CHROMATOGRAFIE

Základní chromatografické termíny

Analyt – látka, která má být pomocí analytické metody stanovena/izolována.

Eluent – mobilní fáze použitá pro separaci analytů.

Eluční roztok/činidlo – kapalina, kterou promýváme chromatografickou kolonu během vlastního dělení u sloupcových chromatografií za účelem vymývání frakcí vzorku z kolony. Eluční činidlo je vždy mobilní fází, ne všechnu mobilní fázi však můžeme považovat za eluční činidlo (např. samotný vzorek či původní roztok v koloně před vlastním dělením).

Efluent/eluát – mobilní fáze vytékající z chromatografické kolony.

Chromatograf – skládá se z několika součástí. Kapalinový chromatograf vždy obsahuje zařízení pro uchovávání a transport mobilní fáze (vysokotlaké čerpadlo), zařízení pro dávkování vzorku (dávkovač, „autosampler"), zařízení pro separaci látek (kolona) a zařízení pro detekci látek (detektor). Signál z detektoru bývá většinou veden do integrátoru v PC. Volitelnými součástmi chromatografu jsou odplyňovač mobilní fáze, termostat kolon, sběrač frakcí, u gradientové eluce směšovač mobilních fází.

Chromatogram – grafický výstup z detektoru vznikající během chromatografického procesu vyjadřující závislost velikosti signálu (osa y) na elučním čase nebo objemu (osa x).

Mobilní fáze – kapalina nebo plyn, které unášejí složky dělené směsi přes tzv. stacionární fázi.

Retardační faktor (R_F) – používá se u chromatografie v plošném uspořádání. Je to poměr vzdálenosti středu koncentračního maxima separované složky od místa nanesení vzorku (startovní linie) a vzdálenosti čela mobilní fáze od startovní linie (viz str. 96). Hodnoty R_F se mohou pohybovat od $R_F = 0$ pro látky vyvíjecím činidlem za daných podmínek neunášené (zůstávají na startu) až po $R_F = 1$ pro látky zcela nezdržované stacionární fází a unášené s čelem mobilní fáze.

Retenční/eluční čas nebo **objem** – používá se při hodnocení chromatografie ve sloupcovém uspořádání. Jedná se o 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.

Stacionární fáze – pevná látka nebo s ní nepohyblivě spojený povlak kapaliny, která je vlastní účinnou složkou chromatografického zařízení (kolony nebo plošné vrstvy).

Vyvíjecí roztok/činidlo – označení mobilní fáze při plošných chromatografiích.

Chromatografické metody jsou fyzikálně-chemické separační metody, jejichž podstatou je rozdělování složek směsi vzorku mezi dvě fáze, a to fázi nepohyblivou (**stacionární**) a pohyblivou (**mobilní**). Tyto dvě fáze se od sebe odlišují některou základní fyzikálně-chemickou vlastností, např. polaritou.

Spolu s pohybující se mobilní fází je soustavou unášen také vzorek. Dělené složky vzorku (analyty) interagují v různé míře se stacionární a mobilní fází a mají snahu dosáhnout rovnovážného rozdělení mezi obě fáze. Rovnováha je však neustále narušována pohybující se mobilní fází a tak analyty, které se poutají více ke stacionární fázi, se pohybují pomaleji a jsou zadržovány déle, než analyty, které se ke stacionární fázi poutají méně. Na základě tohoto principu dochází k rozdělení složek směsi.

Chromatografické metody lze klasifikovat podle různých hledisek. Z hlediska typu interakcí, které se uplatňují při dělení, rozdělujeme chromatografii na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, gelovou a afinitní. Podle skupenství mobilní fáze rozlišujeme dva základní typy chromatografie kapalinovou a plynovou. Podle uspořádání stacionární fáze dělíme chromatografii na kolonovou (sloupcovou), kapilární, na tenké vrstvě, a na papíře.

Chromatografické metody jsou **vždy** spojeny s nějakou detekční technikou (spektrofotometrickou, fluorescenční, coulometrickou, konduktometrickou, hmotnostní spektrometrií).

Kapalinová chromatografie

Základní principy uplatňující se v kapalinové chromatografii

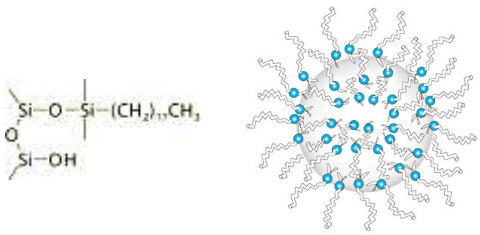
Podle principu interakce mezi dělenými látkami a stacionární fází se rozlišují základní typy chromatografie:

Typ chromatografie	Princip dělení
Adsorpční	Adsorpce na stacionární fázi
Rozdělovací	Rozdělení mezi kapalnou fázi zakotvenou na stacionární tuhé fázi a mobilní fázi
Typ chromatografie	**Princip dělení**
Iontově výměnná	Výměna kationtů nebo aniontů mezi funkčními skupinami navázanými na stacionární tuhé fázi a komponentami vzorků
Gelová filtrace	Dělení na základě velikosti molekul při průtoku stacionární fází
Afinitní	Selektivní interakce mezi komponentami vzorku a specifickými ligandy navázanými na inertní stacionární fázi

Adsorpční chromatografie

Stacionární fází je pevný, jemně zrněný adsorbent. Vzorek nanesený na adsorbent se při průtoku mobilní fáze dělí na jednotlivé složky (sloučeniny) podle intenzity jejich vazebných interakcí s adsorbentem a podle polarity mobilní fáze. Adsorbent neváže molekuly na celý svůj povrch, ale jen na tzv. aktivní centra. Principem interakcí jsou nevazebné síly typu dipól-dipól, vodíkové vazby, van der Waalsovy interakce, případně hydrofobní interakce. Nejrychleji je unášena sloučenina, která má malou afinitu k adsorbentu a zároveň je nejlépe rozpustná v mobilní fázi. Je-li adsorbent polární (nejčastěji silikagel nebo oxid hlinitý) a mobilní fází je nepolární organické rozpouštědlo (uhlovodík, halogenalkan), putují adsorbentem nejrychleji nepolární složky. Polární jsou pevně adsorbovány poblíž místa nanesení vzorku a k jejich eluci je třeba zvýšit polaritu rozpouštědla.

Je-li adsorbent nepolární (nejčastěji silikagel modifikovaný navázáním delších uhlovodíkových zbytků – C-8, C-18), používá se k eluci směs vodného pufru a polárního organického rozpouštědla (methanol, acetonitril). Nejrychleji jsou unášeny polární sloučeniny, nepolární látky jsou zadržovány.



Modifikovaný silikagel

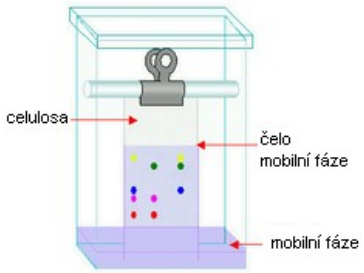
Většina polárních adsorbentů musí být před použitím zahřátá na 110–120 °C (aktivována), poněvadž jejich adsorpční kapacita je snížena vodou navázanou na jejich povrchu. Adsorpční chromatografie se provádí v kolonách i na tenkých vrstvách.

Rozdělovací chromatografie

Při rozdělovací chromatografii se látky dělí mezi dvě kapalné, navzájem nemísitelné fáze. Jednou z nich je kapalina zakotvená (navázaná) na stacionární fázi, druhou je kapalná mobilní fáze. Proces rozdělování lze zjednodušeně přirovnat k extrakci látky mezi dvě nemísitelné kapaliny při protřepávání v dělicí nálevce. Jestliže má látka dělené směsi polární charakter, přechází více do polárního rozpouštědla, naopak nepolární látky přejdou do rozpouštědla nepolárního. Kvantitativní mírou rozdělení je rozdělovací koeficient. Obdobné procesy se odehrávají i při chromatografickém dělení. Stacionární fází bývá obvykle vodná fáze (voda nebo pufr), která ve formě tenkého filmu pokrývá povrch polárního adsorbentu (silikagel, celulosa, oxid hlinitý). Mobilní fáze, kterou je organické rozpouštědlo, zprostředkovává pohyb dělené směsi přes fázi zakotvenou a ve vzájemném kontaktu obou fází dochází k rozdělování látek směsi na principu extrakce. Mobilní fáze se obohacuje o složky v ní dobře rozpustné, tj. nepolární, naopak v zakotvené fázi jsou zadržovány látky mající charakter polární.

Používá se též uspořádání, v němž stacionární fáze je méně polární než fáze mobilní. Při této chromatografii s obrácenými fázemi je pohyblivost obou typů složek směsi právě opačná.

Velmi rozšířenou formou rozdělovací chromatografie byla dříve papírová chromatografie. Tato metoda je však v současné době již používána málo. Uplatňuje se dělení na kolonách a na tenkých vrstvách. Jako materiál pro stacionární fázi se nejčastěji používá oxid hlinitý, silikagel, vláknitá celulosa. Poněvadž tyto materiály mají současně i vlastnosti adsorpční, může se při rozdělovací chromatografii částečně uplatňovat i princip adsorpce a naopak při adsorpční chromatografii může být dělení ovlivňováno i přítomností vody navázané na nedokonale vysušeném sorbentu.



Uspořádání při papírové chromatografii

Iontově výměnná chromatografie

Stacionární fází při tomto typu chromatografie jsou měniče iontů (ionexy). Jsou to jemně zrněné organické, méně často anorganické polymery s prostorově síťovitou strukturou. Na povrchu obsahují četné funkční skupiny kyselé nebo zásadité povahy (viz též sorbenty používané při SPE). Měniče kationtů (katexy) obsahují pevně vázané kyselé funkční skupiny, jejichž disociací (uvolněním tzv. protiiontu) vznikají záporně nabité skupiny ($–COO^-$, $–SO_3^-$, fenolický $–O^-$, apod). Měniče aniontů (anexy) obsahují bazické skupiny, které se při určité hodnotě pH protonizují (váží na sebe z roztoku ion H^+) a stávají se kladně nabitými (kvartérní amoniová skupina $–NR_4^+$, $–NH_3^+$, $=NH_2^+$, apod.).

Pokud funkční skupiny ionexu (např. skupiny $–SO_3^-$, $–NR_4^+$) jsou ionizovány v širokém rozsahu pH, označujeme ionex jako silný (silně kyselý resp. bazický), pokud jsou ionizovány v úzkém rozsahu pH (např. skupiny $–COO^-$, $–NH_3^+$), tak jako slabý (slabě kyselý resp. bazický). Silné katexy mohou být použity v tzv. H^+-cyklu (protiiontem k funkční skupině je H^+) nebo Na^+-cyklu, silné anexy v OH^--cyklu nebo Cl^--cyklu. Naproti tomu slabě kyselé katexy mohou pracovat pouze v H^+-cyklu: účinné jsou jen v alkalicky reagujících roztocích (přesněji při pH > pK_A funkční skupiny), neboť v kyselém prostředí je potlačena disociace funkční skupiny: $–COO^- + H^+ \rightarrow –COOH$. Analogicky slabé anexy se používají pouze v OH^--cyklu a jsou účinné jen v kysele reagujících roztocích, protože v zásaditém prostředí je potlačena ionizace funkční skupiny, např.: $–NH_3^+ + OH^- \rightarrow -NH_2$.

Základní charakteristikou ionexu je jeho celková výměnná kapacita, udávající počet příslušně nabitých iontů (kationtů nebo aniontů) schopných navázat se na 1 g ionexu (udává se v tzv. miliekvivalentech (meq/g), což odpovídá látkovému množství náboje v mmol/g ionexu).

Částice iontoměniče vážou z roztoku určitý ion a přitom uvolňují do roztoku ekvivalentní množství iontu stejného náboje, který byl původně vázán na ionexu.

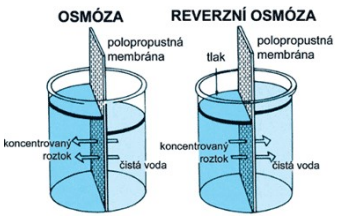
Většina způsobů dělení na ionexech má dvě fáze. V první fázi se složky směsi navazují na ionex a ve druhé fázi nastává postupné vytěsnění složek z ionexu a tím i jejich rozdělení. Postupné vytěsnění navázaných látek z ionexu je umožněno odlišnou pevností vazby mezi vyměňovanými ionty a funkčními skupinami ionexu. Pevnost vazby závisí na elektrických vlastnostech vázaných iontů. Ionty se z ionexu uvolňují promýváním ionexu eluentem, ve kterém se mění koncentrace iontů, pH, iontová síla, teplota, případně jiný parametr.

Ionty směsi se nahrazují postupně ionty eluentu a postupně vytékají z ionexu.

Jako chromatografické náplně se používá několik typů látek. Nejobvyklejším základem syntetických ionexů jsou v současné době polymery na bázi polystyrenu, s prostorovou strukturou vzniklou zesítěním lineárních řetězců příčnými vazbami (např. divinylbenzenem). Iontoměničové pryskyřice mají vlastnosti reverzibilních gelů (stykem s rozpouštědlem, nejčastěji vodou, botnají).

Iontově výměnnou chromatografii lze použít jak k dělení jednoduchých iontů, tak organických sloučenin s ionizovatelnými skupinami jako aminokyselin, peptidů, bílkovin, zachycení a zakoncentrování iontů z velkého objemu zředěného vzorku. Příkladem užití iontoměničů je též příprava deionizované vody.

Deionizovaná voda se získá průtokem vodovodní vody (s vodivostí 500–1000 µS/cm) kolonou s aktivním uhlím (odstranění chloru a většiny organických nepolárních sloučenin), slabě kyselým katexem v H^+-cyklu, který vymění všechny kationty ve vodě za H^+, za který je sériově zařazen slabě bazický anex v OH^--cyklu, který vymění <u>většinu</u> aniontů za OH^-. Často se používá jedna kolona se smíšeným katexem a anexem (Mix-Bed). Produktem je deionizovaná voda, jejíž vodivost je přibližně **10 µS/cm**.



Druhou možností přípravy deionizované vody je použití reverzní osmózy, při které molekuly vody prochází pod tlakem (větším než je osmotický tlak) přes semipermeabilní membránu, složenou z několika tenkých vrstev, zatímco většina rozpouštěných látek (90–98% minerálních solí, více než 90 % organických sloučenin, všechny bakterie a mikroorganismy) přes membránu projít nemůže. Rozpuštěné látky, které neprojdou membránou, jsou z ní vymývány a odváděny do odpadu. Vodivost přečištěné vody (permeátu) bývá dle kvality zdrojové vody **5–20 µS/cm.**

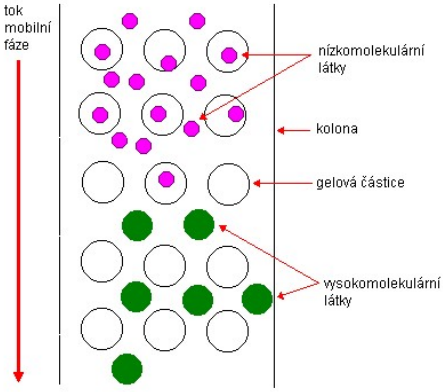
Demineralizovaná voda se získá přečištěním deionizované vody pomocí silně bazického anexu v OH^--cyklu, který odstraní i zbytky aniontů a oxid křemičitý. Vodivost demineralizované vody je nižší než **0,1 µS/cm** (tj. rezistivita > 18, 2 MΩ/cm).

Demineralizovaná voda se dále ještě upravuje fotooxidací. Zářením o vlnové délce 254 nm se voda sterilizuje (záření působí germicidně, poškozuje především nukleové kyseliny, ale i jiné biologicky významné makromolekuly). Při použití záření o vlnové délce 185 nm (fotooxidace

organických sloučenin na CO_2 a H_2O) nebo speciálních uhlíkových filtrů se získá z demineralizované vody tzv. **ultračistá voda** s velmi nízkou zbytkovou koncentrací organického uhlíku (total organic carbon, TOC < 5 ppb).

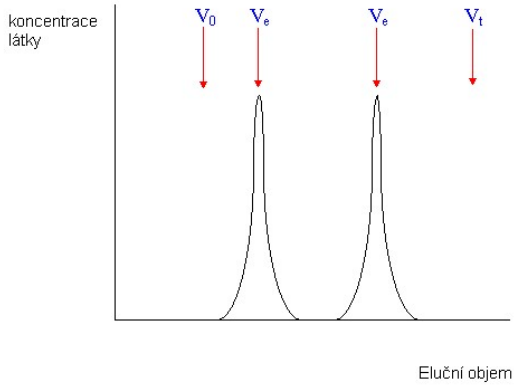
Gelová filtrace (gelová permeační chromatografie)

Při této metodě probíhá dělení látek na základě velikosti molekul. Dělícím materiálem je pórovitý gel. Gel se získává botnáním vysušeného práškovitého materiálu, který má vnitřní trojrozměrnou nebo síťovitou strukturu, která zajišťuje pórovitý charakter. Velikost pórů závisí na typu gelu. Botnáním se do pórů dostává rozpouštědlo. Roztok směsi látek lišících se velikostí se nanese na povrch gelu. Gel v koloně nebo na tenké vrstvě se promývá elučním roztokem stejného složení jako je roztok v pórech gelu. Molekuly větší než póry gelu nemohou pronikat do pórů a procházejí přes kolonu stejnou rychlostí jako eluční roztok. Objeví se v eluátu hned po vytečení první porce elučního roztoku. Malé molekuly pronikají do pórů gelu. Tam eluční roztok neprotéká a neunáší je. Pokud se difúzí dostanou ven z částice gelu, proud elučního roztoku ji odnese k další částici gelu. Látky se rozdělují podle zmenšujících se rozměrů molekul. Velké molekuly tedy procházejí kolonou rychleji, malé pomaleji. V praxi se však také uplatňují další interakce mezi částicemi, např. adsorpční, polární, apod.



Separace molekul při gelové filtraci

Gel v prášku se musí nechat nabotnat v destilované vodě nebo v pufru, se kterým budeme pracovat. Botnání trvá několik hodin. Aby se vytvořil homogenní gel, tak se jen velmi málo promíchává a nepoužívá se magnetické míchadlo. Při intenzivním míchání by se mohla porušit matrice gelu. Objem rozpouštědla použijeme aspoň dvakrát větší, než bude mít gel po nabotnání. Při laboratorní teplotě trvá botnání podle typu gelu 2 až 72 hodin, při teplotě 90 °C trvá botnání 1 až 5 hodin.

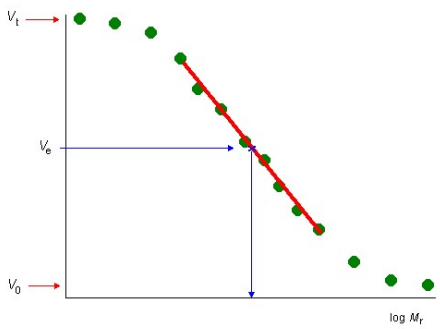


V_0 objem mobilní fáze vně gelových částic (mrtvý objem)

V_t objem mobilní fáze vně i uvnitř gelových částic (celkový objem)

V_e objem potřebný k eluci dané látky (eluční objem)

Záznam při gelové filtraci



Kalibrační křivka při gelové filtraci

Využití gelové chromatografie

Skupinová separace slouží k oddělení nízkomolekulárních látek od vysokomolekulárních, např. k odsolování bílkovin, odstranění extrakčního činidla, oddělení koenzymu nebo inhibitoru od enzymu, ukončení reakce mezi nízkomolekulární látkou a polymerem.

Frakcionace se používá k purifikaci biopolymerů ze směsi. Aby byl dělicí proces účinný, je třeba volit správný typ gelu.

Stanovení M_r biopolymerů. Kolona se nakalibruje pomocí vzorků se známými molekulovými hmotnostmi a podobným tvarem. Kalibrační křivka se sestrojí jako závislost elučního objemu na logaritmu M_r. Přibližná molekulová hmotnost neznámého biopolymeru se určí na základě elučního objemu z kalibrační křivky.

Molekulová síta je možné také použít k **zakoncentrování vzorků** biopolymerů. Přídavkem suchého Sephadexu k roztoku začnou částice rozpouštědla pronikat do botnavého materiálu a dosáhneme tak snížení objemu.

Pro gelovou chromatografii se používají materiály, které jsou známy pod názvy Sephadex, Sepharosa, Bio-Gel, aj. Jako **Sephadex** se označují zesíťované dextranové gely s různou velikostí pórů. Různé typy jsou označeny písmenem G a číslem, které značí desetinásobek objemu vody, který nasaje 1 g gelu ve formě prášku při botnání. Jsou vhodné pro odsolování i pro separaci proteinů. Sephadexy značené písmenem LH mají navíc navázánu hydroxypropylovou skupinu. Používají se na dělení lipofilních látek (triacylglyceridů, mastných kyselin, aromatických uhlovodíků, steroidních hormonů) do $M_r < 10\,000$. **Sepharosa** se vyrábí se z agarosy (součást agaru). Má velké póry a kyselý charakter. Používá se pro dělení proteinů s $M_r > 200\,000$.
Bio-Gel P je polymer akrylamidu a *N*,*N*'-methylenbisakrylamidu. Obsahuje málo polárních skupin. Má velký frakcionační rozsah 2 000 až 3 000 000, lepší průtok. Dodává se v suchém stavu a botnání gelu trvá asi 4 hodiny bez promíchávání. **Bio-Gel A** obsahuje také agarosu. Frakcionační rozsah je velmi velký 10 000 až 150 000 000. Dodává se už nabotnaný v destilované vodě.

Důležitou vlastností gelu je **frakcionační rozsah gelu**. Je to rozsah relativních molekulových hmotností, v kterém se látky od sebe oddělují. Mimo tento rozsah nelze daným gelem látky rozdělit. Rozsah pro nejhustější gely je asi 1 000. Rozsah pro gely na dělení velkých molekul je až několik miliónů. Horní hranice frakcionačního rozsahu se nazývá **vylučovací limit**.

Frakcionační rozsah vybraných gelů

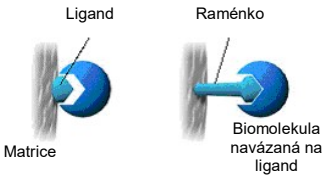
M_r	Médium
50−1 000	Sephadex G-15, Bio-Gel P-2
1 000−5 000	Sephadex G-25
1 500−30 000	Sephadex G-50, Bio-Gel P-10
4 000−150 000	Sephadex G-100
5 000−250 000	Sephadex G 200
60 000−20 000 000	Sepharose 4B

Afinitní chromatografie

umožňuje separaci biomolekul na základě jejich specifických interakcí. Zakotvená fáze je tvořena inertním nosičem, na který se zpravidla kovalentně váže (imobilizuje) biospecifický ligand.

Biospecifické interakce využívané při afinitní chromatografii
Enzym – substrát, kofaktor, inhibitor
Hormon – receptorový protein
Protilátka – antigen
Komplementární sekvence bází v DNA a RNA

Jako inertní matrice se v afinitní chromatografii používají nejčastěji agarosa, dextranové gely, celulosa a její deriváty, polyakrylamidové gely a jejich deriváty nebo porézní sklo. Způsob jakým se ligand kovalentně váže na matrici, závisí na druhu matrice, vlastnostech ligandu a jeho funkčních skupin.



Afinitní chromatografie

Agarosa aktivovaná bromkyanem se všeobecně používá na navázání ligandů, které obsahují $–NH_2$ skupinu, např. při imobilizaci bílkovin.

Pokud se na ligand vážou malé molekuly, může být navázán přímo na povrchu matrice. Jsou-li však navazované molekuly větší, může být jejich vazba prostorově omezovaná samotnou inertní matricí. Proto se podstatná část gelů používaných při afinitní chromatografii upravuje navázáním tzv. raménka (angl. spacer arm). Je to uhlíkatý nebo jiný řetězec navázaný na aktivovanou matrici a teprve na něj se váže příslušný ligand.

Při afinitní chromatografii se směs látek nanáší na kolonu naplněnou matricí s navázaným ligandem. Specificky reagující látka ze směsi se navazuje na ligandy, zatímco ostatní látky jsou vymyty pufrem z kolony. Oddělená složka je pak eluována z kolony elučním roztokem – jeho účinkem se navázaná látka z ligandu opět uvolní. Principem eluce je změna pH, iontové síly, polarity eluentu apod.

Techniky kapalinové chromatografie

Z hlediska metody provedení rozlišujeme při kapalinové chromatografii dvě základní techniky: chromatografii planární a kolonovu.

Planární chromatografie

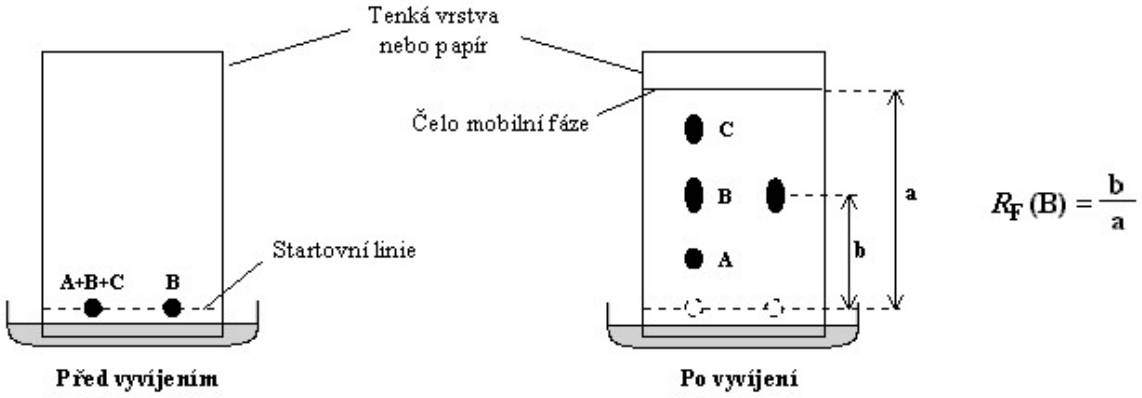
Planární chromatografie patří mezi instrumentálně nejjednodušší techniky kapalinové chromatografie. Zahrnuje papírovou chromatografii, která je v současné době na ústupu a používá se jen zřídka, a chromatografii na tenkých vrstvách. Tenké vrstvy se připravují buď manuelně, nanášením chromatografického materiálu na skleněnou podložku, mnohem běžnější jsou však komerčně dodávané chromatografické desky. Jako stacionární fáze se nejčastěji používají sorbenty na bázi silikagelu a oxidu hlinitého. Chromatografie na tenké vrstvě se používá převážně ke kvalitativní analýze.

Vzorky se nanáší na spodní okraj desky na tzv. místa startu ve formě teček nebo čárek pomocí kapilár. Tenká vrstva se umísťuje do nádobky nasycené parami mobilní fáze tak, že spodní okraj tenké vrstvy je smáčen mobilní fází, která působením kapilárních sil mezi částicemi stacionární fáze vzlíná a tak

dochází k jejímu průtoku podél stacionární fáze. Látky směsi jsou unášeny mobilní fází a současně interagují s povrchem fáze stacionární. Na základě afinity ke stacionární fázi zůstanou navázány v určité vzdálenosti od místa startu. Po vysušení desky se barevné látky objeví ve formě skvrn v různé vzdálenosti od místa startu. Nebarevné látky musí být zviditelněny postřikem vhodným detekčním činidlem. Chromatografická deska může být také napuštěna fluorescenčním barvivem. Po vysušení jsou skvrny látek detekovány pod UV světlem, jako skvrny zhášející fluorescenci (nejčastěji při 254 nm).

Při vyhodnocování chromatografie na tenké vrstvě se provádí výpočet retardačních faktorů jednotlivých zón (zóny nebarevných látek je nutno odkrýt vhodným detekčním činidlem).

Retardační faktor (R_F **)** je poměr vzdálenosti středu koncentračního maxima zóny od startu ke vzdálenosti čela mobilní fáze od startu.



Chromatografie na tenké vrstvě a princip hodnocení

Protože existuje značné množství faktorů (např. teplota, odchylky ve složení chromatografické soustavy, vlhkost), které do jisté míry ovlivňují polohu zóny, a tedy hodnotu R_F, vyvíjíme obvykle na chromatogramu zároveň vzorek standardu (autentické látky). Dosáhne-li standard a látka oddělená z neznámého vzorku stejné hodnoty R_F (a to nejméně ve třech různých chromatografických soustavách), je pravděpodobné, že se jedná o látky chemicky totožné. Množství látky v zóně lze odhadnout podle velikosti její plochy, kvantitativně stanovit denzitometrem, či po vymytí látky ze zóny vhodným rozpouštědlem.

Sloupcová chromatografie

Při sloupcové chromatografii je stacionární fáze naplněna do skleněné kolony a mobilní fáze protéká kolonou buď samovolně působením gravitace, nebo je průtok urychlen působením tlaku. Klasická sloupcová chromatografie se využívá k separaci látek. Látky se dělí na základě rozdílné afinity ke stacionární a mobilní fázi. Nejčastěji se používá eluční uspořádání, tj. látky jsou po rozdělení na koloně postupně eluovány a zachytávány ve formě frakcí vytékajících z kolony. Pokud jsou barevné, je možno jejich dělení pozorovat přímo na koloně. Nebarevné látky musí být vizualizovány po vytečení z kolony. Používá se buď reakce s vhodným činidlem, fotometrie eluátu při určité vlnové délce, příp. měření jiného parametru eluátu.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, HPLC

(z angl. high-performance liquid chromatography)

Eluční sloupcová chromatografie byla v posledních desetiletích podstatně zdokonalena a zmechanizována. Hlavní podíl na tom má vývoj nového sortimentu stacionárních fází. Vysoké účinnosti separačního procesu je dosaženo použitím kolon s velmi jemně zrněným sorbentem (3–10 μm) a dobře definovanou velikosti částic. Kolony se proto vyznačují vysokou hustotou a homogenitou náplně. Separační proces je tak účinnější a kratší, používané kolony mají menší rozměry. S klesající velikostí částic však stoupá odpor kolony a na dosažení potřebné rychlosti průtoku mobilní fáze je třeba použít tlak jednotek až desítek MPa. Proto se tato separační technika někdy označuje jako vysokotlaká kapalinová chromatografie (angl. high-pressure liquid chromatography).

V klinicko-biochemické praxi je HPLC využívána pro sledování hladiny různých léků, metabolitů, vitamínů, hormonů, apod.

Základní komponenty HPLC systému jsou:

- Zásobník mobilní fáze
- Vysokotlaké čerpadlo, zajišťující průtok mobilní fáze kolonou
- Dávkovací zařízení
- Dělící kolona
- Detektor
- Integrátor (počítač)

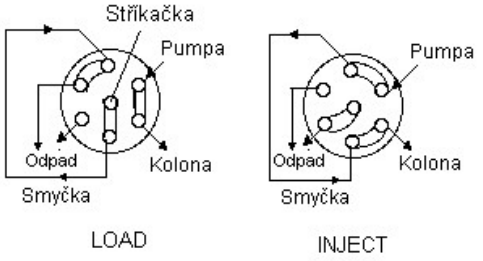
Zásobníky mobilní fáze slouží jako rezervoáry mobilní fáze. Mobilní fáze je z nich čerpadly transportována na kolony. Mobilní fáze musí být před čerpáním zbavena rozpuštěného plynu, aby se z ní při vyšším tlaku neuvolňovaly v koloně bubliny. Odplynění se provádí ultrazvukem, sníženým tlakem nebo varem.

Vysokotlaká čerpadla musí zajistit konstantní (nebo programovatelný) bezpulzní průtok (0,1−10 ml/min) při tlacích do 60 MPa. Moderní přístroje využívají obvykle dvě pulzní pístová čerpadla, jejichž činnost je fázově posunuta a pohybují se tak, aby došlo k maximálnímu potlačení pulzace toku mobilní fáze.

Mobilní fáze může mít konstantní polaritu, kdy čerpadlo pumpuje do kolony jediné rozpouštědlo (např. metanol). Tento režim, který se nazývá **isokratický**, se používá nejčastěji. Je také možné měnit eluční sílu mobilní fáze tak, že se postupně mění zastoupení dvou nebo více rozpouštědel. Tento postup vyžaduje čerpadlo gradientové, s programátorem gradientu.

Dávkovací zařízení. Při dávkování vzorku je nutné překonat velký pracovní tlak uvnitř kolony. Nejčastěji se v HPLC používá 6-cestný injekční ventil s vyměnitelnou smyčkou (např. Rheodyne).

Schematický diagram smyčkového dávkovače uvádí obrázek. V pozici „load“ je vzorek naplněn pomocí stříkačky do dávkovače. Přitom se vzorkem zaplní externí smyčka (obvykle 5–100 μl). Během plnění smyčky prochází mobilní fáze ventilem na kolonu. V pozici „inject“ rotuje ventil tak, že mobilní fáze nyní



Princip smyčkového dávkovače

začne procházet přes smyčku a vzorek je tak vnesen na kolonu.

Obsluha jednoduchých smyčkových dávkovačů je manuální, pro sériové analýzy se používají automatické dávkovače (autosamplery).

Chromatografické kolony se zhotovují z nerezové oceli nebo ze skla. Nejvýhodnější jsou kovové kolony, jejichž vnitřní povrch je potažen vrstvou skla. V současnosti se obvykle používají kolony o délce 10 až 30 cm, průměr analytických kolon bývá v řádu jednotek milimetrů. Účinnost kolony závisí na použité stacionární fázi, na délce kolony a na jejím tvaru, na materiálu kolony, na úpravě vnitřního povrchu kolony a na množství spojovacích částí. Kolony lze plnit stacionární fází přímo v laboratoři, nebo je možné je koupit hotové od výrobců, což je běžnější.

Náplně kolon se volí v závislosti na charakteru analyzovaných sloučenin a principu, který má být při dělení uplatněn. Kolony musí být mechanicky stabilní při pracovních tlacích do 30 – 40 MPa, mají mít vysokou účinnost a poskytovat symetrické píky i při separaci polárních, kyselých, bazických či vysokomolekulárních látek (peptidů, proteinů, atp.) a měly by mít co nejvyšší permeabilitu (malý odpor i při vysokých průtocích mobilních fází), aby bylo možno dosáhnout rychlých separací. Při HPLC se obecně mohou uplatňovat všechny z interakcí, které byly uvedeny v přehledu výše. V současné době existuje obrovská škála komerčně připravených kolon s různými typy náplní. Nejběžnější aplikací současné HPLC je chromatografie na reverzních fázích. Kolony jsou v tomto případě plněny silikagelem C18, což je silikagel s chemicky navázanými oktadecylovými zbytky. V některých případech se namísto 18-uhlíkatých zbytků na silikagel navazují uhlovodíkové zbytky C8, C12 nebo skupiny –C≡N, fenylové příp. další skupiny. Vývoj směřuje ke zvyšování selektivity dělení a zmenšování rozměrů částic, což vede ke zkracování doby analýzy.

Novým trendem je použití kapilárních kolon, jejichž průměr je srovnatelný s velikostí částic náplně. Vedle analytických kolon se pracuje též se speciálními kolonami preparačními o velkém průměru a délce. Před nebo za analytickou nebo preparační kolonu se zařazují předkolony a postkolony. Předkolony slouží hlavně k ochraně vlastní kolony, předkolony i postkolony mohou být využity k derivatizaci analytu. Kolony mohou být temperovány – k tomu slouží **kolonové termostaty**.

Detektory slouží k tomu, aby eluent vytékající z kolony mohl být kontinuálně monitorován. Musí rozeznat specifický signál eluovaných látek od signálu rozpouštědel. Nejčastějším typem detektoru je **UV/VIS detektor**. Rozpouštědla používaná v HPLC obvykle v UV/VIS oblasti neabsorbují a UV/VIS detektor lze použít k detekci mnoha látek. UV detektor může pracovat při určité vlnové délce nebo lze vlnové délky libovolně měnit, obvykle v rozsahu 190–600 nm. Citlivost UV detektorů je obvykle v rozsahu absorbancí 0,001–1,0 (což odpovídá ng analytu).

Spektrometrický detektor s diodovým polem (angl. diode array detector, DAD) je detektor umožňující snímat absorpční spektrum v závislosti na čase. Výsledkem je trojrozměrný záznam absorpčních spekter všech eluovaných látek. Diodové pole však poskytuje jednodušší spektrum než spektrum měřené v kyvetě, identifikace látky podle zaznamenaného spektra je špatně uskutečnitelná. Slouží zejména k posouzení čistoty zaznamenaného píku analyzované látky. Citlivost je asi o 1 řád horší než u UV/VIS detektorů.

Látky, které vykazují přirozenou fluorescenci anebo mohou být vhodnou reakcí na fluoreskující látky převedeny (předkolonová nebo postkolonová derivatizace) mohou být detekovány **fluorescenčními detektory**. Detektory jsou velmi citlivé a selektivní, lze stanovit až pikogramy analytu.

Velmi citlivé jsou **elektrochemické detektory**. Podle principu měření se dělí na amperometrické a coulometrické. Měří se změna proudu (amperometrický detektor) nebo potenciálu (coulometrický detektor) při průchodu vzorku mezi dvěma elektrodami v průtokové kyvetě. Jedna z těchto elektrod funguje jako referenční, zatímco potenciál druhé lze nastavit tak, aby vzorek v kyvetě byl oxidován nebo redukován.

Hmotnostní detektory (MS detektory – z angl. mass spectrum**)** jsou velmi účinným prostředkem pro identifikaci látek vytékajících z kolony. Umožňují měřit jejich hmotnostní spektrum, které je pro každou látku vysoce specifické. Spojení HPLC a MS je však technicky i finančně dosti náročné, např. vzhledem k tomu, že HPLC separace se provádí za vysokých tlaků, MS měření v hlubokém vakuu, hmotnostní spektrometr je třeba navíc chránit před nadbytkem vody a solí apod. Za chromatografickou kolonu se umísťuje dělič toku, který k detektoru přivádí pouze část eluentu z kolony.

Výstup z detektoru je obvykle připojen k počítači se softwarem umožňujícím převod analogového signálu do digitálního formátu, jeho uložení a zpracování.

Záznam odezvy chromatografického detektoru na čase se nazývá **chromatogram**. Zóny separovaných látek procházející detektorem jsou zaznamenávány jako koncentrační profily (chromatografické píky). V ideálním případě je chromatografický pík symetrický a má Gaussovský tvar. Množství daného analytu odpovídá ploše resp. výšce pod eluční křivkou (píkem).

Základní parametry separace v kolonové chromatografii

Retenční čas komponenty vzorku (t_r) − časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce odpovídající průchodu maximální koncentrace látky detektorem.

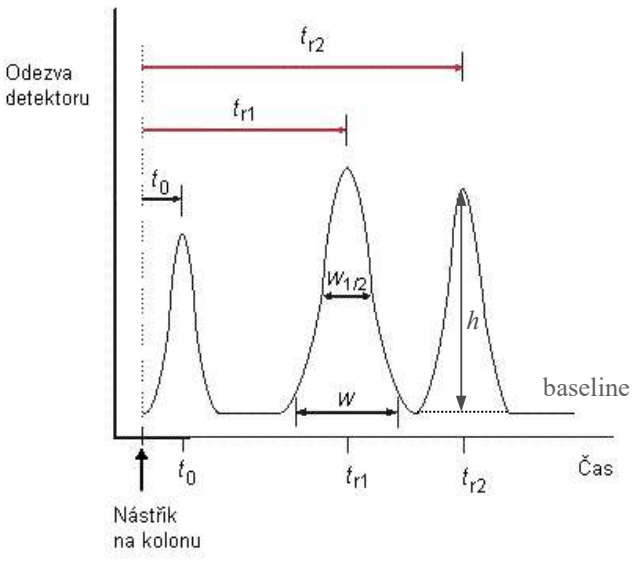
Mrtvý čas kolony (t_0) − časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce maximální koncentrace složky, jež není stacionární fází zadržována.

Šířka chromatografického píku (W) − odečítá se na úrovni základní linie, v polovině výšky píku ($W_{1/2}$) nebo v inflexním bodu, udává se v časových jednotkách.

Výška píku (h) − vzdálenost mezi maximem píku a jeho nulovou linií (angl. baseline).

Plocha píku (A) − plocha vymezená tečnami vzestupné a sestupné linie píku a základní linií, určuje se výhradně metodou numerické integrace.

Redukovaný retenční čas (t'_r) – charakterizuje dobu, po kterou se analyt zdrží interakcemi se stacionární fází: $\boldsymbol{t'_r = t_r - t_0}$



Chromatogram a základní parametry

Retenční (kapacitní) faktor (k): $\boldsymbol{k = t'_r / t_0}$

Rozlišení (R_S): $\boldsymbol{R_s = 2(t_{r2} - t_{r1}) / (W_2 + W_1)}$

Hodnota rozlišení umožňuje číselně vyjádřit úroveň separace: Látky považujeme za zcela oddělené, jestliže $R_s > 1{,}5$ (u symetrických píků postačí $R_s = 1$)

Plynová chromatografie

Při plynové chromatografii je mobilní fází plyn. Stacionární fází může být pevná látka a metoda se označuje jako **adsorpční** plynová chromatografie, nebo kapalina, a pak se jedná o **rozdělovací** plynovou chromatografii. Těmito technikami lze dělit všechny látky, které je možno po zahřátí kolony na pracovní teplotu (až 400 °C) převést bez rozkladu na plynnou fázi. U látek s vysokou teplotou varu se provede **derivatizace**, tj. reakce, jejímž výsledkem jsou deriváty původní sloučeniny s nižší teplotou varu. Pevné vzorky se předem rozpustí v těkavých kapalinách.

Dělení probíhá v kolonách v plynovém chromatografu. Vzorky se nastřikují do vyhřívaného dávkovače přes plynotěsnou elastickou membránu velmi přesnou stříkačkou. Pak dochází ke zplynění vzorku a jeho páry jsou nosným plynem, jímž je zpravidla dusík nebo argon, unášeny do vyhřívané kolony. Používají se kolony náplňové nebo kapilární. Při průchodu kolonou se jednotlivé látky dělí na principu adsorpční nebo rozdělovací chromatografie. Po rozdělení procházejí separované sloučeniny detektorem. Detektor pracuje na principu **plamenoionizačním**, kde se rozdělené složky zavádějí do plamene vodík-vzduch a sleduje se jejich ionizace, nebo se jedná o **detektor elektronového záchytu**, kde dochází k záchytu elektronů z beta-zářiče eletronegativními atomy stanovované látky a tím ke snížení měřeného ionizačního proudu. Signál jde na analogový zapisovač a integrátorem je zpracován na číselný výstup.

Pro stanovení jednotlivých složek separovaných plynovou chromatografií lze použít také **hmotnostního spektrometru**. Tento způsob detekce nabízejí špičkové plynové chromatografy. V iontovém zdroji hmotnostního spektrometru při vysokém vakuu dostávají molekuly pozitivní náboj. Pak procházejí elektrickým polem, kde se jednotlivé fragmenty i molekulový kation urychlují podle velikosti náboje a kolmo působícím magnetickým polem, kde se vychylují podle své hmotnosti a dopadají na detektor (počítač částic). Tak vzniká hmotnostní spektrum, které charakterizuje nejen kvantitativní zastoupení látek, ale také velmi spolehlivě vypovídá o jejich kvalitě (tj. o jakou sloučeninu se jedná).

V klinické biochemii se plynová chromatografie používá zejména při stanovení léčiv a jejich metabolitů, a dále pro stanovení alkoholu, organických kyselin, hormonů a steroidů.

PRAKTICKÁ ČÁST

Úkol 10.1 Gelová chromatografie Blue Dextranu a fenolové červeně

Jednou z aplikací gelové filtrace je tzv. skupinová separace tj. oddělení vysokomolekulární látky od nízkomolekulární. V této úloze se jedná o modelový pokus, při němž na Sephadexu G-25 je dělena směs Blue Dextran 2 000 a fenolové červeně. Blue Dextran 2 000 je polysacharid značený modrým barvivem, s molekulovou hmotností 2 000 000. Fenolová červeň má molekulovou hmotnost 354,4.

Materiál: Sephadex G25 (2 g, nabotnaný aspoň 3 h v deionizované vodě), Blue Dextran 2000 (20 mg/ml), fenolová červeň (0,5 % roztok), skleněná chromatografická kolona, skleněná tyčinka, nálevka, 2 kádinky 150 ml, zkumavka, dělená plastová pipetka, vata, stojan s držákem, deionizovaná voda.

Provedení:

Příprava kolony

- Chromatografickou kolonu upevněte ve stojanu do svislé polohy.
- Do zúžené výtokové části vložte malý chomáček vaty a kolonu uzavřete výtokovým kohoutem.
- Ze zbotnalého gelu odstraňte dekantací většinu kapaliny nad povrchem gelu. Skleněnou tyčinkou suspenzi lehce promíchejte a pomocí nálevky nalijte do připravené kolony.
- Otevřete kohout na koloně a tekutinu nechte volně vytékat, dokud nad gelem nezůstane asi 1 mm kapaliny. Kohout uzavřete.

Příprava a nanesení vzorku

- Pomocí plastové pipetky odměřte do mikrozkumavky cca 0,5 ml roztoku Blue Dextranu a smíchejte s cca 0,5 ml roztoku fenolové červeně.
- Připravený roztok naneste opatrně plastovou pipetkou na gel v koloně.
- Kohout na koloně otevřete a nechte roztok vsáknout – do gelu se **nesmí** dostat vzduchové bubliny.

Eluce a separace

- Opatrně naneste 0,5–1 ml demi-vody těsně nad gel v koloně, tak aby nedošlo ke zvíření gelových částic. Kohout na koloně otevřete a nechte roztok vsáknout. Opakujte ještě aspoň 3krát.
- Nad gel v koloně velmi opatrně naneste demi-vodu a to až k hornímu okraji kolony a otevřete kohout na koloně – pozorujte průběh dělení.
- Po kompletním rozdělení směsi do zón kohout uzavřete.
- Zakreslete schematicky chromatografickou kolonu a polohu separovaných analytů.

✍ 1. Vedle stručného popisu práce zakreslete schematicky polohu a zbarvení zón.

✍ 2. Zdůvodněte chromatografické chování těchto látek.

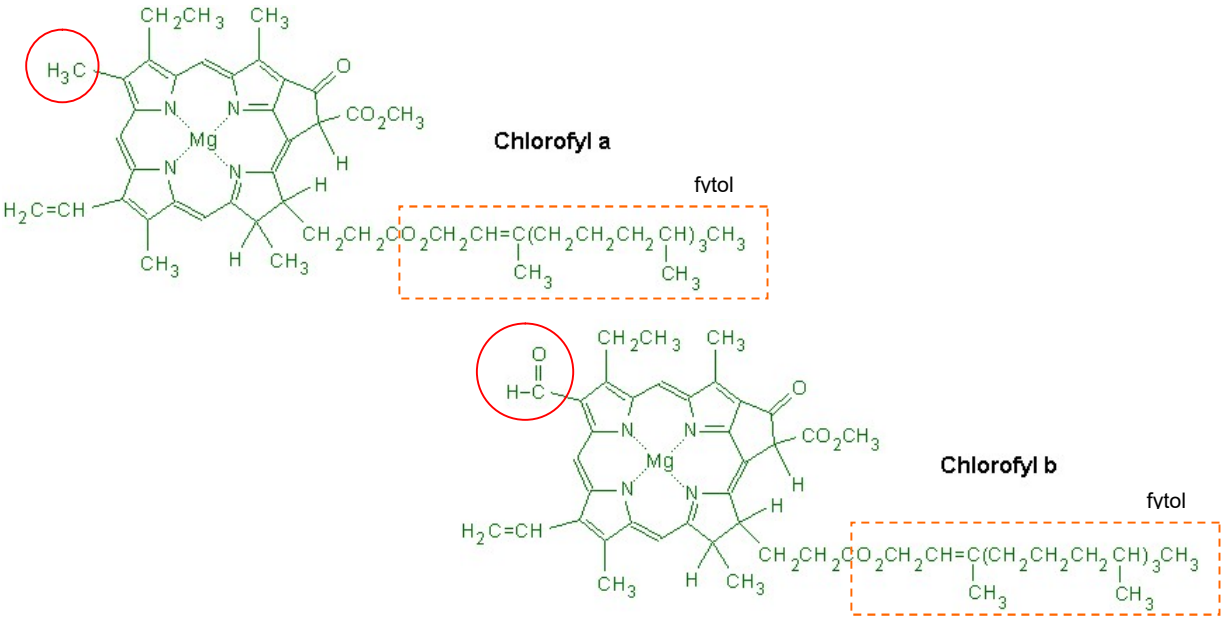
✍ 3. Navrhněte způsob izolace jednotlivých složek směsi.

Úkol 10.2 Adsorpční chromatografie listových barviv na tenké vrstvě silikagelu

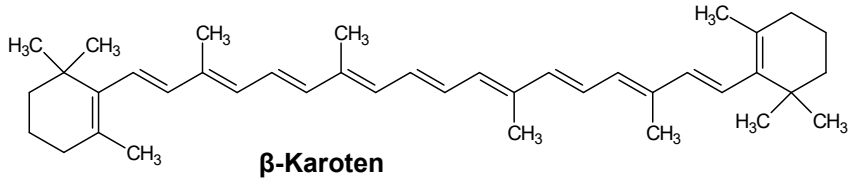
V tomto modelovém úkolu sledujeme rozdělení listových barviv po aplikaci acetonového extraktu zelených rostlin na tenkou vrstvu silikagelu.

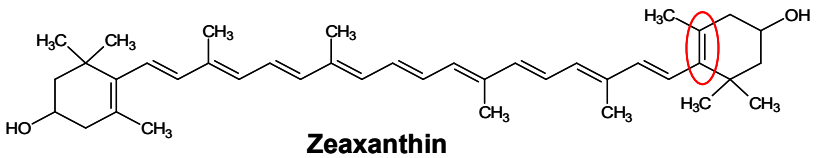
Listová barviva jsou lipofilní pigmenty (vázané v membránových strukturách), účastnící se fotosyntetických procesů a nacházející se v plastidech. Jejich význam spočívá ve schopnosti konvertovat energii elektromagnetického záření na energii chemických vazeb. Rozlišujeme zelené chlorofyly, žluté až červenohnědé karotenoidy a převážně modré fykobiliny.

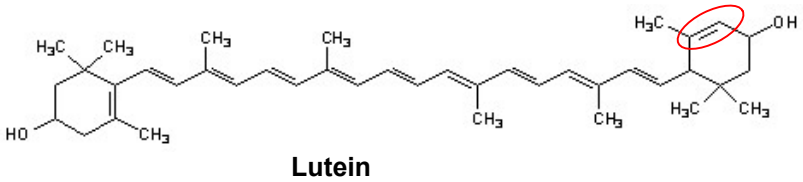
Struktura chlorofylů je podobná struktuře hemu v živočišných buňkách, obsahuje tetrapyrrolové jádro s komplexně vázaným kationtem hořečnatým. Na čtvrtém pyrrolovém jádře je navázán esterovou vazbou alifatický alkohol fytol, zodpovědný za lipofilní vlastnosti chlorofylu. Chlorofyly v rostlinách dělíme na chlorofyl *a* a *b*, lišící se substituentem na druhém pyrrolovém jádře.



Karotenoidy jsou rostlinná barviva, která patří do skupiny isoprenoidů. Jsou obsaženy v mrkvi (karoteny), rajských jablíčkách (lykopen), šípcích, paprikách i v dalších rostlinách. Nejrozšířenějším karotenoidem je žlutý β-karoten, z xantofylů lutein a zeaxanthin.







Materiál: Chromatografické desky Silufol 15 x 7,5 cm, elektrický vysoušeč, nanášecí kapiláry, chromatografická komora, šablona k odečítání hodnot R_F. Vyvíjecí směs (benzín : propan-2-ol : voda 100 : 10 : 0,25, *v/v/v*). Zelené listy, třecí miska, tlouček, mořský písek, $CaCO_3$, aceton, lžička, nálevka, filtrační papír, zkumavka.

Benzín je hořlavina I. třídy, v laboratoři se nesmí pracovat s otevřeným ohněm!

Provedení:

Příprava extraktu

- Odvažte 2,0 g čerstvých listů.
- Rozstříhejte odvážené listy na menší kousky a rozetřete je ve třecí misce s malým množstvím mořského písku, uhličitanu vápenatého (na špičku malé lžičky) a 5 ml acetonu.
- Směs zfiltrujte do zkumavky.

Příprava chromatografické desky

- Chromatografické desky bereme **rukou za hrany**, povrchu se nedotýkáme prsty.
- Před nanášením vzorků označte velmi lehce tužkou příčnou linii startu (**nesmí se porušit vrstva silikagelu**) ve vzdálenosti 15 mm od dolního okraje desky (při vložení desky do komory s vyvíjecí směsí musí být startovní linie nad hladinou, jinak dojde k vyplavení vzorků).
- Mezi jednotlivými vzorky a od bočních okrajů by měla být vzdálenost aspoň 10 mm.

Aplikace vzorku

- Vzorky extraktu postupně aplikujte kapilárkami, aniž byste porušili tenkou vrstvu silikagelu: ponořte kapilárku do roztoku vzorku a vytáhněte ji ven, poté se kapilárkou, kolmo orientovanou k desce, lehce a velmi krátce dotkněte místa na startovní linii (průměr skvrn by měl být menší než 3 mm), skvrnu vysušte máváním desky ve vzduchu po dobu cca 10 s.
- Po vysušení opakujte nanesení téhož vzorku do stejného místa ještě 5krát, po každém nanesení desku vysušte.

Separace

- Desku s vysušeným vzorkem vložte do komory s mobilní fází, komoru opět uzavřete (nad roztokem vyvíjejícího činidla musí být prostor nasycený jeho parami) a nechte potřebnou dobu vyvíjet.
- Dosáhne-li čelo mobilní fáze žádané vzdálenosti (cca 1 cm od konce desky), chromatografickou desku vyjměte z komory a ihned označte vzdálenost, kam doputovala mobilní fáze.
- Chromatografickou desku usušte na vzduchu.

Hodnocení

- Označte tužkou koncentrační maxima jednotlivých barevných zón.

- Vyhodnoťte retardační faktory R_F hlavních separovaných sloučenin.

Ukázka chromatogramu

✍ 4. Lze na základě struktury jednoznačně určit polárnější molekulu z dvojice uvedených látek: a) chlorofyl *a vs* chlorofyl *b*; b) β-karoten *vs* zeaxanthin; c) zeaxanthin *vs* lutein?

✍ 5. Zaznamenejte údaje o chromatografické soustavě (typ absorbentu, složení mobilní fáze, teplota), vzorku a hlavních analytech, schéma chromatogramu s barvou zón a vypočtenými hodnotami R_F.

✍ 6. Vysvětlete vztah mezi strukturou látky a chromatografickým chováním. Porovnejte polohu zón jednotlivých analytů ve směsi.

✍ 7. Jakým způsobem byste vyhodnotili chromatogram kvantitativně?

✍ 8. Navrhněte způsob izolace jednotlivých složek směsi.

Úkol 10.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

- Seznamte se s uspořádáním a použitím kapalinového chromatografu.

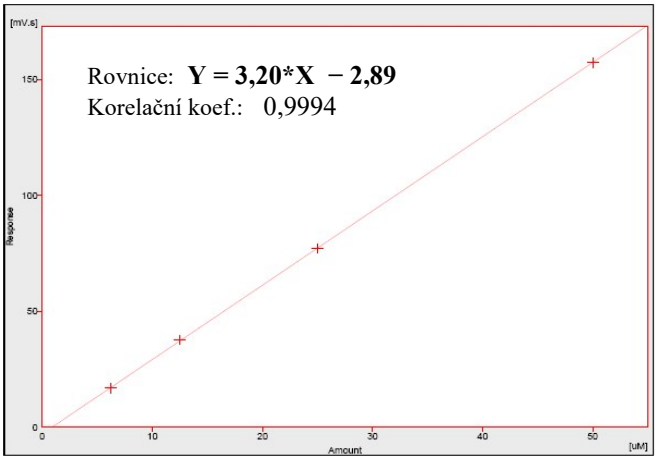
✍ 9. Zaznamenejte si údaje o demonstrované chromatografické metodě:

Stanovovaný analyt:	Vzorek:	Nanášený objem (µl):
Kolona – název: Sorbent: Rozměr kolony (délka×vnitřní průměr mm):	Výrobce:	Velikost zrnění (µm):
Mobilní fáze:		
Průtok (ml/min):	Tlak (MPa):	

✍ 10. Vypočtěte koncentraci homocysteinu v plazmě použitím kalibrační rovnice.

HPLC stanovení homocysteinu v plazmě

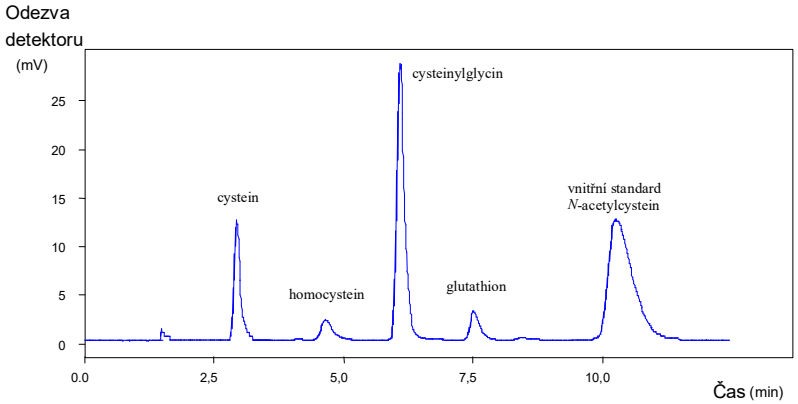
Kalibrační graf pro homocystein (Hcy): Y: Odezva (response) – plocha pod píkem
X: Množství (amount)



Kalibrační tabulka standardů (Hcy):

	Odezva (mV.s)	Množství (µmol/l)
1	16,750	6,25
2	37,665	12,50
3	77,083	25,00
4	157,255	50,00

Ukázka chromatogramu – separace nízkomolekulárních thiolů lidské plazmy na reverzní fázi C18



(thioly jsou před separací specificky navázány na fluorofor) – detekce fluorescenční

Tabulka výsledků z chromatogramu:

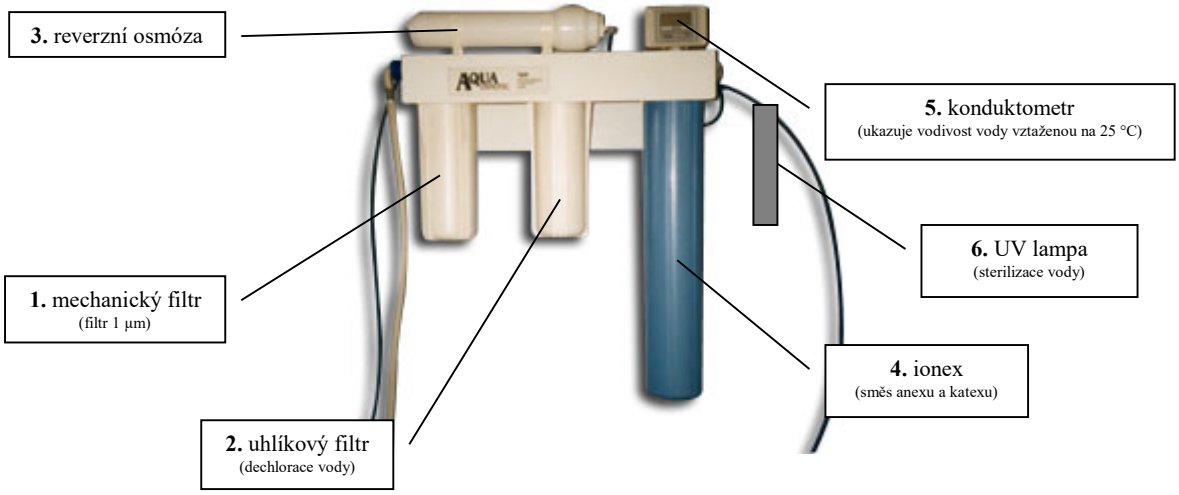
	Retenční čas (min)	Plocha (mV.s)	Množství (µmol/L)	Sloučenina
1	2,92	270,91		Cys
2	**4,59**	**75,49**		**Hcy**
3	6,00	322,77		CysGly
4	7,57	14,73		GSH
5	10,03	299,24		NAcCys
	Celkem	992,02		

✍ 11. Nakreslete strukturní vzorce plazmatických thiolů a seřaďte je podle rostoucí polarity.

✍ 12. Prodiskutujte s vyučujícím možnost použití vnitřního standardu.

Úkol 10.4 Deionizace a demineralizace vody

Schéma zařízení na výrobu demineralizované vody



- Seznamte se s uspořádáním zdroje demineralizované vody (tzv. demi-vody) na Biochemickém ústavu.