

Chromatografie

Petr Breinek

Společným znakem všech chromatografických metod je kontinuální dělení složek analyzované směsi mezi dvěma fázemi.

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

Výsledek chromatografie [chlorofylu](#)



Princip chromatografického dělení

Koncentrace látky mezi těmito fázemi je definována **distribučním koeficientem** $K_d = c_s / c_m$

Sloučeniny se dělí dle svých distribučních koeficientů pro zvolenou mobilní a stacionární fázi

Různá hlediska dělení chromatografie

Podle povahy mobilní fáze

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

Podle způsobu provedení

- ❖ **Kolonová (sloupcová)** - stacionární fázi (ukotvenou na vhodném materiálu) je naplněna skleněná či kovová kolona a mobilní fáze protéká kolonou pomocí gravitace nebo pumpy
- ❖ **Plošná (planární)** vhodný materiál pro stacionární fázi (silikagel, Al_2O_3) je nanesen v tenké vrstvě na skleněnou, plastickou nebo kovovou desku a mobilní fáze se pohybuje tenkou vrstvou pomocí kapilárních sil - tenkovrstevná chromatografie (chromatografie na tenké vrstvě, TLC), papírová chromatografie

Podle principu separace

- **Rozdělovací**
- **Adsorpční**
- **Ionově výměnná (chemisorpční)**
- **Gelová (síťový efekt)**
- **Afinitní**

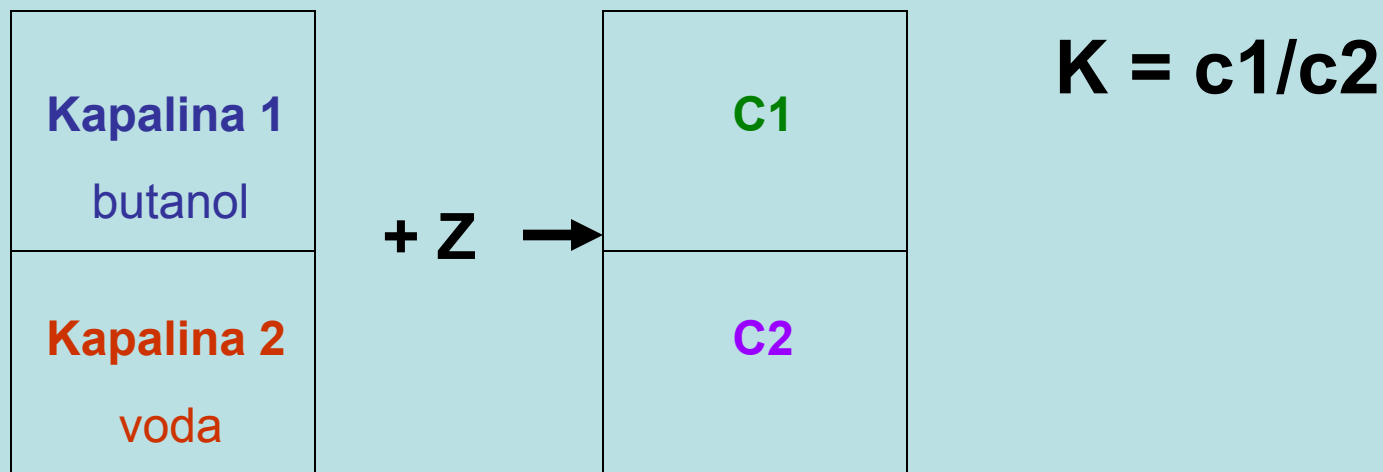
Podle účelu použití

- ✓ **Analytická**
- ✓ **Preparativní**

Rozdělovací chromatografie

je založena na různé velikosti rozdělovacích koeficientů dělených látek mezi dvěma nemísitelnými nebo omezeně mísitelnými kapalinami

- separaci rozhoduje **různá rozpustnost dělených látek v stacionární a mobilní fázi**



Adsorpční chromatografie

je založena na rozdílných adsorpčních schopnostech jedné látky k povrchu druhé látky(adsorbentu) tvořící stacionární fázi

• stacionární fáze je adsorbent (sorbent)

- ❖ **Polární** (např. silikagel, oxid hlinitý a křemičitý)
- ❖ **Nepolární** (např. aktivní uhlí)

Iontově výměnná chromatografie

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

stacionární fází je **iontoměnič** (ionex)

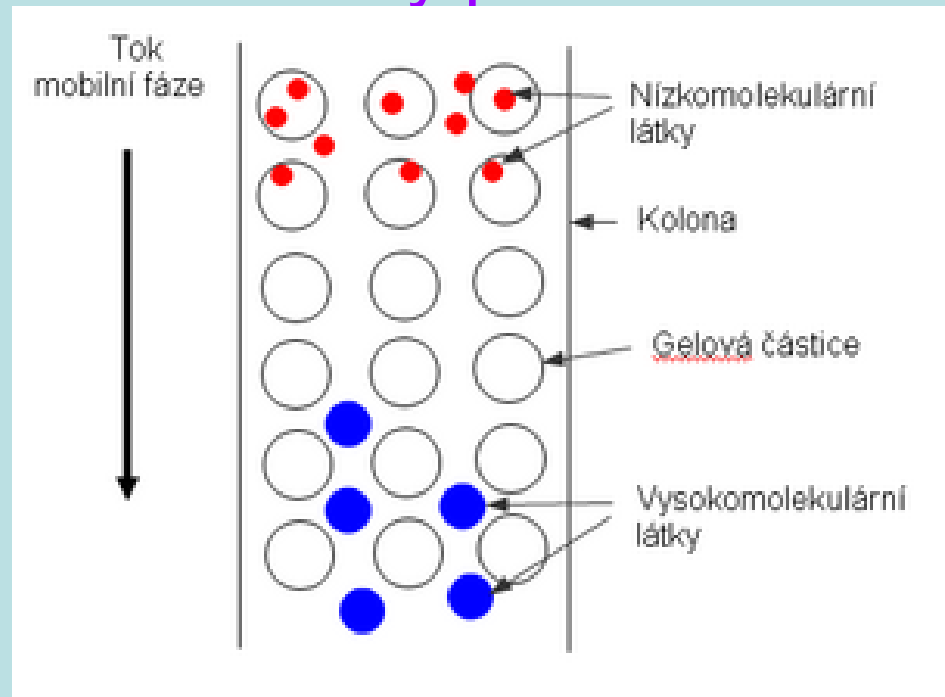
- ❖ Anexy („přitahují anionty“)
- ❖ Katexy („přitahují kationty“)

mobilní fází jsou nejčastěji vodné roztoky

Gelová chromatografie

také chromatografie na „molekulových sítích“
dělení látek na gelu je založeno na velikosti molekul

- stacionární fáze je neionizovaný přírodní nebo syntetický gel.



Afinitní chromatografie

využívá vlastnosti biologicky aktivní látky vytvářet specificky reverzibilní komplex s jinou molekulou (chemická reakce).

Stacionární fáze obsahuje zakotvené ligandy, na které se rozdělovaná látka váže.

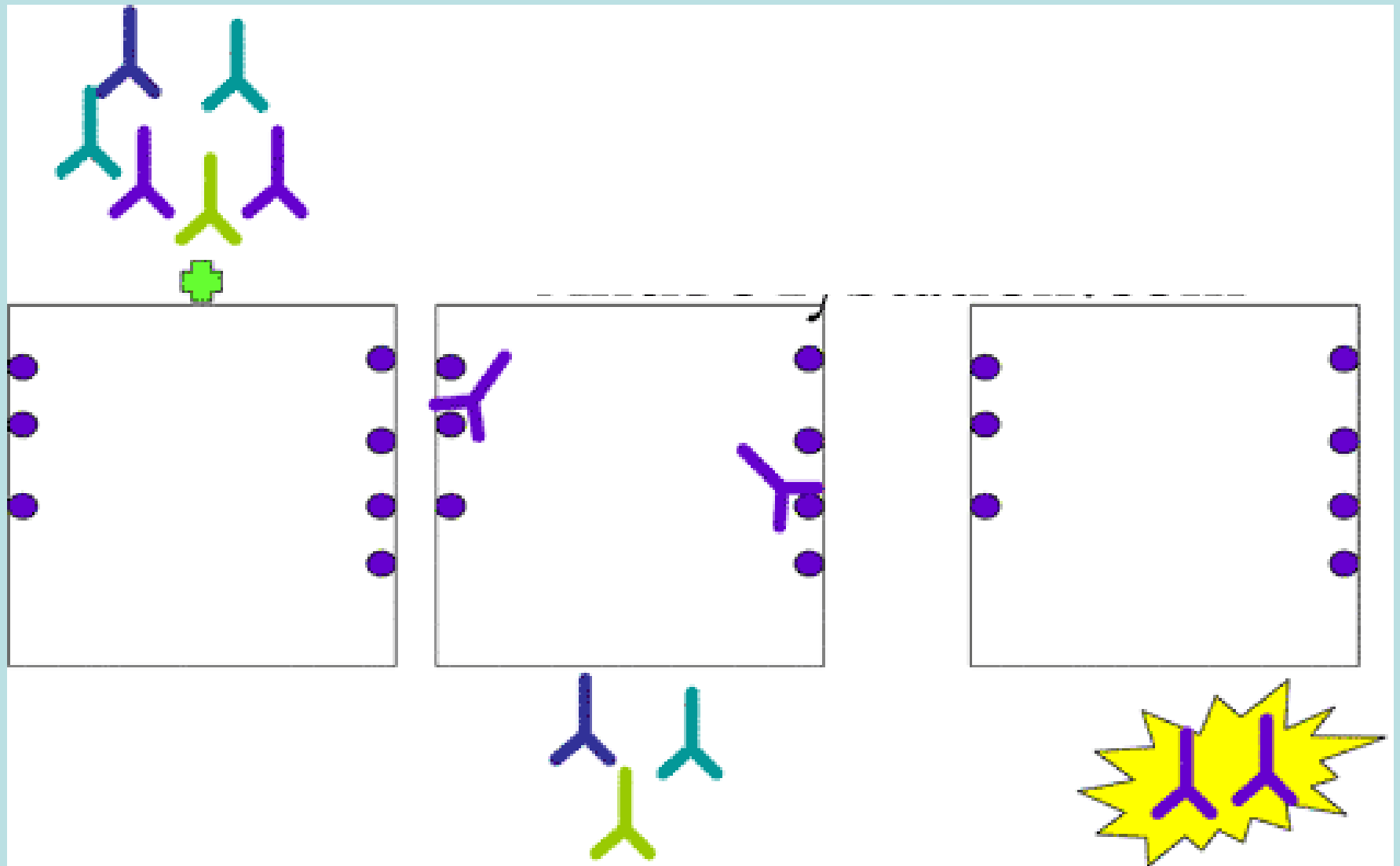
Jestliže jednu složku navážeme na vhodný nosič, potom můžeme druhou látku izolovat a kvantitativně stanovit.

Např. **antigen-protilátka**, enzym-substrát,...

Potom je zpravidla nutné změnit složení eluentu, aby nastala disociace komplexu a abychom získali přečištěný materiál.

Typickým příkladem použití afinitní chromatografie je izolace albuminu z lidského séra.

Afinitní chromatografie

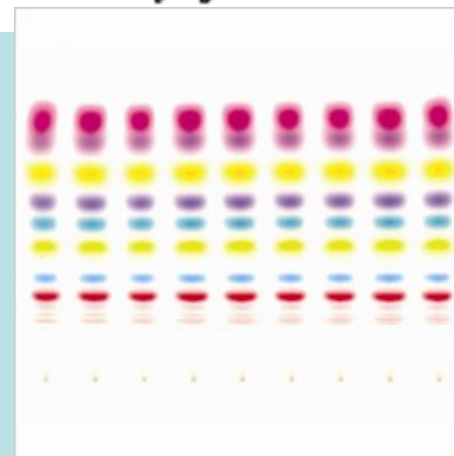
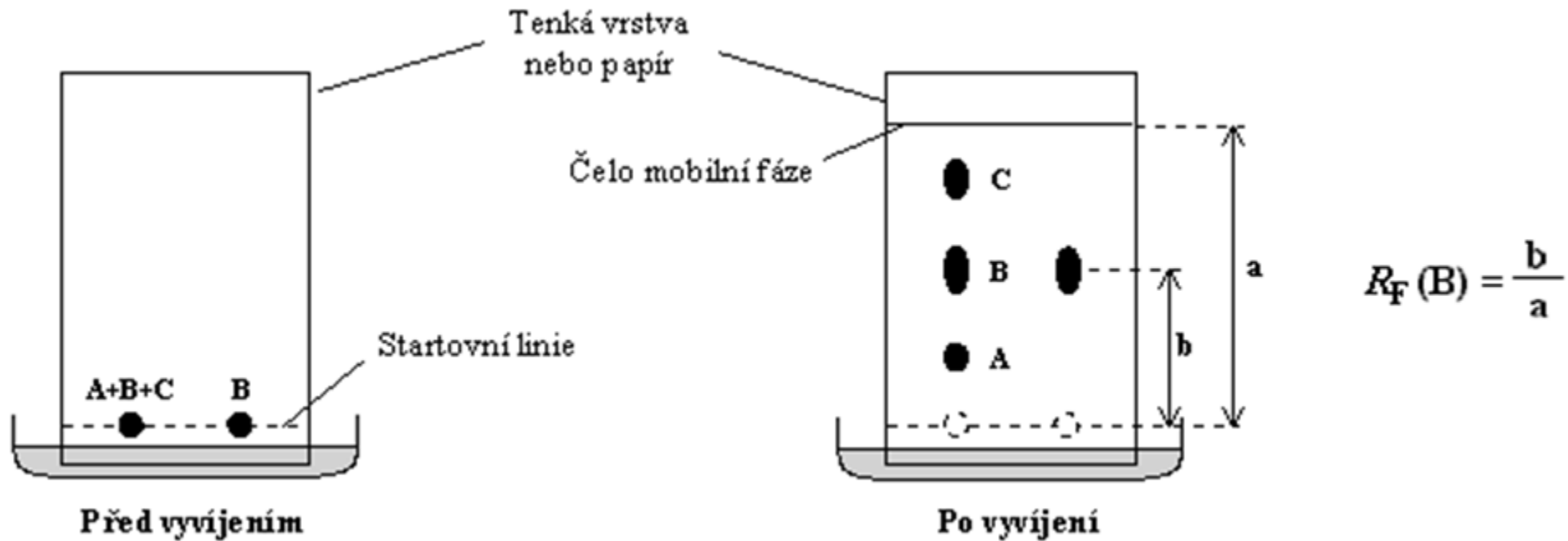


Techniky úpravy vzorků

- Extrakce kapalinou
- Extrakce pevnou látkou (SPE)
- Ultrafiltrace
- Derivatizace
- Extrakce plynem (headspace)
- Adsorpce
- Vymrazování



Planární (plošná) chromatografie



Příklad:
Papírová chromatografie
Toxilab (Merck)



Extrakce



Napipetování extraktu



Vložení terčičku filtr.papíru



Odpaření extrakčního činidla



Obr. 3.5
Vložení terčíku na start



Vyvíjení chromatogramu

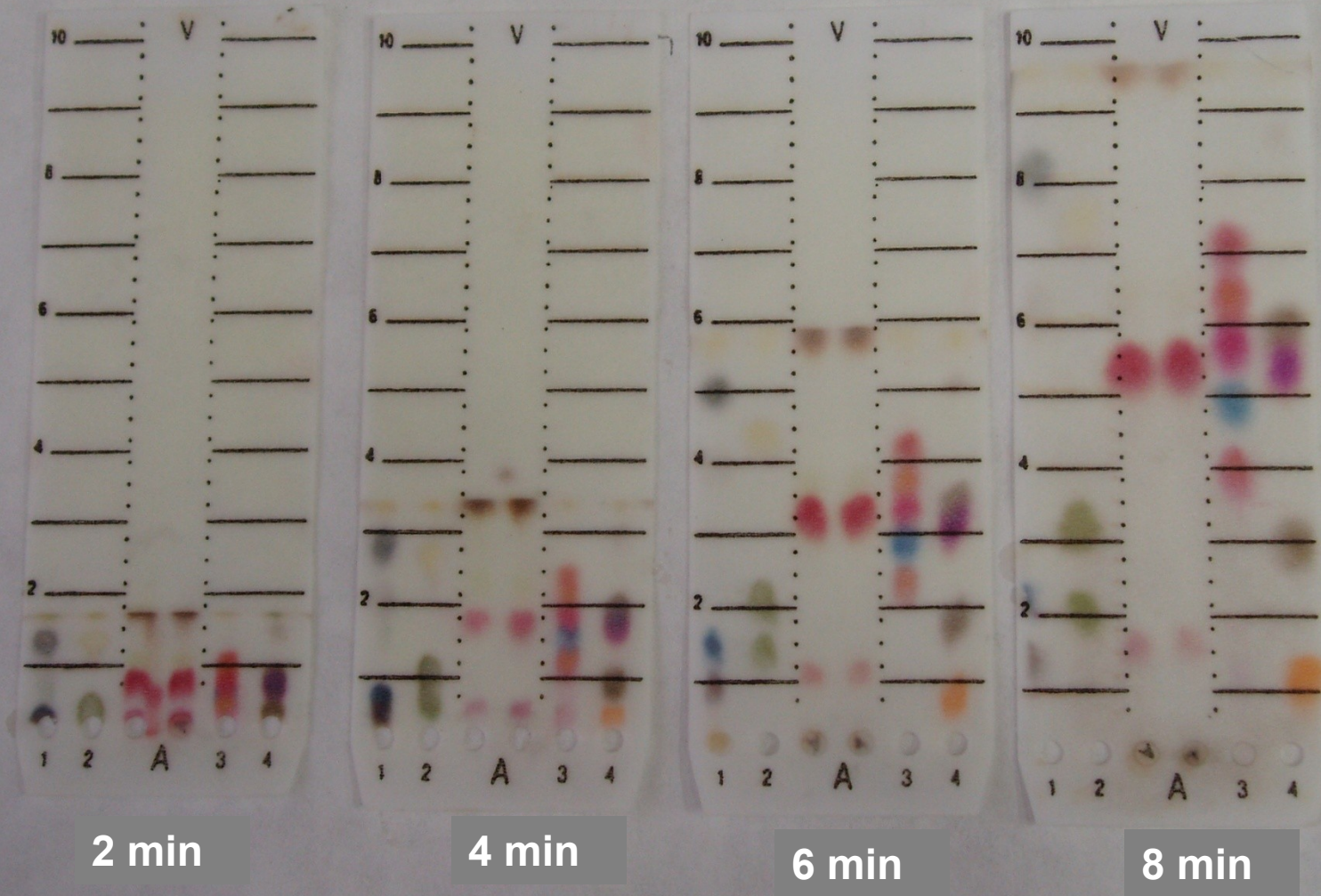


Fixace chromatogramu



Barvení chromatogramu

Časový průběh vyvíjení chromatogramu



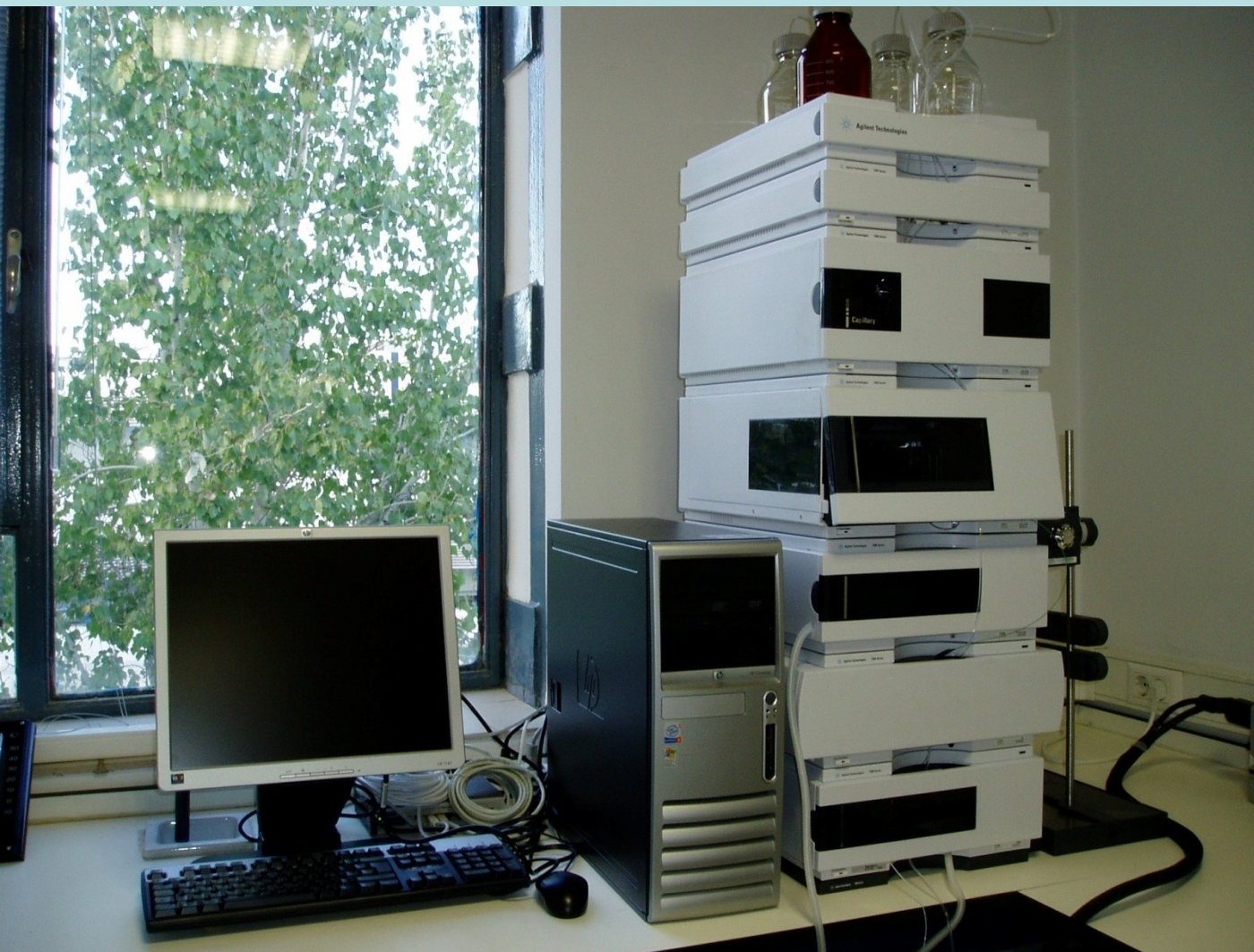
Kapalinová chromatografie

1. Adsorpční
2. Rozdělovací
3. Ionově výměnná
4. Gelová
5. Afinitní

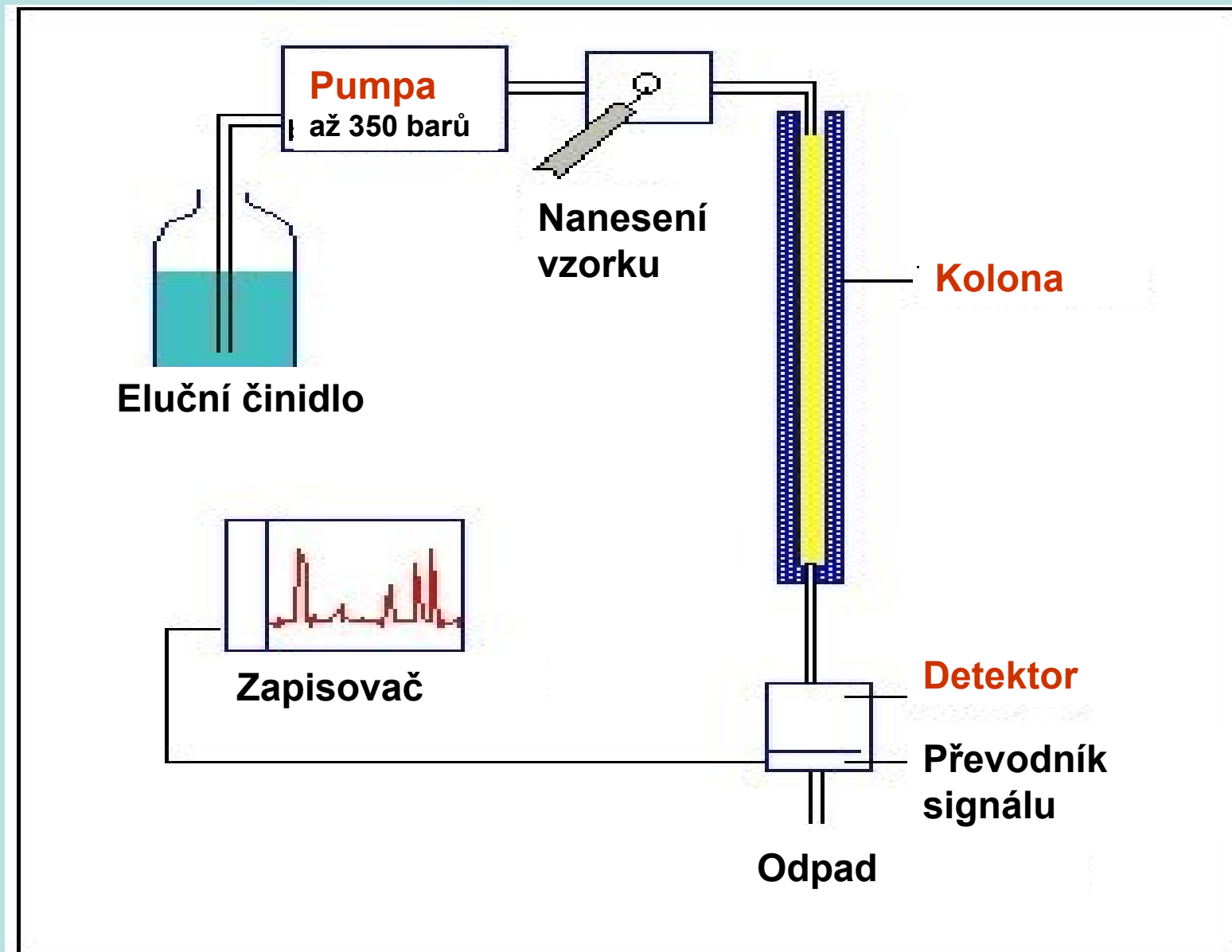
Příklad

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

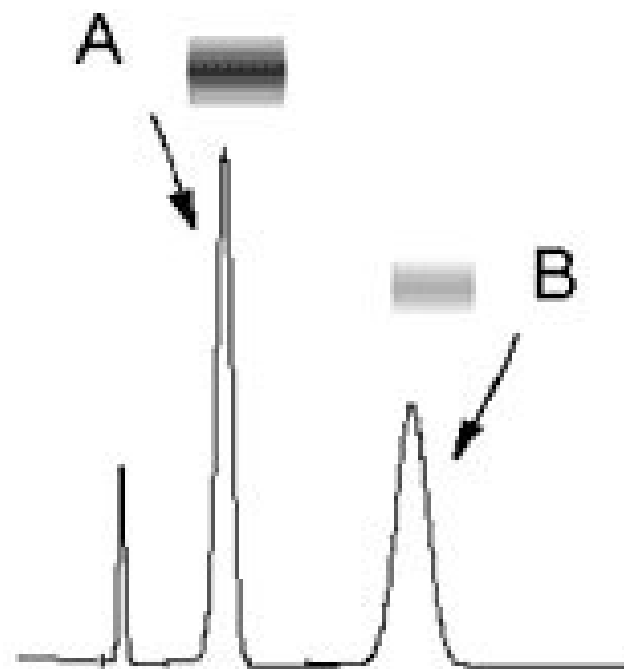
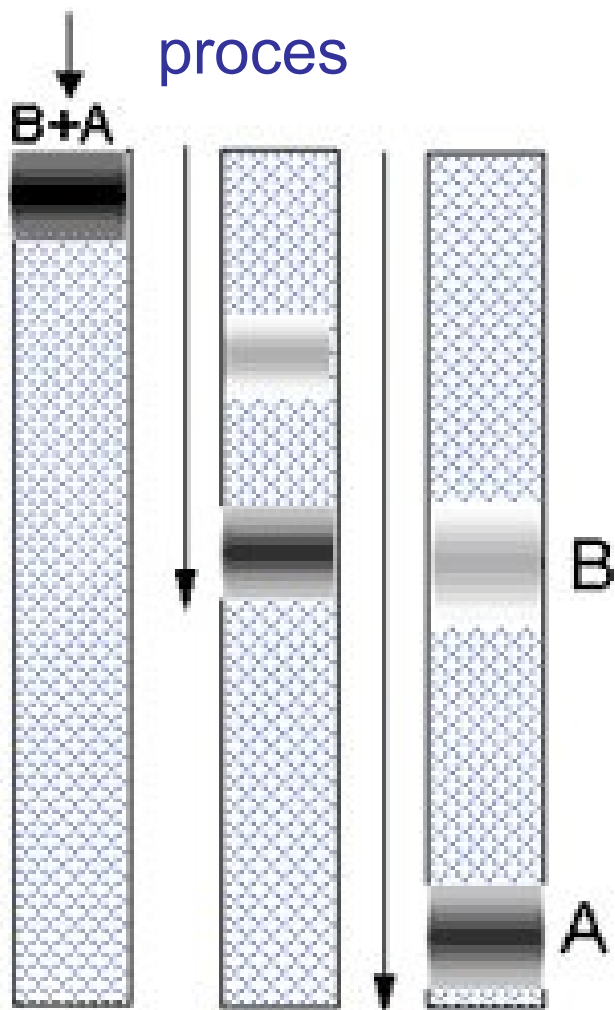
HPLC – přístroj



HPLC – jednoduché schéma



Chromatografický proces



Chromatogram

Eluce látek v koloně

Reverzní fáze = stacionární fáze je méně polární než fáze mobilní

Typ eluce:

- ❖ Izokratický
- ❖ Gradientový = v průběhu dělení se mění složení mobilní fáze

Hlavní součásti kapalinového chromatografu

Vysokotlaká pumpa

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

Injektor

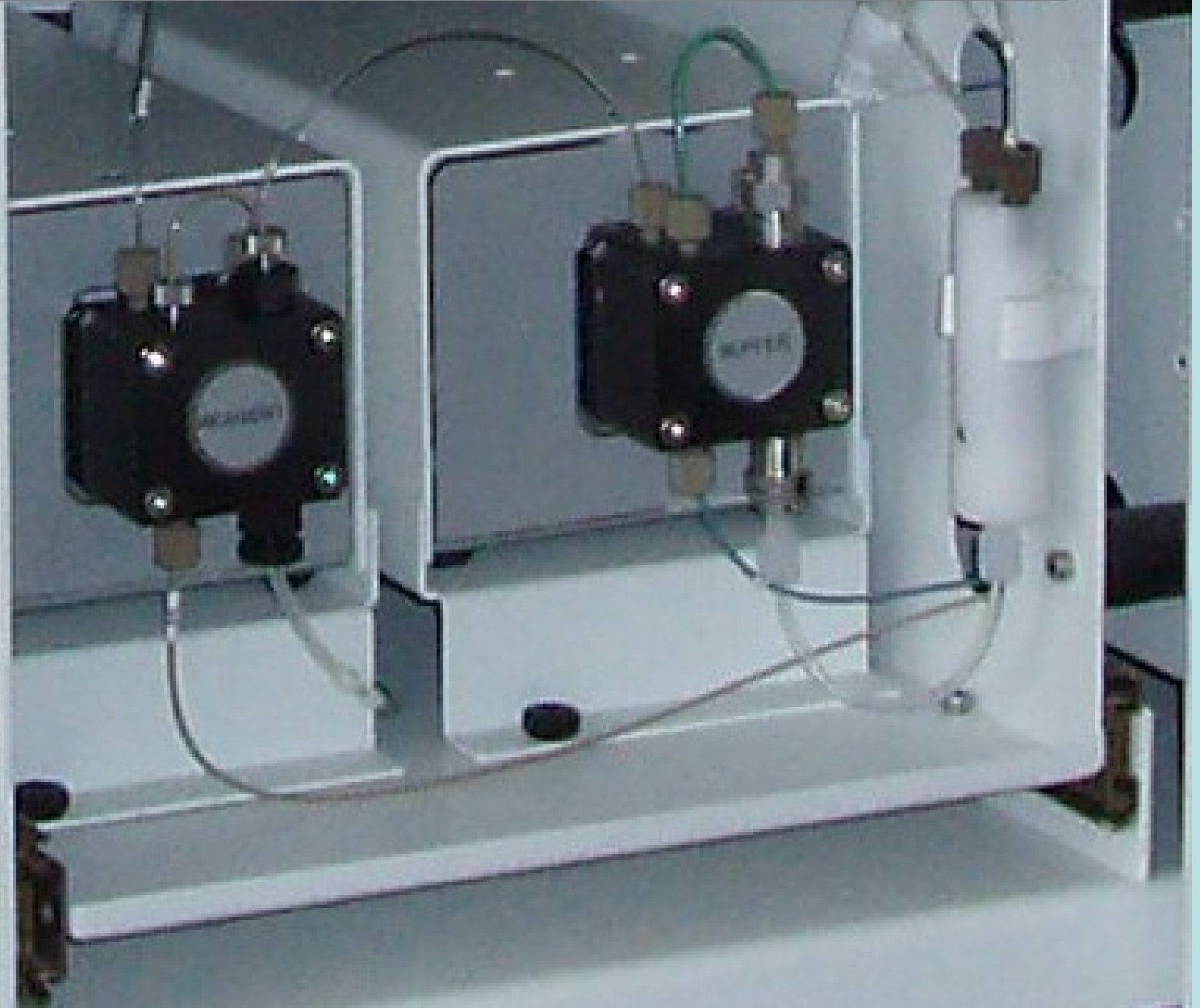
Dělicí kolona

Detektor

Vyhodnocovací zařízení

(zapisovač, PC, tiskárna)

Vysokotlaká peristaltická pumpa



Injektor – dávkovací zařízení





Dělicí kolona

Detektory

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

Základní pojmy:

Fáze

Průtok (flow rate, ml/s)

Retenční čas (minuty)

Pík

Výška píku; Plocha píku; Šířka píku

Šum

Drift

Účinnost kolony

Teoretické patro = **minimální délka kolony nezbytná pro ustavení 1 cyklu rovnováhy mezi fázemi;**

50 000 -100 000 teoretických pater na 1m délky

Kvantifikace (vyhodnocení)

1. Přímé srovnání

plocha nebo výška píku

srovnání s kalibrátorem (externí standard)

2. Metoda vnitřního standardu

plocha nebo výška píku

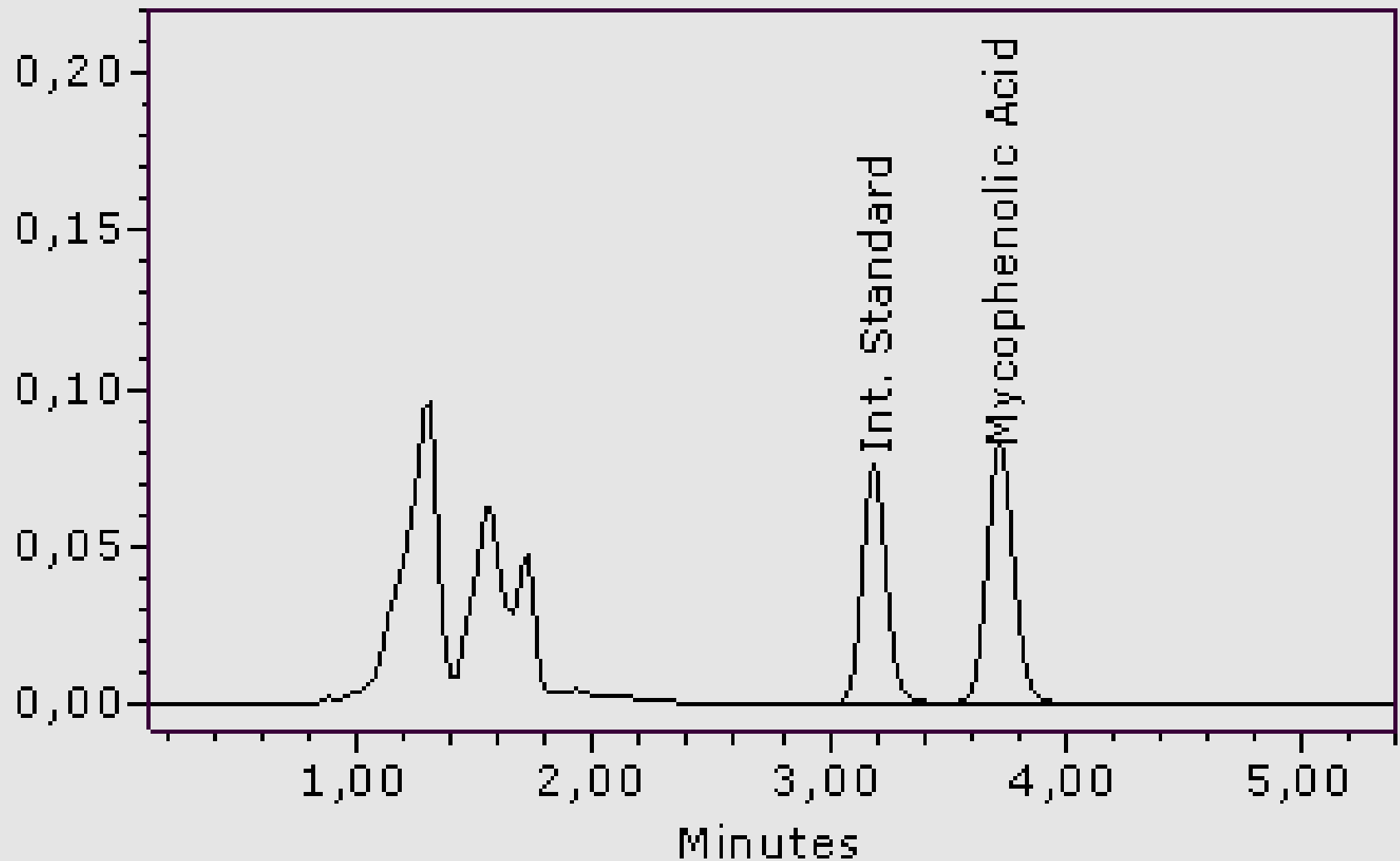
srovnání poměru plochy nebo výšky píku

stanovované látky s vnitřním a externím

standardem

3. Metoda standardního přídatku

Chromatografický záznam



Příklad

Analyzátor aminokyselin

Mobilní fáze

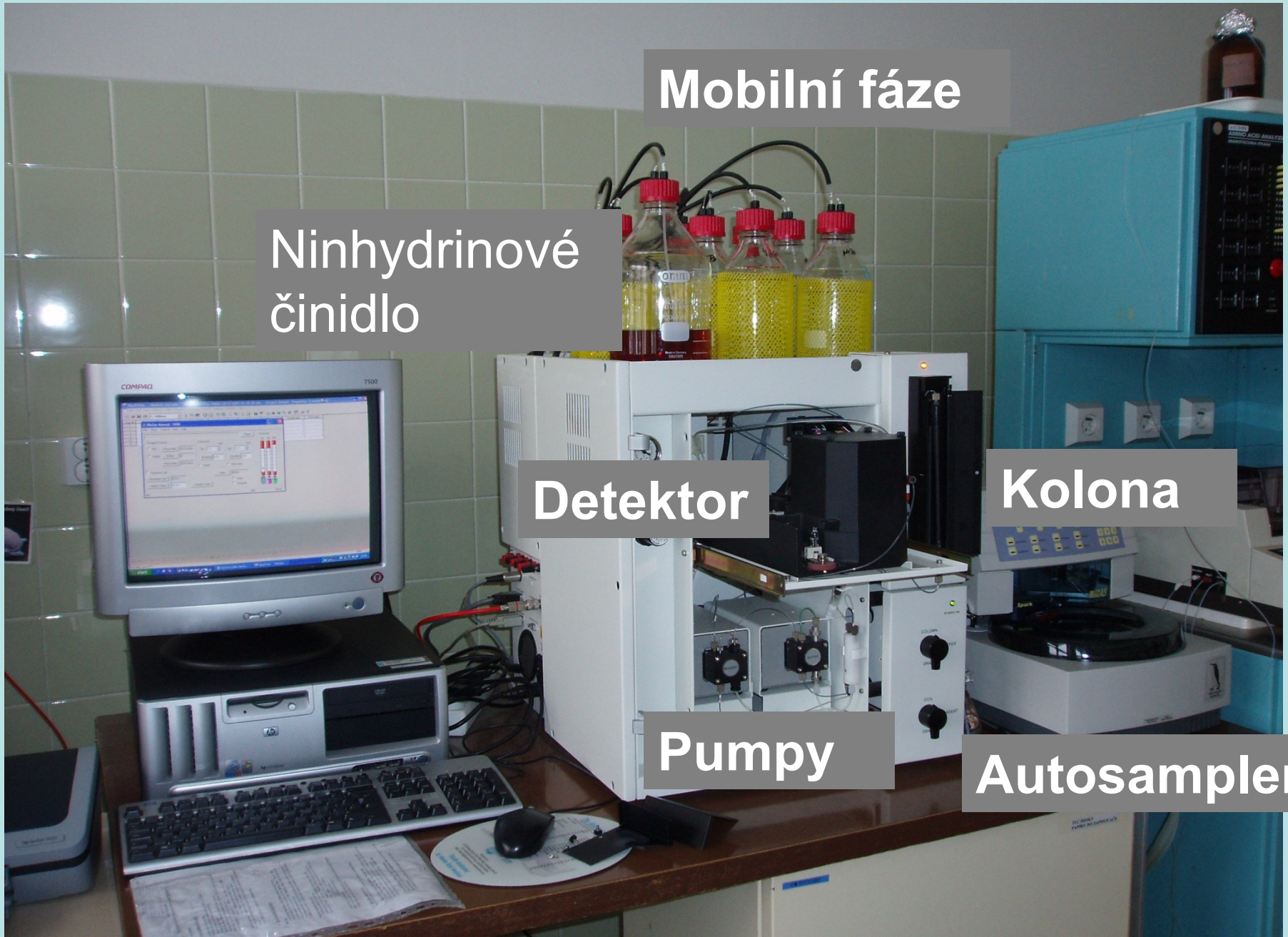
Ninhydrinové
čínidlo

Detektor

Kolona

Pumpy

Autosampler

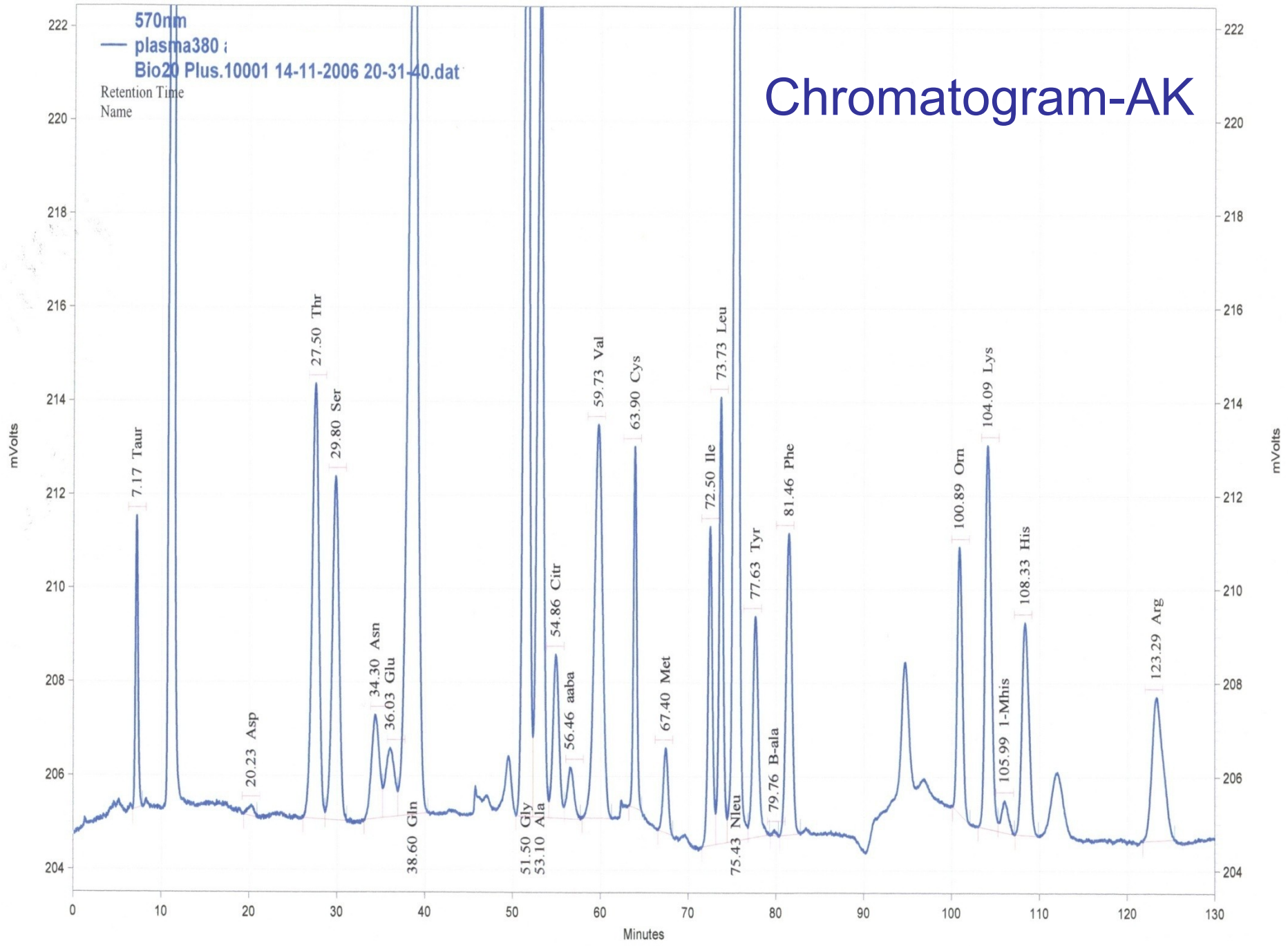


Detektor- fotodioda

Průtoková kyveta

Zdroj- halogenová lampa





570nm
plasma380 ;
Bio20 Plus.10001 14-11-2006 20-31-40.dat

Retention Time
Name

Chromatogram-AK

mVolts

mVolts

Minutes

Plynová chromatografie (GC)

Dělená směs musí procházet kolonou v
plynném stavu!

Plyn - Kapalina

Plyn - Pevná látka

Rozdělovací

Adsorpční



Autosampler

Vyhříváný prostor pro kolonu

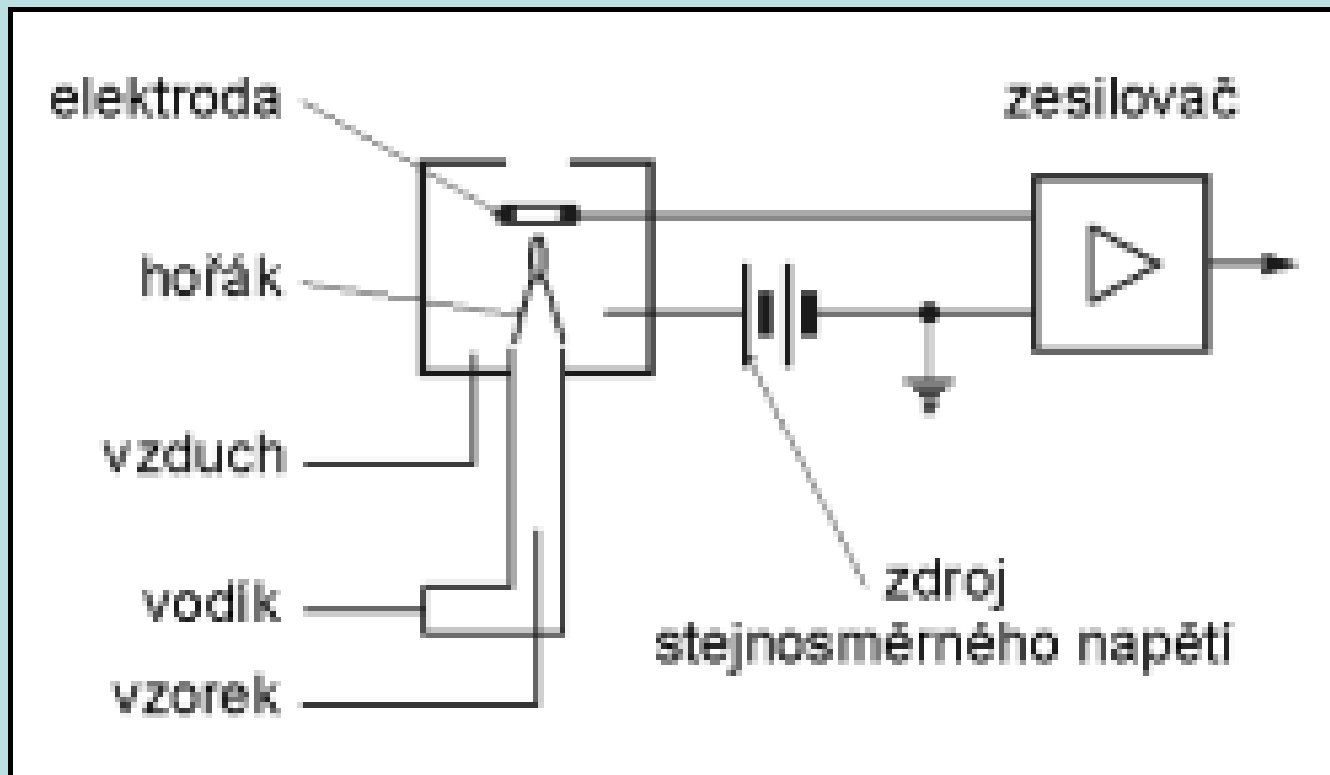


Kolona

Detektory (u GC):

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

Plamenový ionizační detektor (FID)



Obr. 14. Zapojení měřicího obvodu s FID

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

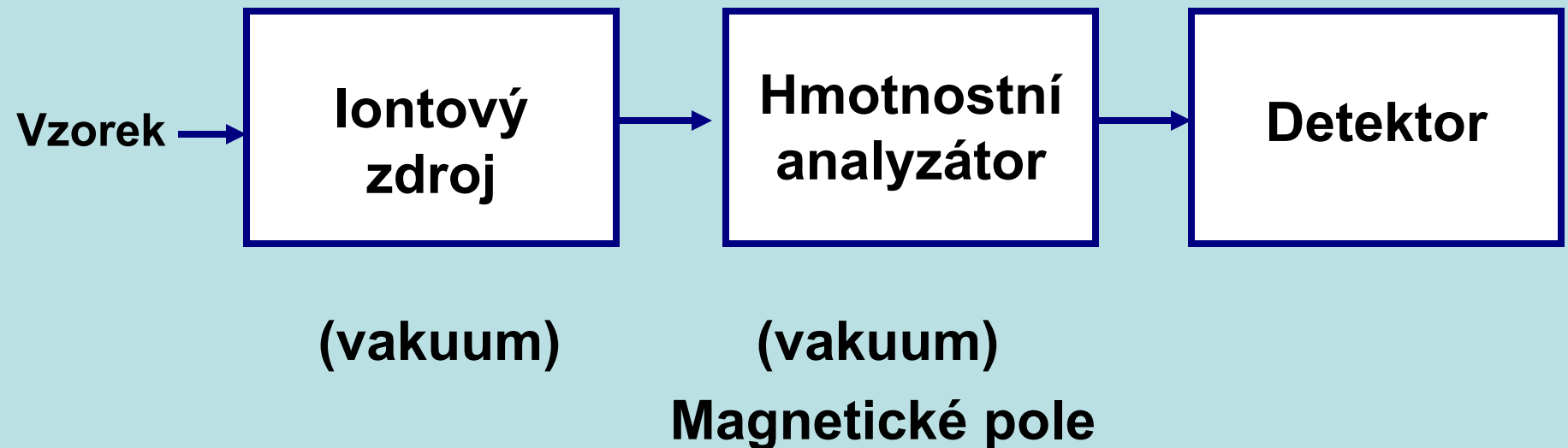
Hmotnostní spektrometrie (MS)

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

Principem MS je pohyb iontů v elektrickém nebo magnetickém poli v závislosti na jejich hmotnosti a náboji

Hlavní součásti hmotových spektrometrů:

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



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

Ionizace a iontové zdroje v MS

- Ionizace nárazem elektronů (EI)
- Desorpce laserem (LD)
 - MALDI(matrix assisted laser desorption/ionization)
 - SELDI(surface enhanced laser desorption/ionization)
- Elektrosprej (ESI)
- Ionizace chemická,

Hmotnostní analyzátory

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

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

