

# 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,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) 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**

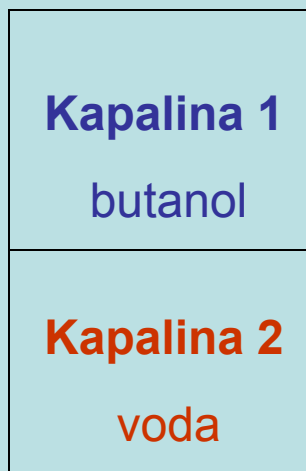
## *Podle účelu použití*

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

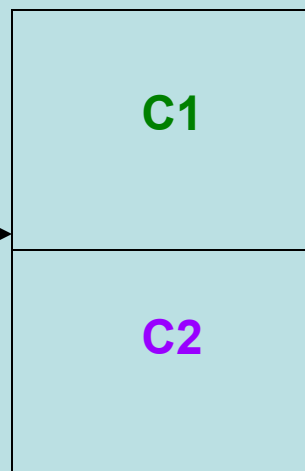
# Rozdělovací chromatografie

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**



+ Z →



$$K = c1/c2$$



# 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 )

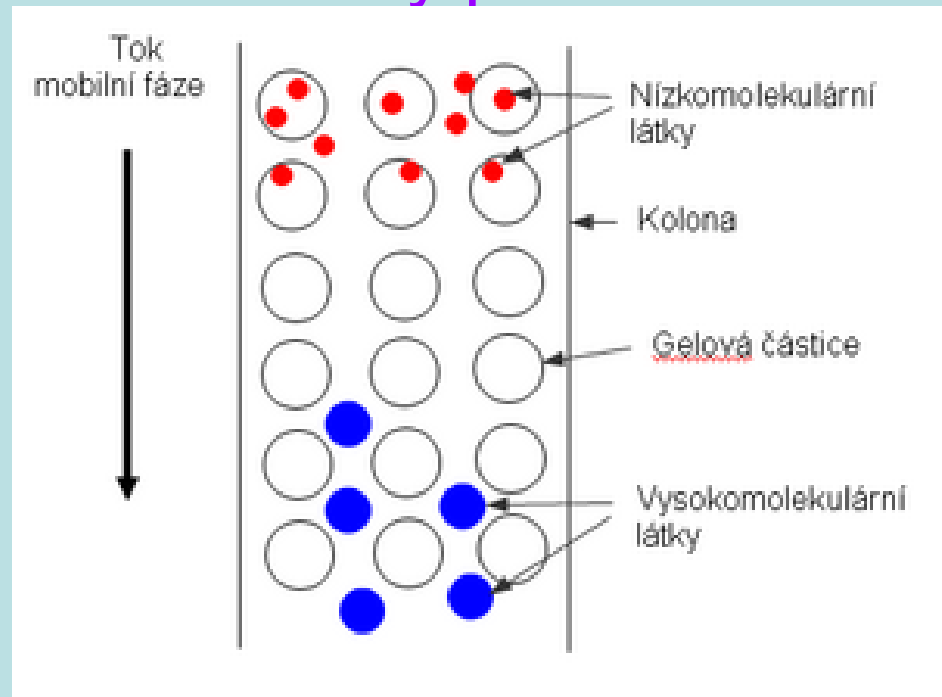
- ❖ Anexy („přitahují anionty“)
- ❖ Katexy („přitahují kationty“)

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.

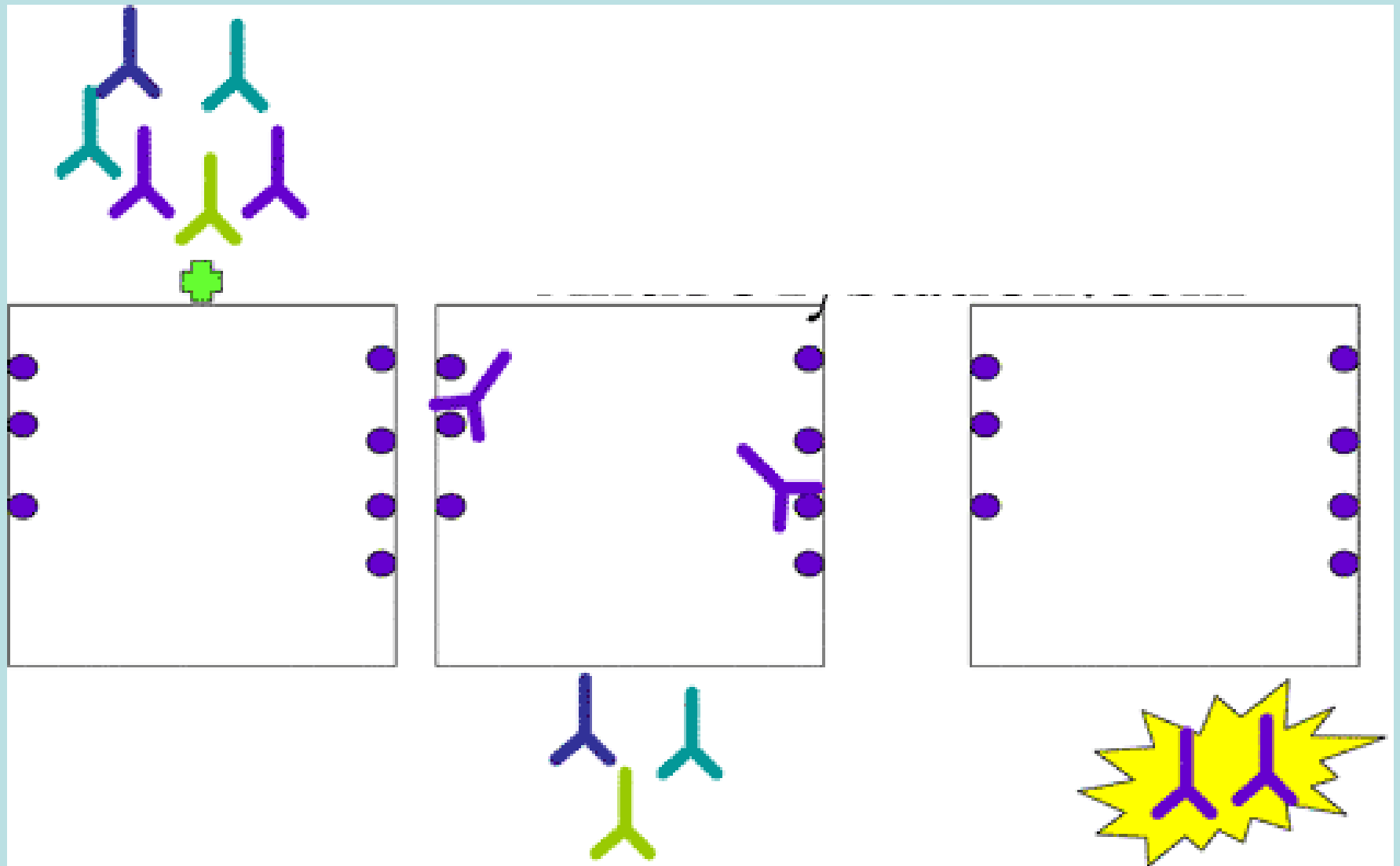
Jestliže jednu složku navážeme na vhodný nosič, potom můžeme druhou látku izolovat a kvantitativně stanovit.

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

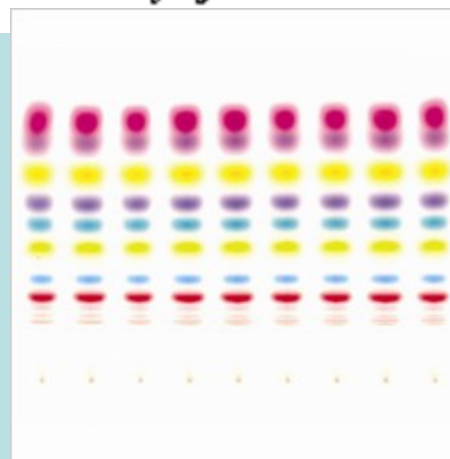
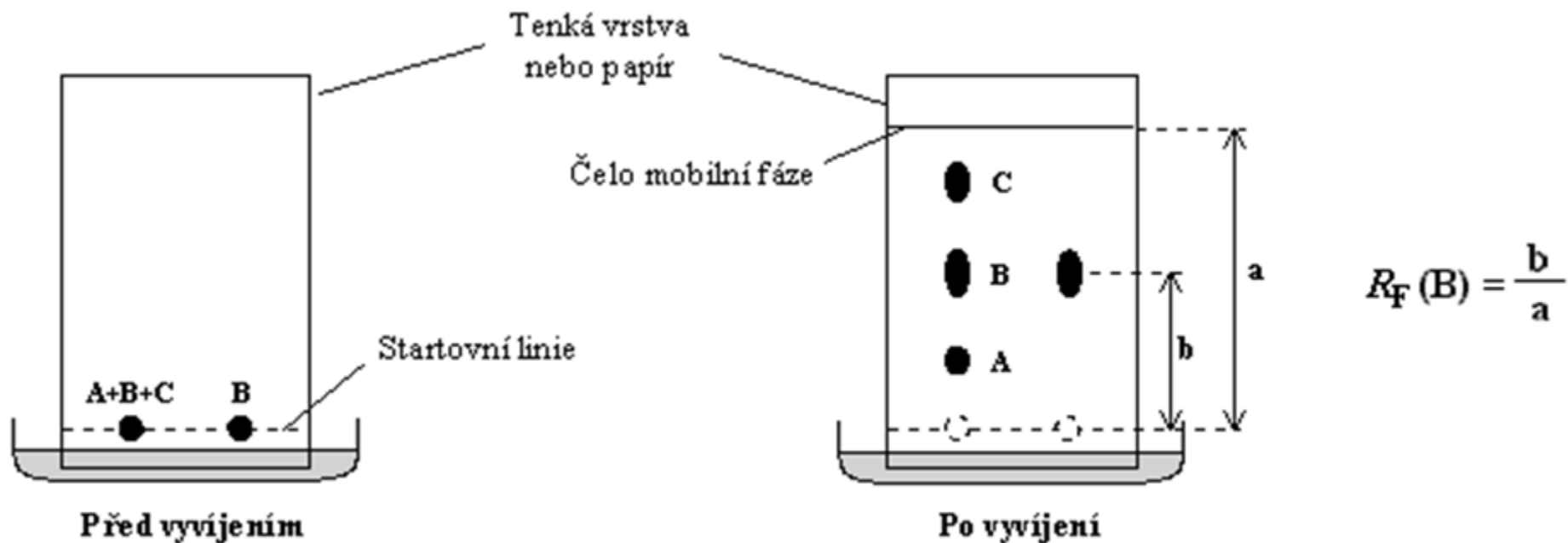


# *Techniky úpravy vzorků*

- 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 terčičku na start



Vyvíjení chromatogramu



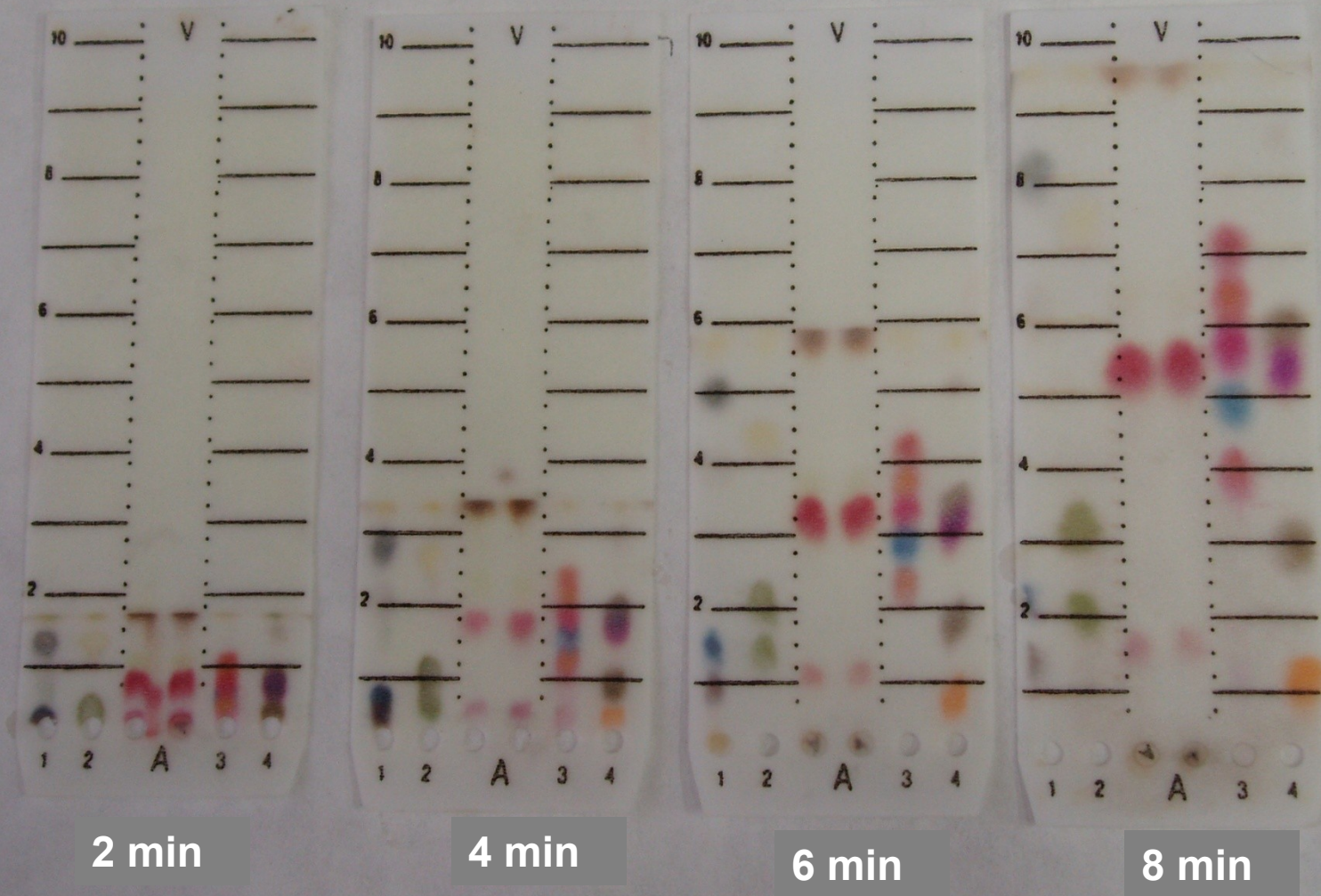
Fixace chromatogramu



Barvení chromatogramu



# Časový průběh vyvíjení chromatogramu



# Kapalinová chromatografie

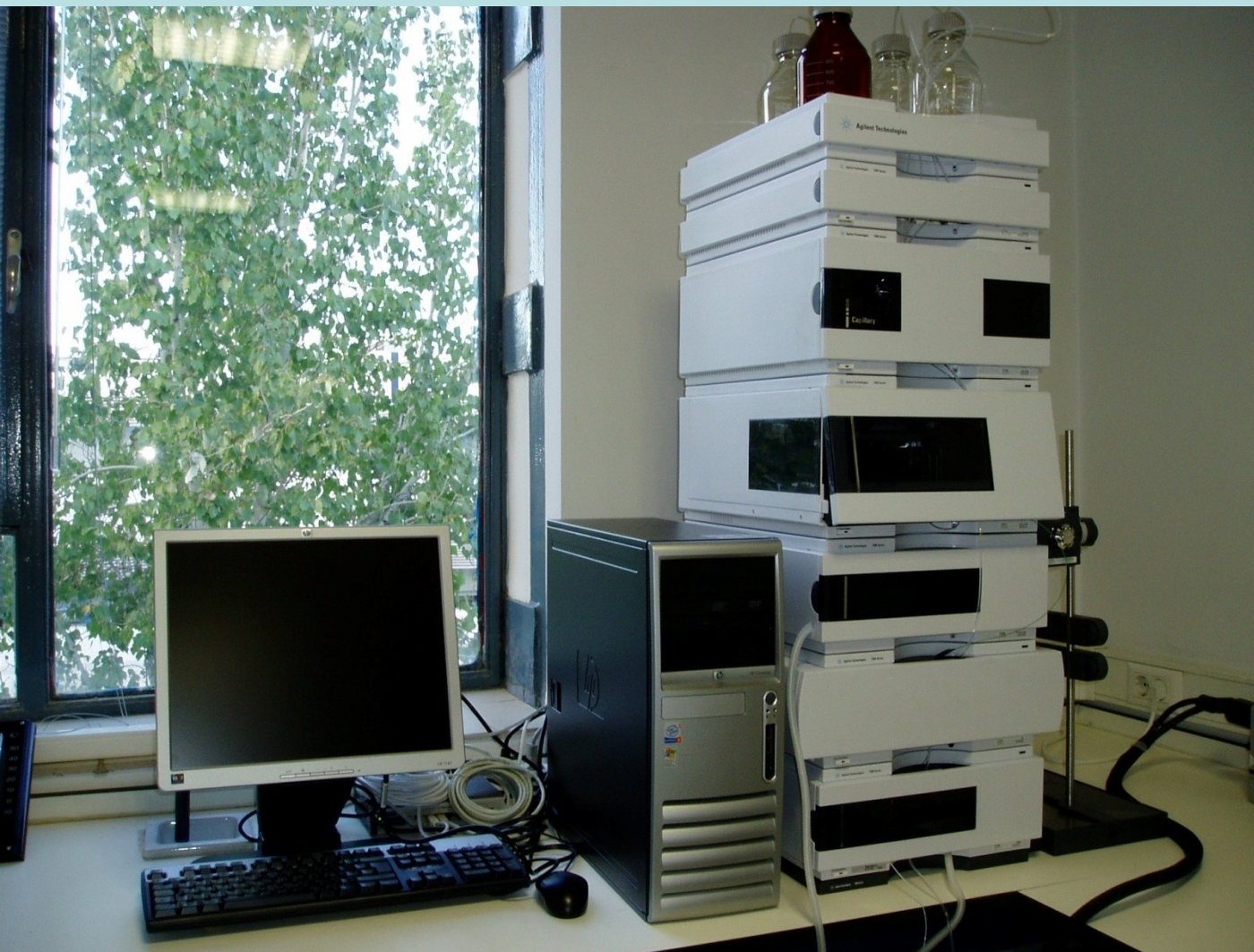
1. Adsorpční
2. Rozdělovací
3. Ionově výměnná
4. Gelová
5. Afinitní

# Příklad

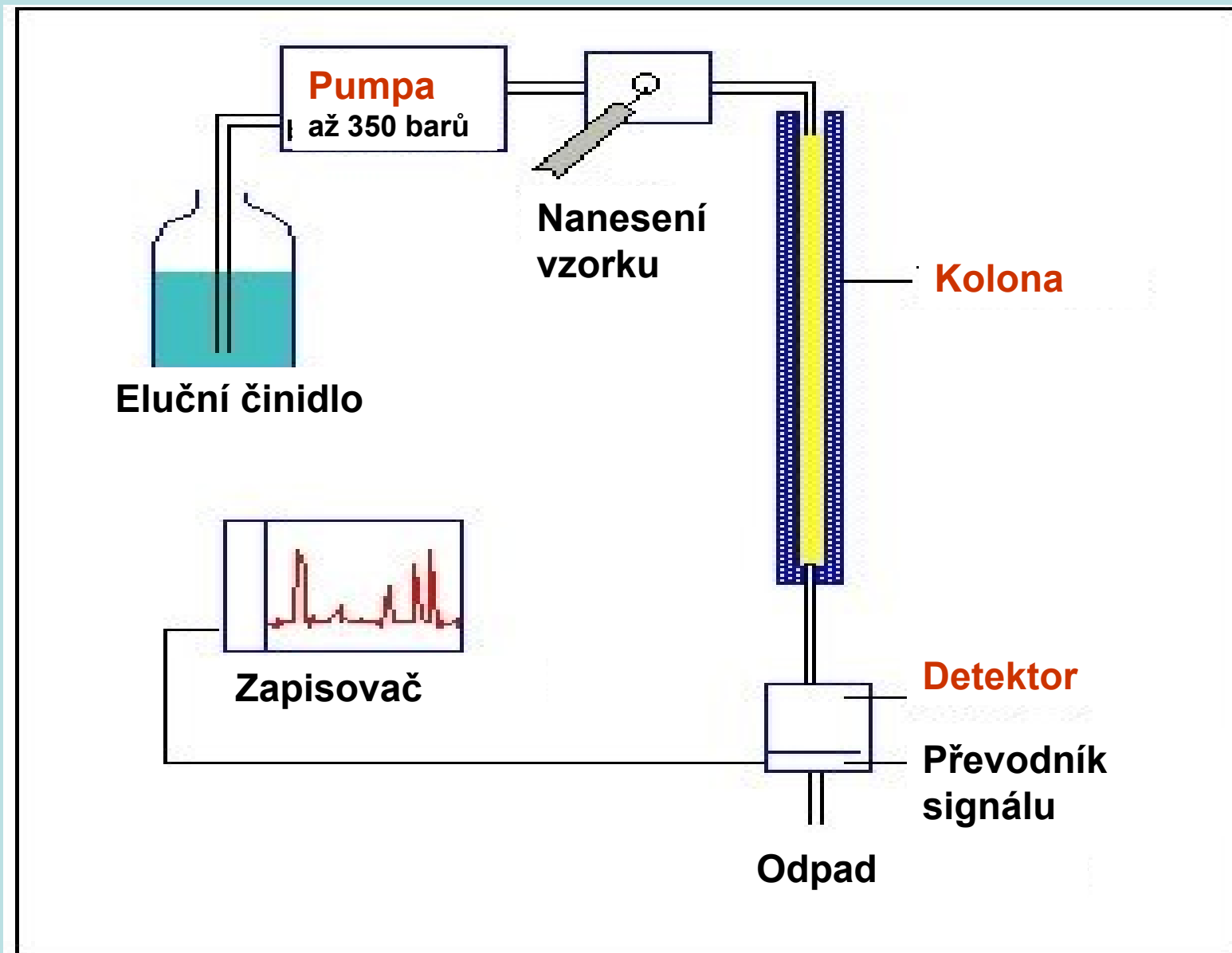
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie  
HPLC (High Performance Liquid Chromatography)



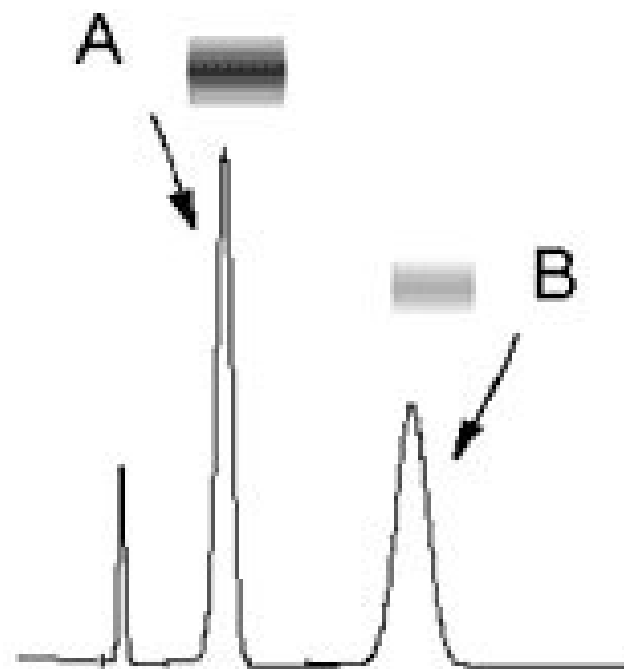
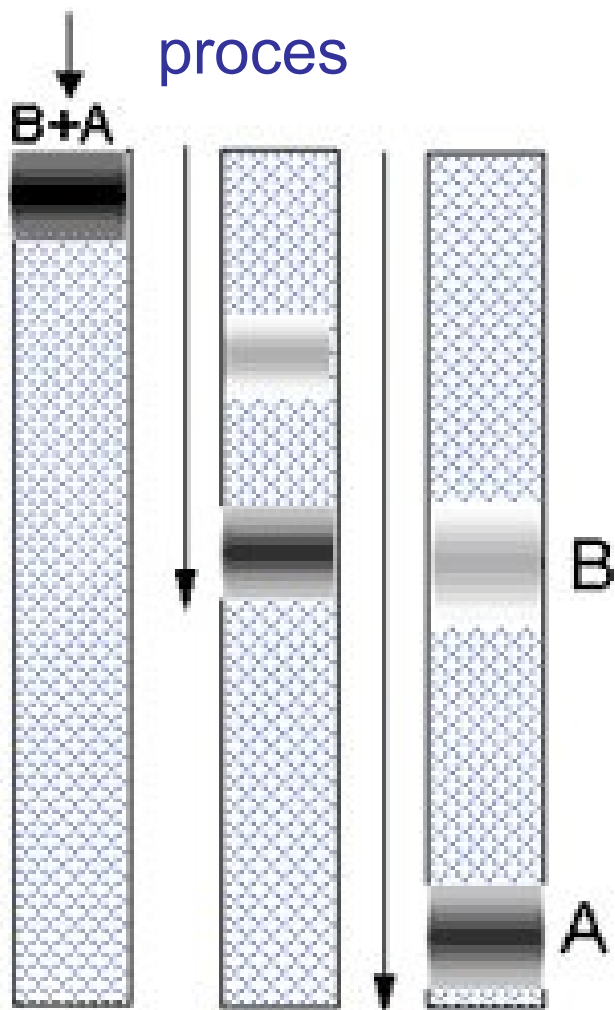
# HPLC – přístroj



# 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

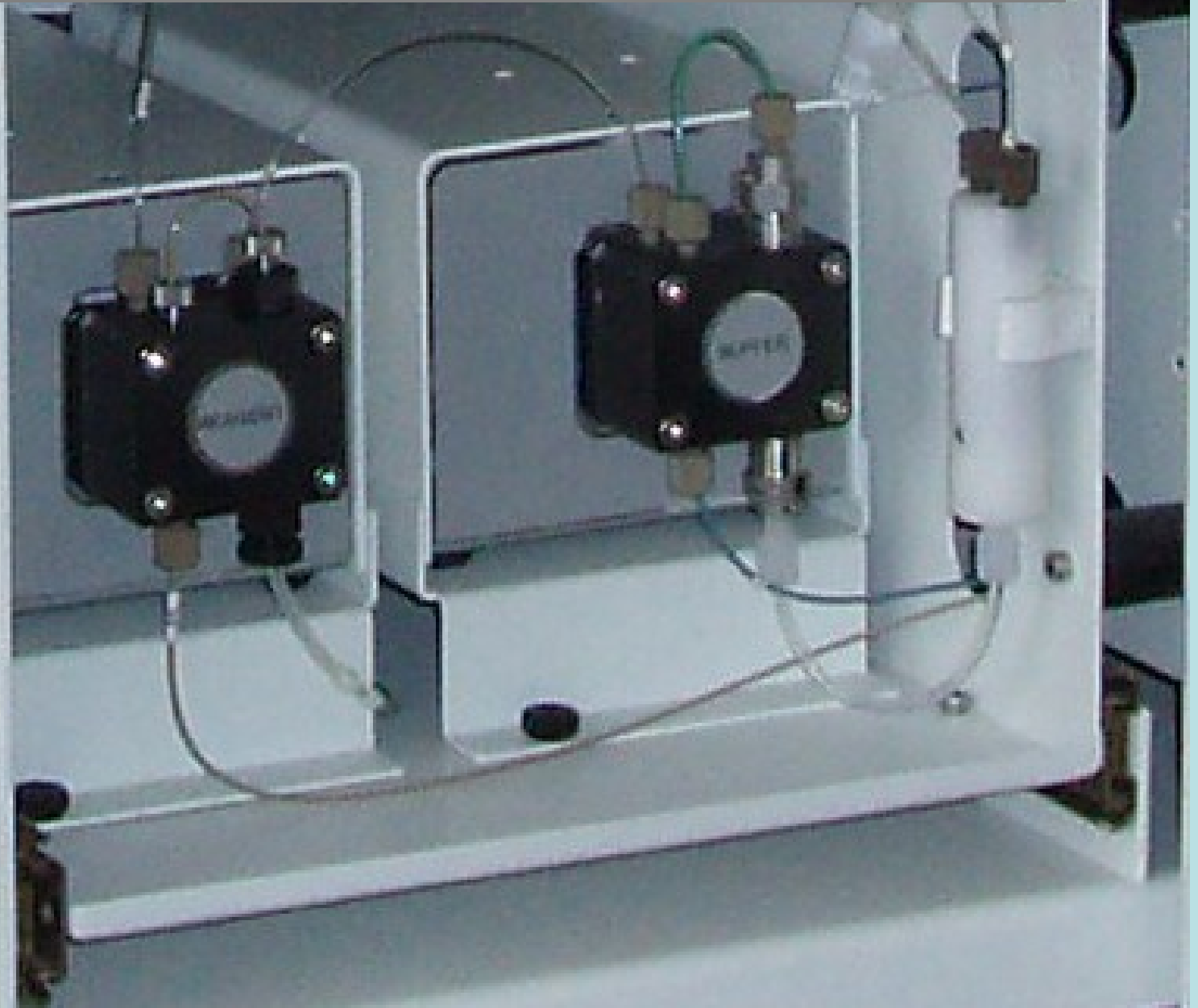
Dělicí kolona

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

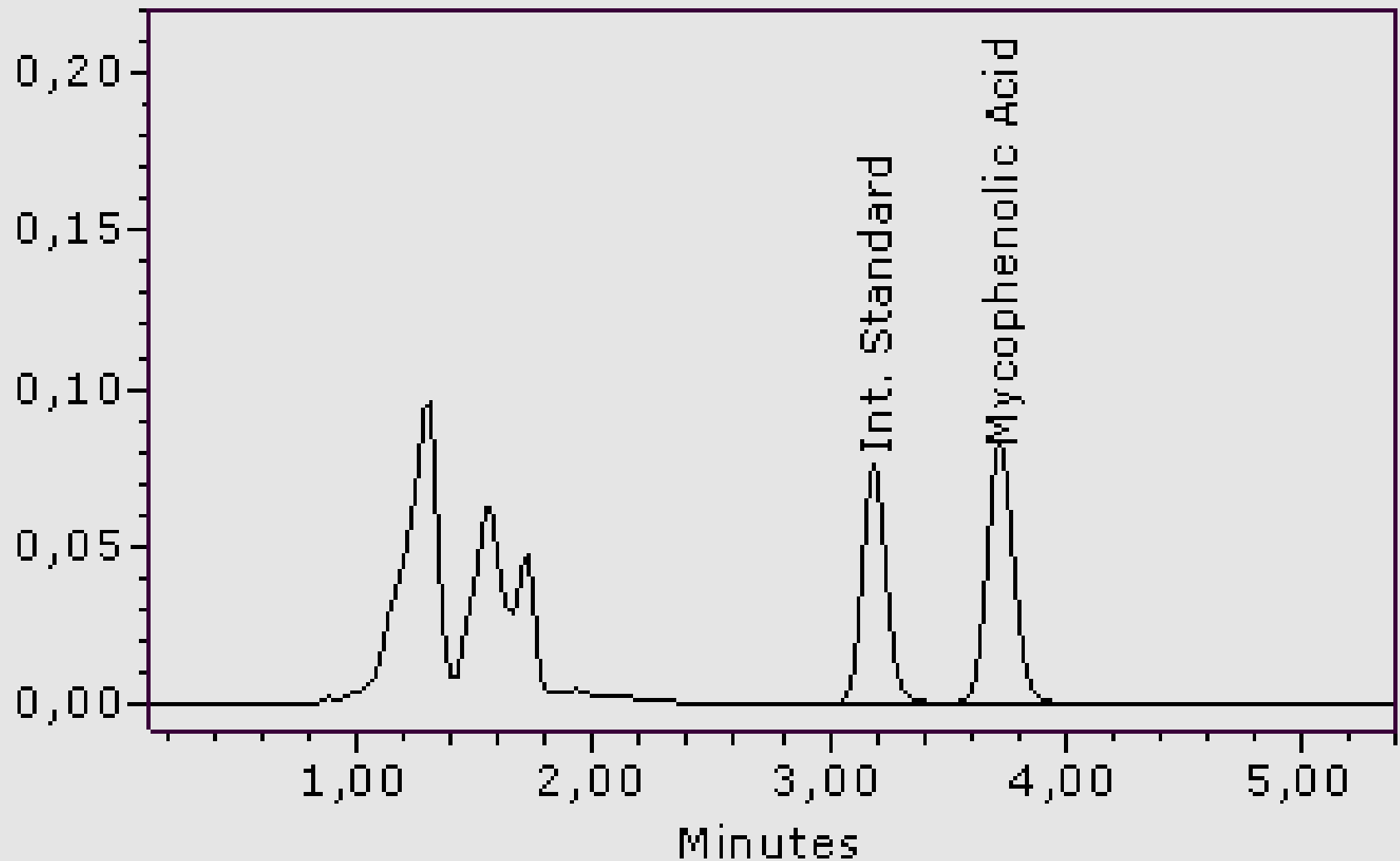
plocha nebo výška píku

srovnání poměru plochy nebo výšky píku stanovované látky s vnitřním a externím standardem

## 3. Metoda standardního přídatku



# Chromatografický záznam



# Příklad

## Analyzátor aminokyselin

Mobilní fáze

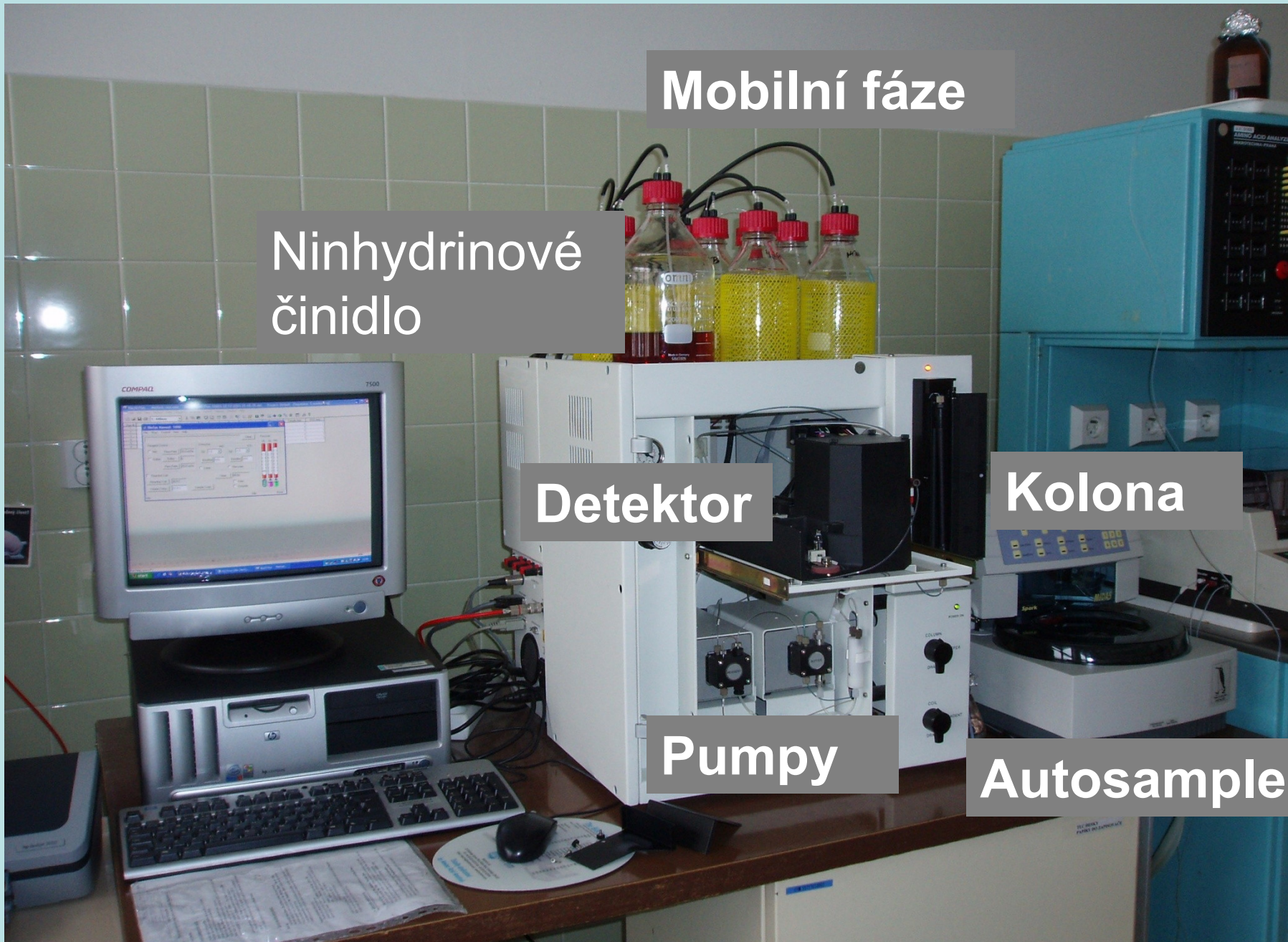
Ninhydrinové  
čínidlo

Detektor

Kolona

Pumpy

Autosampler



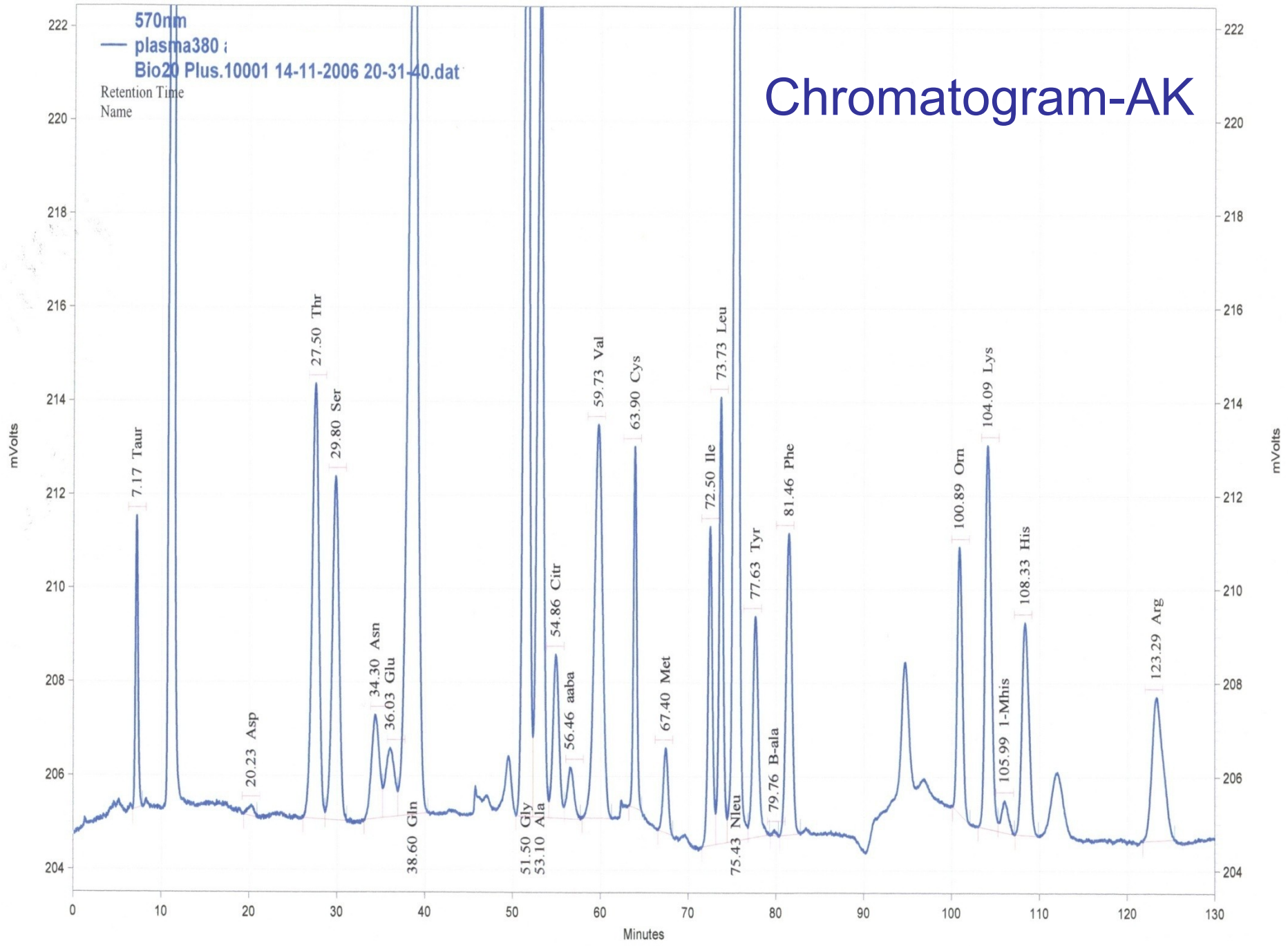


Detektor- fotodioda

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



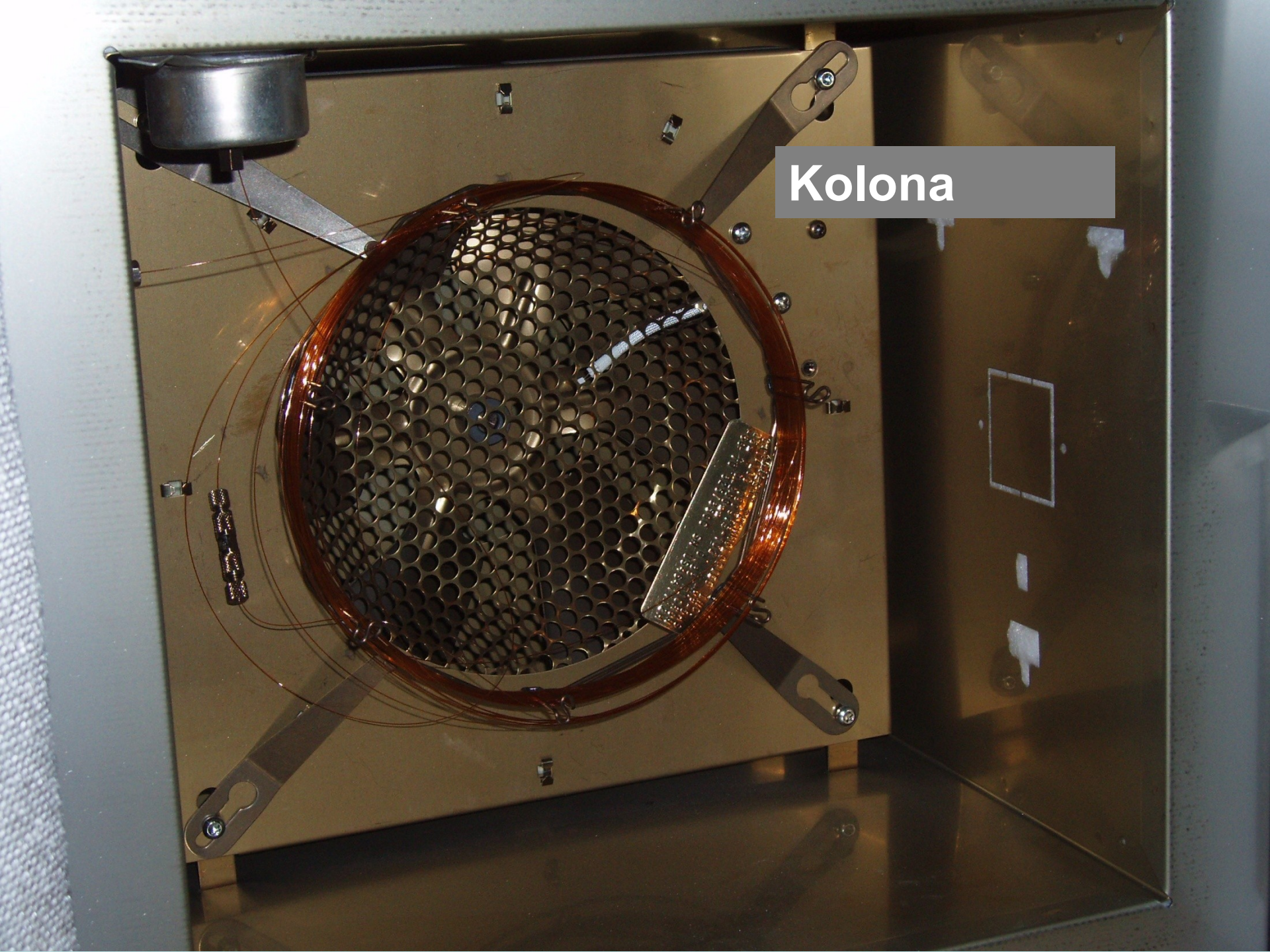


**Autosampler**

**Vyhříváný prostor pro kolonu**



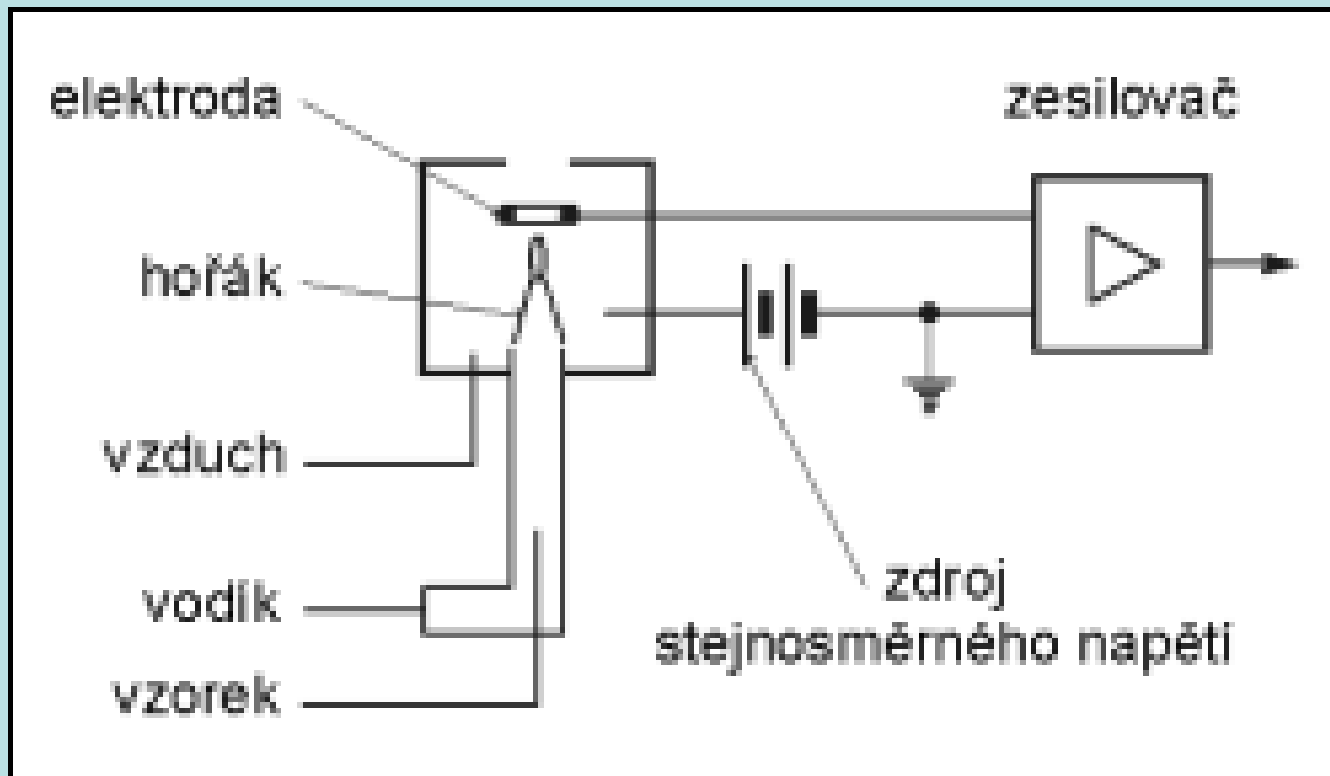
Kolona



# 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)

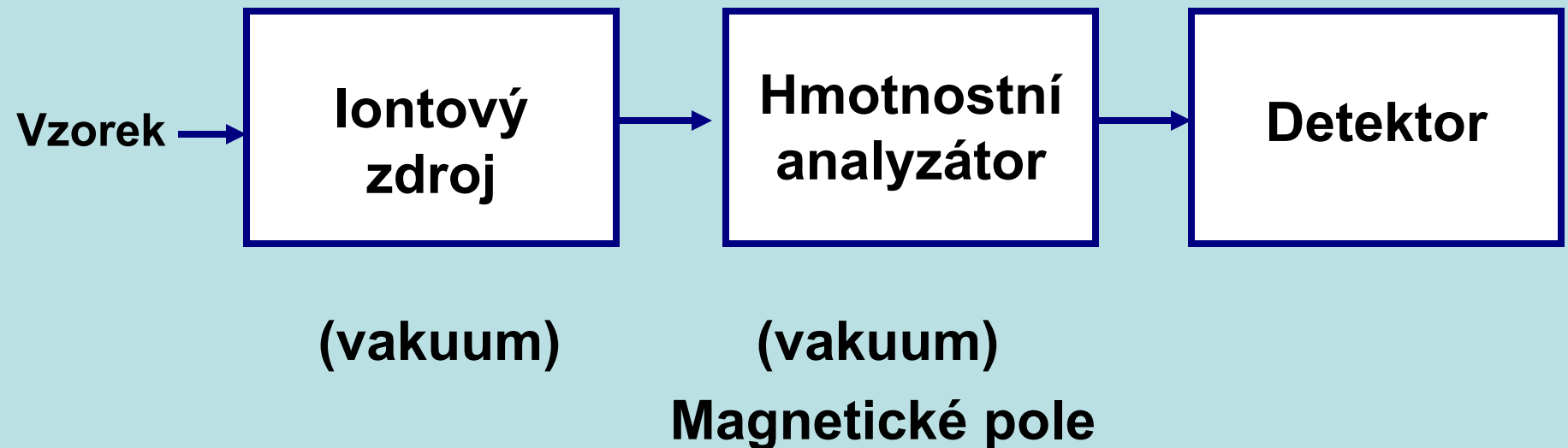
Analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty v plynné fázi ve vakuu a **rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ )**

**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)



# Hmotnostní spektrum

S

