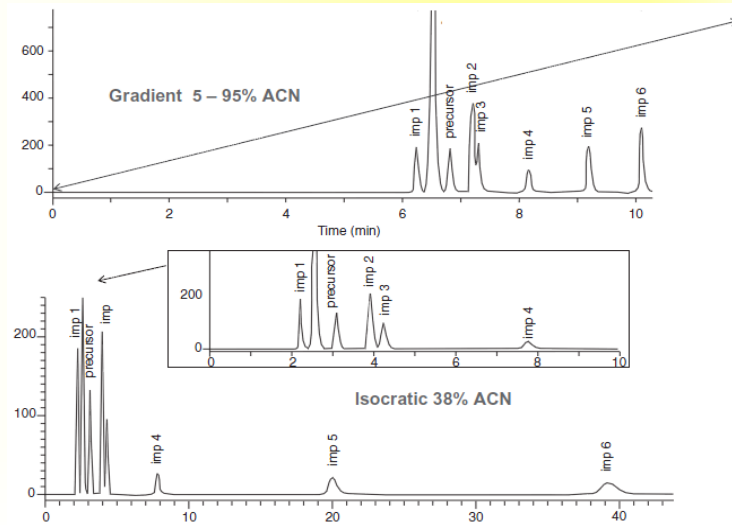


Gradients nepieciešamība

Sastāva maiņai ir jānosaka kustīgās fāzes stipruma pieaugums, lai panāktu to joslu izdalīšanos, kuras citādi izdalītos pārāk vēlu, vai pat neizdalītos nemaz



Gradients nepieciešamība



Sūkņis

- Sūkņa uzdevums ir nemainīgas un atkārtojamas *k.f.* plūsmas piegāde hromatogrāfiskai kolonnai
- Tā kā ŠH kolonnas pildītas ar maza izmēra sorbenta daļiņām (0,5-3-10 μm), tām piemīt liela pretestība *k.f.* plūsmai



Parauga ievadišana

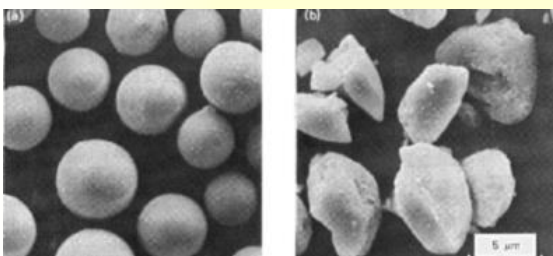
- Svarīgs faktors iekārtu augstās efektivitātes nodrošināšanā ir pareizai parauga ievadišanai kolonnā
- Paraugs ir jāievada šauras joslas veidā un ievadišanas ietekmei uz joslas paplašināšanos ir jābūt pēc iespējas mazākai
- Parauga ievadišanas veids relatīvi īsās (<15 cm) kolonnās ar mazu (<10 μm) sorbenta daļiņu diametru var būt ar kritisku nozīmi, jo tādā gadījumā joslas ir īpaši šauras
- Nepareiza ievadišana var izraisīt efektivitātes kritumu, pat ja kolonna ir ļoti kvalitatīva

Automātiskās paraugu ievadīšanas ierīces

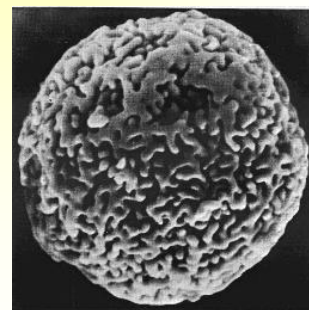


Kolonnas

Nekustīgā fāze ir ciets, porains, aktīvas virsmas materiāls sīku daļiņu veidā, vai plāns šķidrums slānītis, ar ko pārklāts cietais adsorbents vai kolonnas iekšējās sienas.



W.R.Melander, C.Horvath, Reversed-Phase Chromatography, in HPLC Advances and Perspectives, V2, Academic Press, 1980.



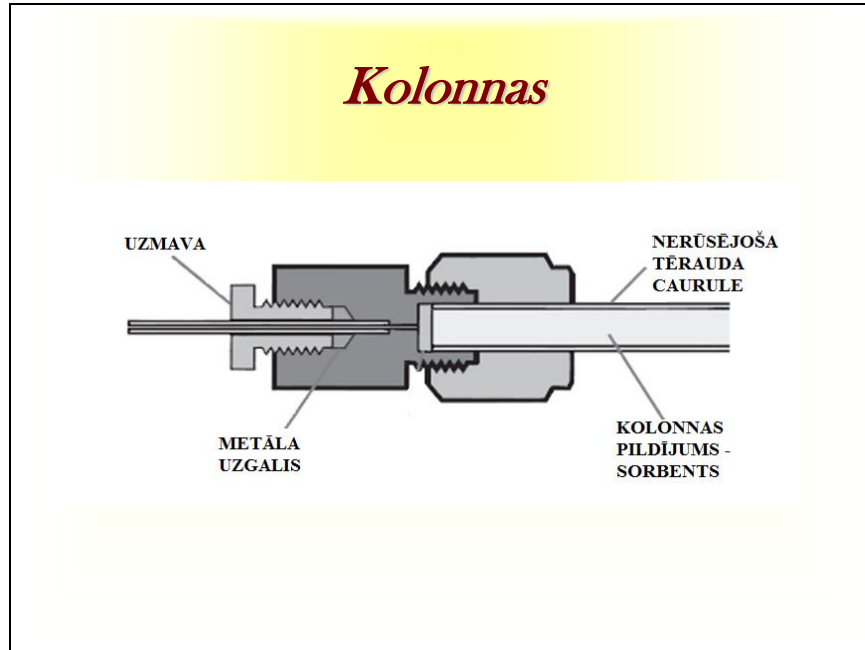
K.K.Unger, Porous silica, Elsevier, 1979

Slaidis 42

Vielu izdalīšanas kolonnas 20.gs. 50.-tajos.



Slaidis 43



Slaidis 44

Kolonnas

1. Ražotājs
2. Pamatmateriāls kolonnu pildījumam
3. Sorbenta ligandu tips
4. Iekšējais diametrs
5. Garums
6. Sorbenta daļiņu izmērs
7. Sorbenta poru izmērs

1 2 3

↓ ↓ ↓

Waters UPLC™ BEH C18

2.1x100mm, 1.7um, 130A

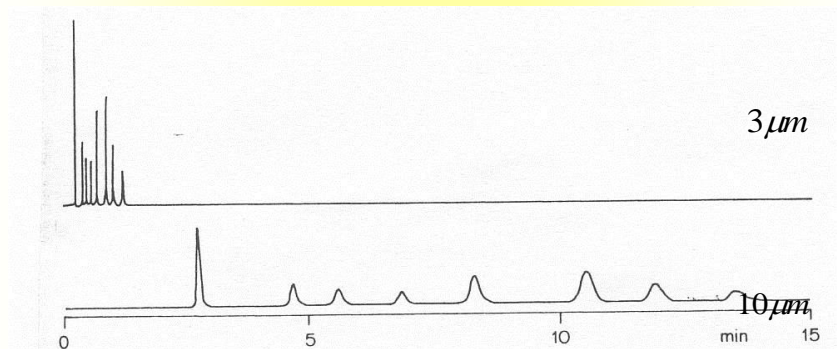
↑ ↑ ↑ ↑

4 5 6 7

www.waters.com

Slaidis 45

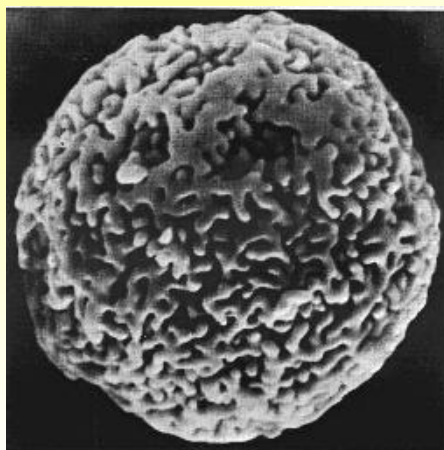
Sorbenta daļiņu izmērs



Slaidis 46

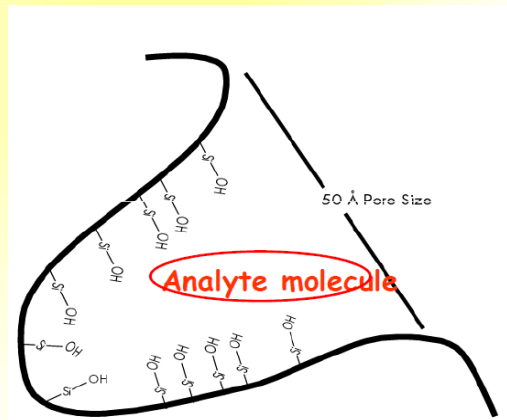
Sorbenta daļiņu izmērs

[K.K.Unger, *Porous silica*, Elsevier, 1979]



Sorbenta poru izmērs

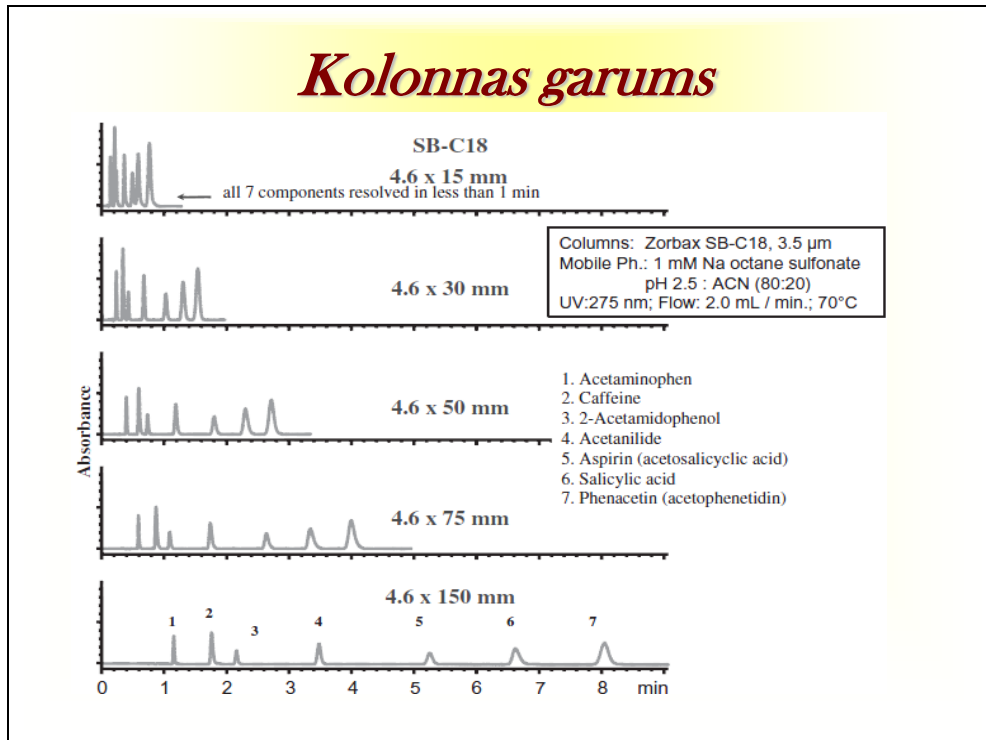
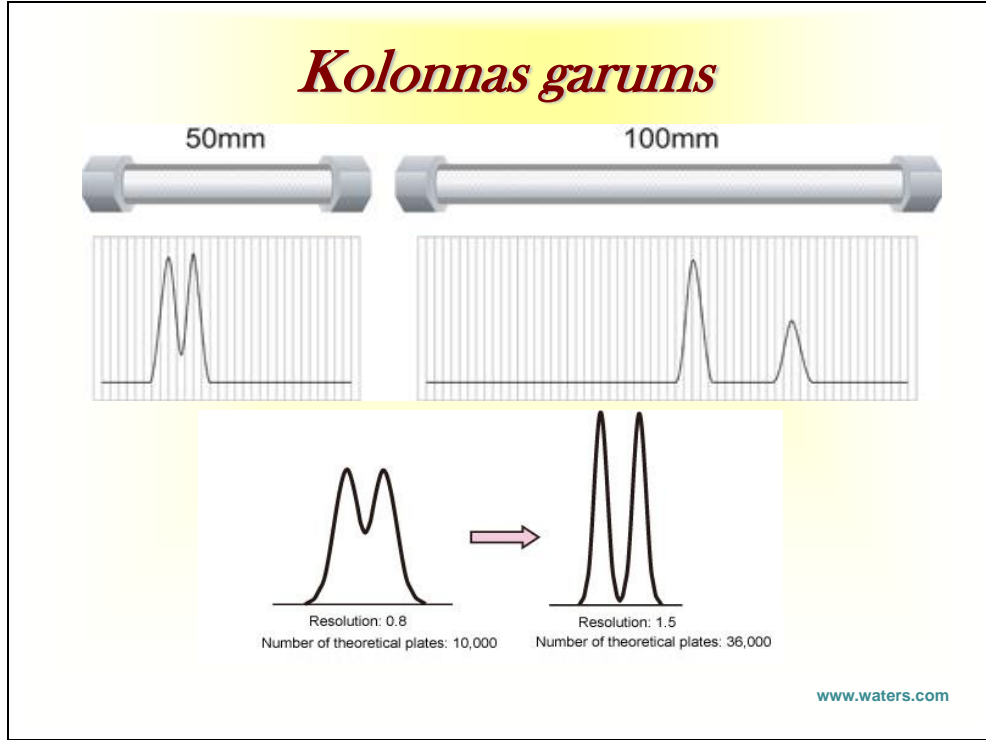
Arī porās notiek
hromatogrāfiskais
līdzsvars



Paraugam jāspēj iekļūt porās, lai notiktu pilnīgs
hromatogrāfiskais līdzsvars uz sorbenta virsmas

Kolonnas garums



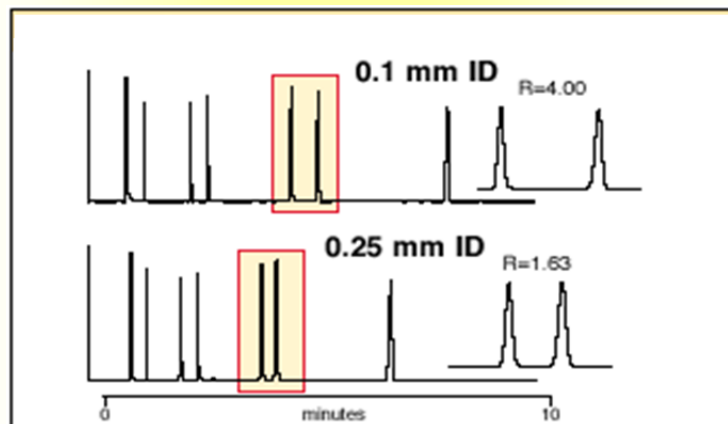


Kolonnas iekšējais diametrs

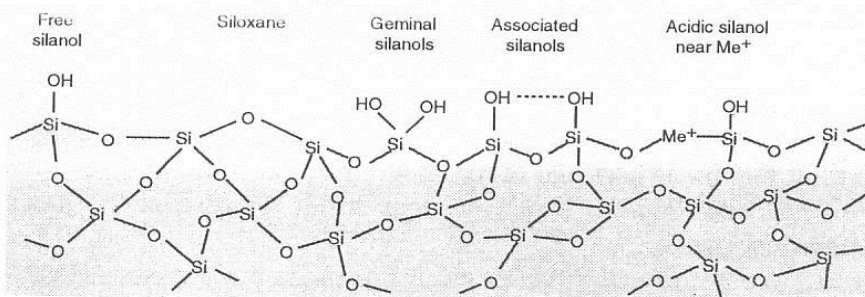
4.6mm id

2.1mm id

Kolonnas iekšējais diametrs



Silikagēla uzbūve

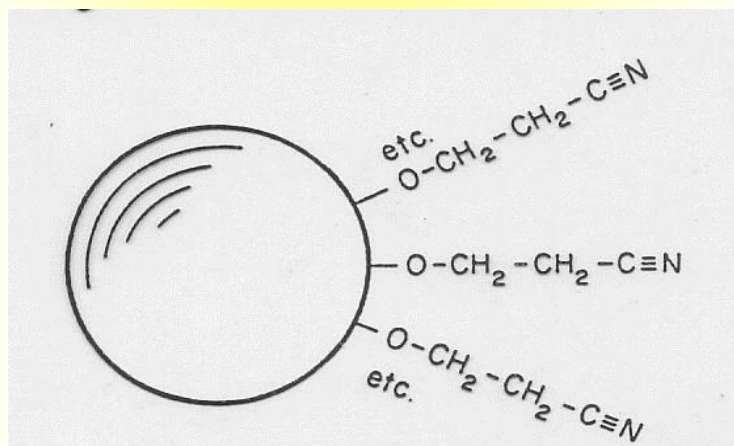


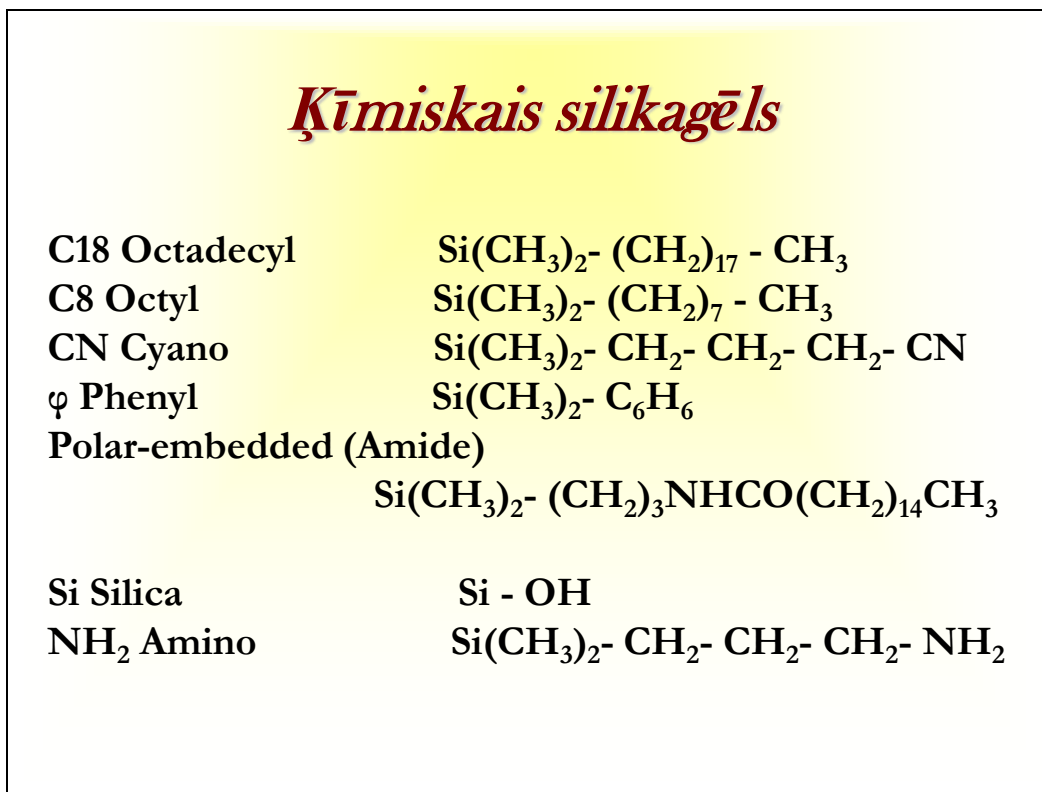
Tas ir sorbents ar izcilām īpašībām

Uz tā pamata var iegūt neskaitāmas ķīmiski saistītās nekustīgās fāzes.

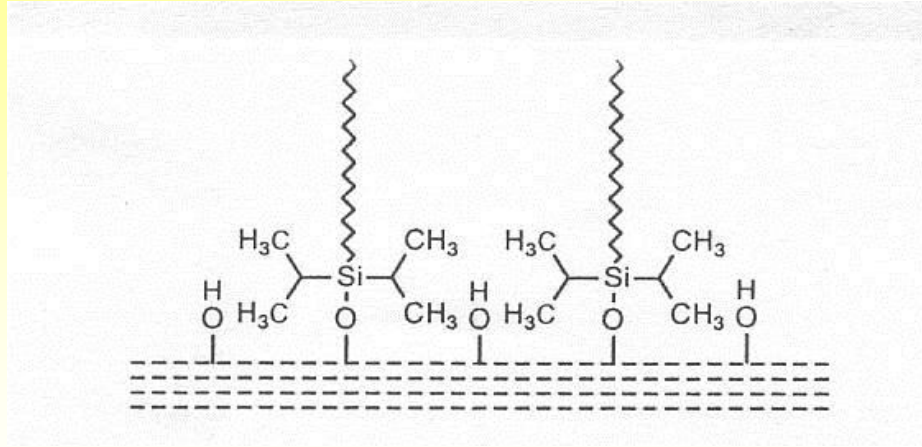
Tas sastāv no *Si* atomiem, kas trīsdimensionālā struktūrā saistīti ar skābekļa atomiem.

Ķīmiskais silikagēls

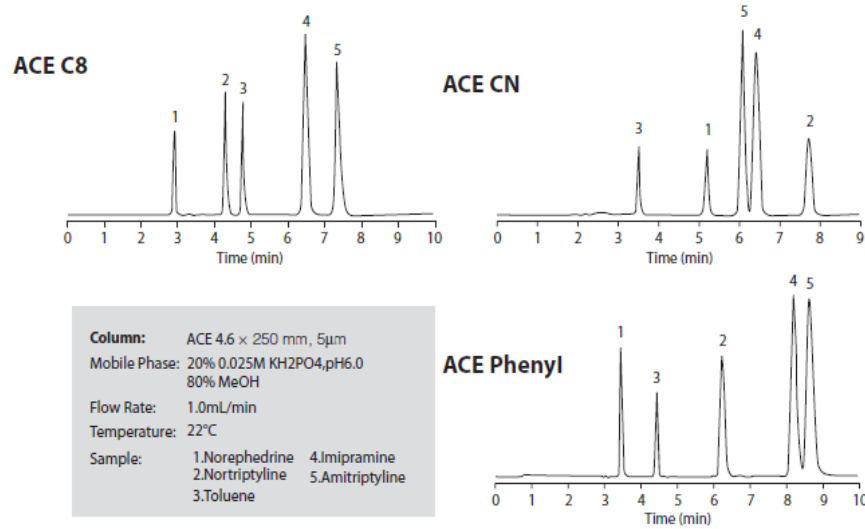




ODS, C18 vai oktadecilsilikagēls



Kīmiskais silikagēls



Detektors

- **Detektora uzdevums ir noteikt, kad vielas josla ir izdalījusies no kolonnas.**
- Detektors nepārtraukti mēra kustīgās fāzes sastāvu, pārvēršot tā maiņu elektriskajā signālā, kurš nonākot datorā vai pašrakstītājā, parāda novirzi no nulles līnijas.

Detektors

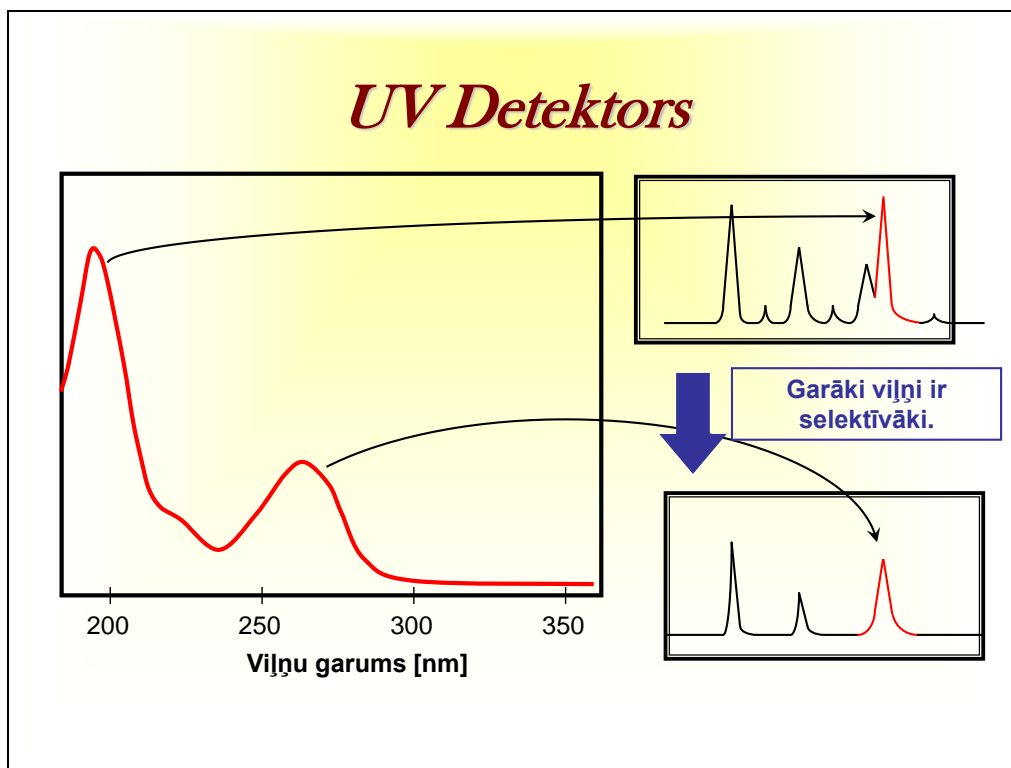
UV-VIS	Ultraviolet / Visible detector
PDA	Photodiode Array detector
RF	Fluorescence detector
CDD	Conductivity detector
RID	Refractive Index detector
ECD	Electrochemical detector
ELSD	Evaporative light scattering detector
MS	Mass spectrometer detector

UV Detektors



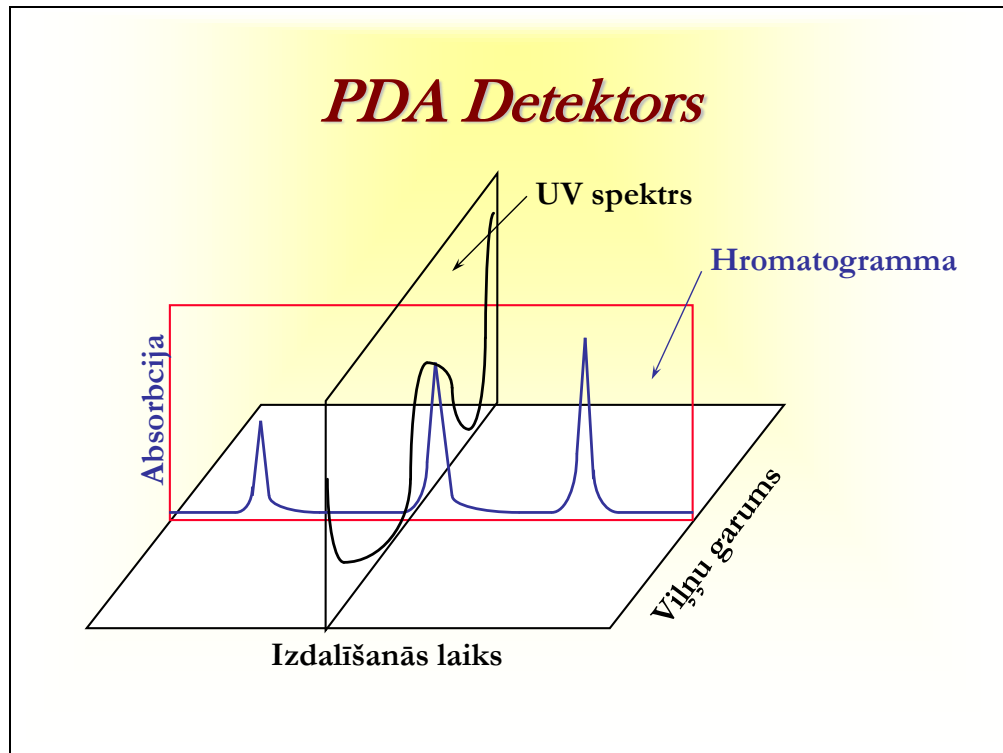
UV Detektors

UV detektors ļauj identificēt tikai tos savienojumus, kuri kaut nedaudz absorbē UV starus izvēlētajā viļņu garumā. Tāpēc šāds detektors ir selektīvs



PDA Detektors

Var izvēlēties viļņa garumu atkarībā no nosakāmo savienojumu dabas. Traucējošās joslas iespējams izslēgt. Pareizi izvēloties detektēšanas apstākļus, bieži vien iespējams veikt kvantitatīvo analīzi joslām, kuras ir slikti atdalītas no citām. Detektēšanas viļņa garumu var mainīt analīzes laikā.



Detektors

Fluorescences detektoru jutība ir 1000 reižu augstāka nekā UV detektoriem. Savienojumus, kuri paši fluorescē, vai kurus var pārvērst fluorescējošos atvasinājumus, iespējams noteikt ar šiem ļoti jutīgajiem un specifiskajiem detektoriem.

Masspektrometrija

- **Definīcija:**

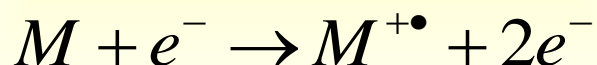
tā mēra masas un lādiņa attiecību analizējamā savienojumā;

Masspektrometrija ļauj ne tikai veikt kvantitatīvo un kvalitatīvo pētāmo objektu analīzi, bet arī noskaidrot to uzbūvi, nosakot masas fragmentu joniem, kas veidojas jonizācijas gaitā un jonu atdalāšanas procesā.

Masspektrometrija

- **Darbības princips:**

Visos gadījumos noteikta enerģijas forma tiek pārnesta uz analizējamās vielas molekulām, tās jonizējot



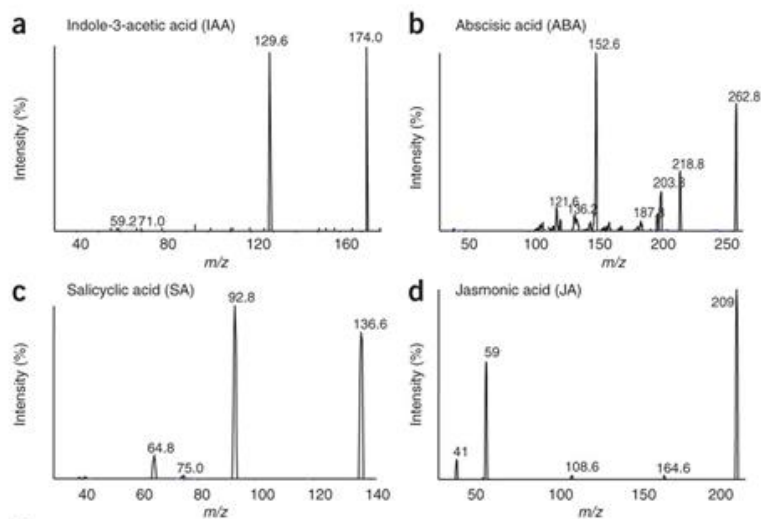
Masspektrometrija

- Darbības princips:**

Klasiskajās elektronu jonizācijas metodēs daži no vielas molekulārajiem joniem “uzsprāgst”, sadaloties daudzos fragmentjonus, kuri kopā ar atlikušajiem molekulārajiem joniem izveido masas spektru. Katra savienojuma masas spektrs ir unikāls un to var izmantot par vielas ķīmiskajiem “pirkstu nospiedumiem”.

Masspektrometrija

- LC-MS atainojums:**



Masspektrometrija

- **Darbības princips:**

Paraugus iekārtā var ievadīt tiešā veidā, ja tie ir tīras cietvielas vai gaistoši šķidrumi. Ja nosakāmās vielas ir maisījumā, tās atdala ar gāzu (*GC*) vai šķidrumu (*HPLC*) hromatogrāfiju, kapilāro elektroforēzi vai kādu citu metodi.



Masspektrometrija

- **Jonizācijas metodes:**

1. Jonizācija ar elektronu triecienu (EIJ).
2. Ķīmiskā jonizācija.
3. Selektīvā jonizācija.
4. Jonizācija ar lādiņu apmaiņu.
5. Ķīmiskā jonizācija atmosfēras spiedienā (ACPI).
6. Matricas veicinātā lāzera desorbciija/jonizācija (MALDI).

Masspektrometrija

- **Jonizācija ar elektronu triecienu:**

Elektroizsmidzināšanas jonizācija ir „maiga” jonizācijas tehnika, kas nodrošina jonu pārnesei no šķidrās uz gāzes fāzi.

Šo jonizācijas metodi plaši izmanto lielu, negaistošu molekulu jonizācijai.

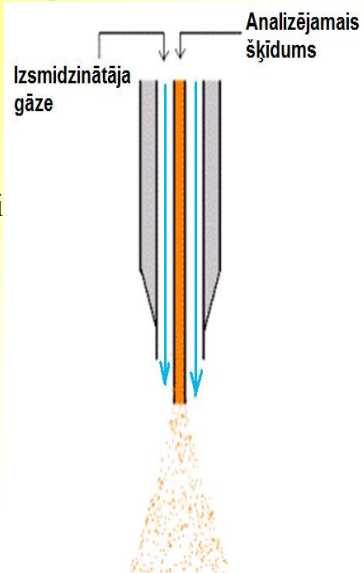
Mūsdienās EIJ ir viena no vadošajām jonizācijas metodēm, kuru izmanto šķidrums hromatogrāfijas – masspektrometrijas analīzēs.

Var izmantot negaistošu molekulu analīzei, kuras nav iespējams analizēt ar gāzu hromatogrāfiju

Masspektrometrija

- **Jonizācija ar elektronu triecienu:**

Enerģiju, kas nepieciešama jonizācijai un fragmentācijai, analizējamās vielas saņem ar elektronu triecienu, kuru enerģija ir 70 eV un kurus emitē sakarsēts kvēldiegs.



Masspektrometrija

- **Jonizācija ar elektronu triecienu:**

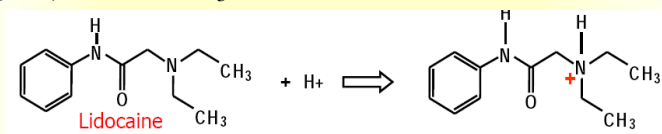


Masspektrometrija

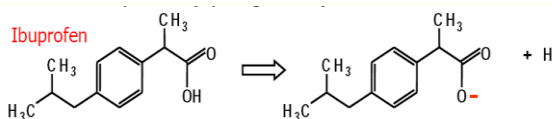
- **Jonizācija ar elektronu triecienu:**

Mainot kapilāram pievadītās strāvas polaritāti, iespējams iegūt pozitīvus vai negatīvus jonus.

Pozitīvi joni veidojas, ja molekulai piesaistās pozitīvi lādētas daļiņas (H^+ , Na^+ , NH_3^+):



Negatīvi joni veidojas, ja no molekulas atšķēļas protons:



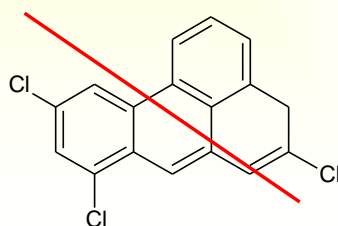
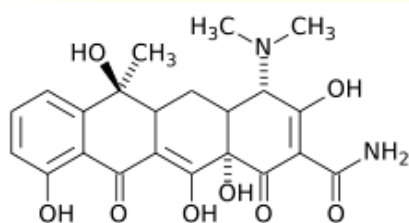
Masspektrometrija

- **Jonizācijas ar elektronu triecienu nosacījumi:**

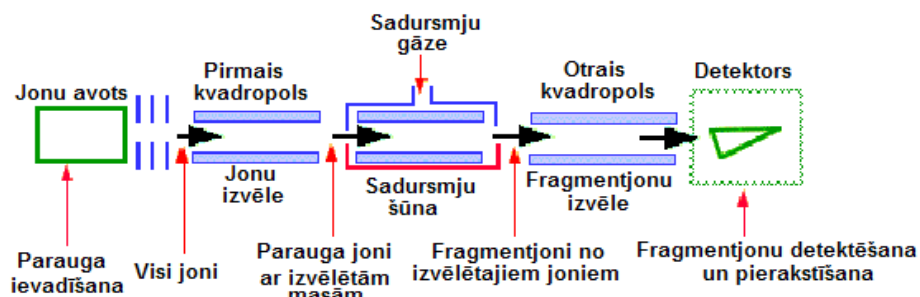
Šķīdumiem jābūt gaistošiem (MeOH, ACN, H₂O);

Kustīgās fāzes piedevām jābūt gaistošām (amonija formiāts, tetrahloretilēnskabe utt.);

Molekulā jābūt hetero atomam.

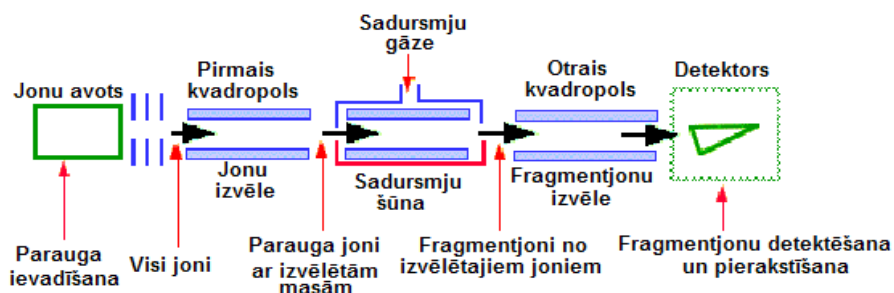


Masspektrometrija



Tandēmmasspektrometrs (MS/MS) spēj veikt vairākkārtīgu masspektrometriju

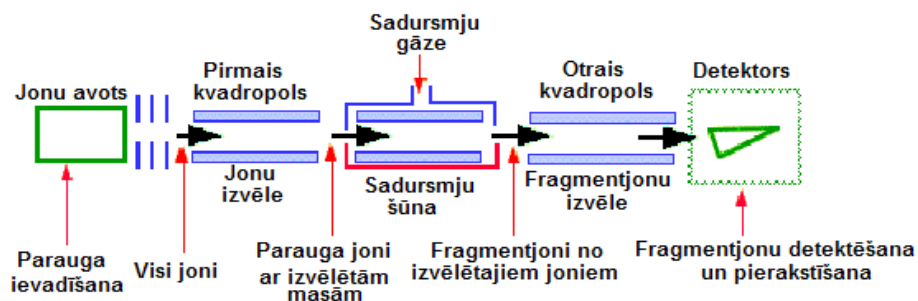
Masspektrometrija



Pirmais masas analizators izolē savienojumu no citām molekulām, kas ienāk masspektrometrā.

Otrais masu analizators stabilizē jonus, kamēr tie, saduroties ar inertu gāzi, veido fragmentus.

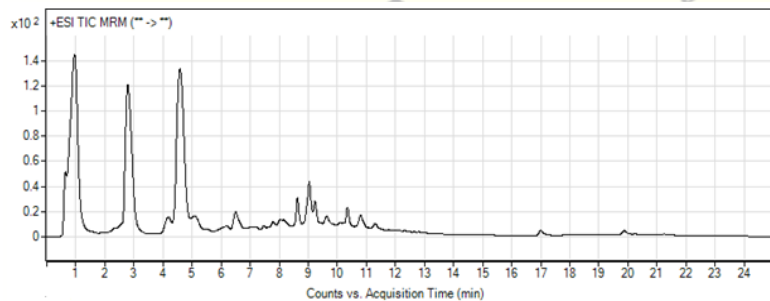
Masspektrometrija



Trešais masu analizators «sakārto» savienojuma radītos fragmentus.

Slaidis 81

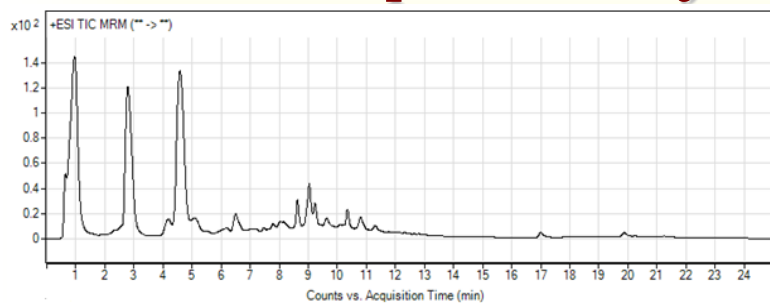
Masspektrometrija



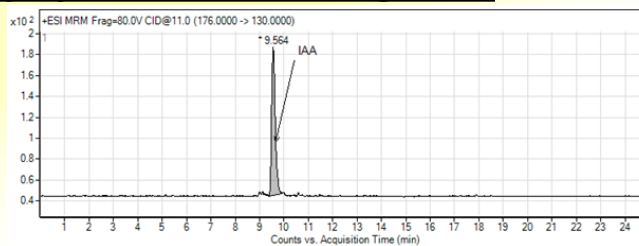
Kopējās jonu strāvas hromatogramma

Slaidis 82

Masspektrometrija



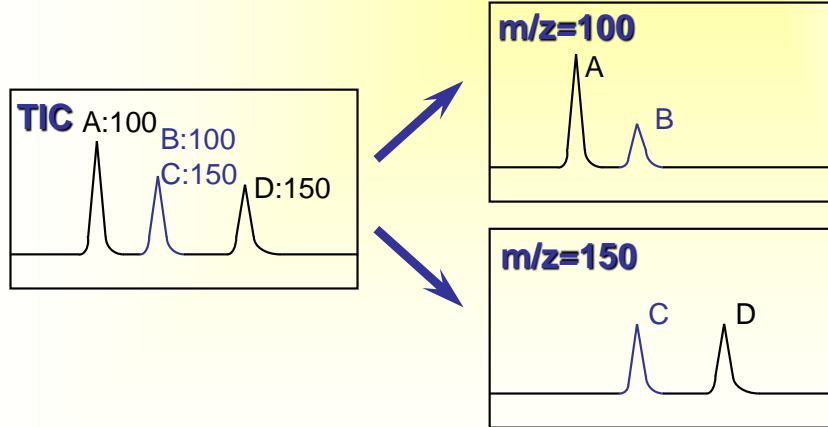
Kopējās jonu strāvas hromatogramma



MRM hromatogramma

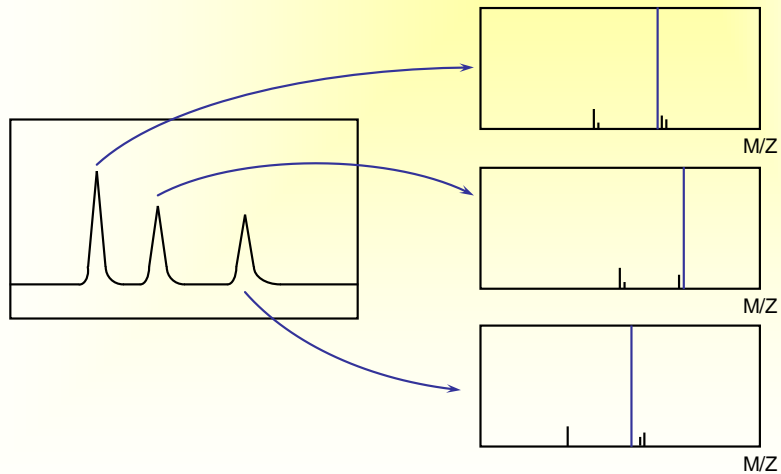
Masspektrometrija

Kvantitatīvā analīze

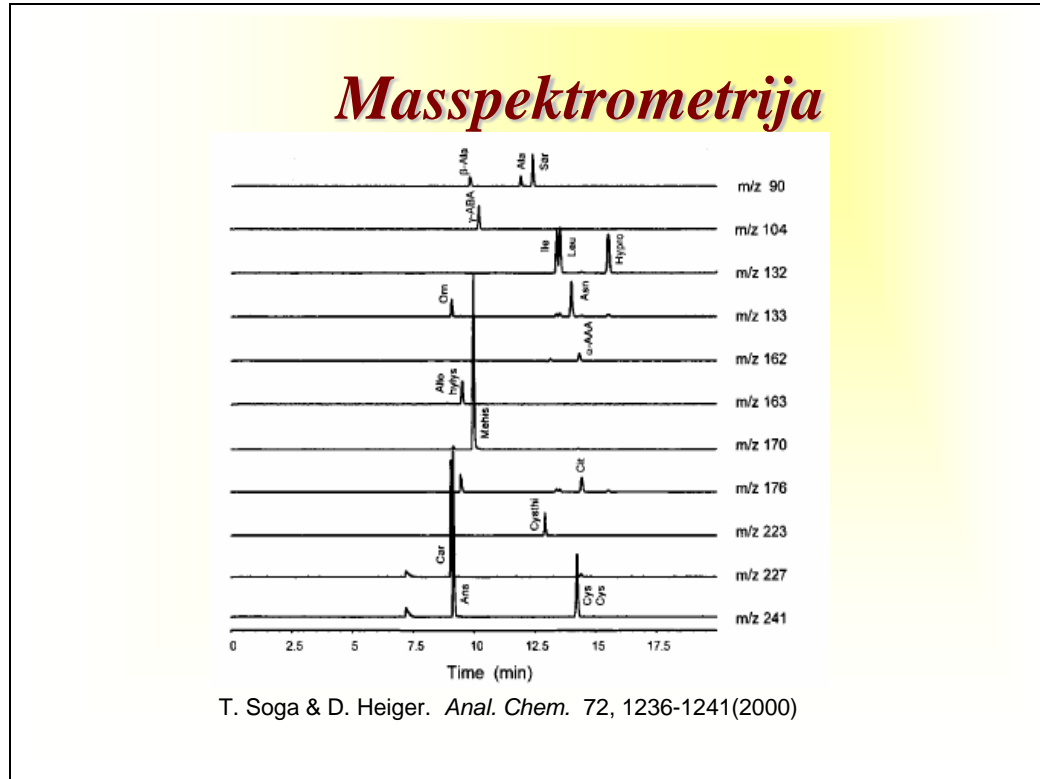


Masspektrometrija

Kvalitatīvā analīze



Slajds 85



Slajds 86



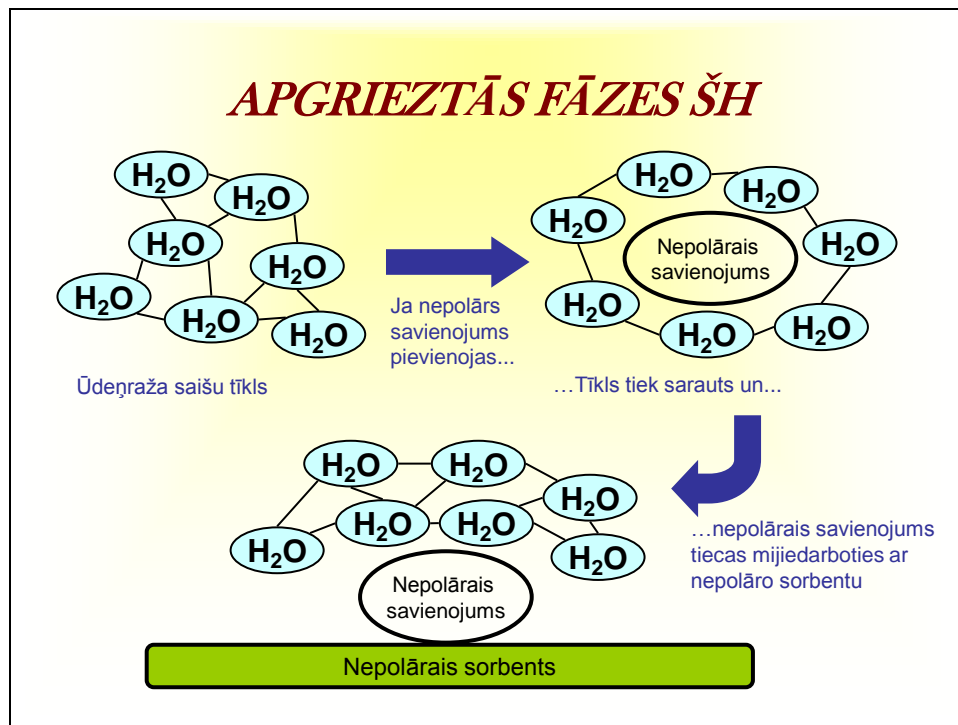


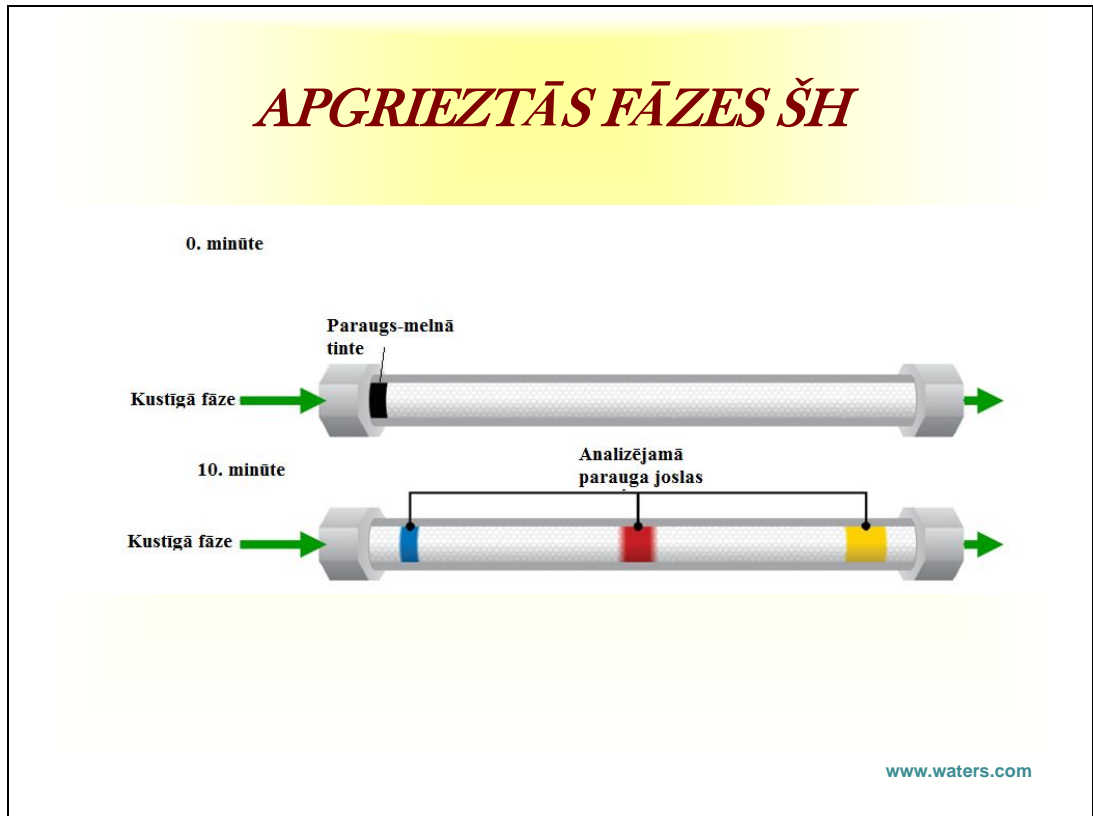
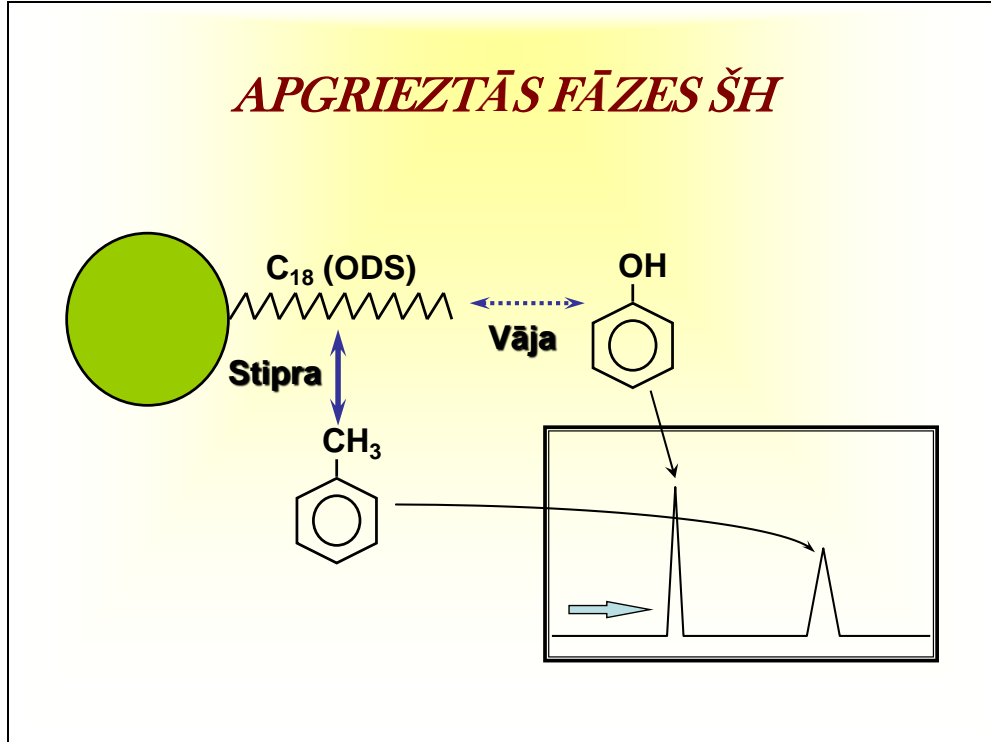
APGRIEZTĀS FĀZES ŠH

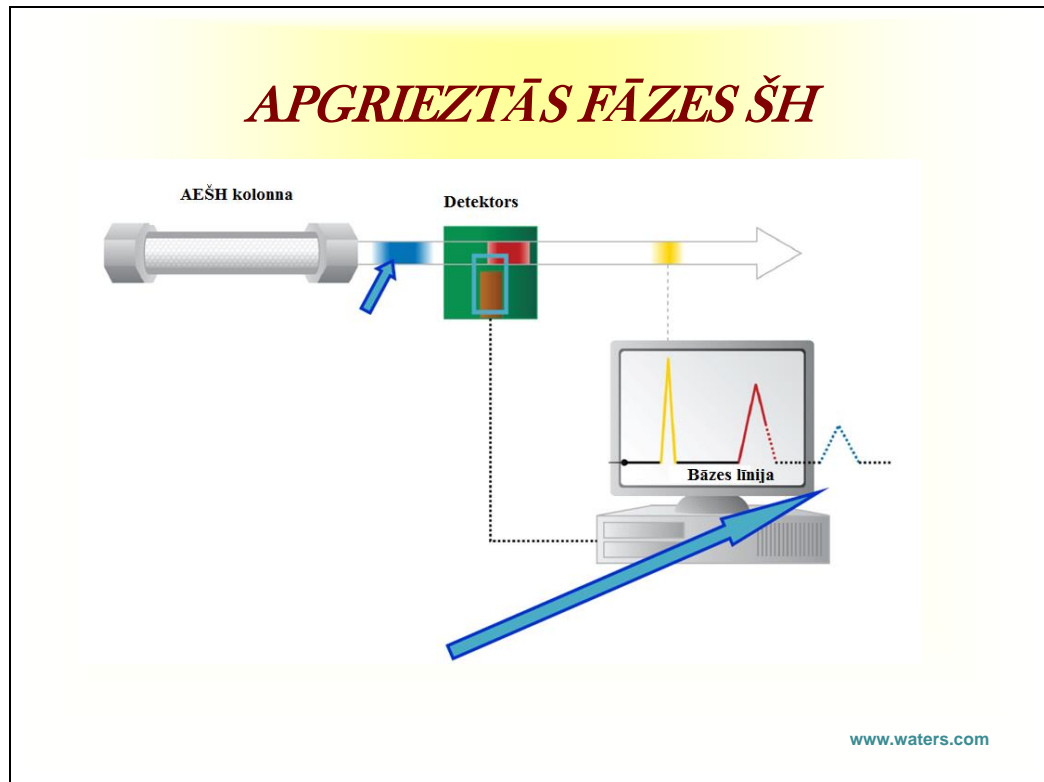
- **Hromatogrāfijas pamatprincips balstās uz hidrofobitātes mijiedarbībām:**

**nepolāra stacionārā fāze polāra kustīgā fāze
relatīvi nepolārs analizējamais paraugs**

- **Izdalīšanās laiki ir jo lielāki, jo analizējamā viela ir nepolārāka.**







KĀPĒC AFŠH IR VISPOULĀRĀKĀ?

- Daudz paraugu ir ūdenī šķīstoši
- Daudz un dažādu sorbentu pieejamība
- Vienkāršas kustīgās fāzes
- Izdalīšanās selektivitāti var panākt mainot k.f. stiprumu

ŠH metožu pielietojums augu hormonu, metabolītu un citu savienojumu analīzē

Metodes izvēle

Viegli noteikt savienojumu:

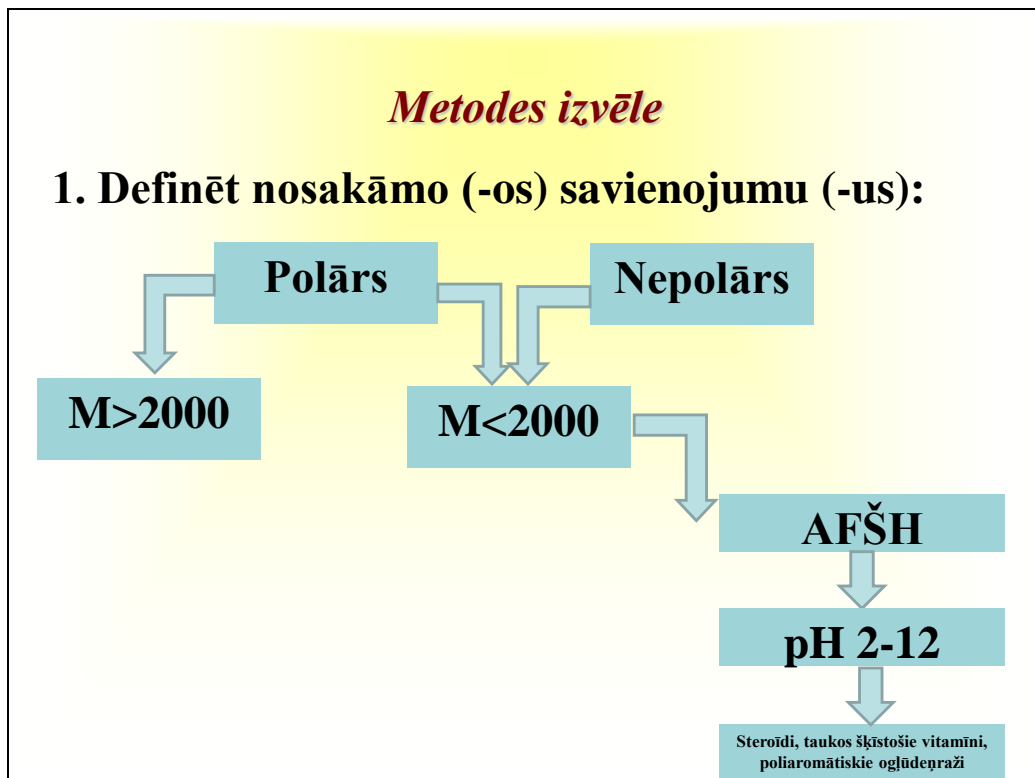
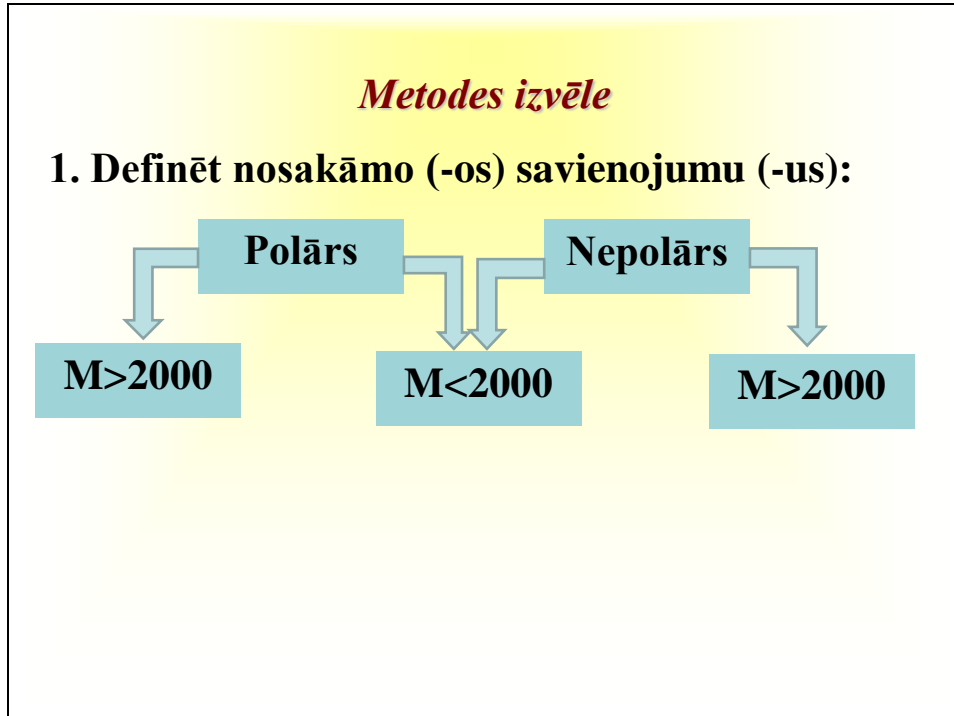
**ir zināma struktūra, molu masa;
ir informācija literatūrā;
ir standartviela.**

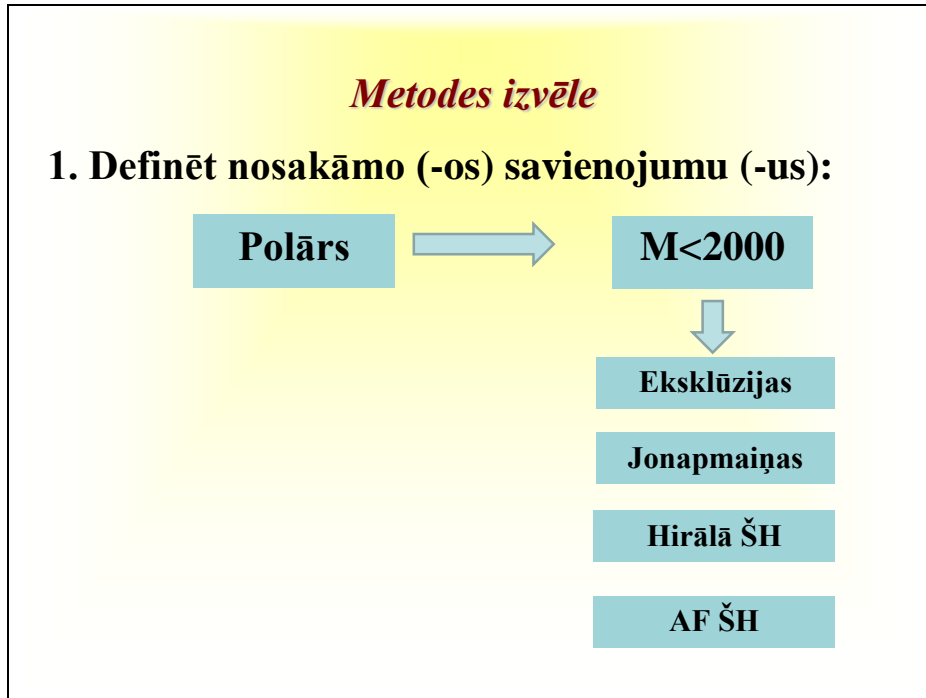
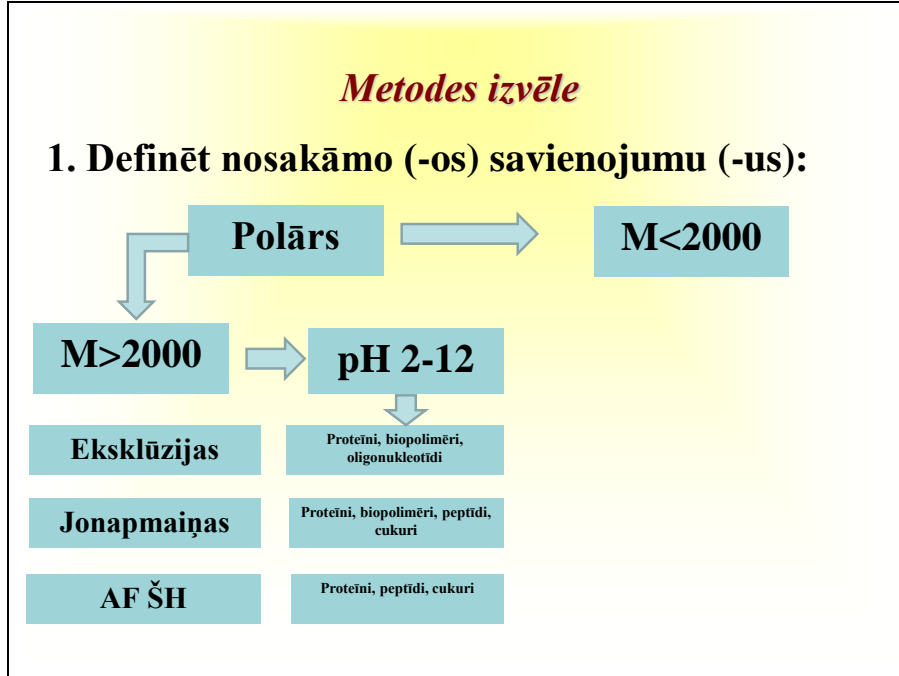
Zināms, ka paraugā tā
koncentrācija ir niecīgā
daudzumā.

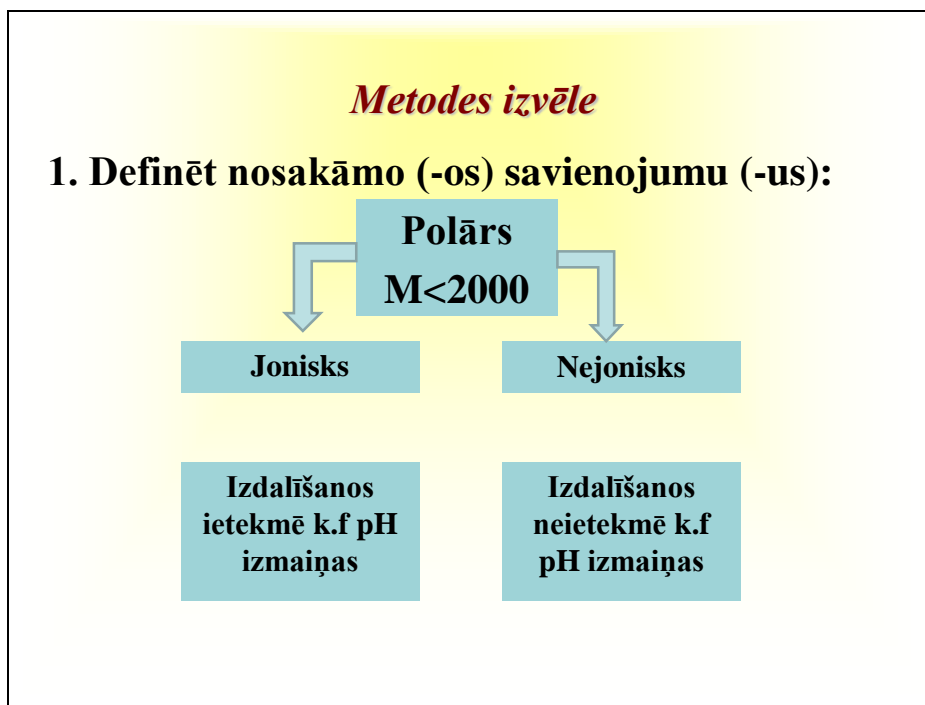
Zināms, ka paraugā tā
koncentrācija ir pietiekamā
daudzumā.

Grūti noteikt savienojumu:

**nav standartvielas;
nav informācijas literatūrā;
nav zināma struktūra, molu masa.**







Metodes izvēle

1. Definēt nosakāmo savienojumu (-us):

SALICILSKĀBE - Salicylic acid

Molekulārā formula - $C_7H_6O_3$

Molu masa - $138.12 \text{ g mol}^{-1}$ ($M < 2000$)

Šķīdība – ūdens, acetonitrils, metanols

Savienojuma polaritāte – vidēji polāra (Polārs)

pH ietekme - ?

Metodes izvēle**2. Definēt noteikšanas metodi un apstākļus****AF ŠH*****Ja ir pieejams standarts***Sorbents: Kustīgā fāze: Detektēšana:

C18

A:H₂O

UV

B: ACN, MeOH

gradients no 5%B-100%B

Metodes izvēle**2. Definēt noteikšanas metodi un apstākļus****AF ŠH*****Ja nav pieejams standarts***Sorbents: Kustīgā fāze: Detektēšana:

C18

A:H₂O

MS

B: ACN, MeOH

gradients no 5%B-100%B

Metodes izvēle

2. Definēt noteikšanas metodi un apstākļus

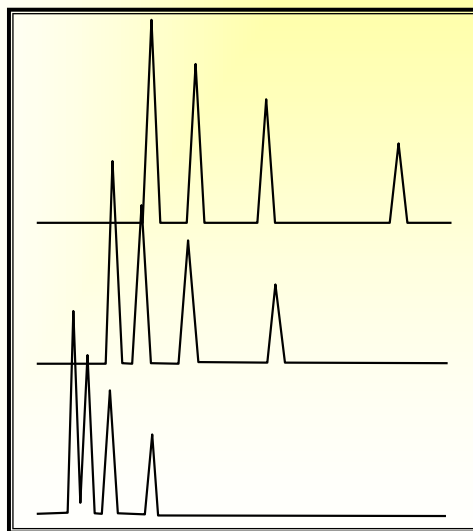
Ja rezultāts neapmierina

AF ŠH

<i>Sorbents:</i>	<i>Kustīgā fāze:</i>	<i>Detektēšana:</i>
C8	A: H ₂ O + pHbuferis	FLD, MS utt
CN	B: ACN, MeOH gradients / izokrātika	

Metodes izvēle

2. Definēt noteikšanas metodi un apstākļus



K.f: Metanols / Ūdens

60/40

70/30

80/20

Metodes izvēle

2. Definēt noteikšanas metodi un apstākļus

- Skābes zaudē protonu un kļūst jonizētas, kad pH palielinās;
- Bāzes – iegūst protonu un kļūst jonizētas, kad pH samazinās

Metodes izvēle

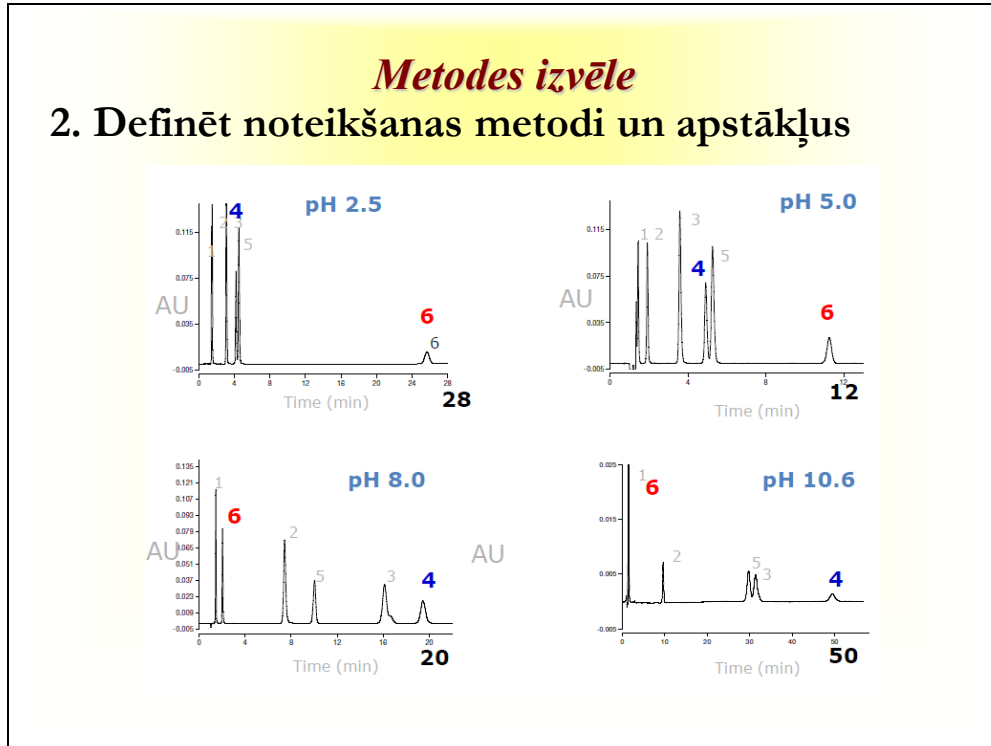
2. Definēt noteikšanas metodi un apstākļus

Skābs ↑
k.f pH
↓ Bāzisks

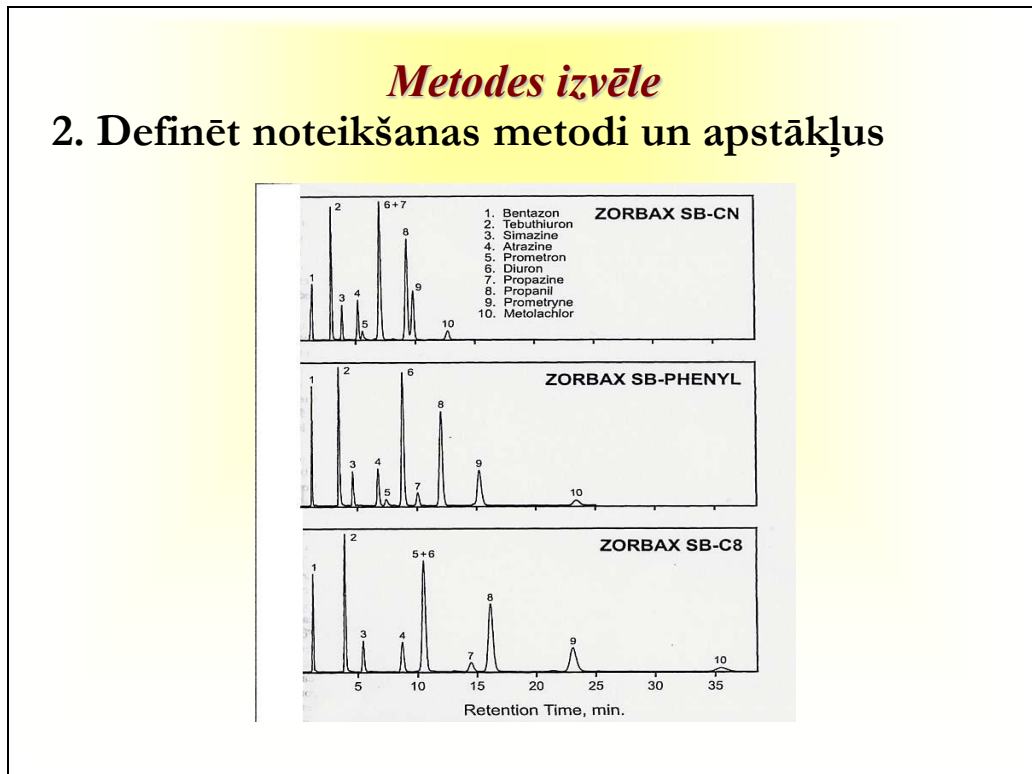
COOH
izdalīšanās laiks palielinās

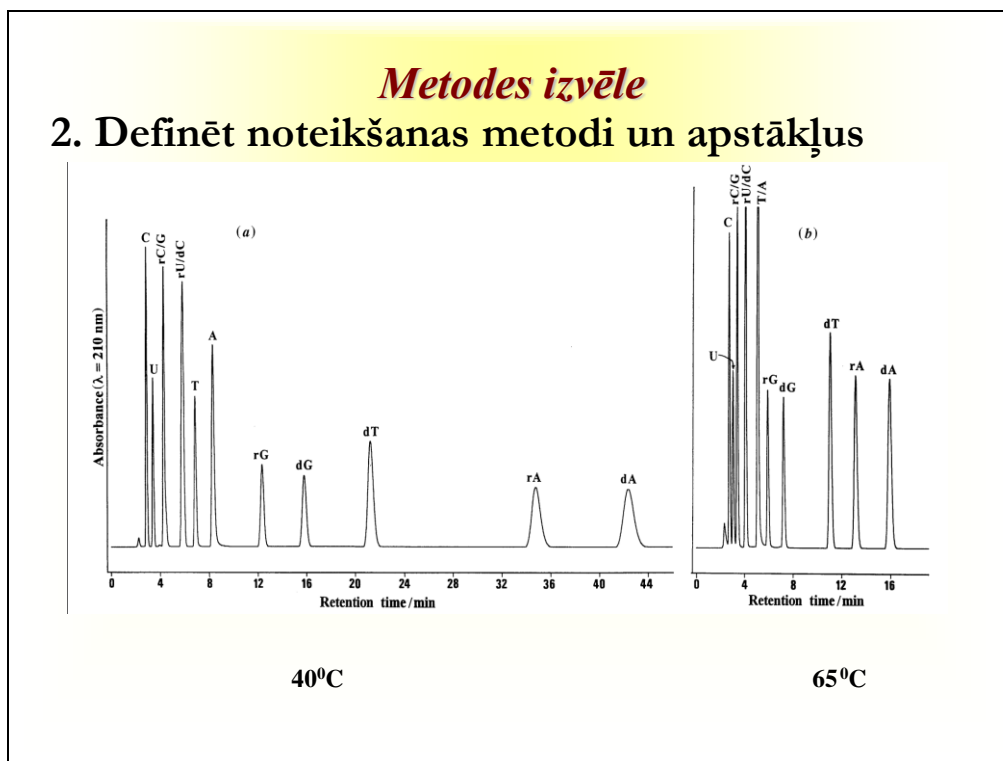
COO⁻
izdalīšanās laiks samazinās
+ H⁺

Slaidis 112



Slaidis 113





Metodes izvēle

2. Definēt noteikšanas metodi un apstākļus

Ja paraugs neabsorbē UV, tad izvēlās alternatīvu detektoru

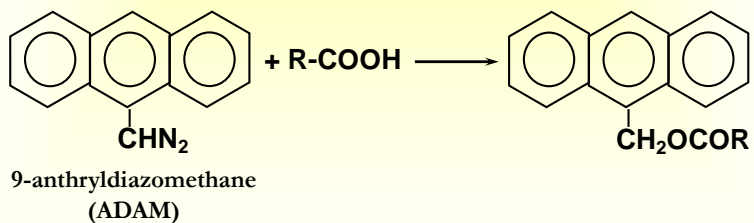
	Selektivitāte	Jutība	Gradianta izmantošana
Absorbcijas	Gaismu absorbējušiem savienojumiem	ng	iespējama
Fluorescences	Fluoriscējošie savienojumi	pg	iespējama
Refrakcijas indeksa	Nav	μg	neiespējama
Gaismas izkliedes	Negaistošie savienojumi	μg	iespējama
Konduktivitātes	Joniskas dabas savienojumi	ng	daļēji iespējama
Elektroķīmiskais	Oksidējošie / reducējošie savienojumi	pg	daļēji iespējama

Metodes izvēle

2. Definēt noteikšanas metodi un apstākļus

- ...vai veic parauga derivatizāciju:

- **ADAM Reaģents (Reaģē ar taukskābēm=fluoriscē)**

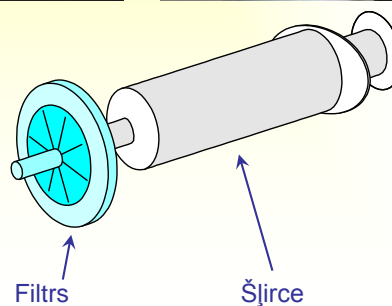
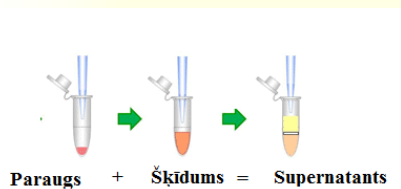


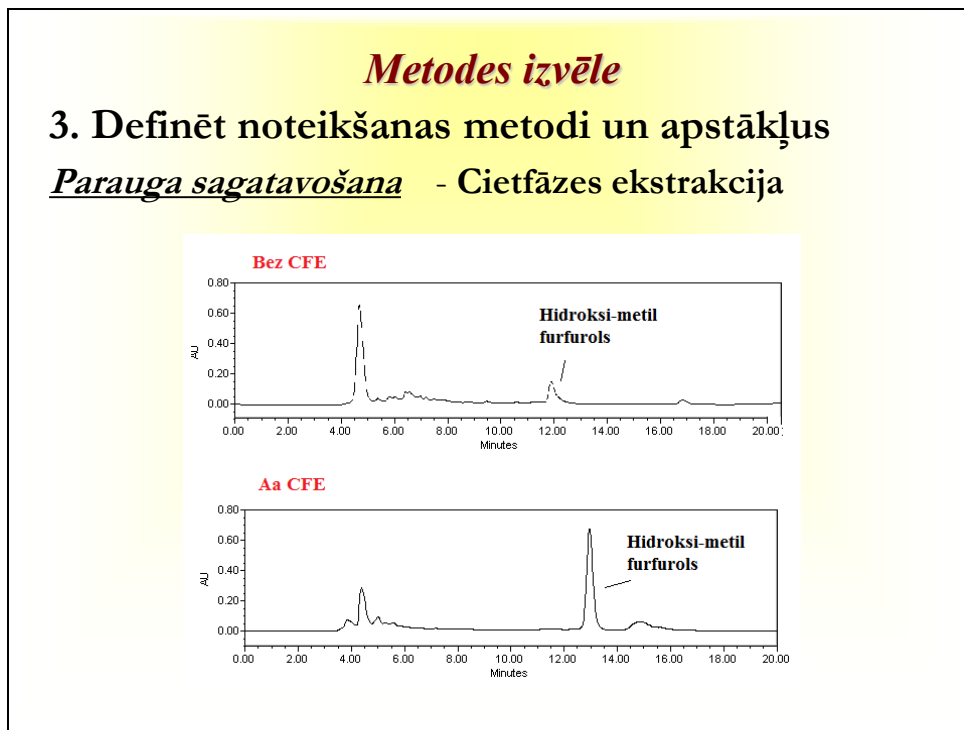
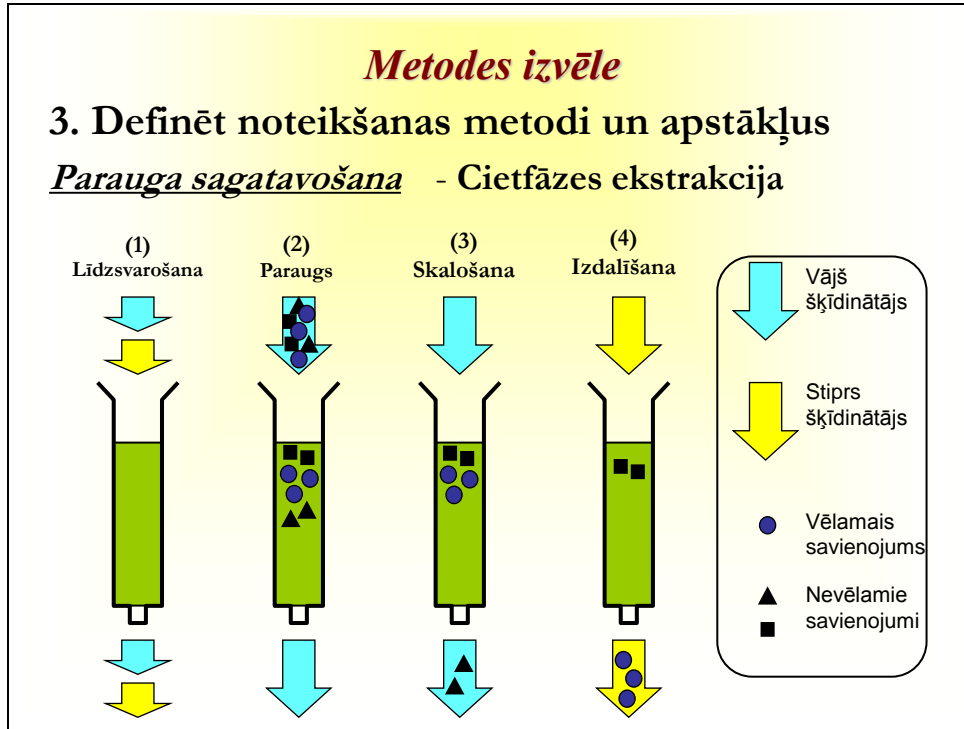
Metodes izvēle

3. Definēt noteikšanas metodi un apstākļus

Parauga sagatavošana

- Filtrēšana
- Centrifugēšana
- Ekstrakcija





Metodes izvēle

3. Definēt noteikšanas metodi un apstākļus

Parauga sagatavošana

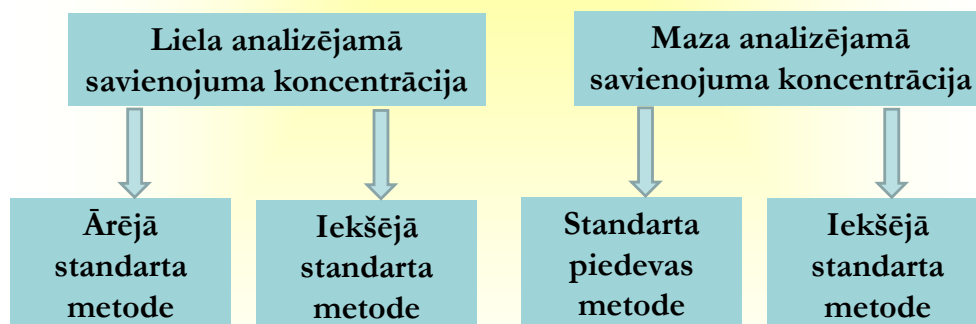
- Cietfāzes ekstrakcija
- Preparatīvā hromatogrāfija
- Derivatizēšana

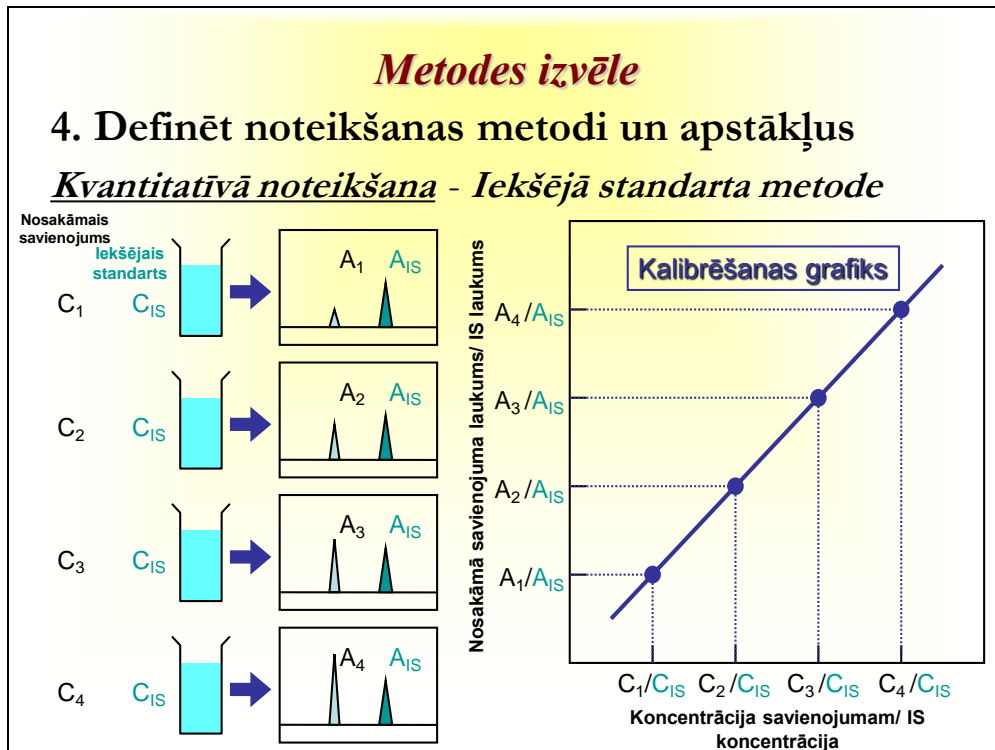
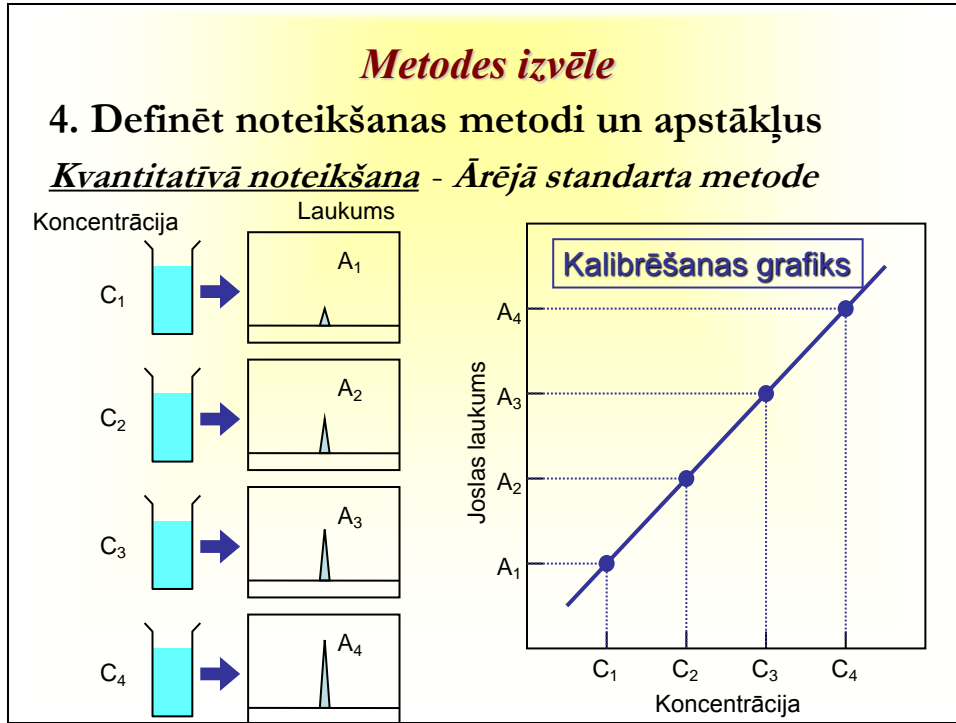


Metodes izvēle

4. Definēt noteikšanas metodi un apstākļus

Kvantitatīvā noteikšana

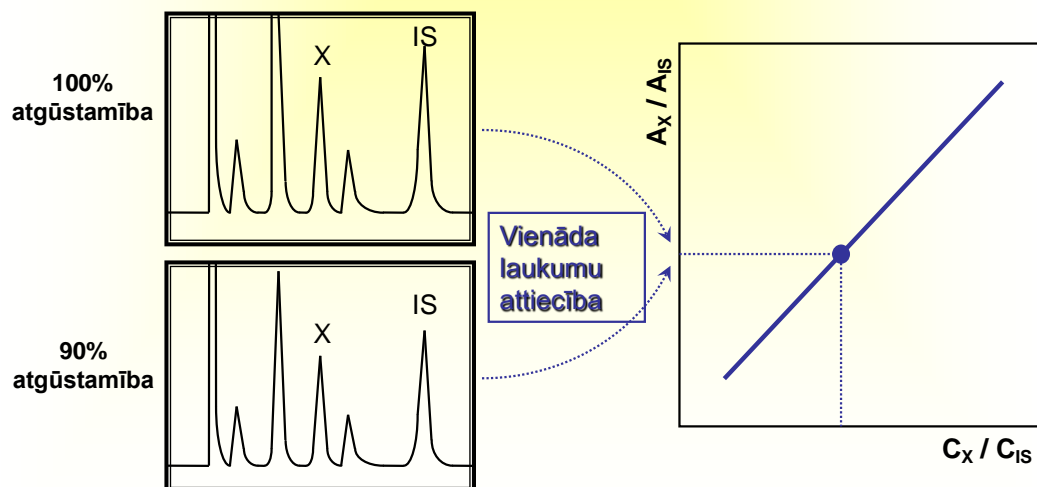




Metodes izvēle

4. Definēt noteikšanas metodi un apstākļus

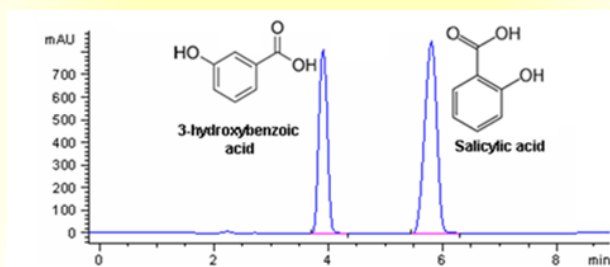
Kvantitatīvā noteikšana - Iekšējā standarta metode



Metodes izvēle

4. Definēt noteikšanas metodi un apstākļus

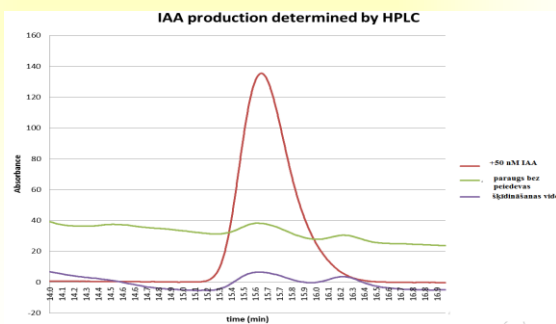
Kvantitatīvā noteikšana - Iekšējā standarta metode



Metodes izvēle

4. Definēt noteikšanas metodi un apstākļus *Kvantitatīvā noteikšana - Standarta piedevas metode*

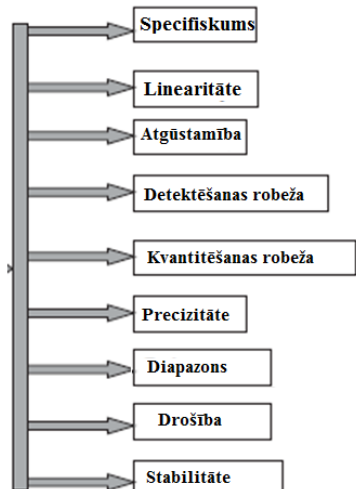
Paraugam pievieno zināmu daudzumu nosakāmā savienojuma.

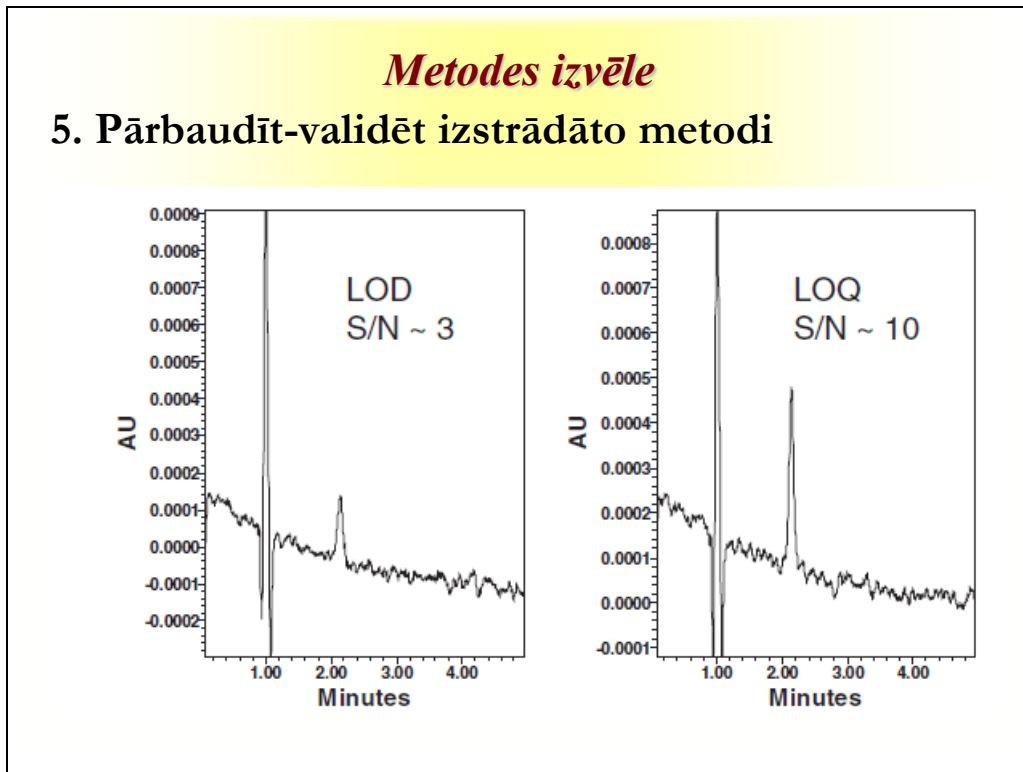
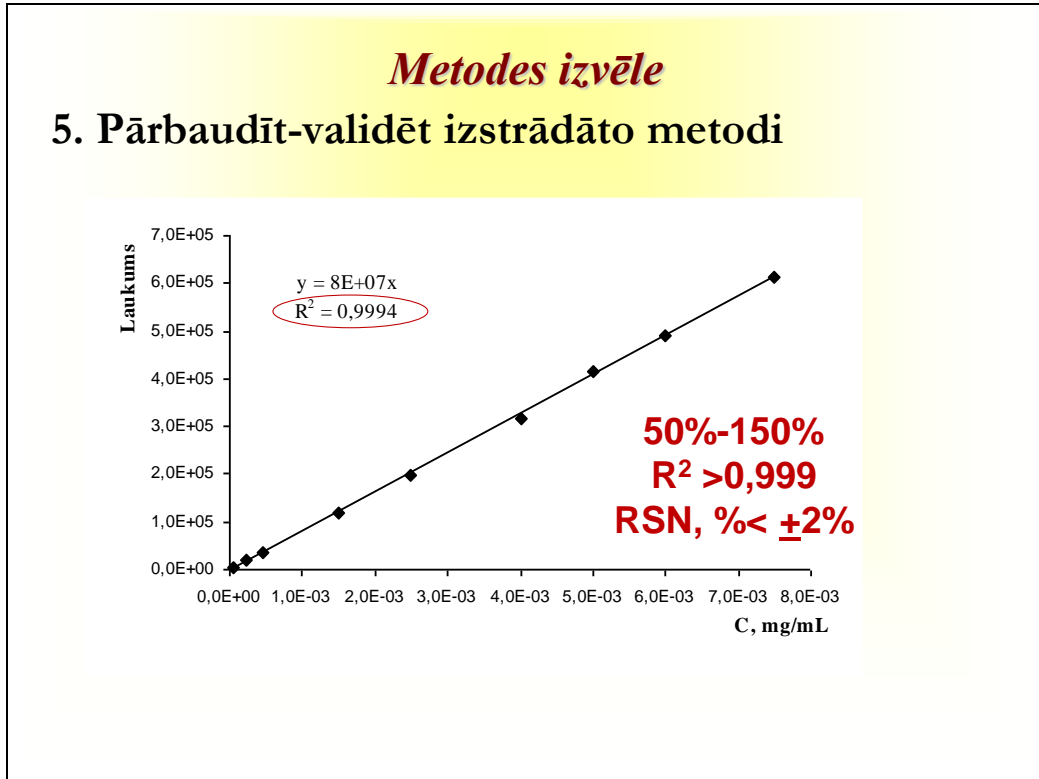


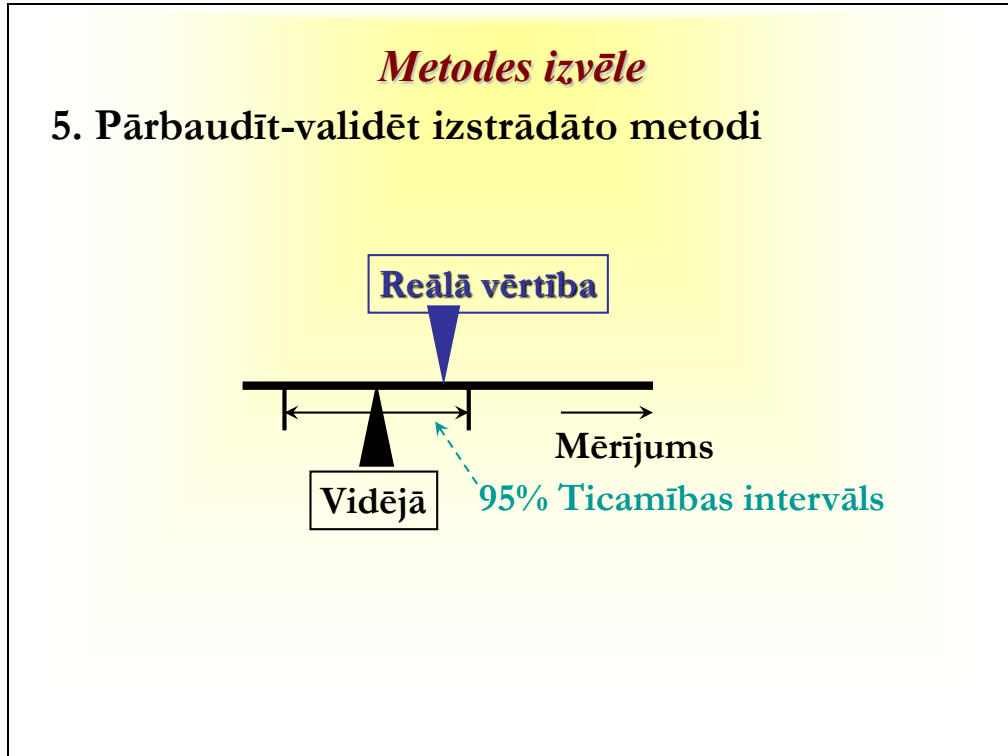
<http://2011.igem.org/Team:Imperial College London/Project Auxin Testing>

Metodes izvēle

5. Pārbaudīt-validēt izstrādāto metodi





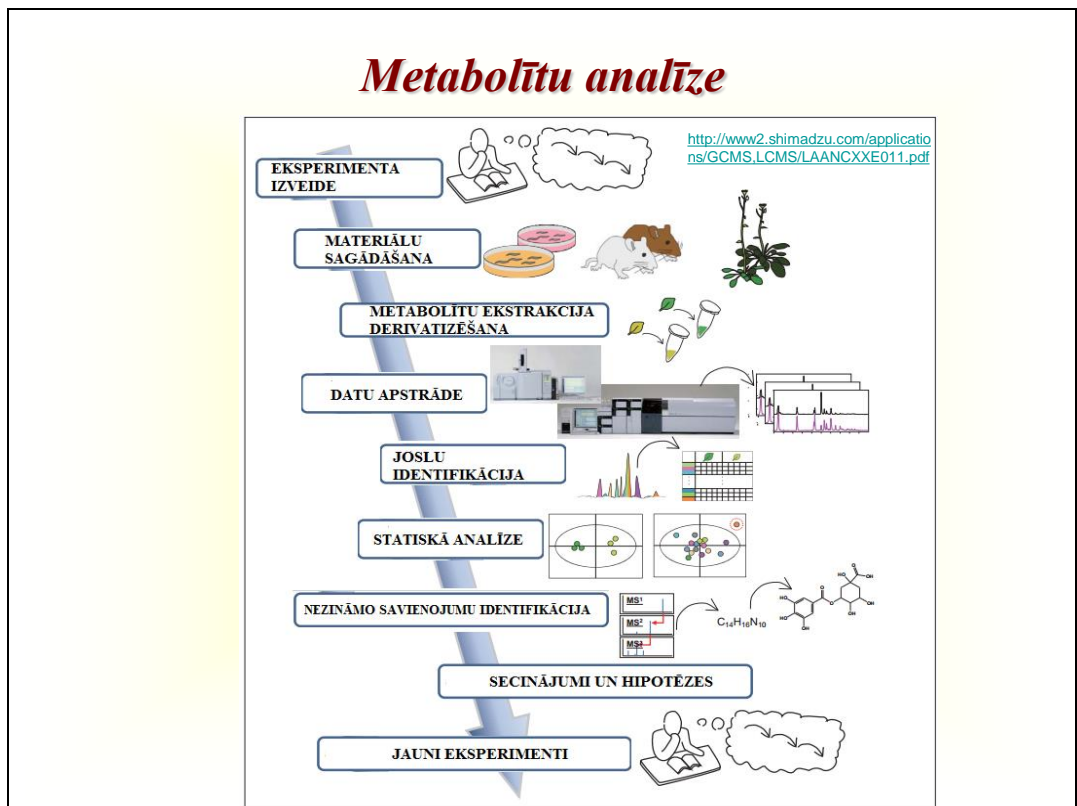
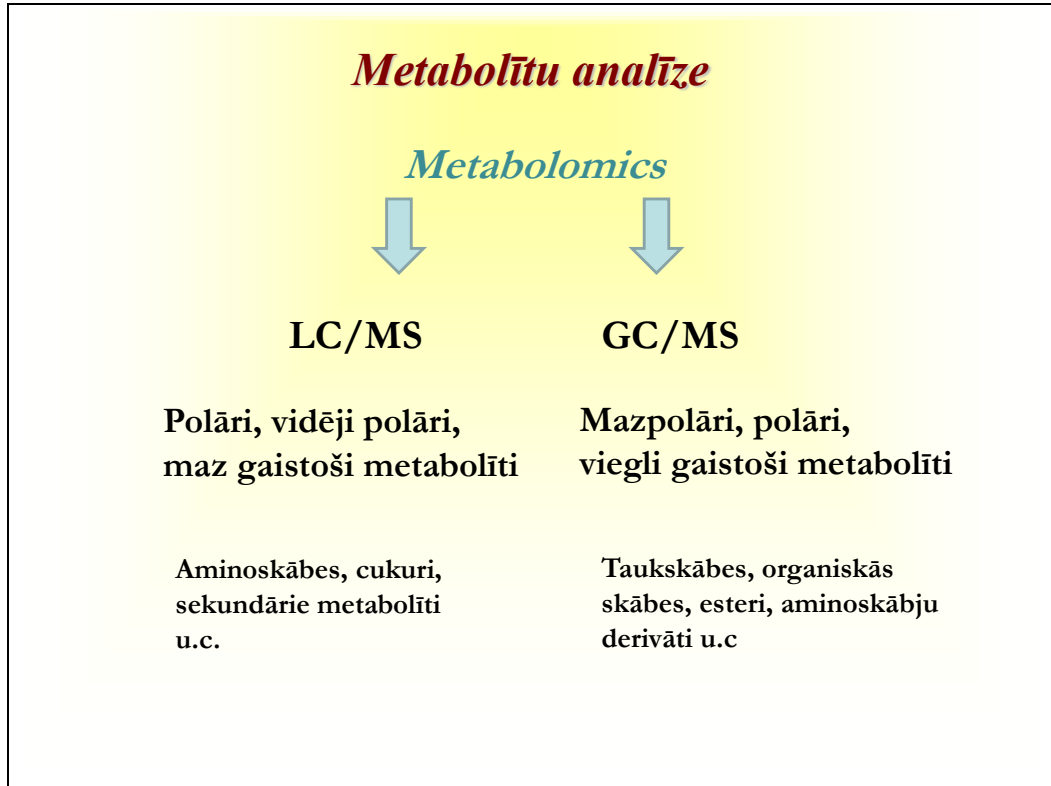


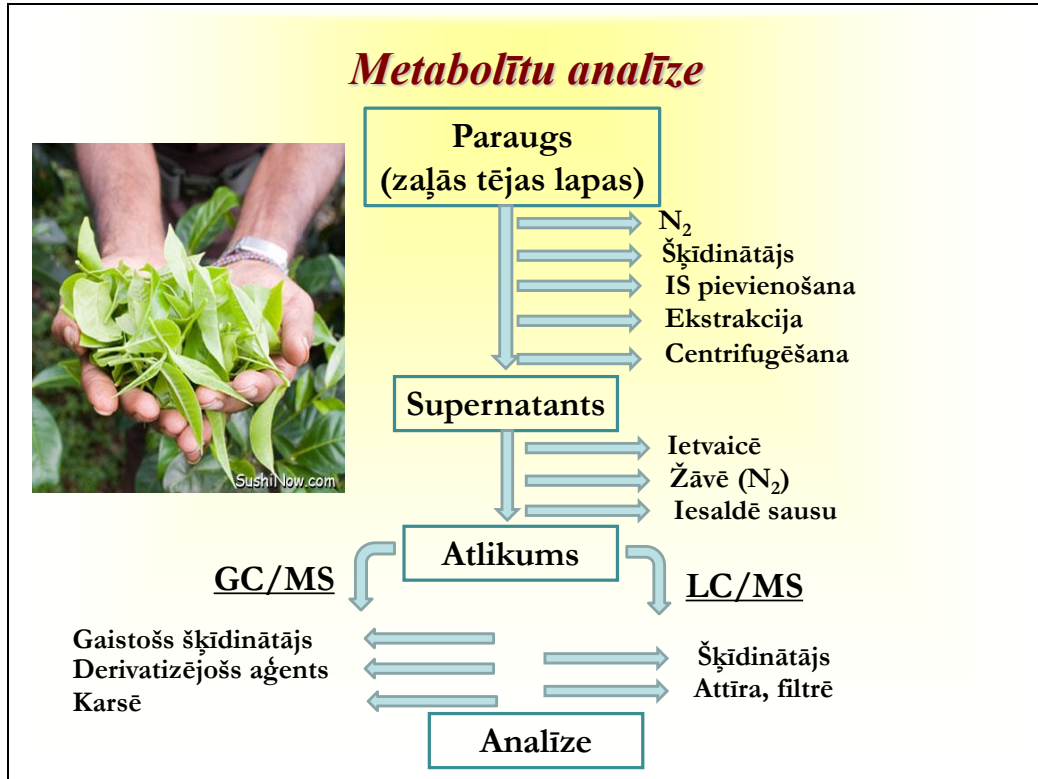
Metabolītu analīze

Metabolomics

<http://www.plantmetabolomics.co.nz/WhatisMetabolomics.aspx>

<http://fiehnlab.ucdavis.edu/staff/kind/Statistics/>

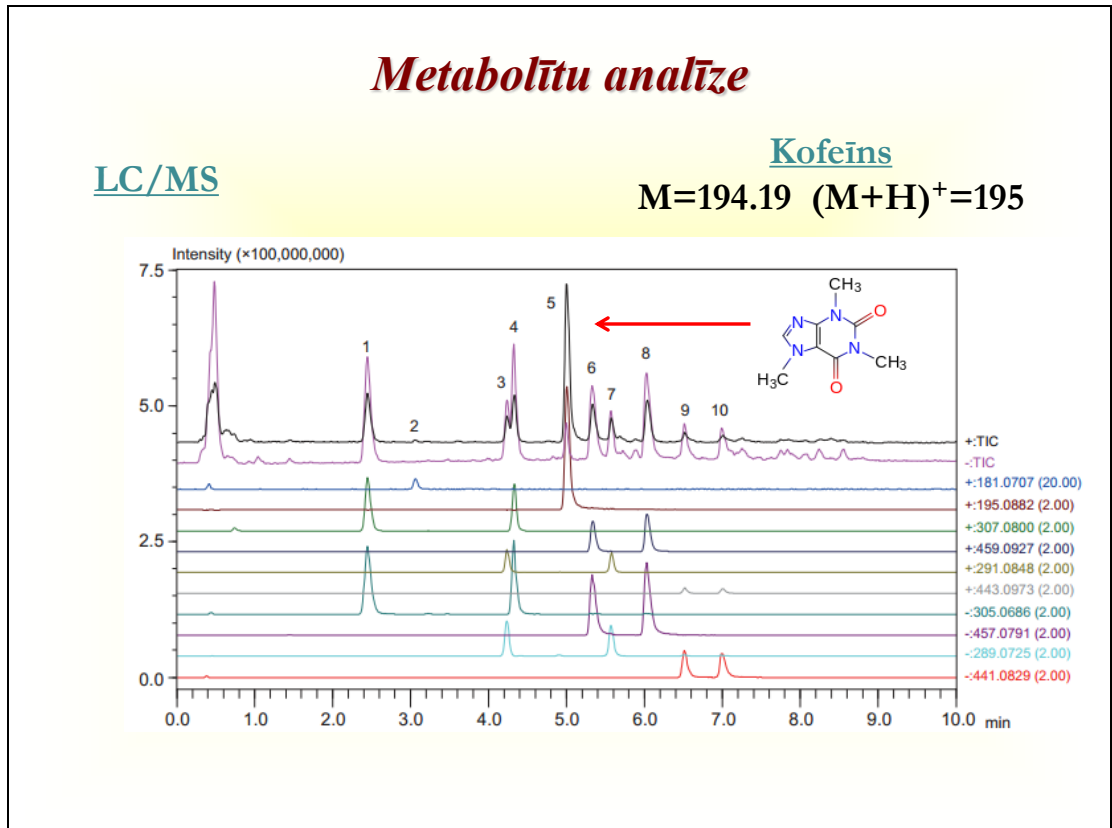
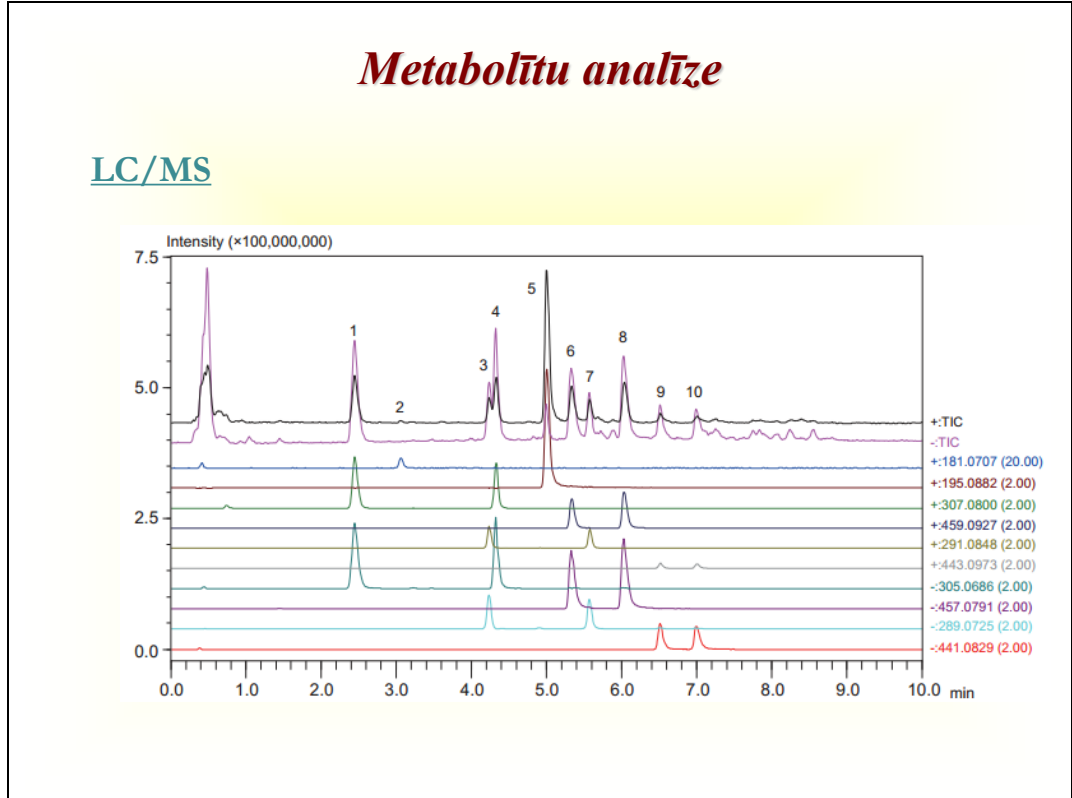




Metabolītu analīze

LC/MS Analytical Conditions	
Instrument	Prominence UFLC series, LCMS-IT-TOF
[LC Conditions]	
Column	Shim-pack XR-ODS (50 mm L. × 2.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile phase A	0.1 % formic acid aqueous solution
Mobile phase B	Methanol
Gradient program	B concentration 2 % (0 min) - B 60 % (10 min) - B 98 % (10.01 - 14 min) - B 2 % (14.01 min) - (STOP) (19 min)
Flow rate	4 mL/min
Column temperature	40 °C
[MS Conditions]	
Ionization mode	ESI (+ / - switching)
Measurement range	m/z 100 - 1000
CDL temperature	200 °C
BH temperature	200 °C

GC/MS Analytical Conditions	
Instrument	GCMS-QP2010 Plus, AOC-20i + s (auto injector)
[GC Conditions]	
Column	Rtx®-5MS (30 m L. × 0.25 mm I.D. df = 0.25 mm, Restek Corp.)
Injection temperature	250 °C
Column temperature	80 °C (2 min) - (15 °C/min) - 320 °C (20 min)
Injection mode	Split
Carrier gas	He (Constant Linear Velocity)
Linear velocity	36.8 cm/sec
Split ratio	25 : 1
Injection volume	1 μL
[MS Conditions]	
Ion source temperature	200 °C
Interface temperature	250 °C
Measurement range	m/z 50 - 1000
Event time	0.2 sec
Scan speed	5000 μ/sec

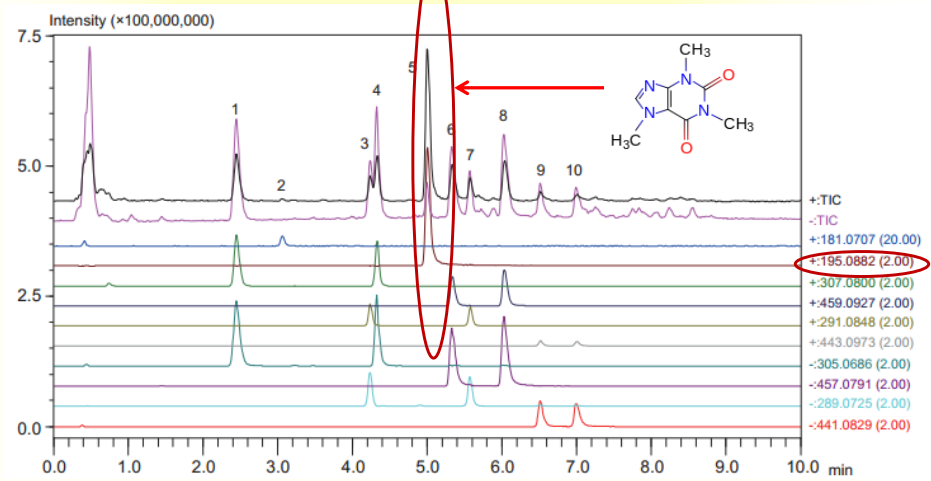


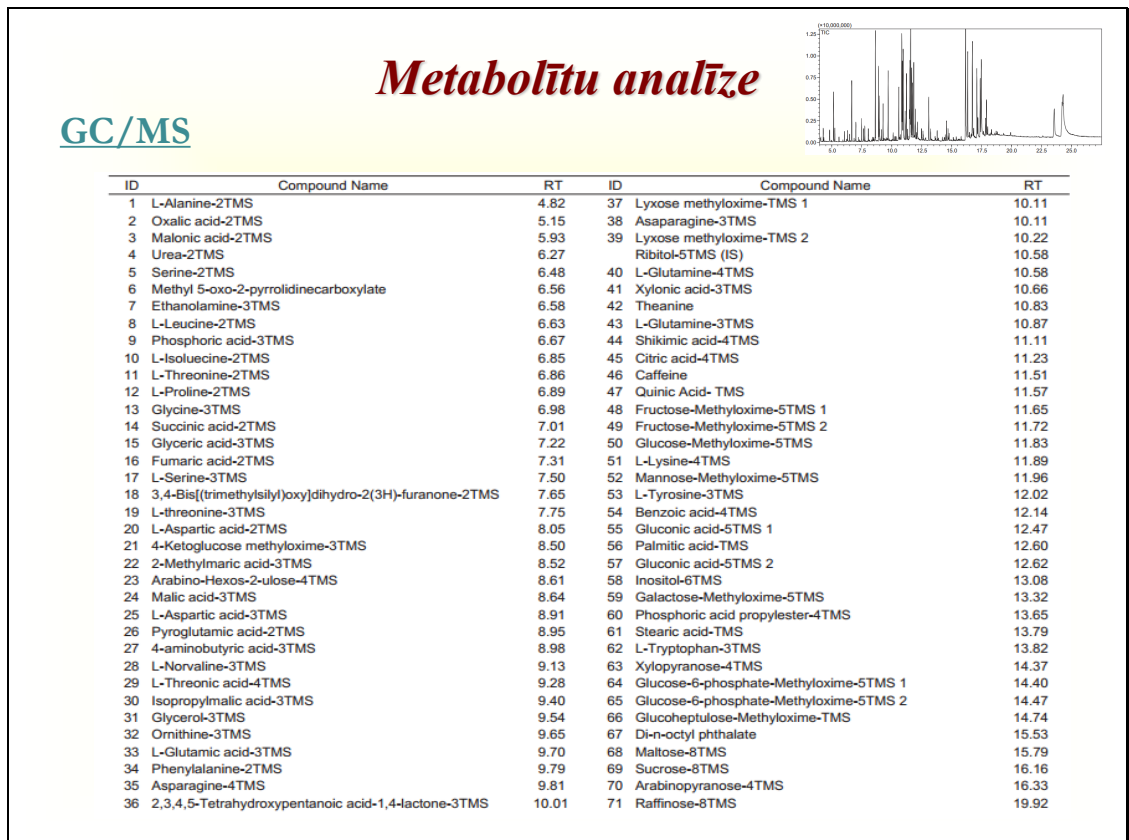
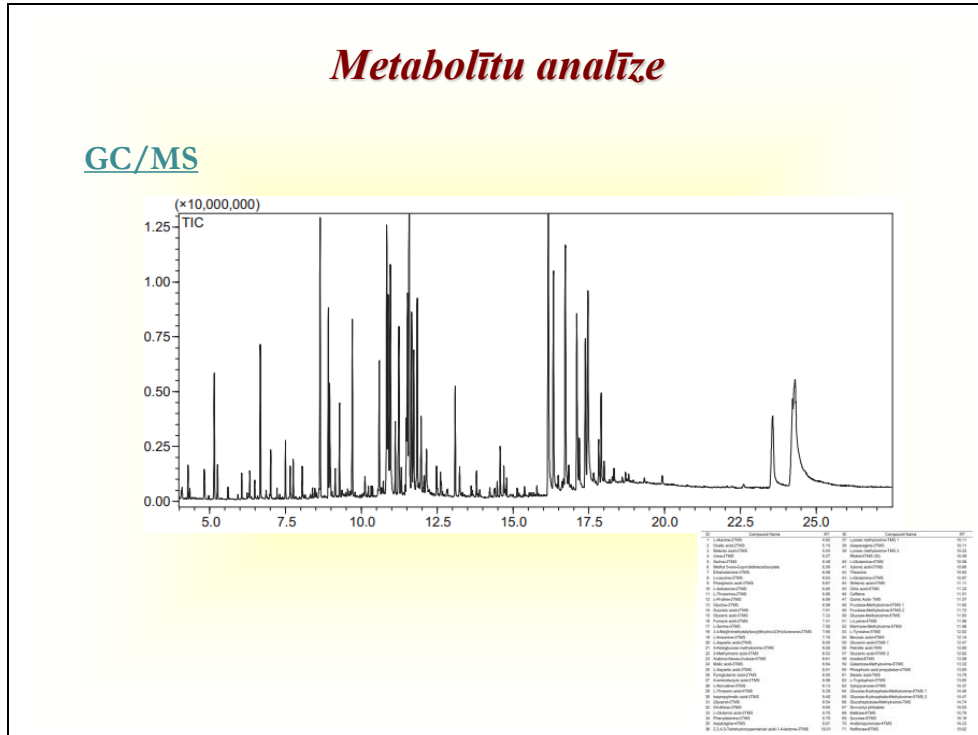
Metabolītu analīze

LC/MS

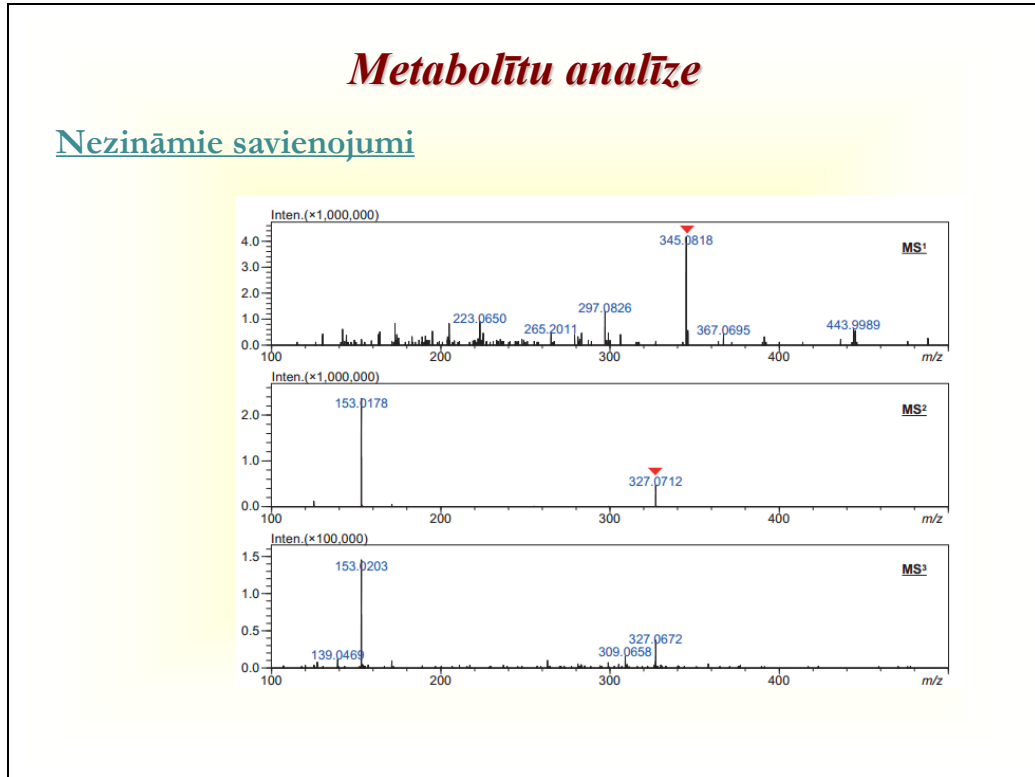
Kofeīns

M=194.19 (M+H)⁺=195

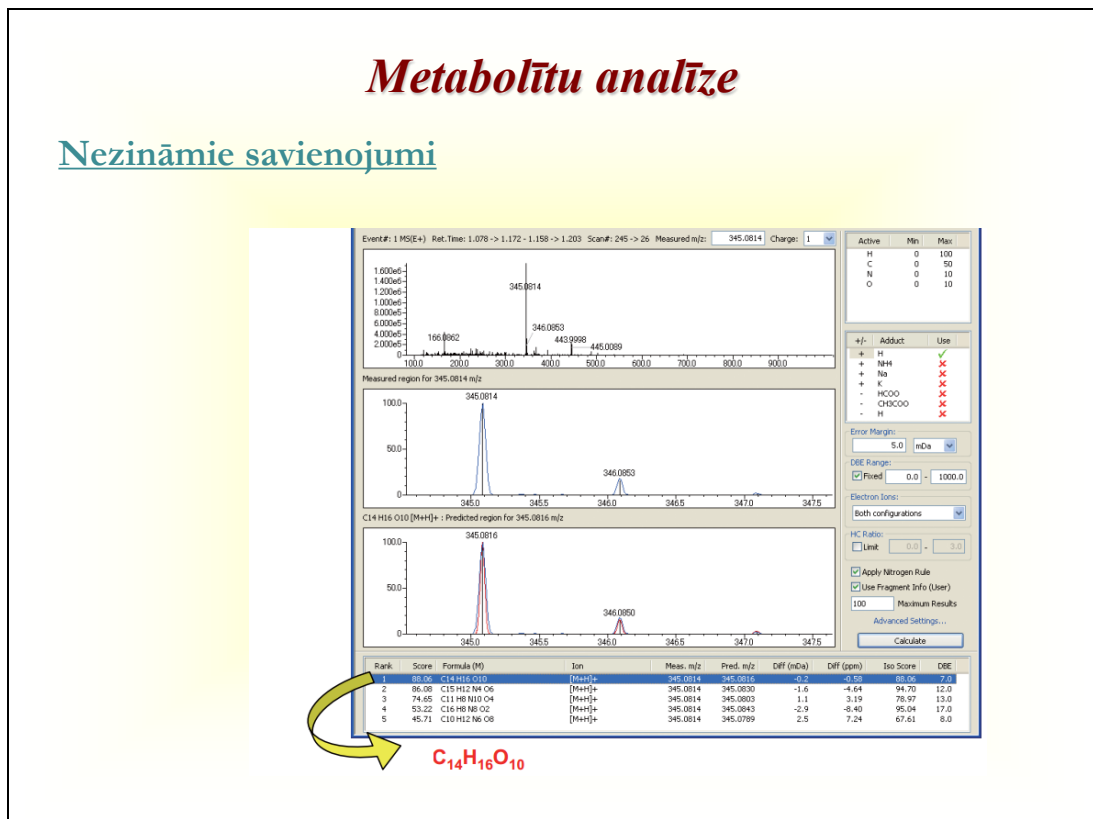




Slajds 141

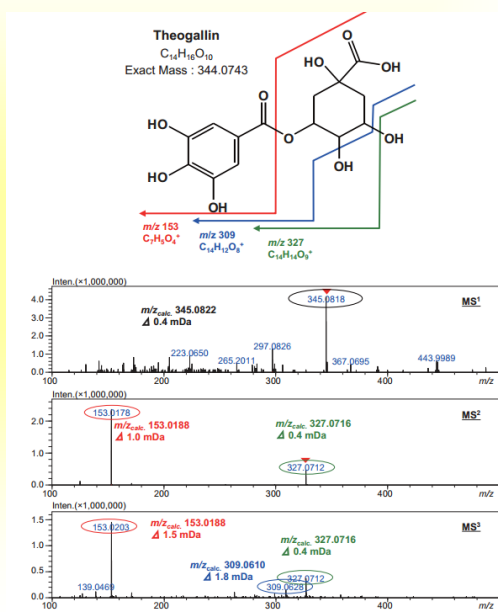


Slajds 142



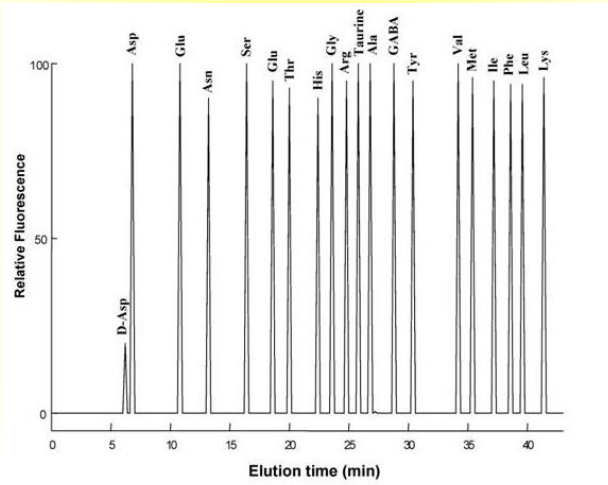
Metabolītu analīze

Nezināmie savienojumi



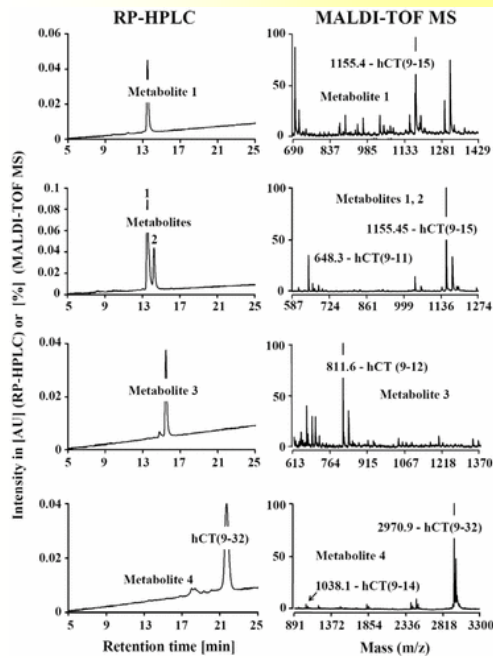
HROMATOGRĀFIJA PRAKSĒ

HROMATOGRĀFIJA PRAKSĒ



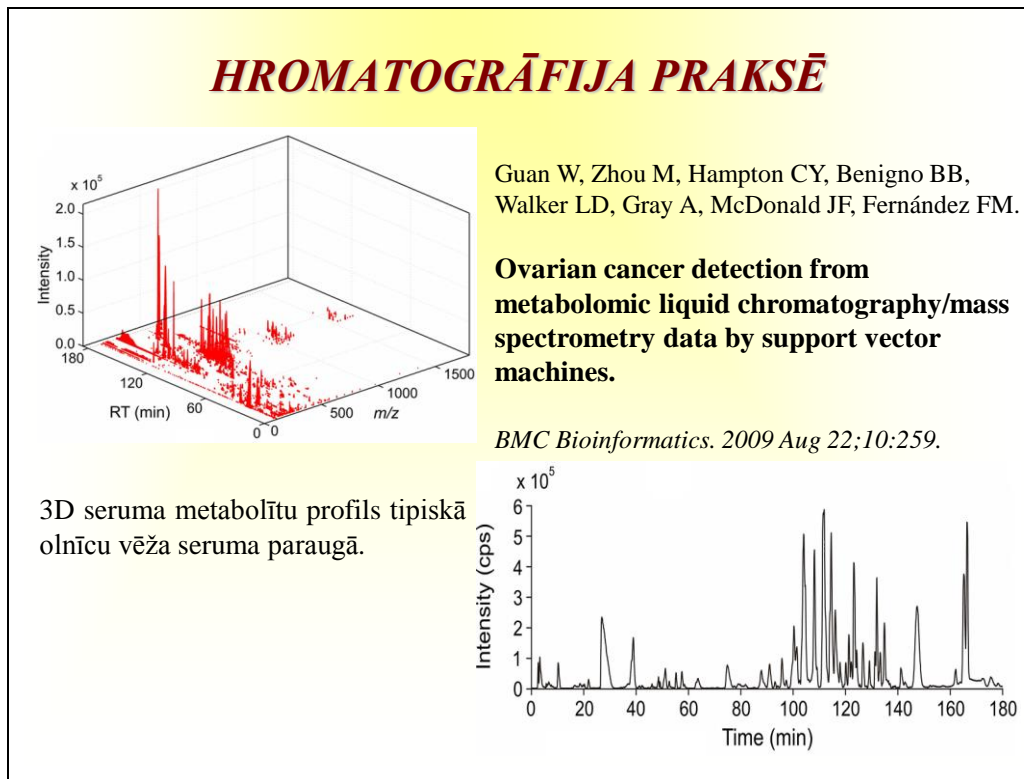
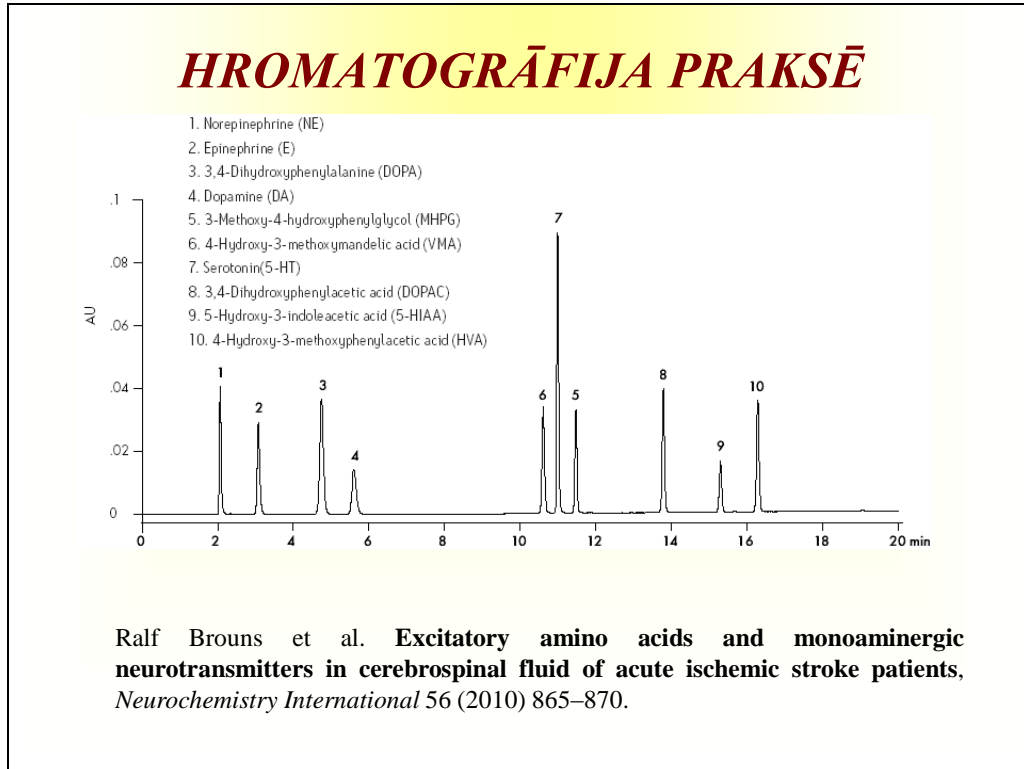
Aminoskābju izdalīšana: *Int J Biol Sci* 2006; 2(2):87-92. doi:10.7150/ijbs.2.87

HROMATOGRĀFIJA PRAKSĒ



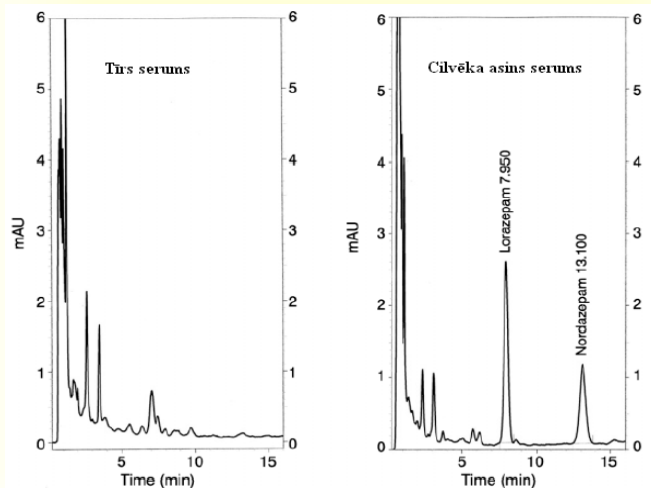
Metabolītu pētījumi:

Biochem. J. (2004) 382 (945–956) (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20040238



HROMATOGRĀFIJA PRAKSĒ

- **Kriminalistika** – narkotiskās vielas, indes, alkohols asinīs;

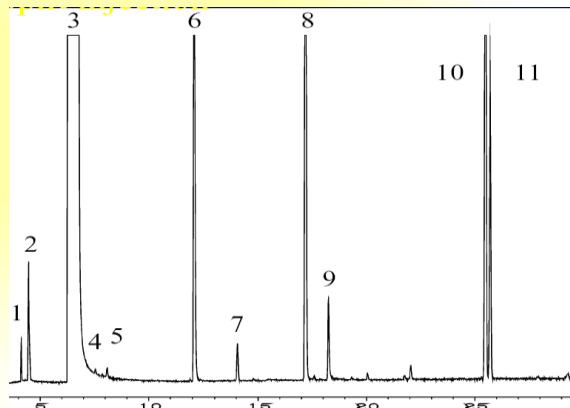


HROMATOGRĀFIJA PRAKSĒ

- **Pārtikas produkti** – saldinātāji, antioksidanti, piedevas, vitamīni, aflatoksīni;

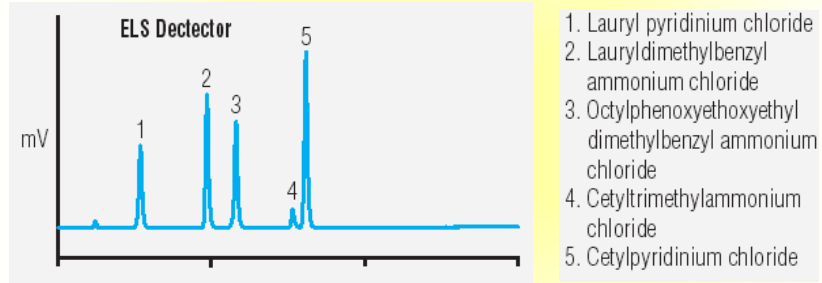
Dažādi spirti Skotu Viskijā:

- 1.Acetaldehīds (fūzelis);
- 2.Metanols;
- 3.Etanols;
- 4.Acetons;
- 5.Izopropanols;
- 6.n-propanols;
- 7.Etilacetāts;
- 8.Izobutanols;
- 9.Etiķskābe;
- 10.Izoamilspirts;
- 11.Aktīvais amilspirts.



HROMATOGRĀFIJA PRAKSĒ

- **Industrija** – policikliskie ogļūdeņraži, virsmas aktīvās vielas, krāsvielas;

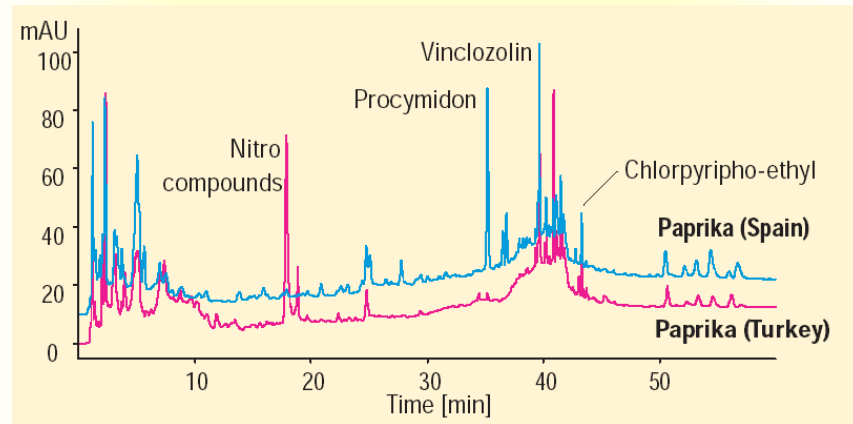


Katjonu dabas virsmas aktīvo vielu analīzes.

Liu et al., *Analyzing Surfactants in Consumer Products on a Single HPLC Column (Dionex)*, LPN 1803-01 04/06.

HROMATOGRĀFIJA PRAKSĒ

- **Piesārņojums**- pesticīdi, herbicīdi, fenoli, polihlorētie bifenili.



Pesticīdu analīzes paprikā.

Schuster et al, *Analysis of Pesticides in Salad Samples and Spices using HPLC*, 1997
Agilent Technologies, Released 09/97, Publication Number 5966-0742E.

