

# Chromatografie

Petr Breinek

Společným znakem všech chromatografických metod je kontinuální **rozdělování složek analyzované směsi vzorku mezi dvěma fázemi.**

- Nepohyblivá fáze (stacionární fáze)
- Pohyblivá fáze (mobilní fáze)

Fáze se odlišují některou fyzikálně-chemickou vlastností, např. polaritou

Kvalitativní a kvantitativní stanovení

Výsledek chromatografie [chlorofylu](#)



# Využití v klinické biochemii

- HbA1c
- Léky a jejich metabolity
- Aminokyseliny
- Metanefriny
- Katecholaminy
- Vitaminy (D2,D3,...)
- Hormony
- Referenční metody
- Toxikologie (screening)



# Např. Stanovení močoviny

## Referenční metody

### a) ID-GC/MS ID-LC/MS

standardní přidání značené močoviny (izotopová diluce) do analyzovaného vzorku a následné stanovení močoviny kombinací plynové nebo kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

### b) HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

# Různá hlediska dělení chromatografie

## *I. Podle skupenství mobilní fáze*

- Chromatografie plynová  
(**GC**; Gas Chromatography),
- Chromatografie kapalinová  
(**LC**; Liquid Chromatography)

## ***II. Podle uspořádání stacionární fáze***

- Kolonová (sloupcová) chromatografie
- Kapilární chromatografie

*Nízkotlaká a vysokotlaká kolonová chromatografie*

- Tenkovrstvá chromatografie (TLC)
- Papírová chromatografie

*Plošná kapalinová chromatografie*

### *III. Podle účelu použití*

- Analytická
- Preparativní

## ***IV. Podle principu separace***

1. Adsorpční
2. Rozdělovací
3. Ionově výměnná (ionexová)
4. Gelová (síťový efekt)
5. Afinitní



# Adsorpční chromatografie

je založena na rozdílné adsorpci látek na povrchu sorbentu, tvořícího stacionární fázi

Sorbenty používané v adsorpční chromatografii se liší svou polaritou případně kyselostí

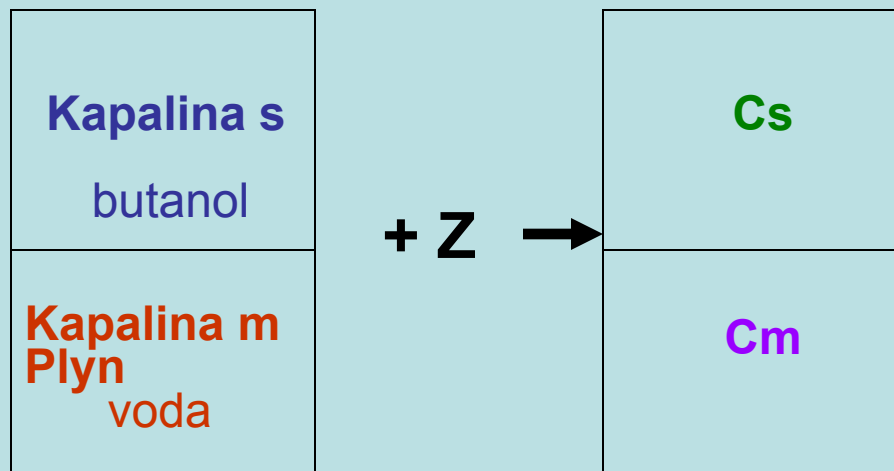
- Nepochární sorbenty (aktivní uhlí, uhlíkové sorbenty)
- Polární kyselé sorbenty (silikagel =  $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ , ...)
- Polární bazické sorbenty ( $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ , ...)

# Rozdělovací chromatografie

je založena na rozdílné rozpustnosti dělených látek ve dvou různých kapalinách

Rozdělovací koeficienty ( $K$ ,  $R_f$ ,  $\alpha$ )

$$K = C_s : C_m$$



# Ionexová chromatografie

dělení látek je založeno na schopnosti výměny iontů na pevném nosiči (matrici)

Stacionární fázi tvoří tzv. ionexy (iontoměniče)

Dělíme je na:

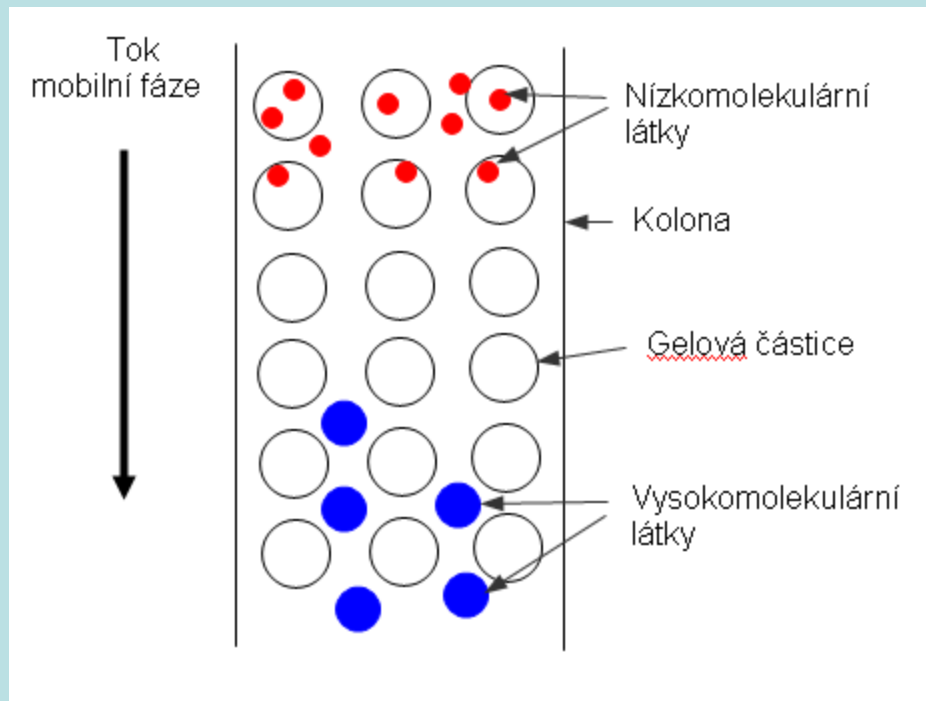
**Katexy** (obsahují na povrchu skupiny nabitě záporně a přitahují z roztoku kationty)

**Anexy** (obsahují na povrchu skupiny nabitě kladně a přitahují z roztoku anionty)

Ionty ze vzorku jsou ionexem pevně připoutány a jsou nakonec uvolněny **elučním činidlem**

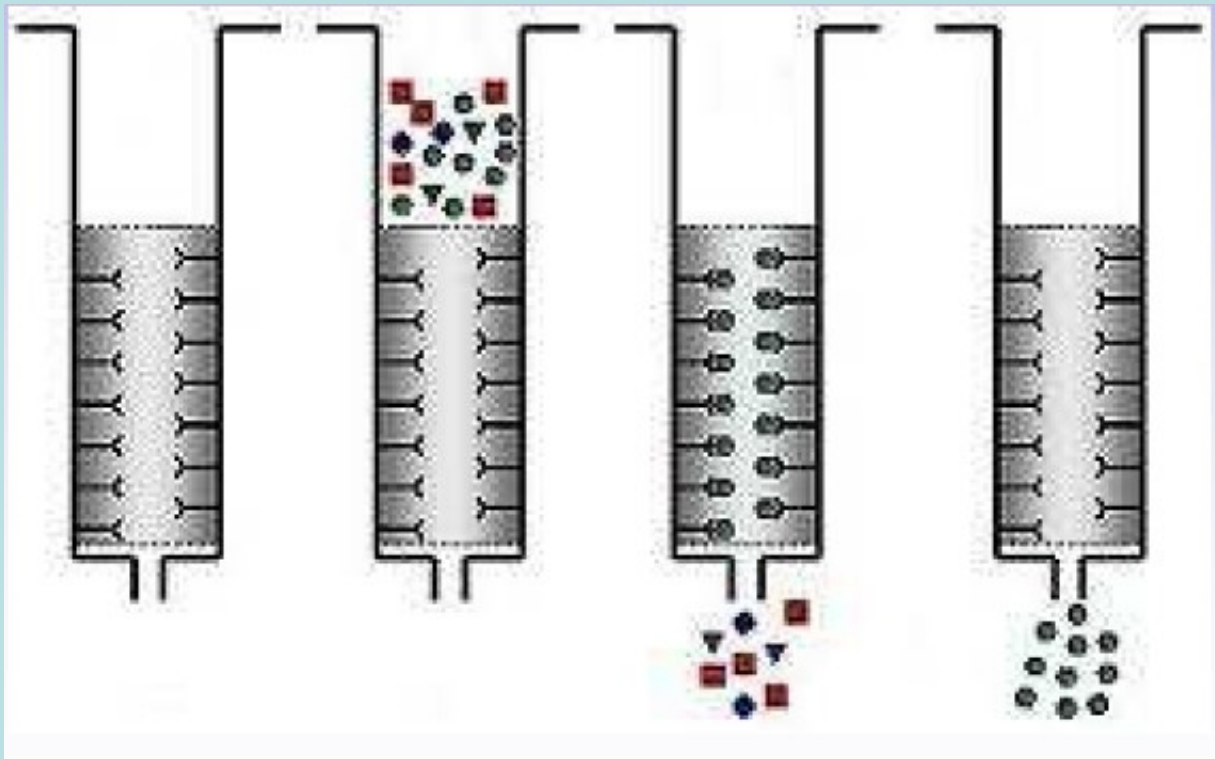
# Gelová chromatografie

také chromatografie na molekulových sítích. Je založena na rozdílné průchodnosti otvorů na částicích stacionární fáze pro různě velké částice dělené směsi. Dělení látek na gelu je založeno na velikosti molekul a Mr.



# Afinitní chromatografie

je založena na specifických interakcích látek s ligandem navázaným na nosič (stacionární fázi)



Např. soustavy antigen-protilátka, enzym-substrát, receptor-hormon, ... Typickým příkladem použití je izolace albuminu z lidského séra.

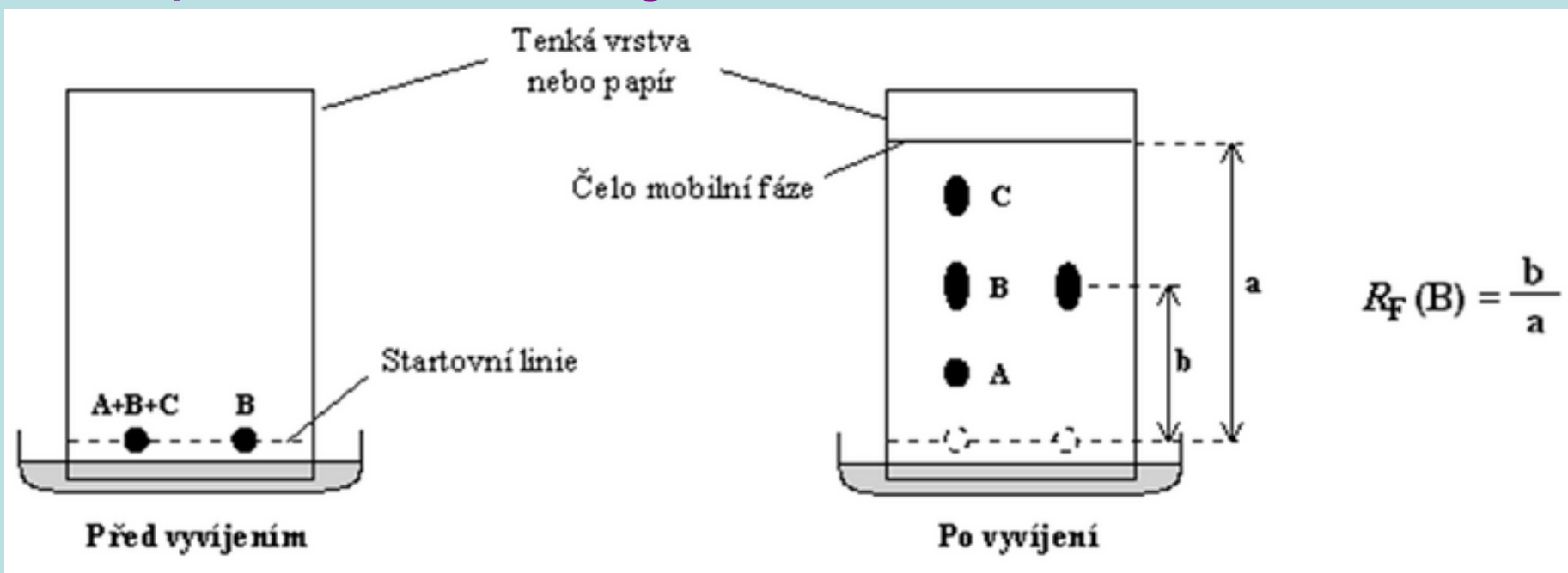
# *Techniky úpravy vzorků*

- Extrakce kapalinou
- Extrakce pevnou látkou (SPE), Solid Phase Extraction
- Ultrafiltrace
- Derivatizace
- Extrakce plynem (headspace)
- Adsorpce
- Vymrazování

# Plošná kapalinová chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

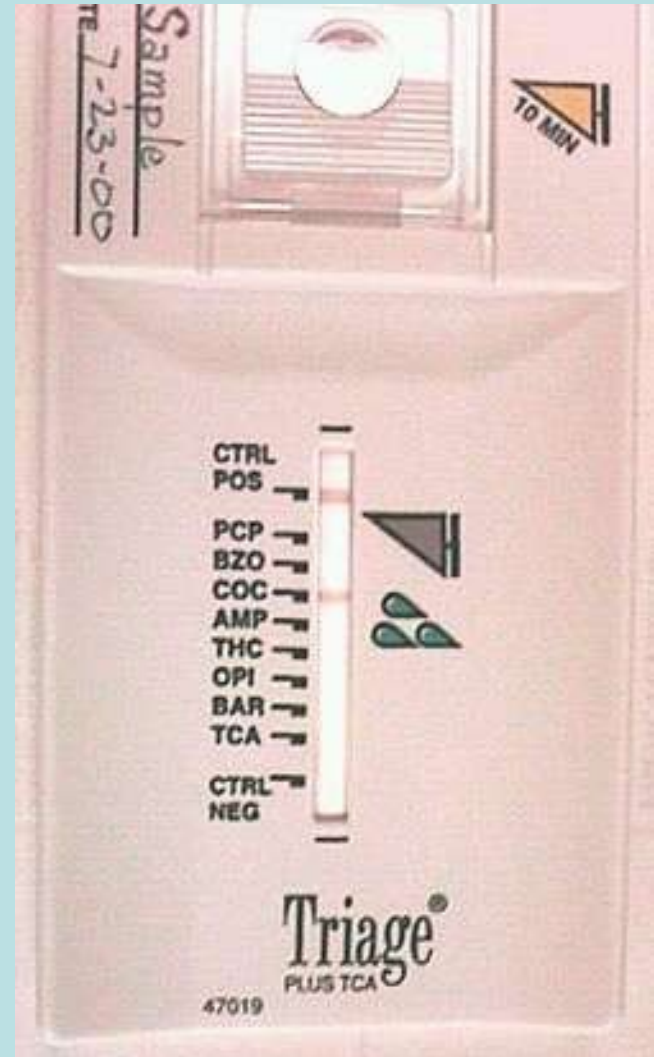
Papírová chromatografie



Retardační faktor  $R_F$

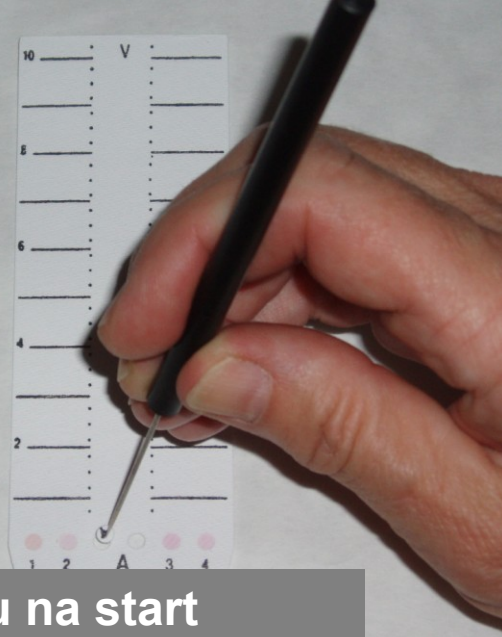
# Spíše pro kvalitativní nebo semikvantitativní metody

Příklad:  
Toxilab (Merck) nebo Triage 6









Obr. 3.5  
Vložení terčíku na start



Vyvíjení chromatogramu

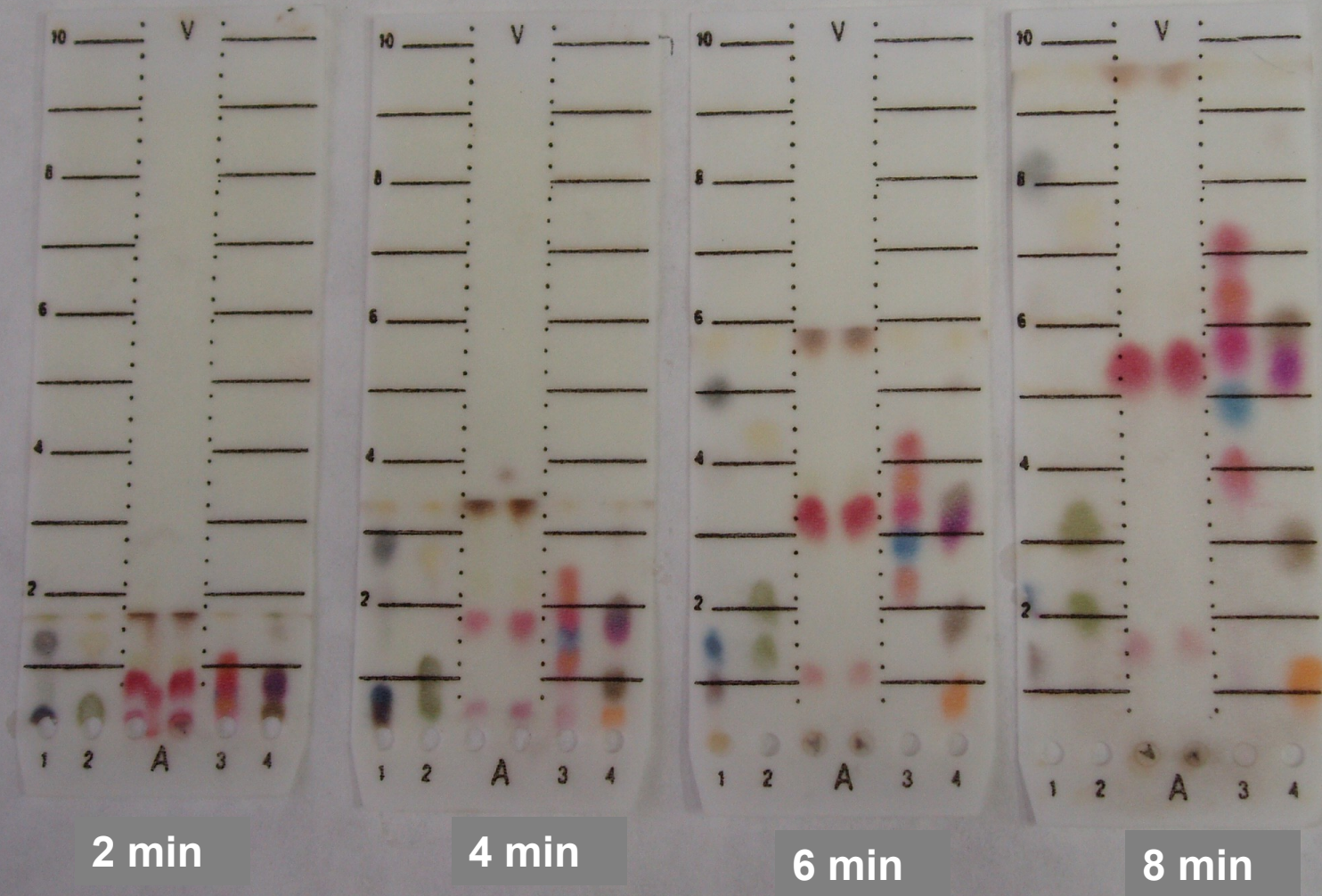


Fixace chromatogramu



Barvení chromatogramu

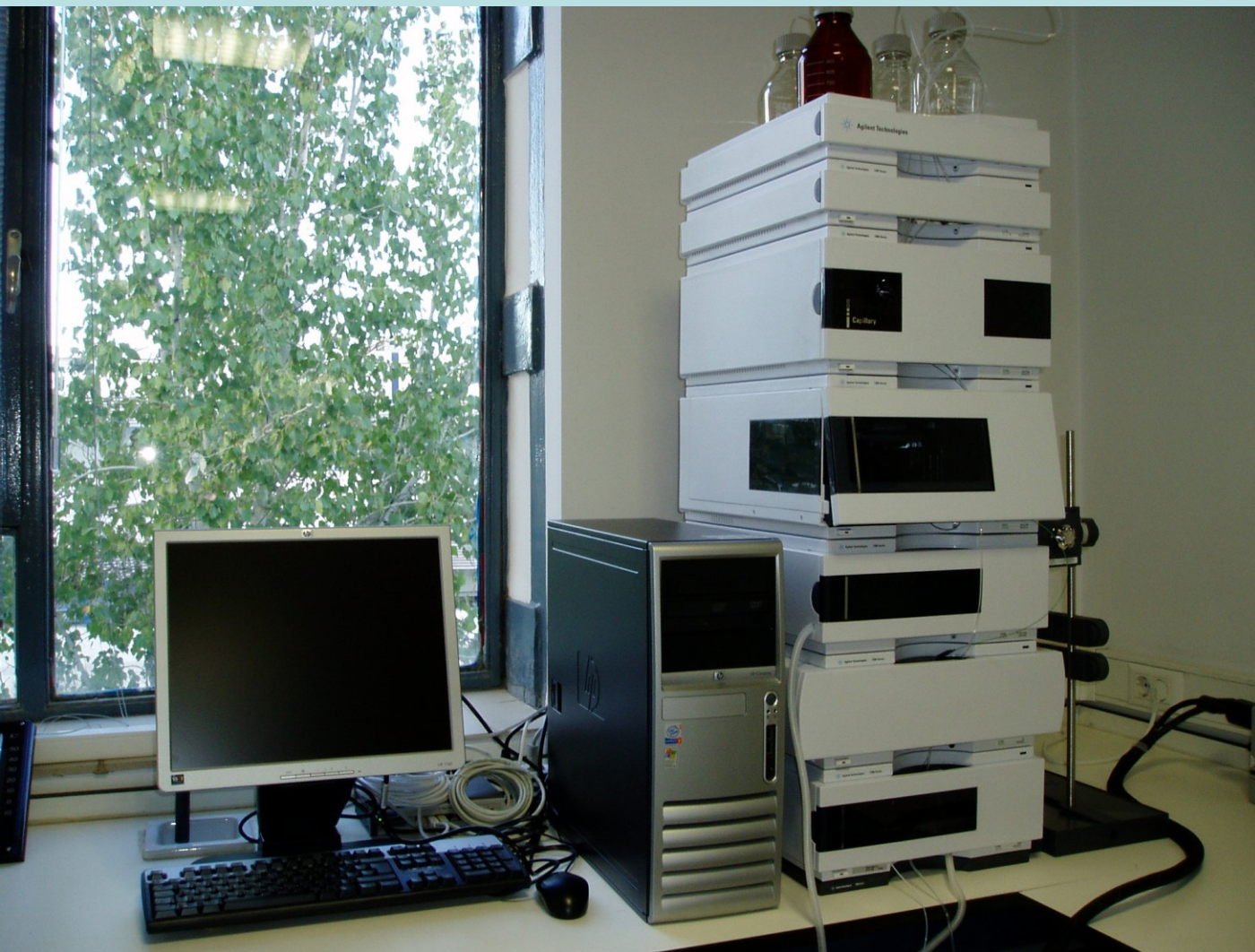
# Časový průběh vyvíjení chromatogramu



# Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

## HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

# HPLC – přístroj



# Konstrukce a hlavní součásti kapalinového chromatografu (HPLC)

Vysokotlaká pumpa

(v případě gradientové eluce je nutná druhá  
pumpa a mísič)

Injektor

Dělicí kolona (event. i předkolona)

Detektor

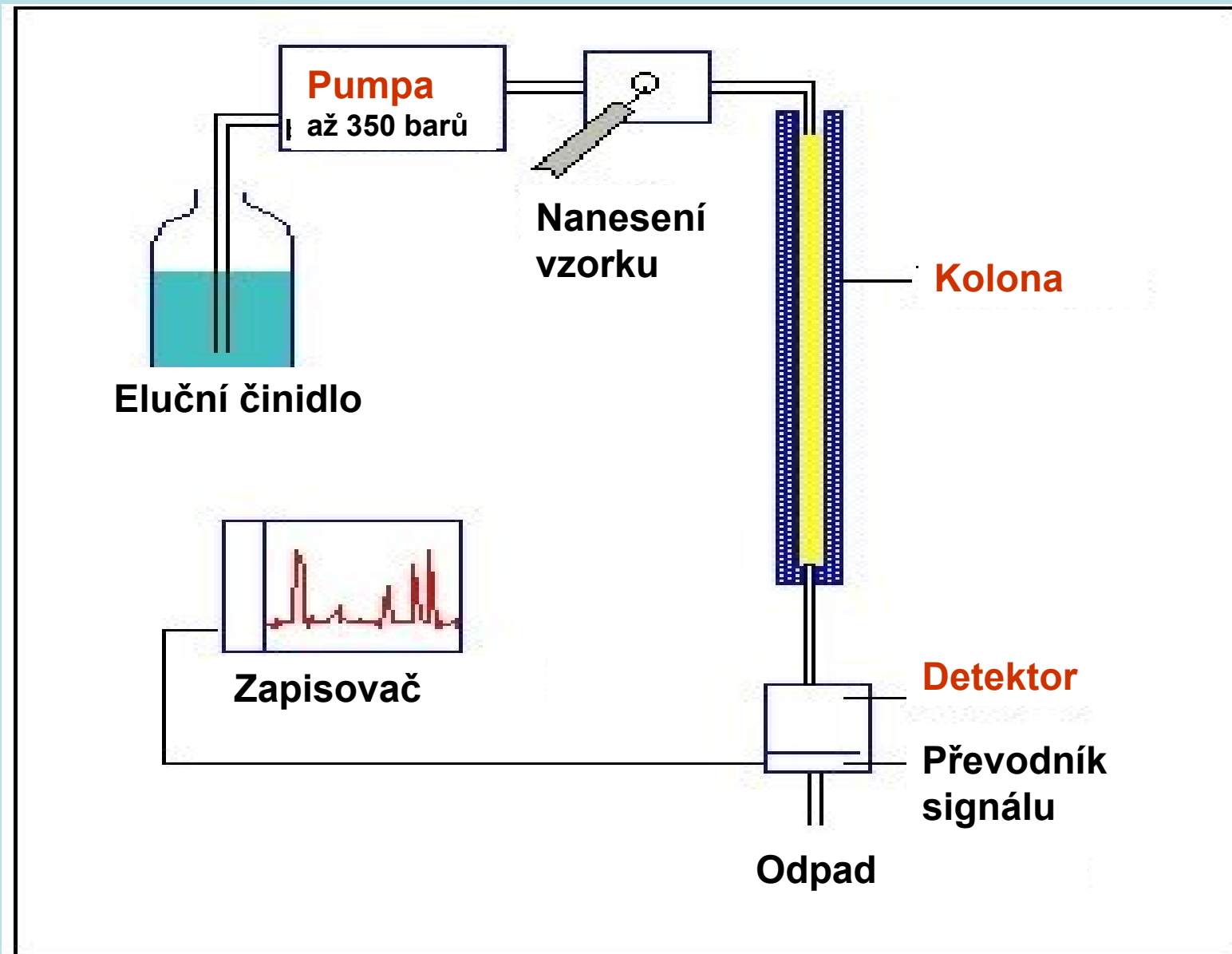
Vyhodnocovací zařízení

(zapisovač, PC, tiskárna)

**Eluce** = promývání kolony elučním činidlem

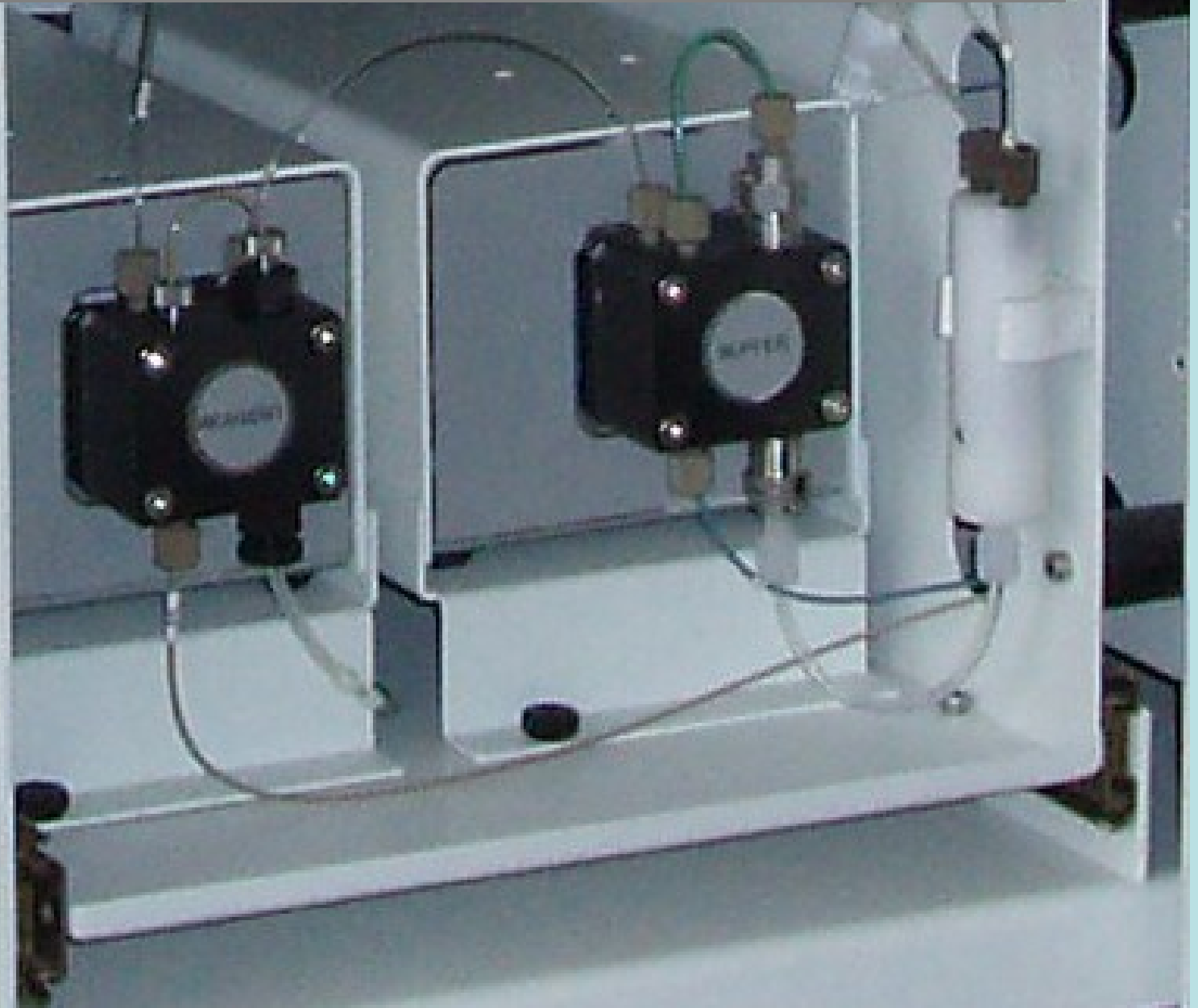
- **Izokratická eluce** (promývání kolony elučním činidlem stejného složení)
- **Gradientová eluce** (během promývání kolony se složení elučního činidla mění, např. pH, poměr činidel, iontová síla,...)

# HPLC – jednoduché schéma





# Vysokotlaká peristaltická pumpa



# Injektor – dávkovací zařízení



# Dělicí kolona



# *Základní pojmy*

Fáze

Průtok (flow rate, ml/s)

Retenční čas (minuty)

Pík

Výška píku; Plocha píku; Šířka píku

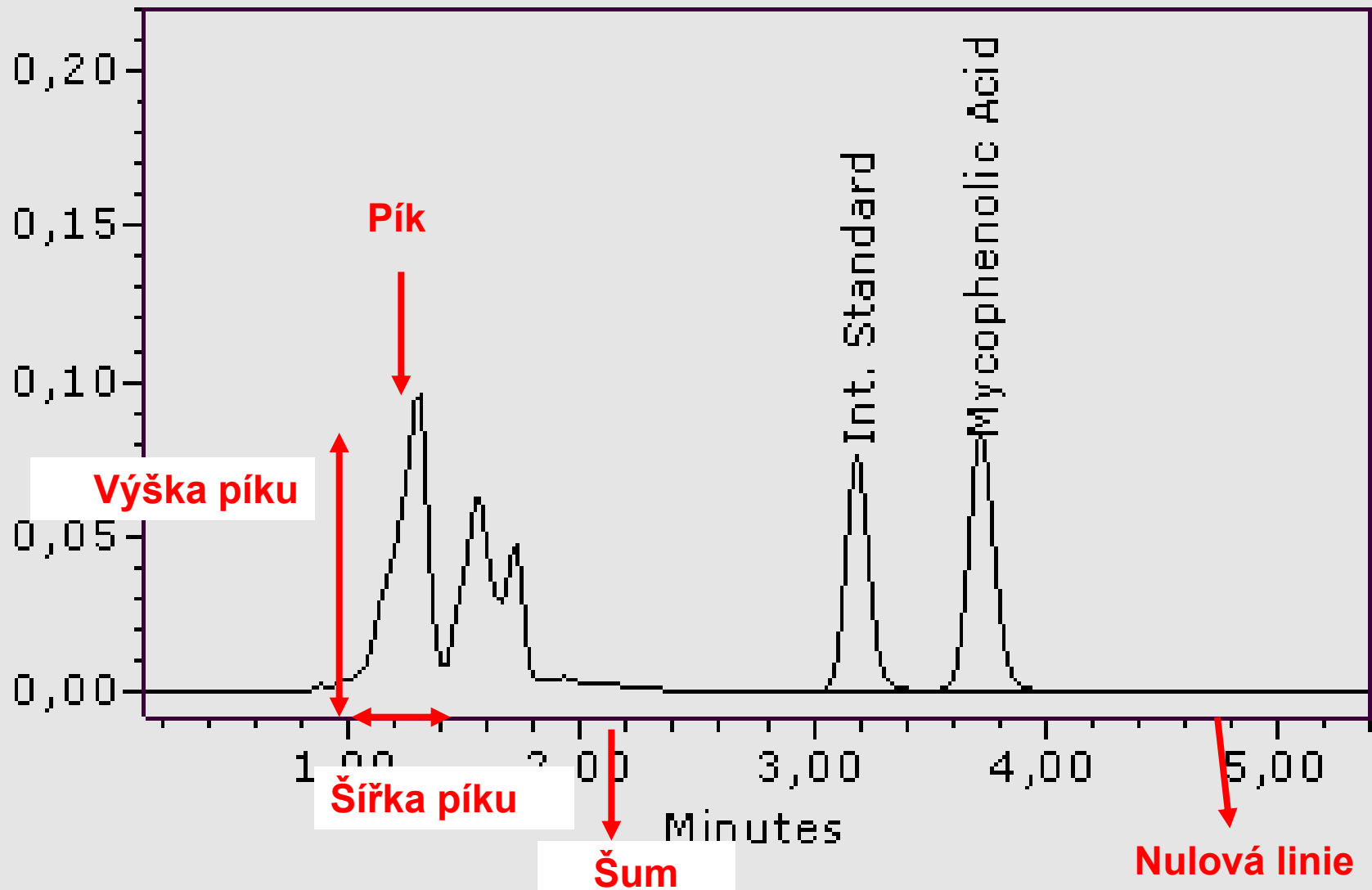
Šum

Drift

Účinnost kolony

Teoretické patro

# Chromatografický záznam



# Teoretické patro

Výšková část kolony, ve které průměrně teoreticky dochází k jednomu rovnovážnému dělicímu kroku fyzikálně chemického jevu (např. adsorpce/desorpce u sorpční chromatografie, rozpuštění látky v zakotvené fázi a její zpětné rozpuštění nebo vypaření do mobilní fáze apod.). Netýká se ionexové a afinitní chromatografie.

- 50 000 -100 000 teoretických pater na 1m délky
- (Také: minimální délka kolony nezbytná pro ustavení 1 cyklu rovnováhy mezi fázemi)

# Účinnost kolony

- Je úměrná počtu teoretických pater dané kolony.
- U ionexové a afinitní chromatografie místo o účinnosti hovoříme spíše o **kapacitě kolony**.
- Naproti tomu zvláště u analytických kolonových chromatografií nás zajímá *rozlišovací schopnost* kolony, kterou charakterizujeme tzv. **separačním číslem**, což je, zjednodušeně řečeno, počet rozlišitelných píků mezi dvěma vybranými mezními.

# Retenční/eluční čas nebo objem

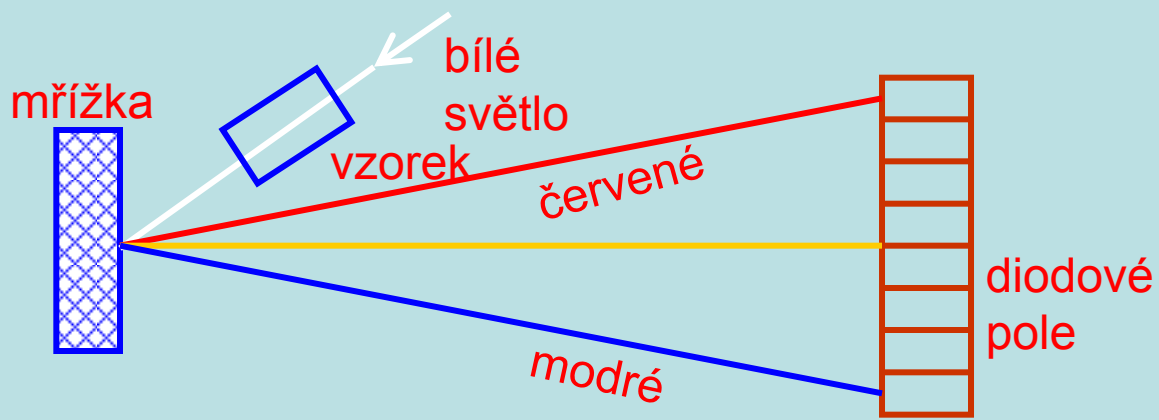
- Čas od začátku eluce, který je potřebný k tomu, aby se daná frakce vzorku dostala k detektoru za kolonou, nebo objem elučního činidla, který proteče za eluční čas kolonou.
- Jsou-li použity dobře definované kolony (např. některé komerční kolony pro HPLC nebo pro kapilární plynovou chromatografii) za předepsaných podmínek, lze retenční časy či objemy pro různé dělené látky tabelovat, neboť jsou dobře reprodukovatelné.



# Detektory používané v chromatografii

- UV/VIS
- Detektor s diodovým polem  
(Diode Array Detector)
- Fluorescenční
- Plamenový ionizační (FID)
- Elektrochemický  
(coulometrický, ampérometrický,....)
- Hmotnostní spektrometr (MS)

# Diodové pole



# Kvantifikace (vyhodnocení)

## 1. Přímé srovnání

plocha nebo výška píku a srovnání s kalibrátorem (externí standard)

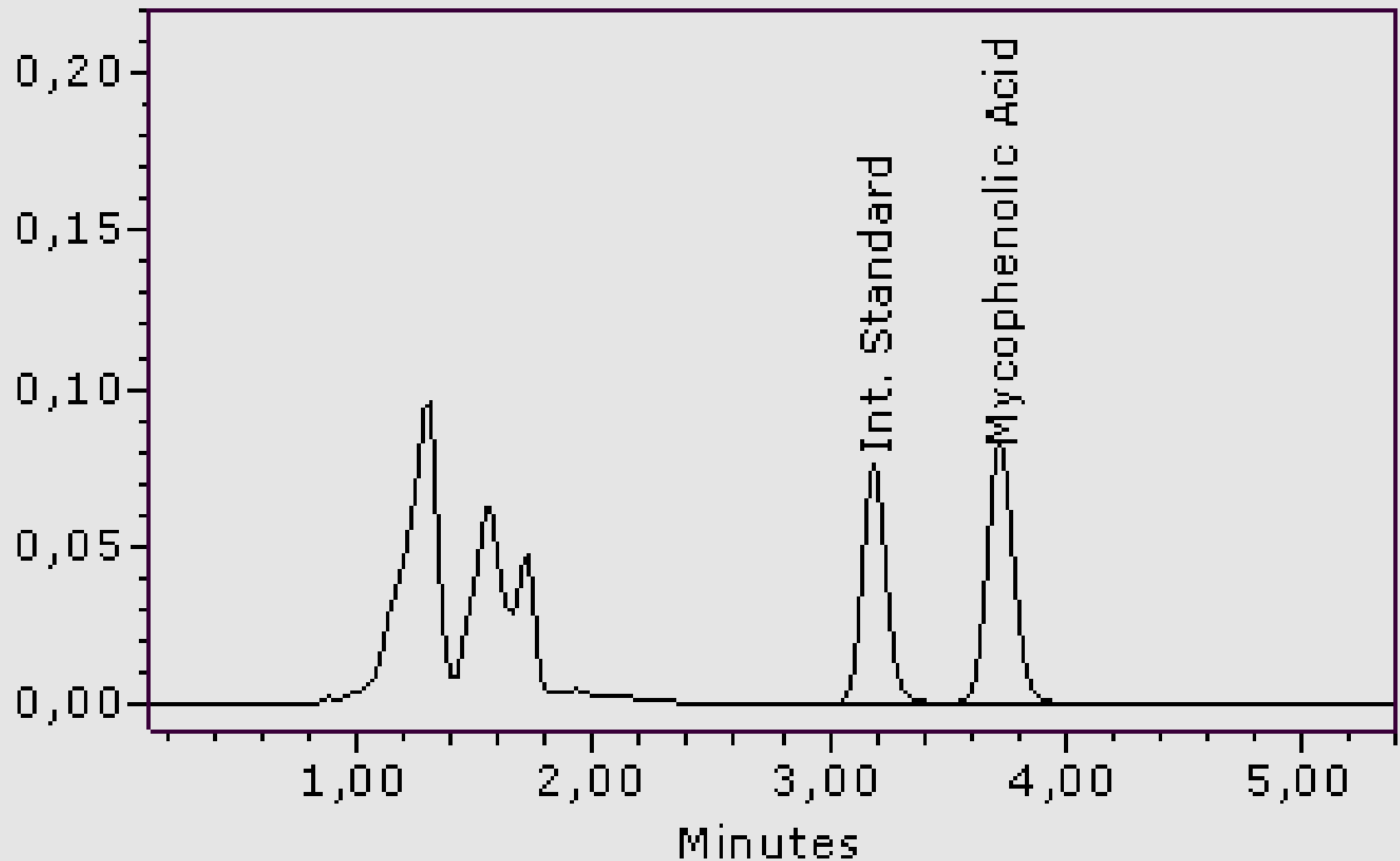
## 2. Metoda vnitřního standardu

plocha nebo výška píku  
srovnání poměru plochy nebo výšky píku stanovované látky s vnitřním standardem a kalibrátorem

# Vnitřní standard

- a) Analog stanovované látky
- b) Izotopem značený analyt ( $^{18}\text{O}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ )
- c) Jiná vhodná látka

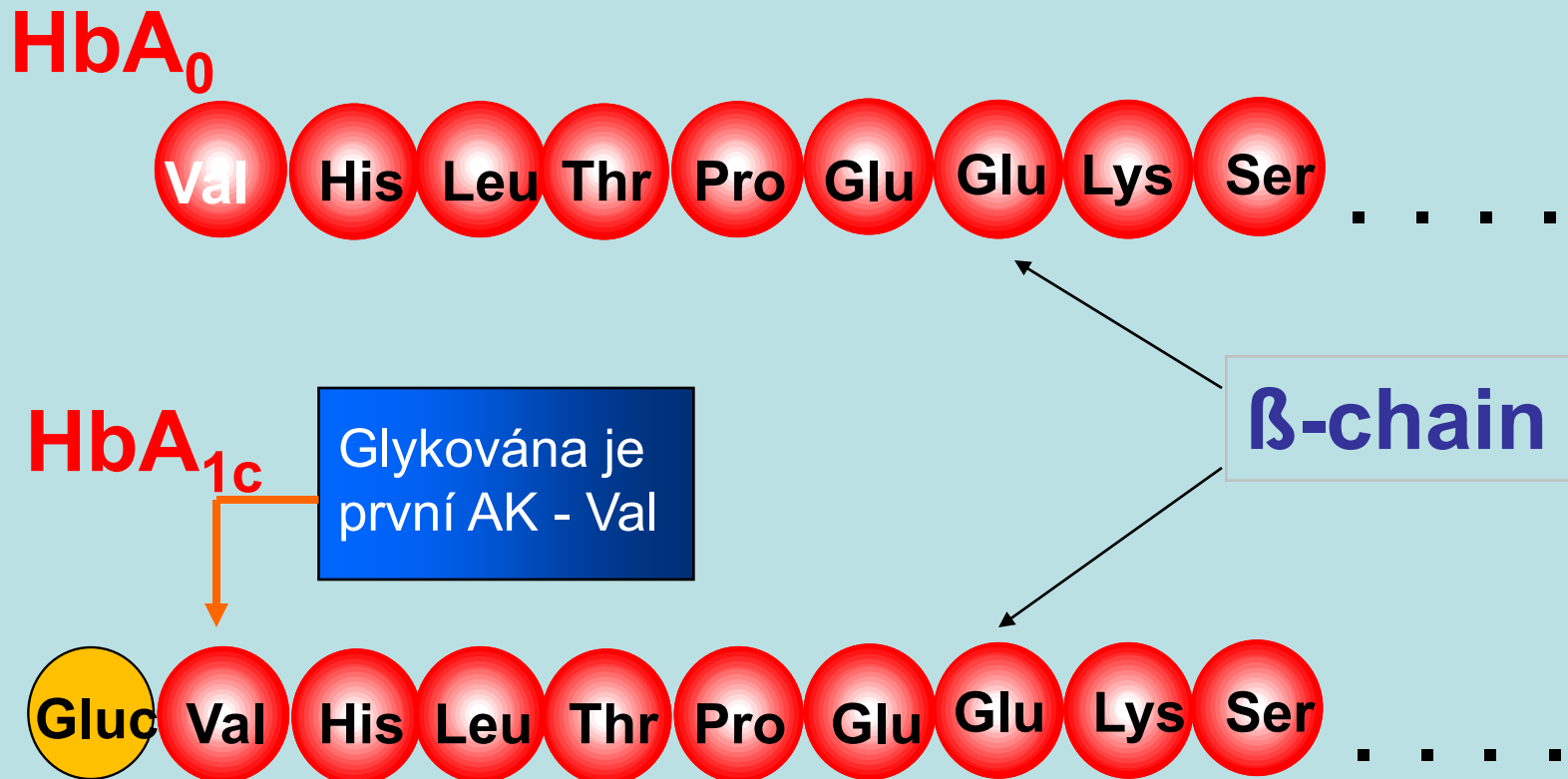
# Chromatografický záznam



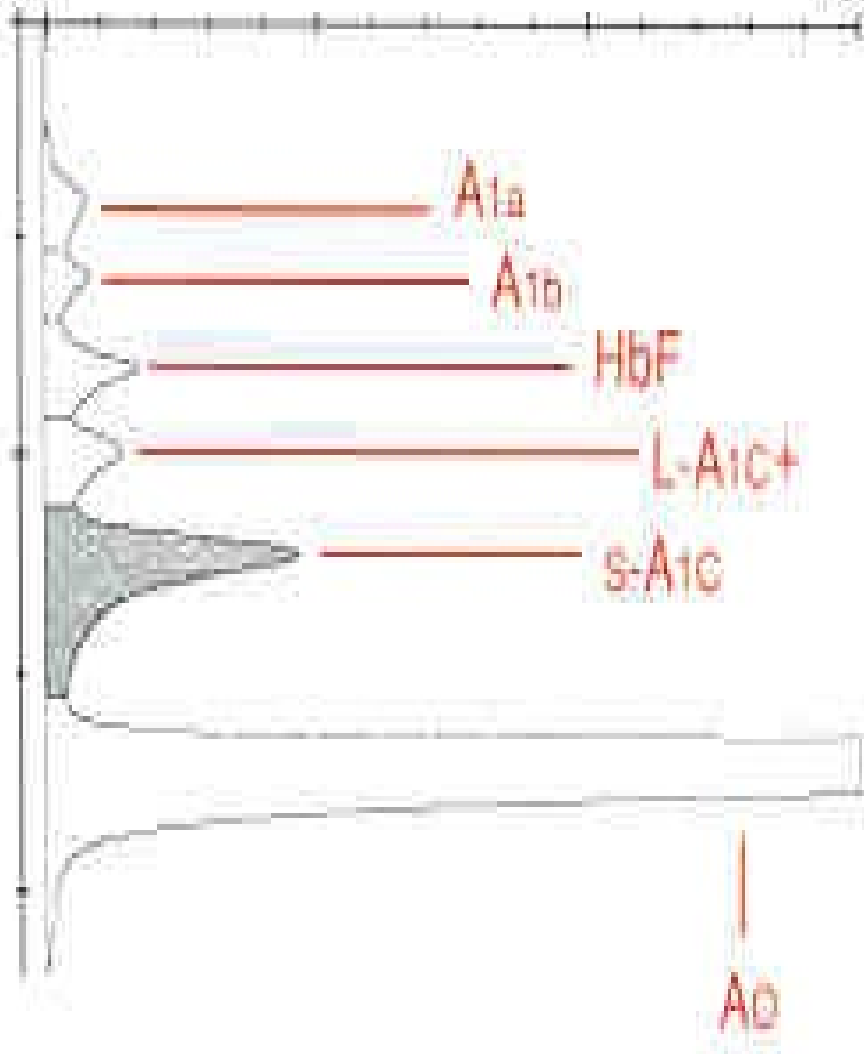
# Chromatograf (HbA1c)



# HbA1c vzniká glykací na N-konci $\beta$ -řetězce hemoglobinu



0% 15%

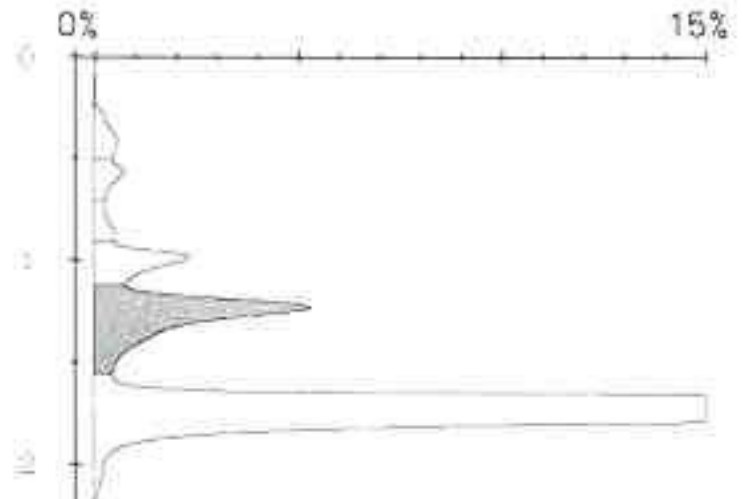


\*\*\*\*\* GLYCOHEMOGLOBIN REPORT \*\*\*\*\*

NO. 404 01D20 1998/04/04 15:43  
SAMPLE ID 03 - 10  
CALIB Y = 1.0911X + 0.0765

NAME	%	TIME	AREA
A1A	0.6	0.43	13.70
A1B	0.5	0.57	12.19
F	0.4	0.89	9.21
LA1C+	1.6	0.99	36.68
SA1C	5.4	1.23	109.65
A0	92.0	1.69	2084.81

TOTAL AREA 2266.24  
SA1C 5.4 TOTAL A1 6.5





# Analyzátor aminosavak

Mobilní fáze

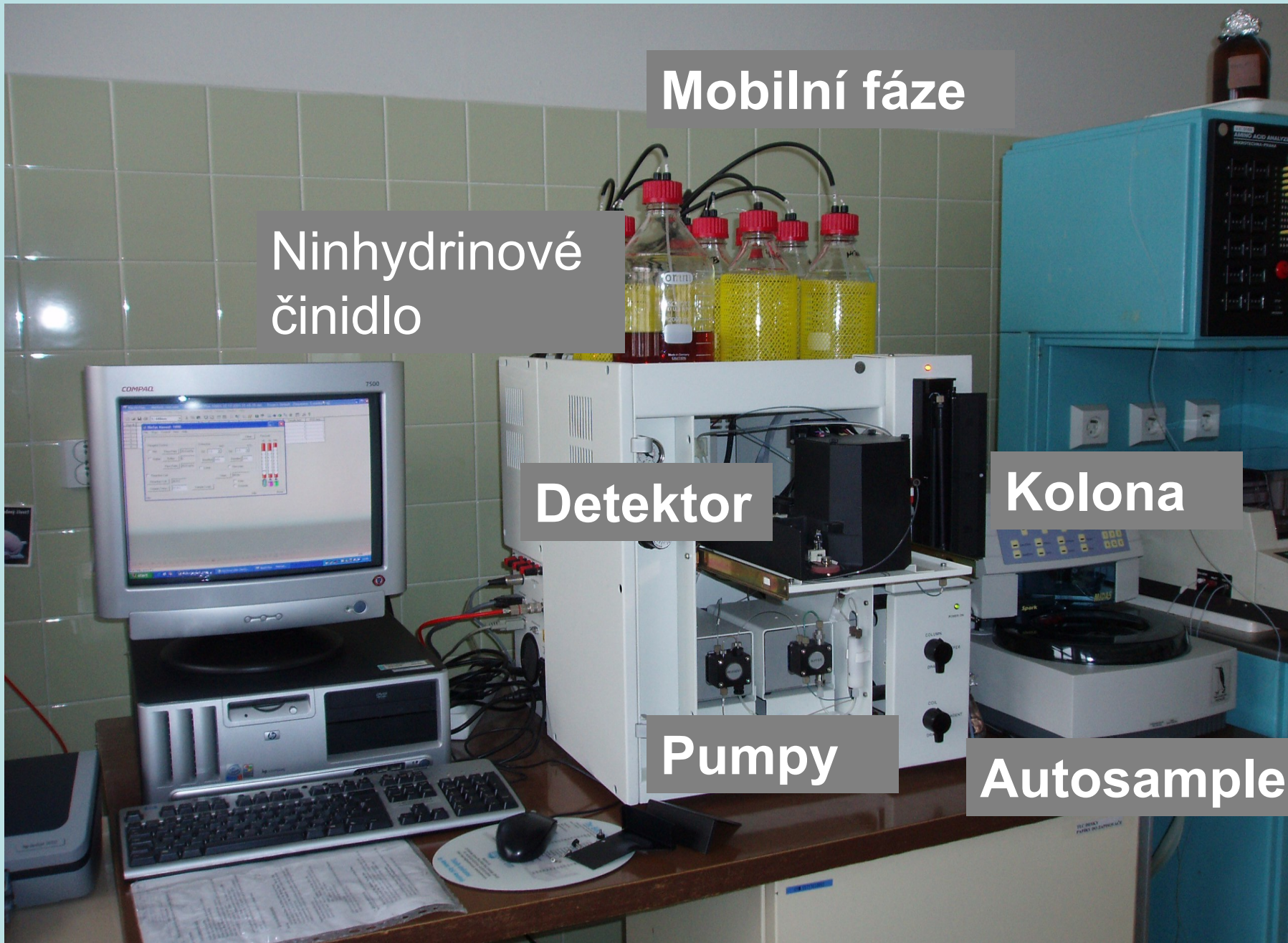
Ninhydrinové  
čínidlo

Detektor

Kolona

Pumpy

Autosampler

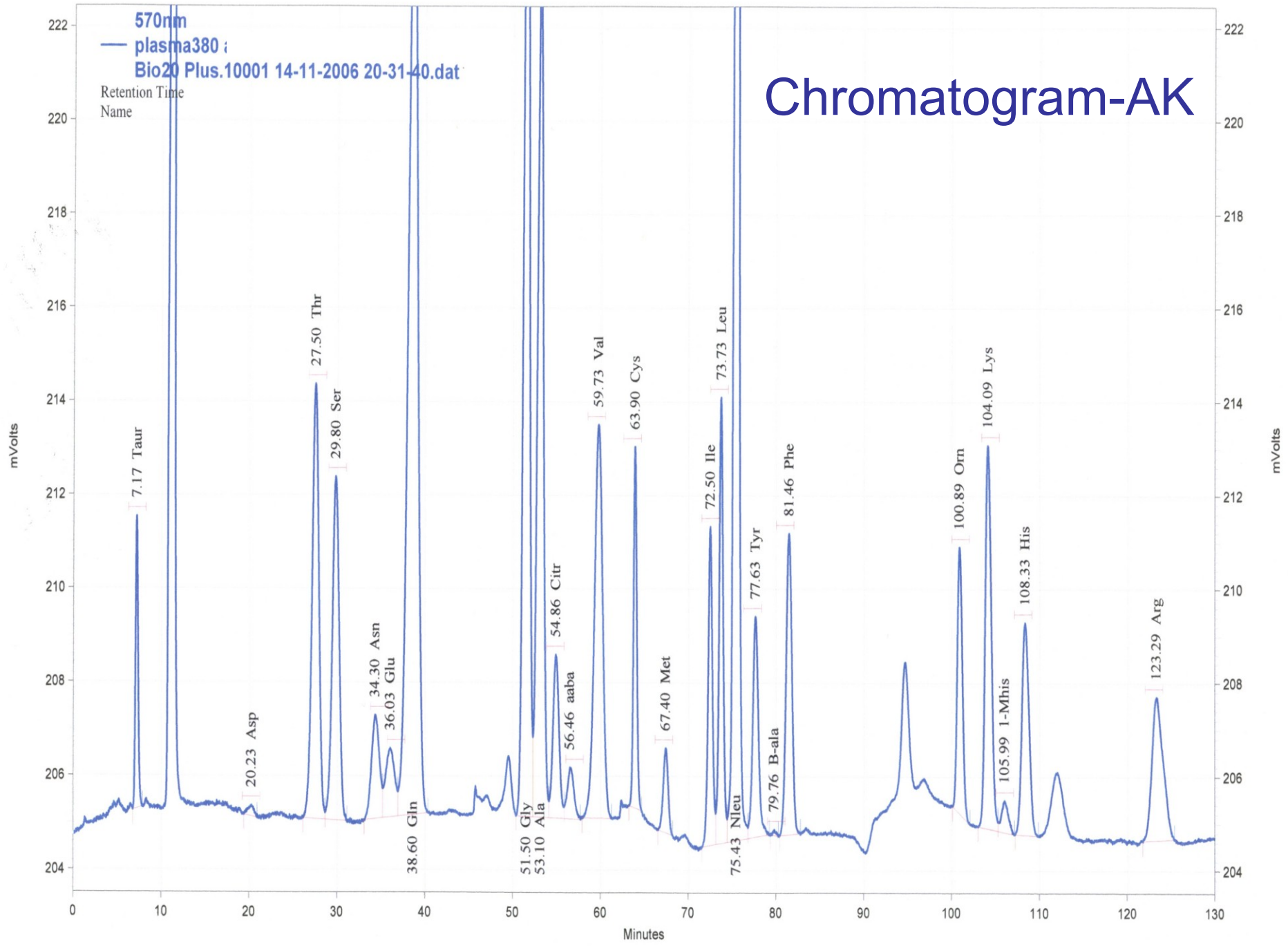


Detektor- fotodioda

Průtoková kyveta

Zdroj- halogenová lampa





# Plynová chromatografie (GC)

# Dělená směs musí procházet kolonou v plynném stavu

(Látka musí mít nízký b.v. nebo převedena po úpravě, nejčastěji derivatizací, na tyto látky)

Plyn - Kapalina

Rozdělovací

Plyn - Pevná látka

Adsorpční

Plyn: Dusík, Argon, .....

# Headspace

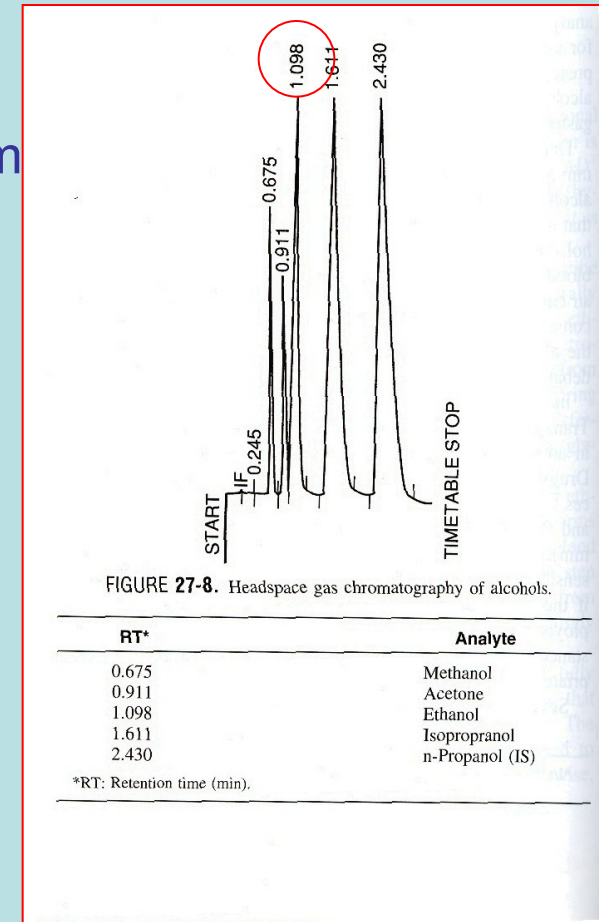
Těkavé látky lze z kapalných i rozmělněných pevných vzorků izolovat šetrnou extrakcí plynem, tzv. headspace techniky. Podstatou těchto metod je analýza plynné fáze, která byla v kontaktu s extrahovaným materiálem.

## ***Statická headspace***

Plynná fáze nad kapalinou nebo pevnou látkou umístěnou ve vialce uzavřené septem. Těkavé složky se rozptýlí v plynné fázi v koncentracích, které odpovídají jejich tlaku par.

# Příklad: Stanovení etanolu (GC)

- Krev je zahřívána ve speciální uzavřené lahvičce
- Zahřátím se etanol uvolní z krve do vzduchového prostoru v lahvičce (headspace )
- Určitá část z tohoto prostoru je automaticky injektována do plynového chromatografu
- Před analýzou jsou vzorky krve nebo séra naředěny roztokem chloridu sodného s obsahem n-propanolu jako vnitřního standardu. Chlorid sodný zvyšuje tlak par etanolu a eliminuje rozdíly v matrici
- Plynová chromatografie je jediná metoda použitelná pro forenzní (soudní) účely



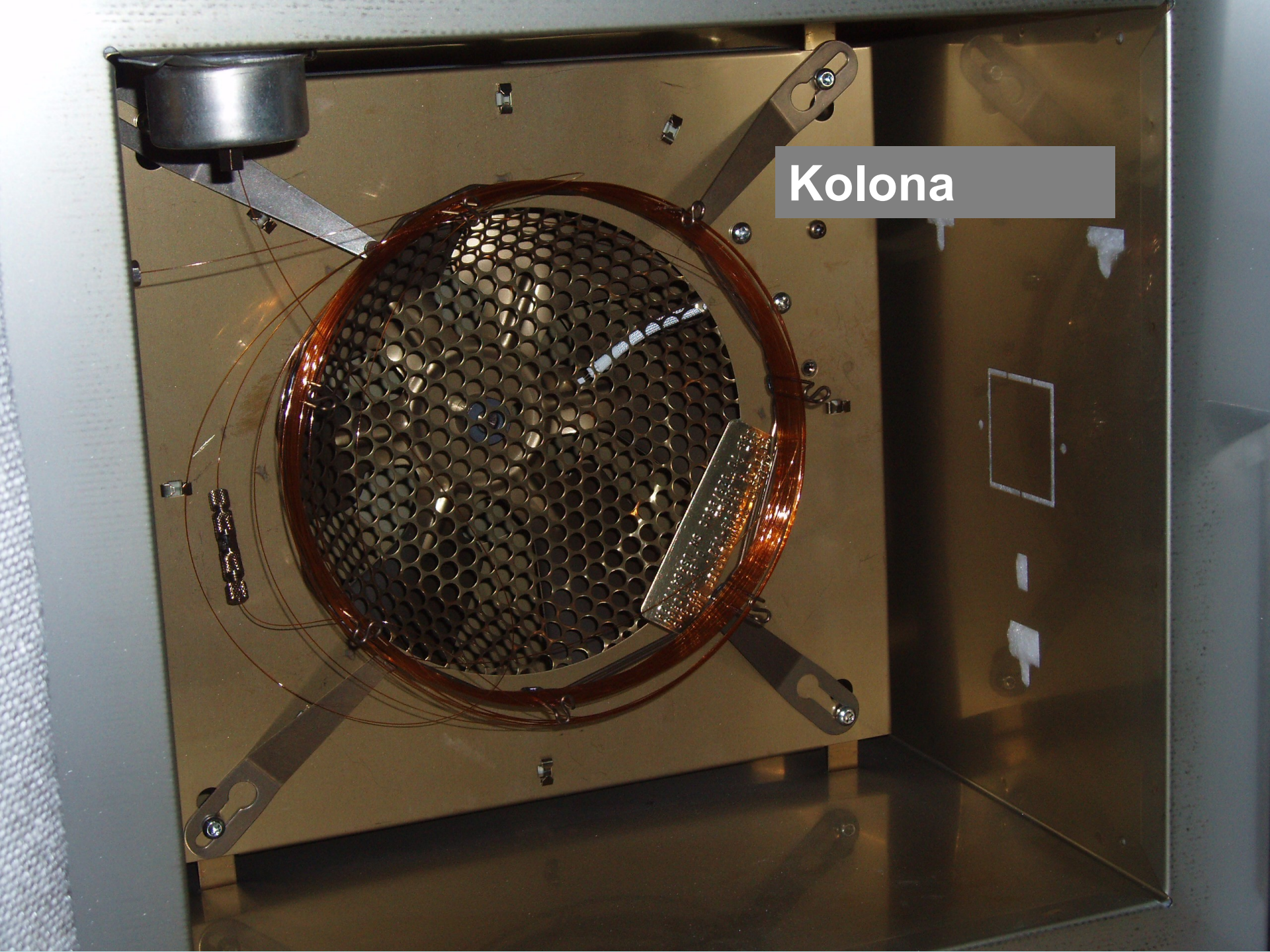




Autosampler

Vyhříváný prostor pro kolonu

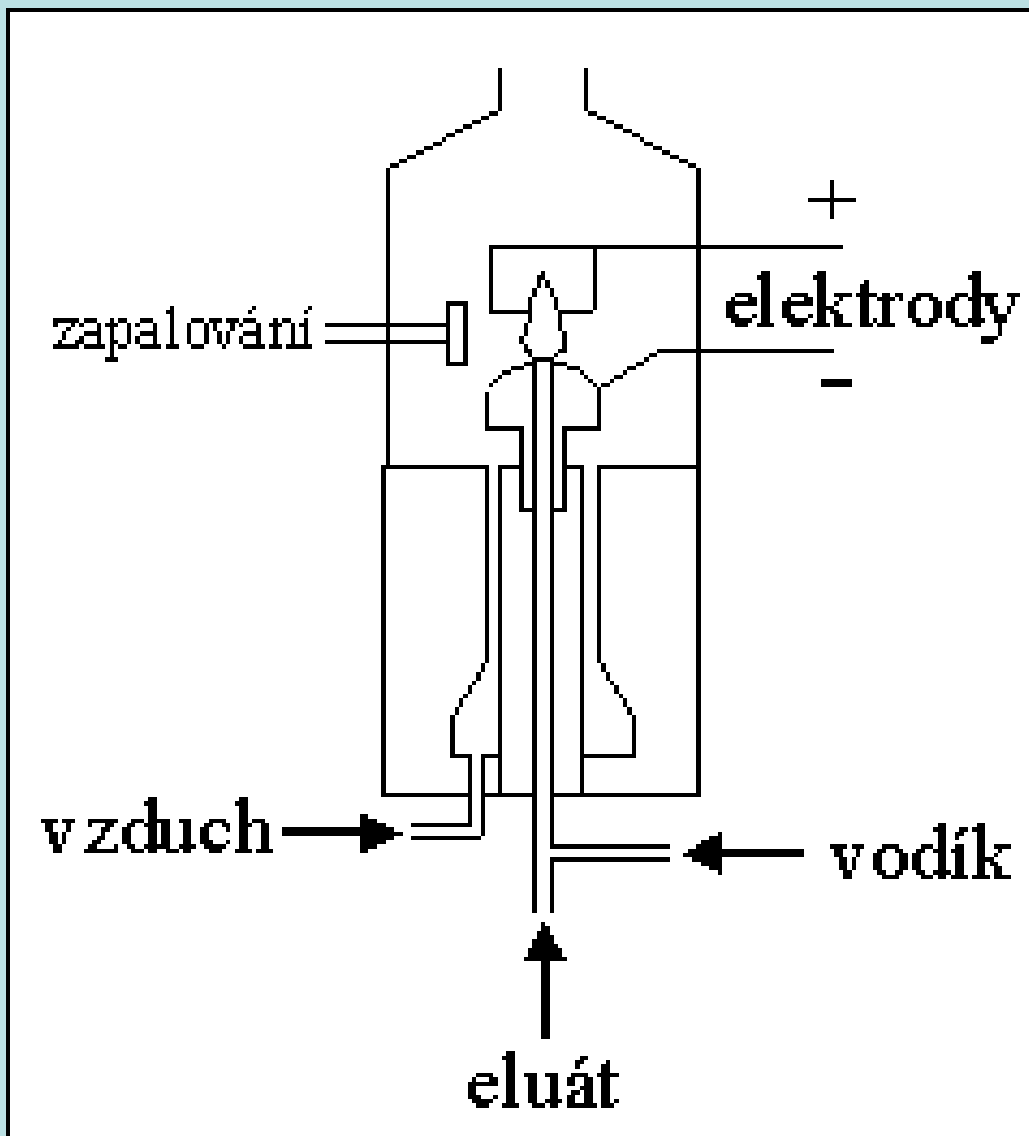
Kolona



# Detektory (u GC):

- Plamenový ionizační (FID)
- Tepelně vodivostní (TCD)
- Elektronového záchytu (ECD)
- Hmotnostní spektrometr (MS)

# Plamenový ionizační detektor (FID)



Měření změny  
ionizačního proudu  
H-plamene v  
důsledku  
přítomnosti iontů  
vzniklých při spálení

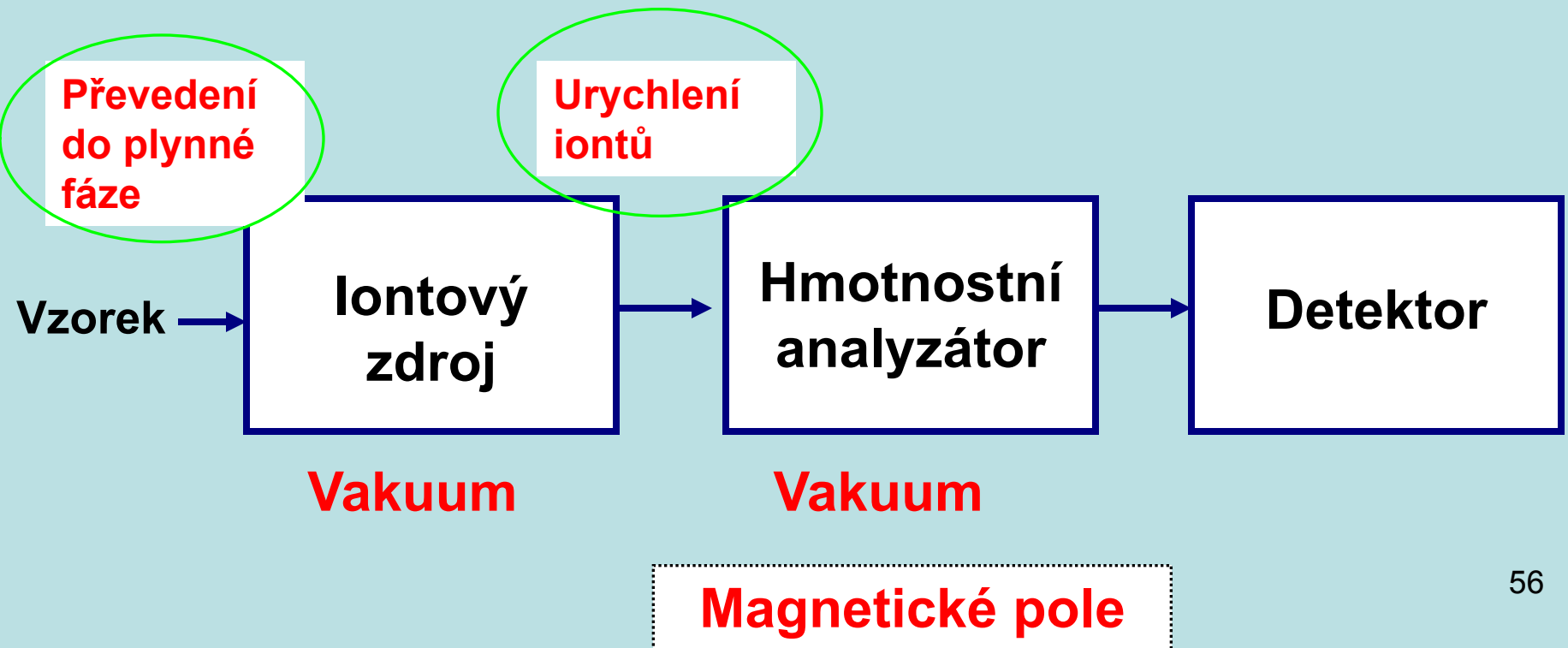
# Hmotnostní spektrometrie (MS)

je analytická metoda identifikující látky podle jejich molekulových hmotností

Analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty v plynné fázi ve vakuu a **rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ )**

# Hlavní součásti hmotových spektrometrů

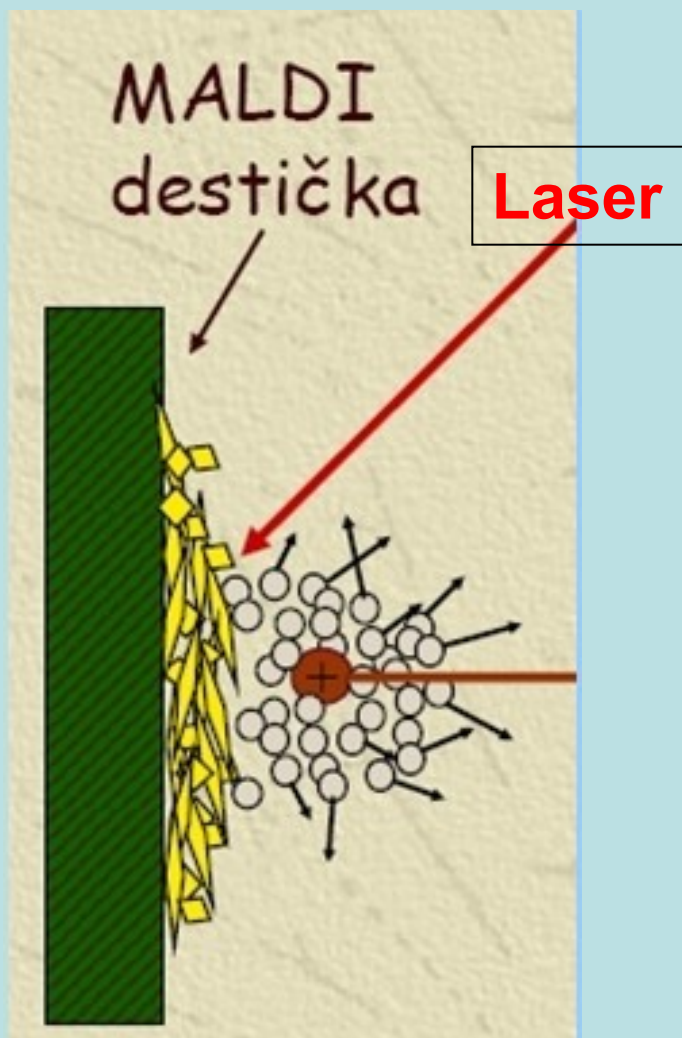
- **Iontový zdroj** (destrukce molekul na fragmenty)
- **Hmotnostní analyzátor**
- **Detektor** dopadajících fragmentů



# Ionizace a iontové zdroje

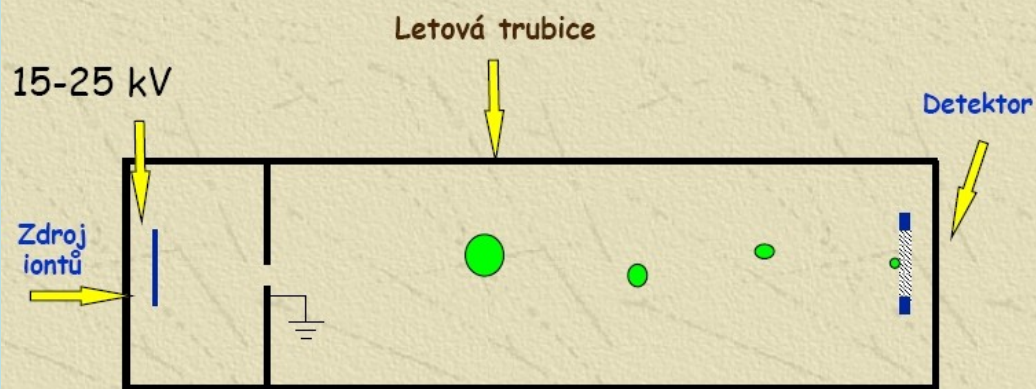
- **Nárazem elektronů (EI)**
- **Laserem (LD)**
  - MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization = ionizace pomocí laserové desorpce s přispěním matrice)
  - SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization)
- **Elektrosprejem (ESI)**
- **Chemická (APCI), ....**

# MALDI-TOF ionizace



Ionty o stejné energii mají rychlosti závislé na jejich hmotnosti ( $m/z$ )

## Průletový analyzátor (TOF)



Lehčí ionty doletí k detektoru rychleji než ionty těžší.

**TOF** (Time of Flight) měření doby letu iontů



# Hmotnostní analyzátořy

Jsou tvořeny kombinací elektrických a magnetických polí nebo je separace založena na měření rychlosti iontů.

- Magnetické
- Kvadrupolové
- Iontové pasti
- Průletové (TOF)
- Tandemové (MS/MS)

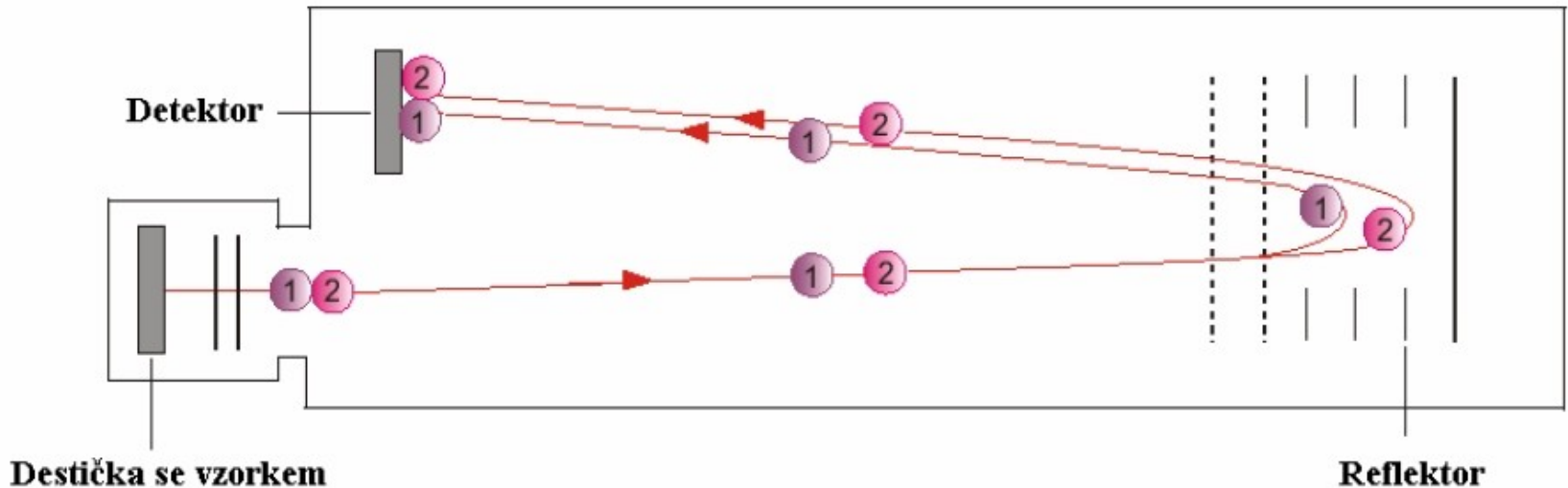
# Detektory

Měření elektrického proudu vznikajícího  
přímým dopadem stanovovaných iontů

- Fotonásobič, elektronový násobič
- Lineární nebo reflektorný mód

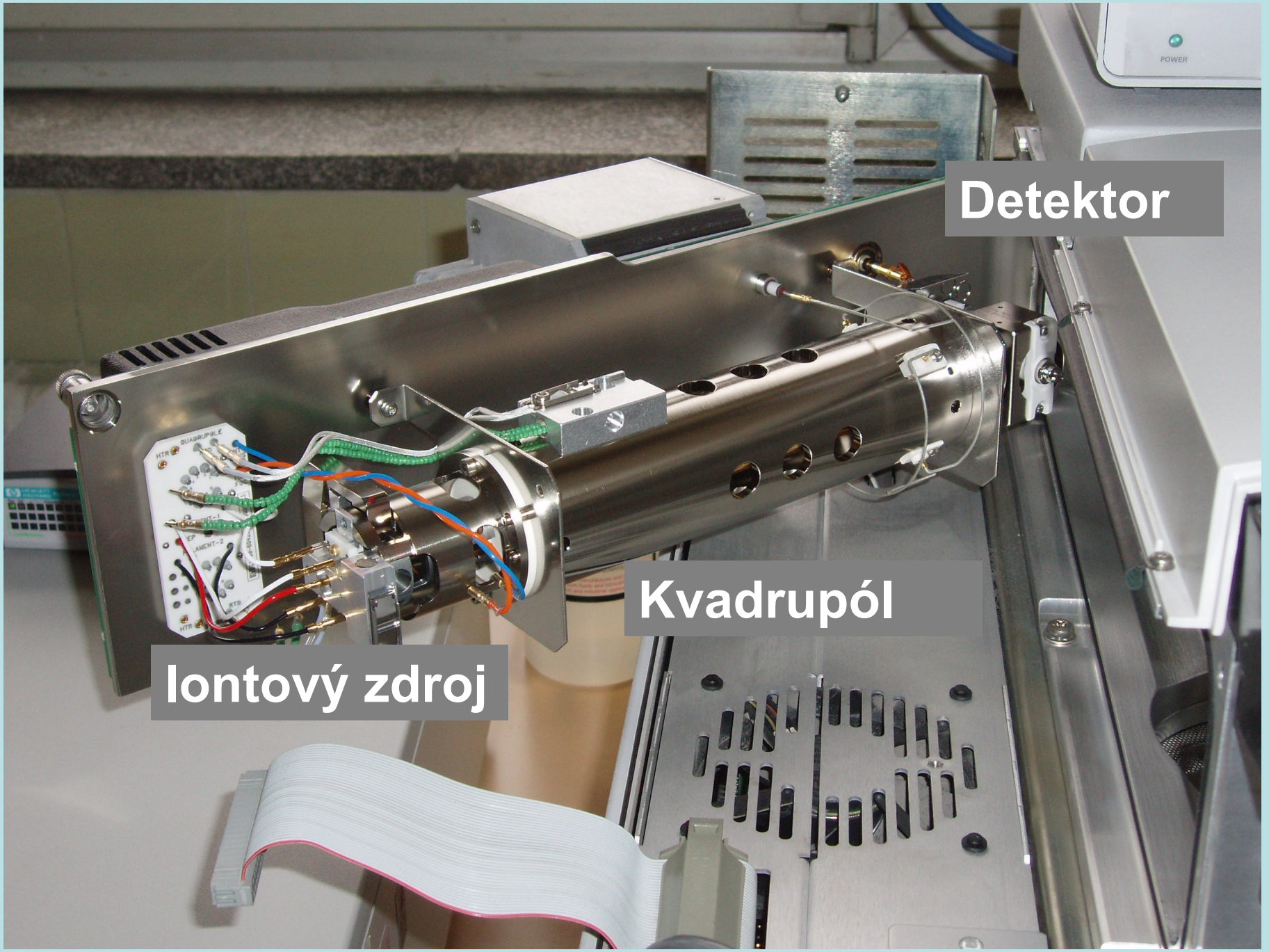
## Reflektorný mód

Letová trubice



# Měření molekulové hmotnosti

1. Převedení molekul na ionty
2. Urychlení iontů z pohybu lze vypočítat poměr  $m/z$
3. Detektor určí parametry dráhy iontů
4. Zpracování signálu a výpočet  $m/z$

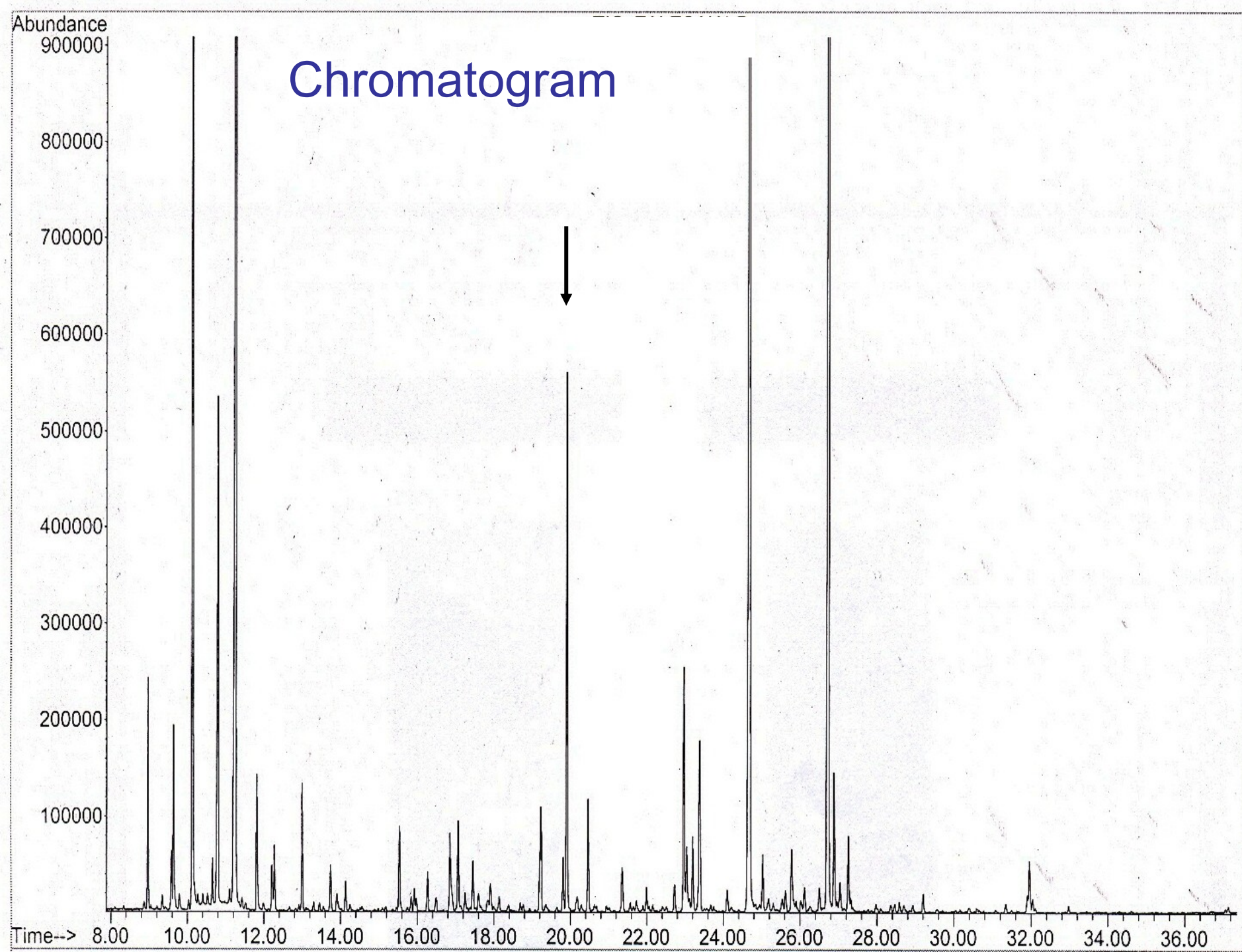


**Detektor**

**Kvadrupól**

**Iontový zdroj**

# Chromatogram



# Hmotnostní spektrum

S

