

Chromatografické metody

Podstata

*„Při chromatografii dochází
k neustálému vytváření
rovnovážných stavů separované
látky mezi dvě fáze – stacionární a
mobilní.“*

Chromatografie

- Mobilní fáze - kapalina – LC
plyn – GC
- Eluce - Izokratická – stejná eluční síla
Gradientová – rostoucí eluční síla
- Použití - analytická
preparativní

Kapalinová chromatografie LC|

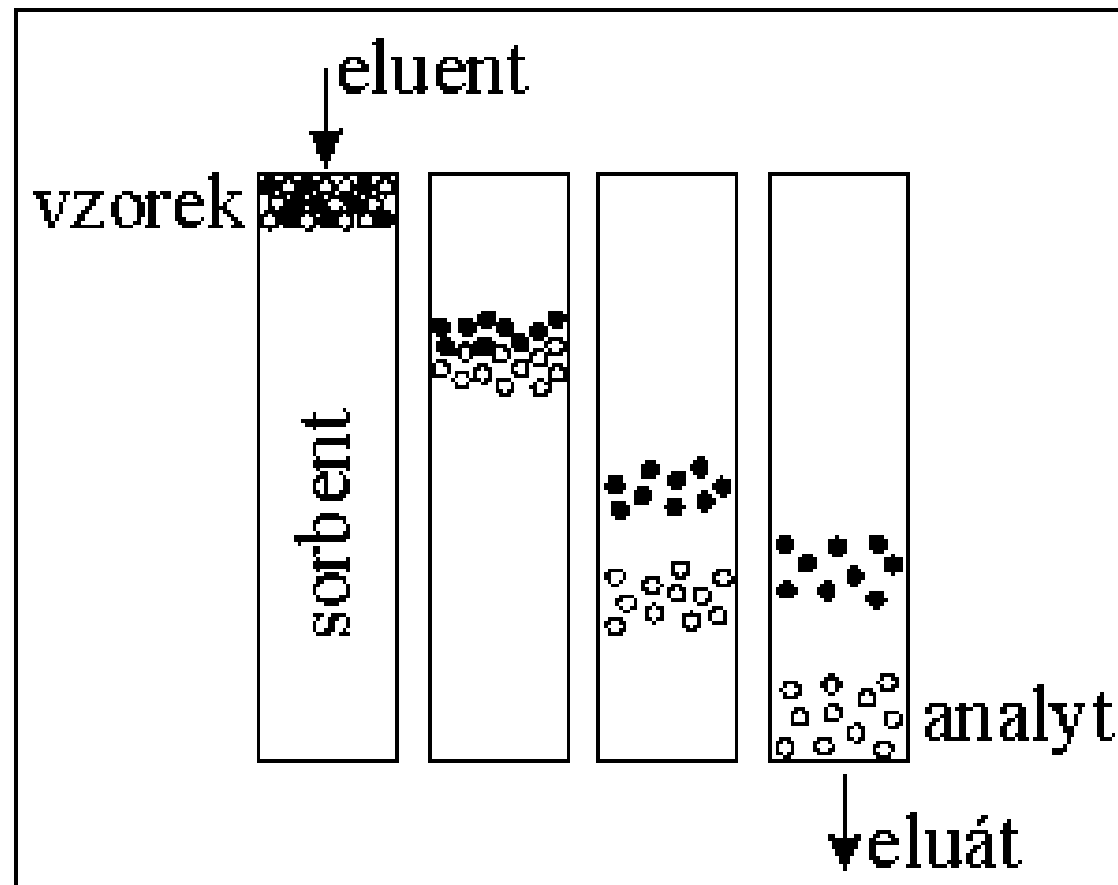
- Mobilní fáze - kapalina
- Stacionární fáze - pevná fáze,
kapalina

Provedení LC

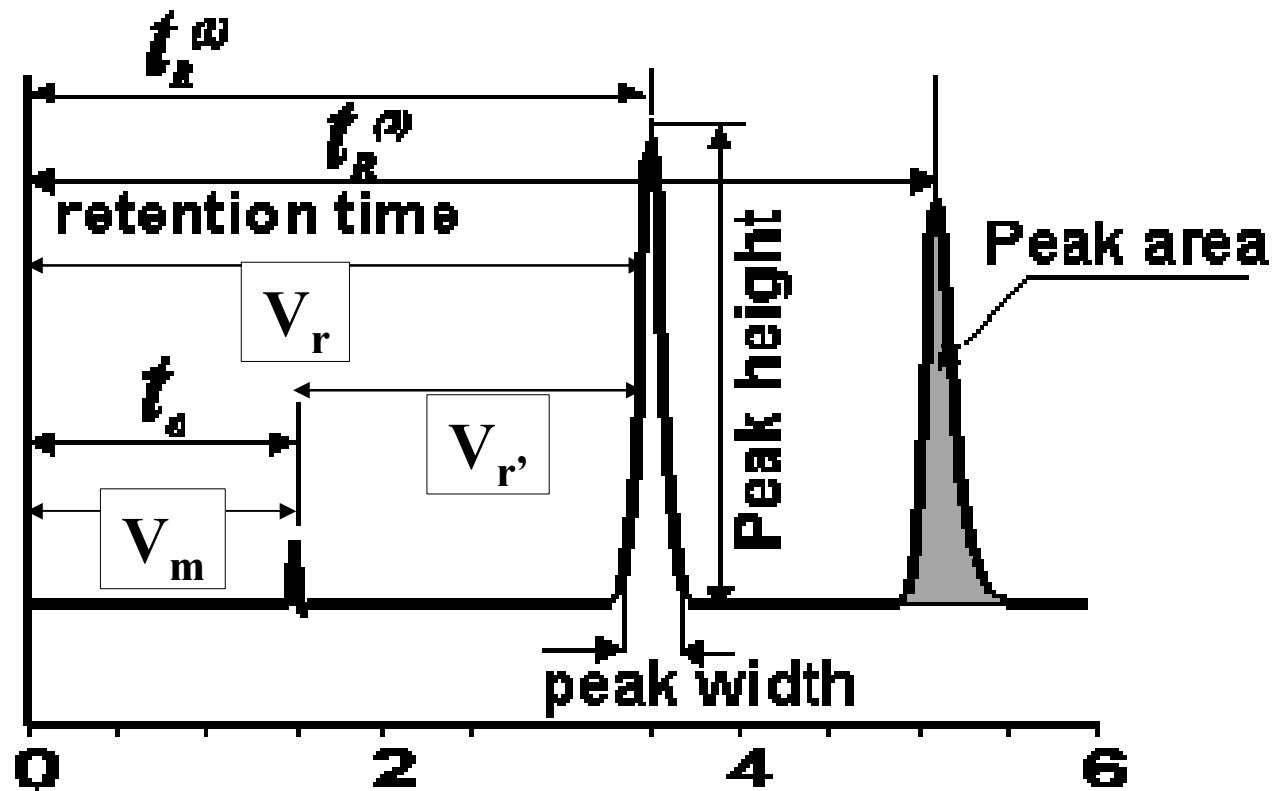
- Papírová PC
- Tenkovrstvá TLC
- Kolonová CC

Teoretické aspekty chromatografie

Chromatografie



Chromatogram



Retenční – eluční čas t_r

- Doba od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křivky

Retenční – eluční objem V_r

- Objem mobilní fáze proteklý od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křivky

$$V_r = t_r \cdot F_m$$

F_m – objemová rychlost mobilní fáze

Mrtvý objem

$$V_r = V_m + V_{r'}$$

V_r – zdánlivý retenční objem

$V_{r'}$ - redukovaný (skutečný) retenční objem

V_m - mrtvý objem – mimokolonové příspěvky
+ mimočásticový objem kolony

Kapacitní faktor k'

$$k' = \frac{V_r - V_m}{V_m} = \frac{V_{r'}}{V_m} = K_D \cdot \frac{V_s}{V_M}$$

$$k' = 1 - 10$$

V_s – objem stacionární fáze

V_M – objem mobilní fáze

Distribuční koeficient

$$K_D = \frac{c_s}{c_M}$$

c_s – rovnovážná koncentrace látky ve stacionární fázi

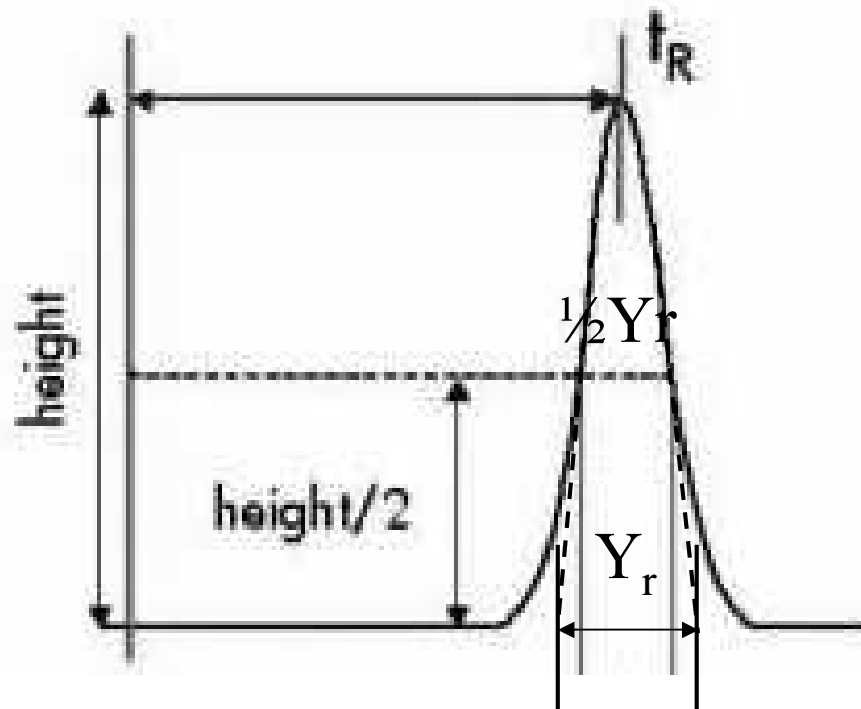
c_M – rovnovážná koncentrace látky ve mobilní fázi

Účinnost kolony

počet teoretických pater N

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{Y_r} \right)^2$$

$$N = 5.545 \cdot \left(\frac{t_r}{1/2 Y_r} \right)^2$$

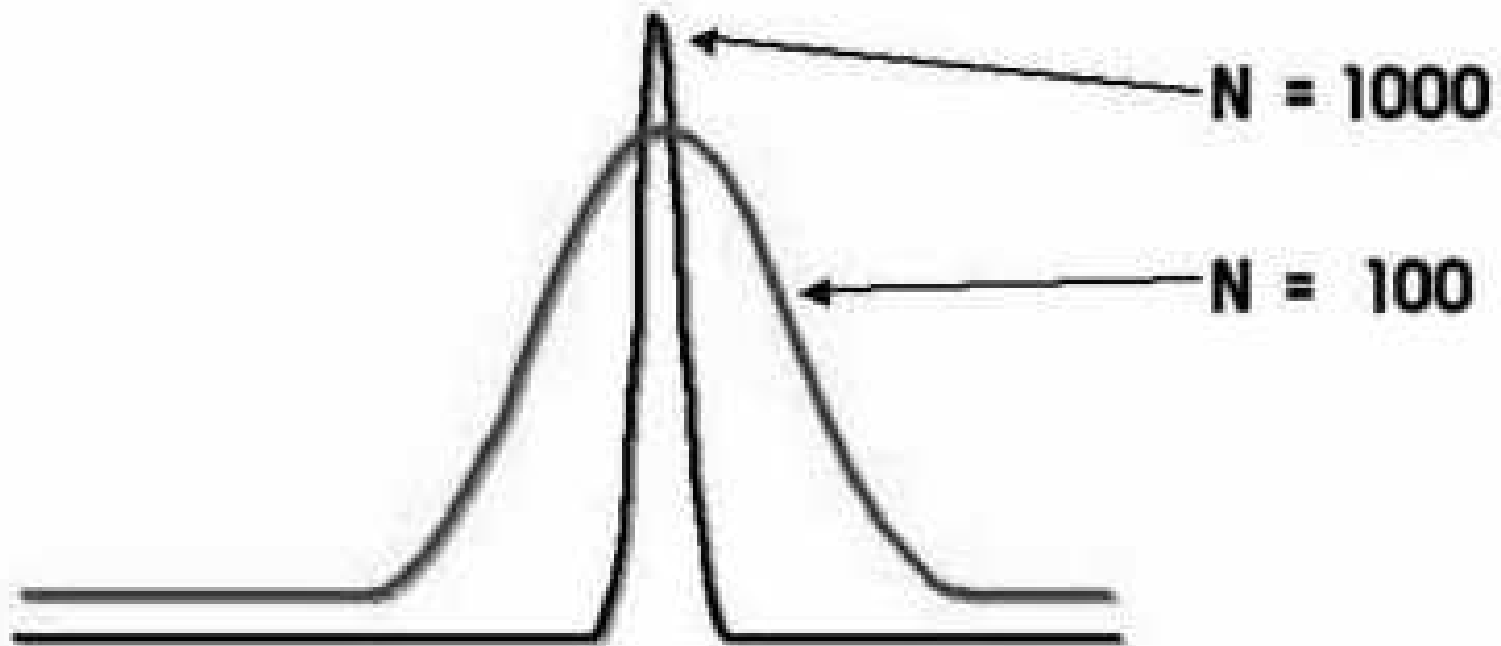


Účinnost kolony výškový ekvivalent teoretického patra H

$$H = \frac{N}{l}$$

l – délka kolony

Účinnost kolony

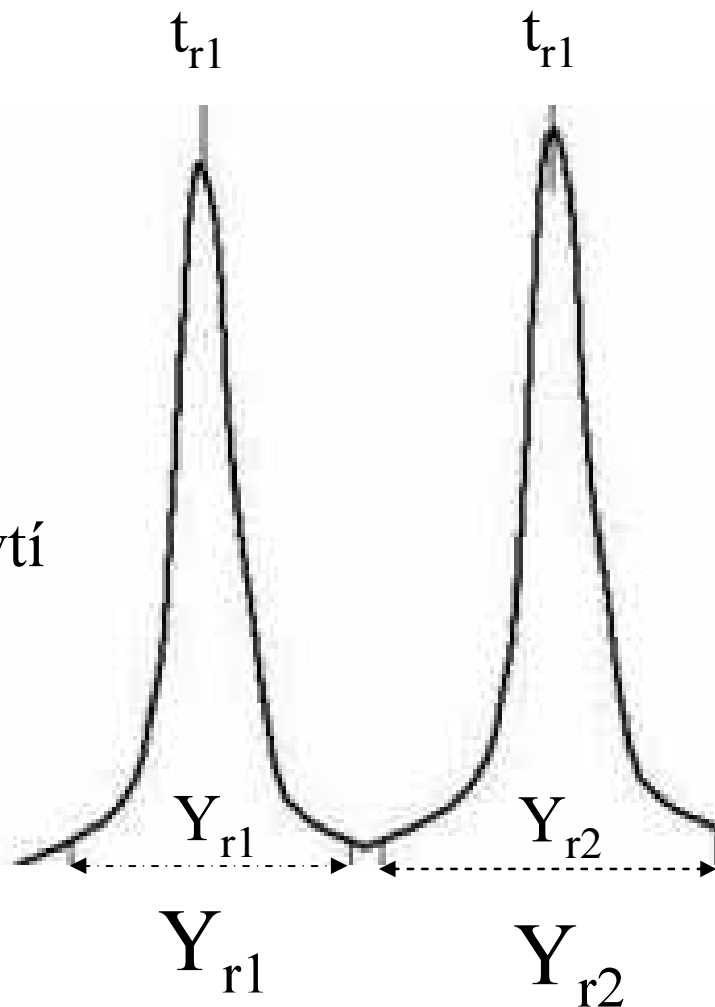


Rozlišení

$$R_{12} = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{Y_{r1} + Y_{r2}}$$

$R_{12}=1.5$ – nulové překrytí

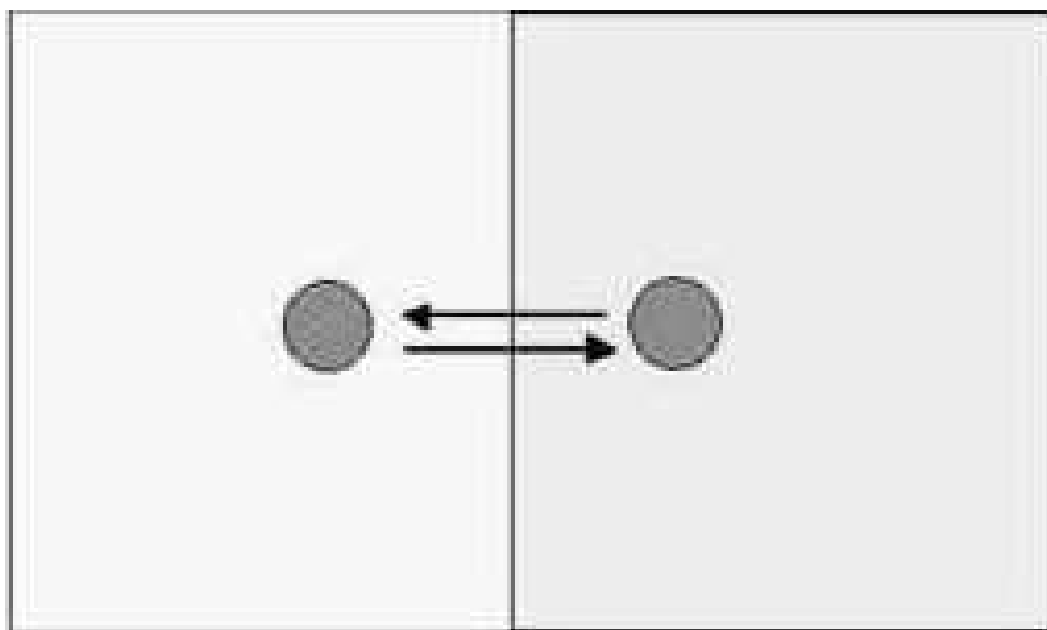
$R_{12}=1.0$ – překrytí 2 %



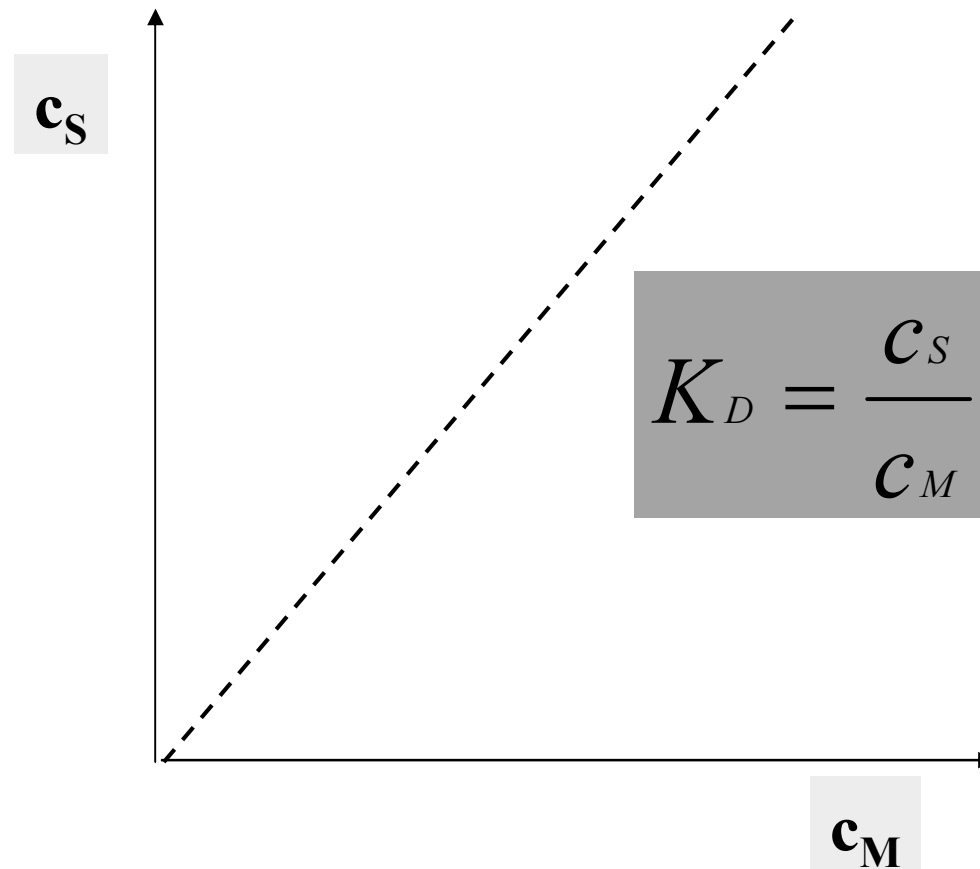
Síly a efekty využívané při separaci

- Iontové síly
- Polární síly
- Nepochární síly
- Sterické interakce
- Efekt velikosti molekul

Rozdělovací chromatografie

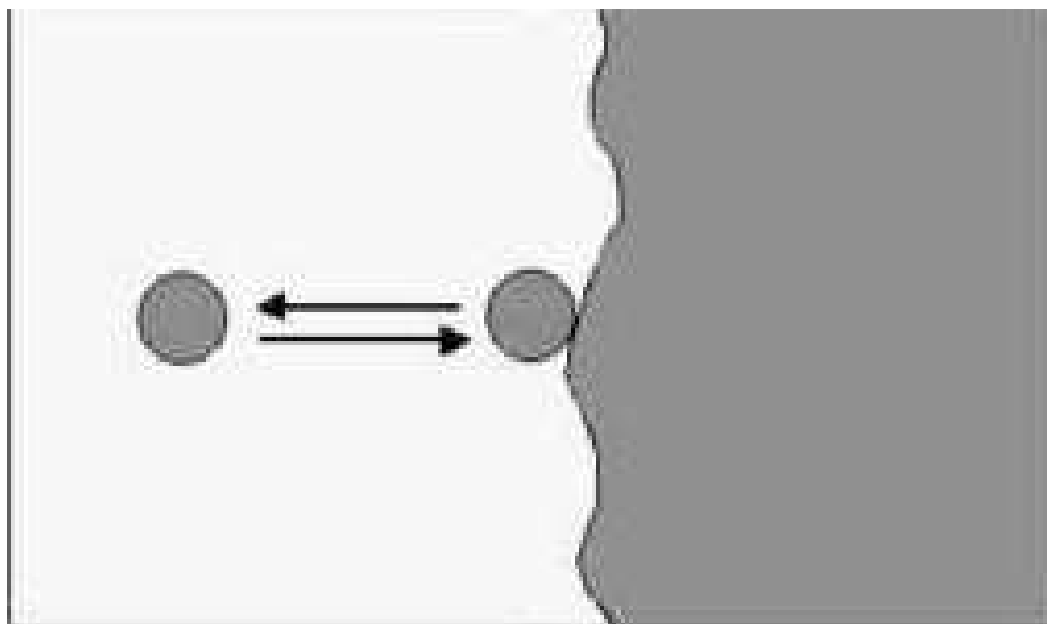


Rozdělovací chromatografie

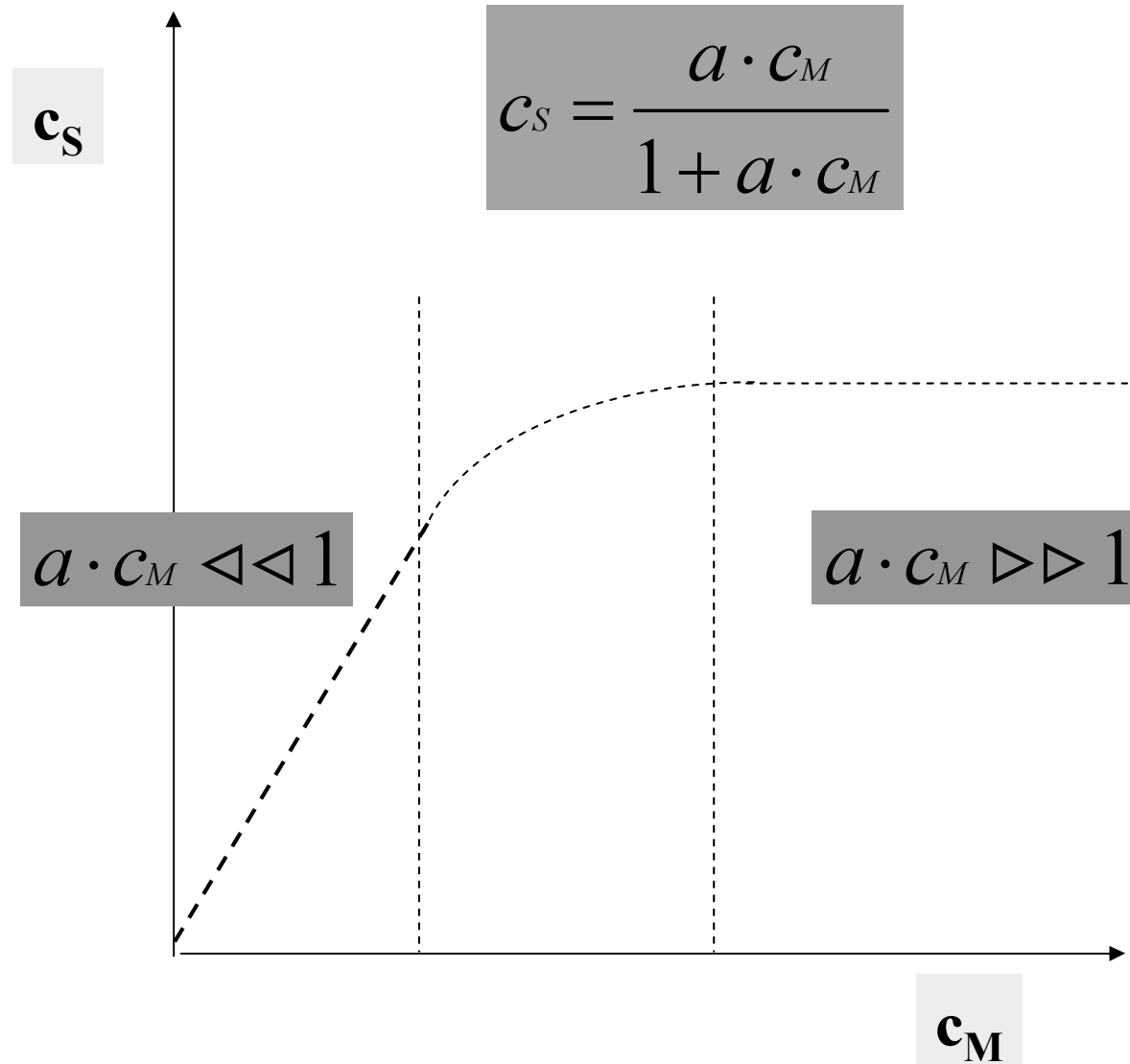


Použití – analytická PC, TLC

Adsorpční chromatografie



Adsorpční chromatografie



Adsorpční chromatografie

- Stacionární fáze – polární

Silikagel $\text{SiO}_2 \cdot n \text{H}_2\text{O}$

Oxid hlinitý Al_2O_3 , $\text{AlO}(\text{OH})$, $\text{Al}(\text{OH})_3$

Hydroxyapatit $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$

Adsorpční chromatografie

- Mobilní fáze – nepolární
- Eluce - zvyšováním polaritý mobilní fáze

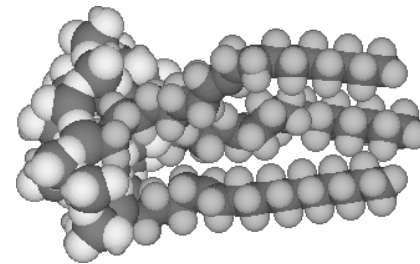
Eluotropická řada:

uhlovodíky < subst. uhlovodíky < ketony <
aldehydy < alkoholy < voda

Reverzně fázová chromatografie

- Stacionární fáze – nepolární

C_8, C_{18}



- Mobilní fáze – polární – vodné roztoky

pH → potlačit disociaci

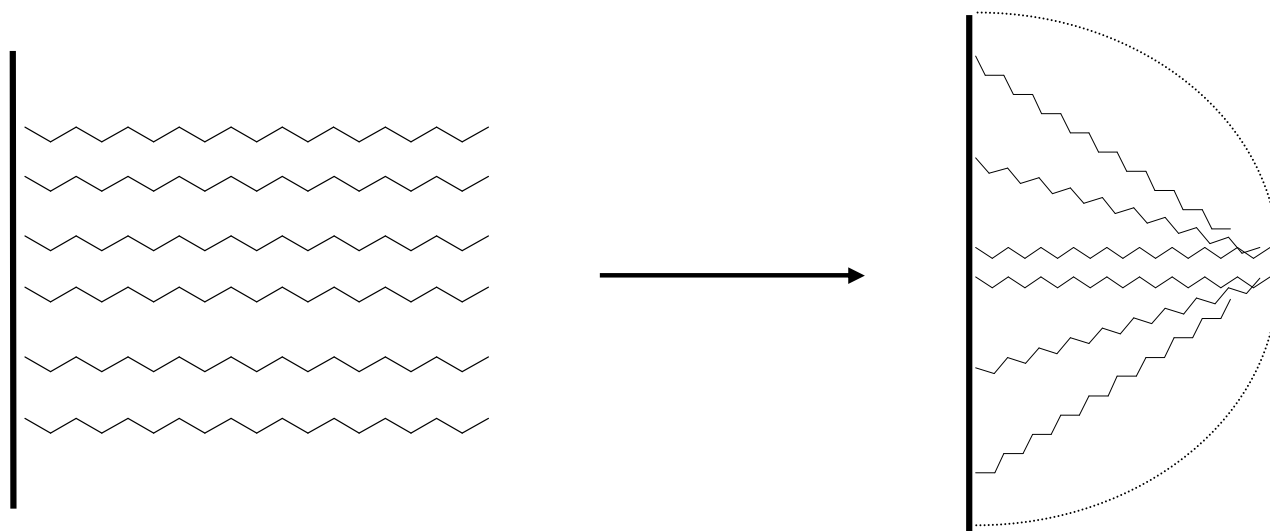
- Eluce – snižováním polarity mobilní fáze

ACN, MetOH,

Reverzně fázová chromatografie

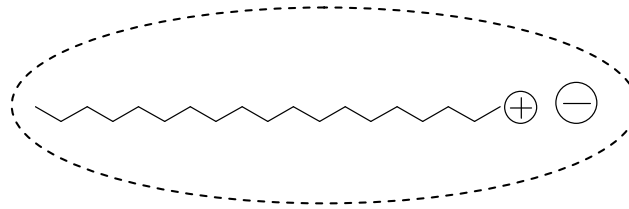
Kartáčový typ stacionární fáze

H₂O



Použití : analytické – až 90 % analýz

Iontově párová chromatografie



iontově párující činidlo

analyt

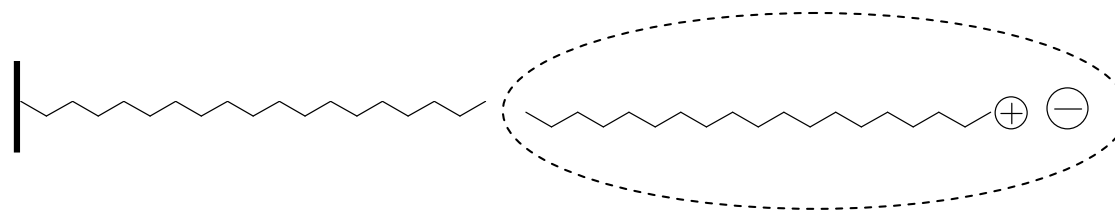
+ - SDS, HClO_4

- - tetrabutylamonium

Iontově párová chromatografie

sorbent C₁₈

iontový pár



Stacionární, mobilní fáze, eluce – RPC

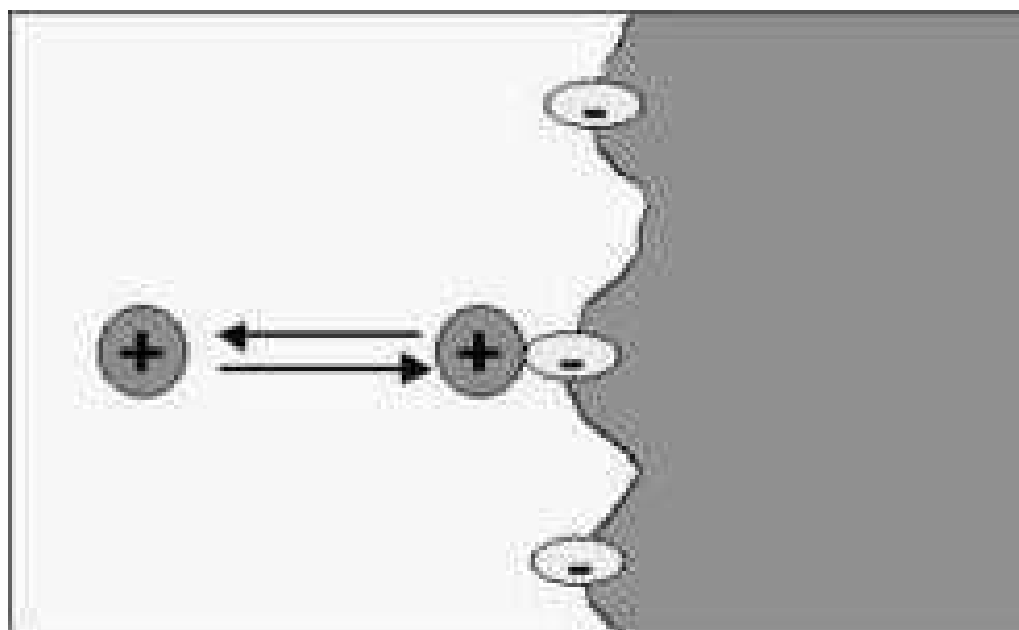
pH → plná ionizace analytu

Hydrofobní chromatografie

- Stacionární fáze – - C₈, -fenyl
- Mobilní fáze – vodné roztoky
1.7 M (NH₄)₂SO₄
- Eluce – snižováním iontové síly

Použití : purifikace bílkovin

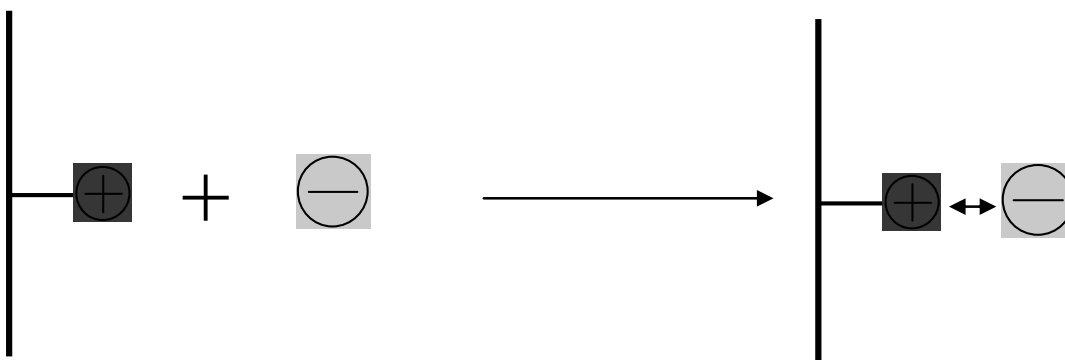
Ionexová chromatografie



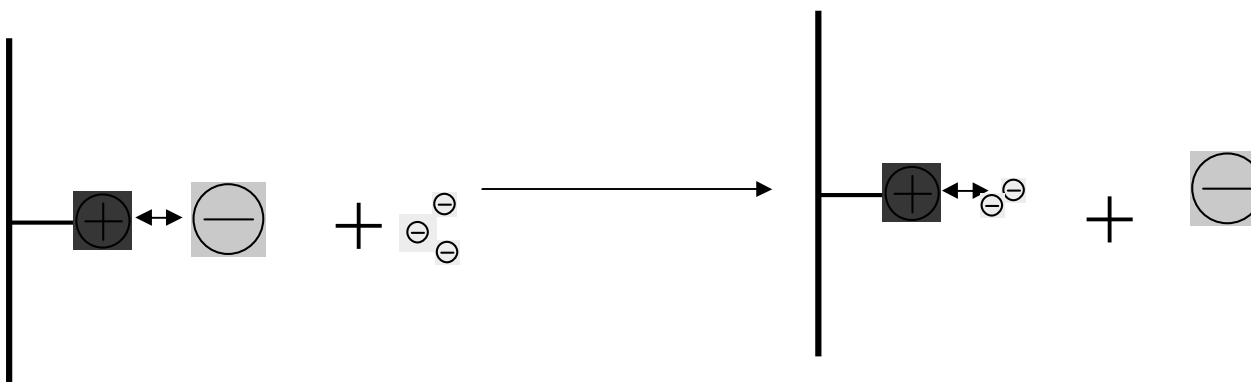
Ionexová chromatografie

elektrostatická interakce

Vazba



Eluce



Ionexy

- Katexy - - vazba kationtů

silné - sulfo(S), sulfopropyl(SP) OSO_3^-

slabé - karboxy(C), karboxymetyl(CM) COO^-

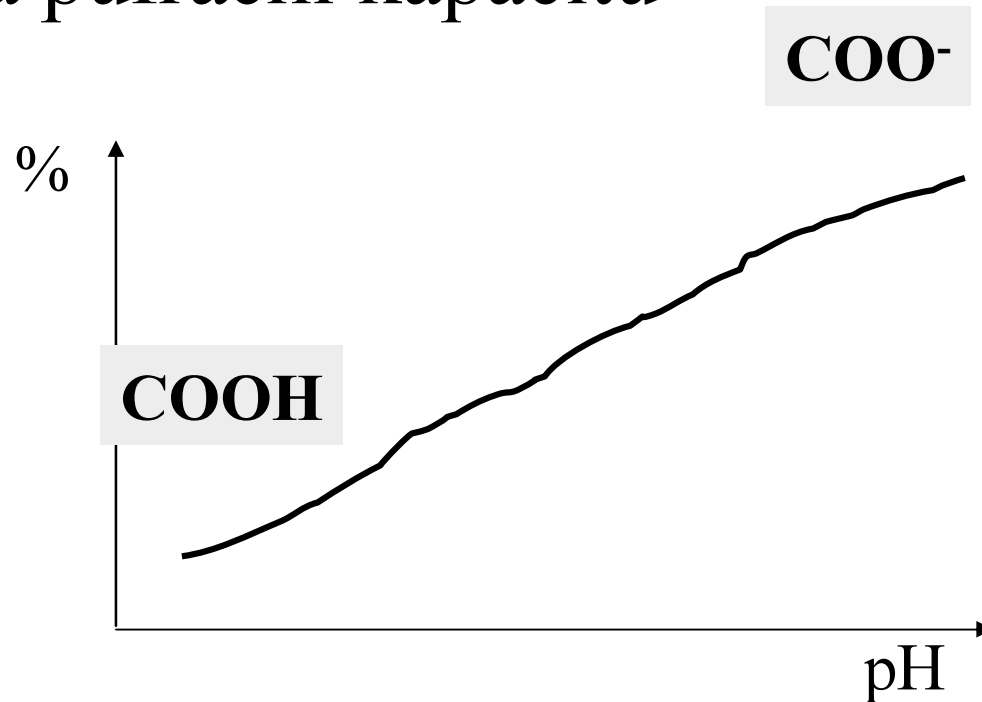
- Anexy - + vazba aniontů

silné - dietylaminoetyl(DEAE)

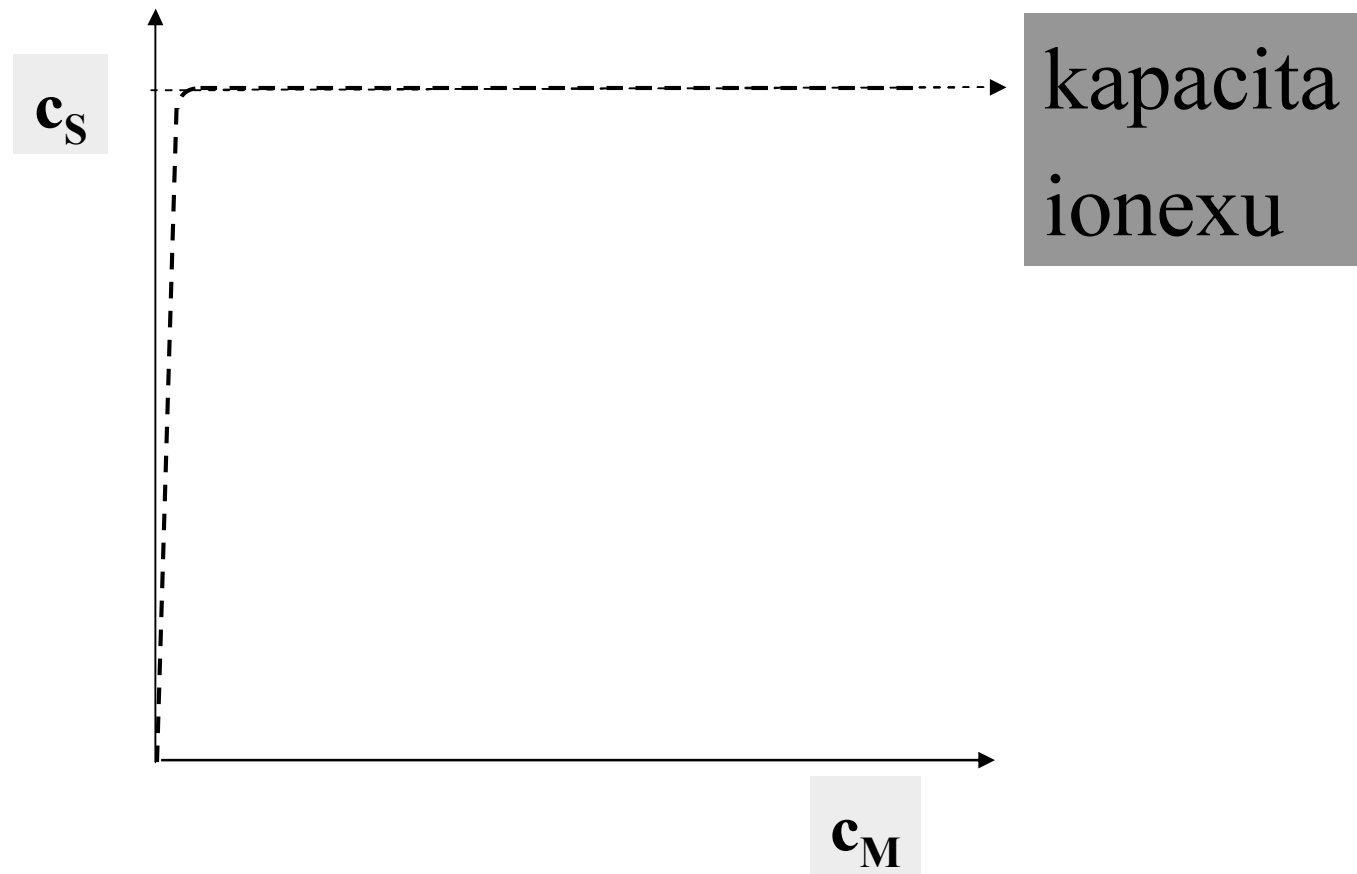
slabé – trietylaminoetyl(TEAE)

Slabý ionex

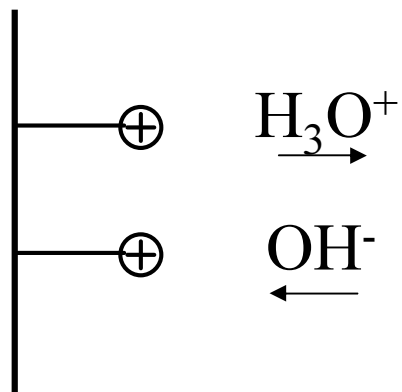
- Vykazuje změny vazebné kapacity v závislosti na pH
- Má pufrační kapacitu



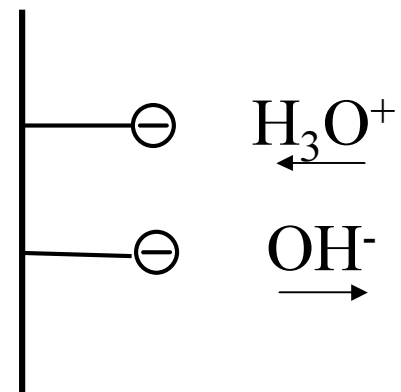
Ionexová chromatografie



Donanův efekt



zvyšování pH



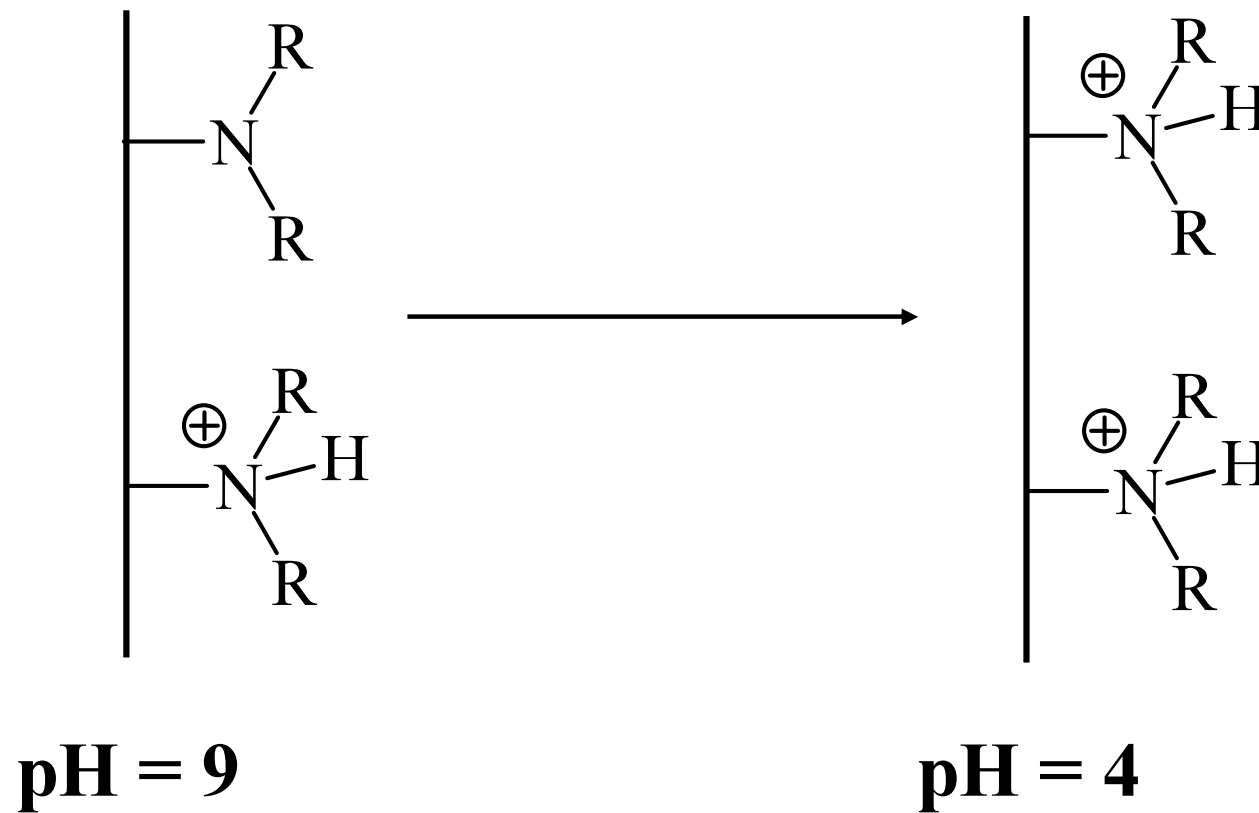
snižování pH

Ionexová chromatografie

- Nanášení vzorku – nízká iontová síla
- Eluce – gradientová
 - Zvyšováním iontové síly
 - Změnou pH
 - Afinitní eluce

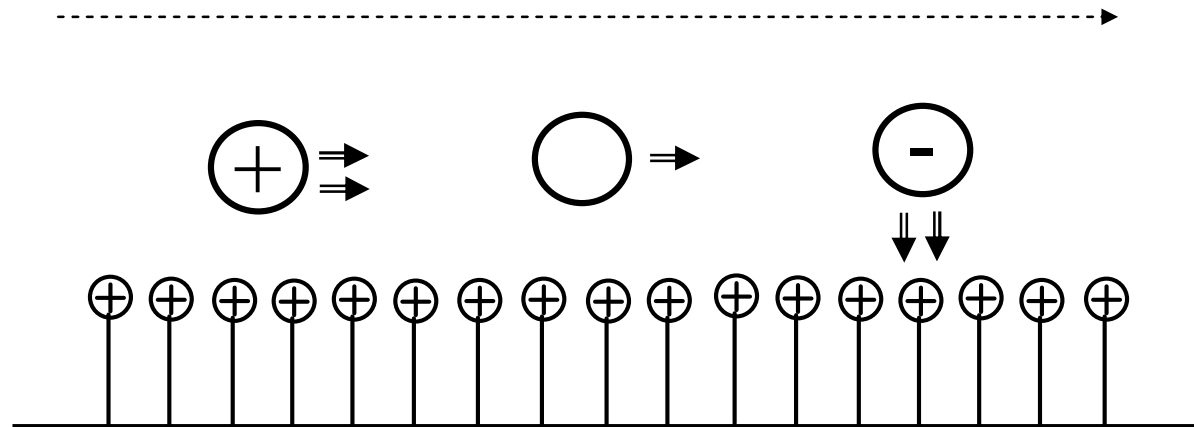
Použití – purifikace, zakoncentrování, výměna pufry

Chromatofokusace děj na koloně

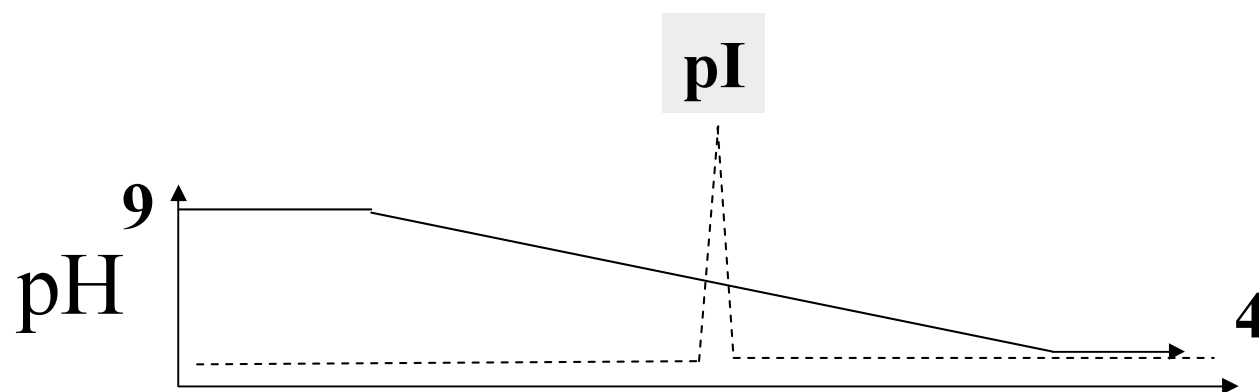


Chromatofokusace chování vzorku

$pH \triangleleft pI$ $pH = pI$ $pH \triangleright pI$



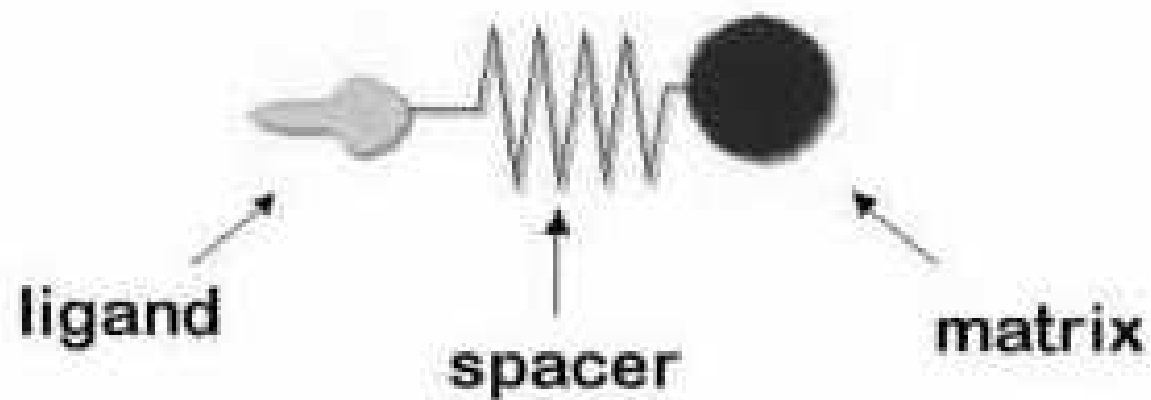
Chromatofokusace chování vzorku



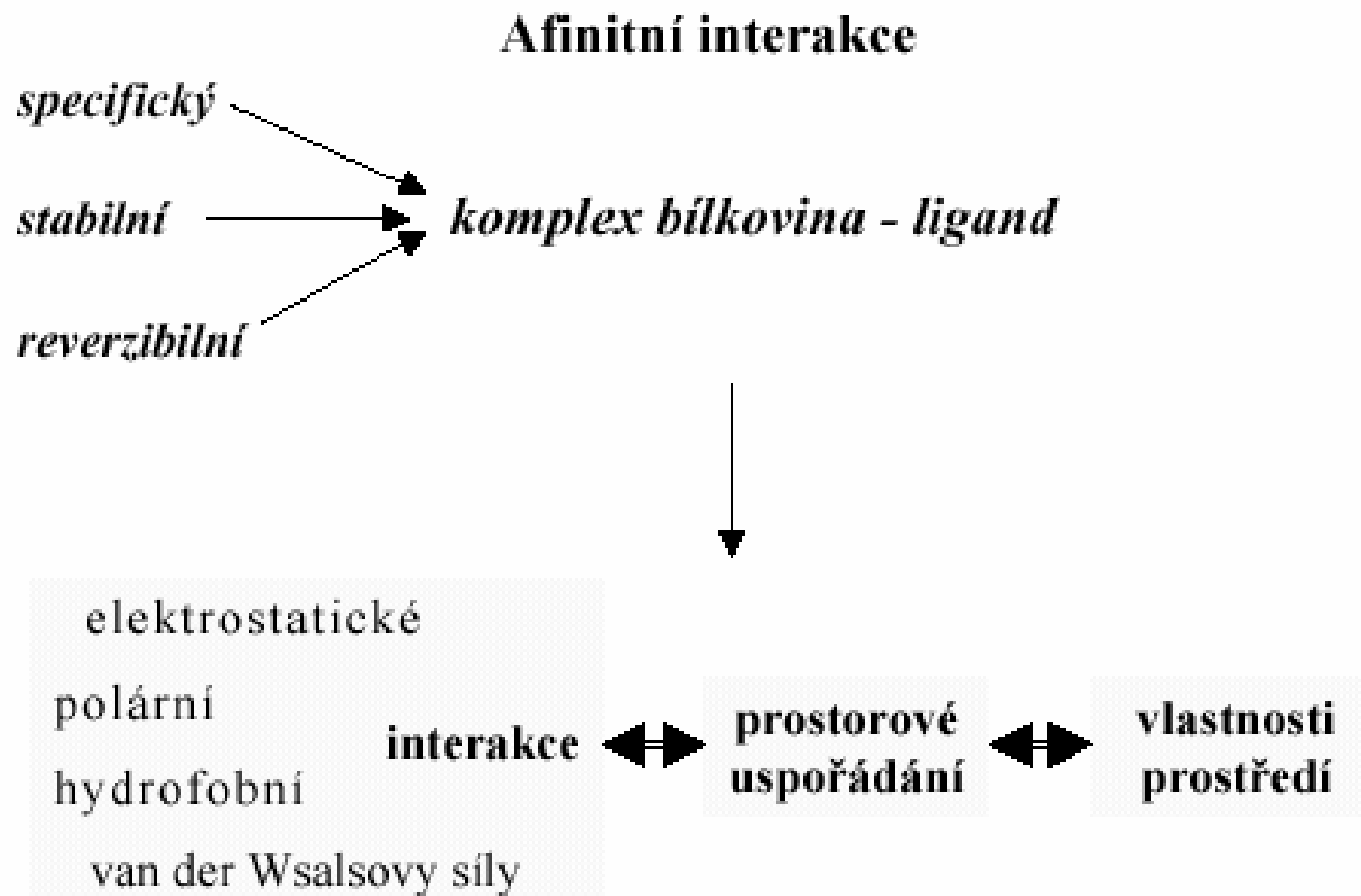
Použití : analytické – stanovení pI

preparativní – purifikace bílkovin

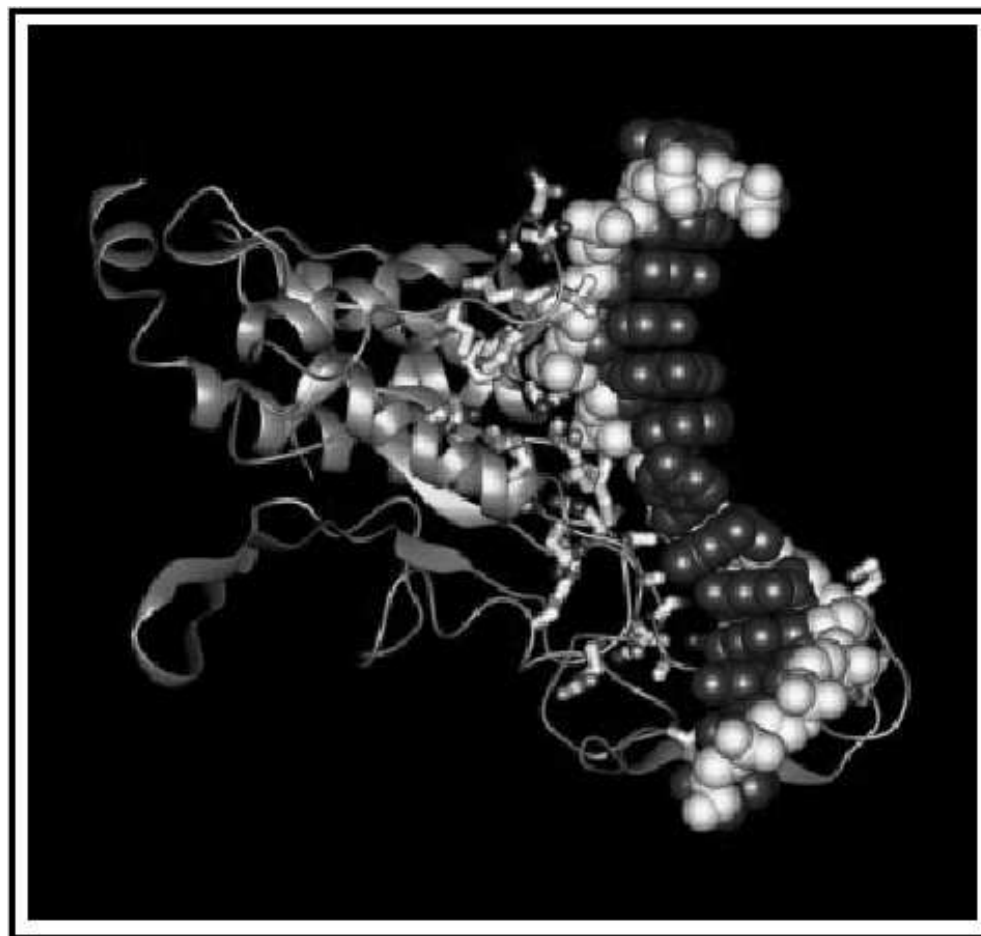
Afinní chromatografie



Afinní interakce



Interakce mezi DNA a endonukleasou

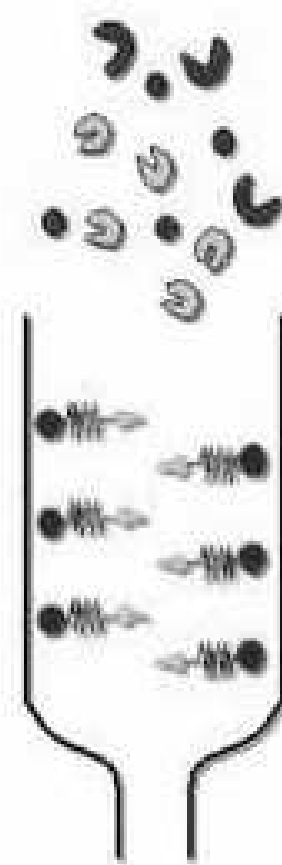


Afinitní páry

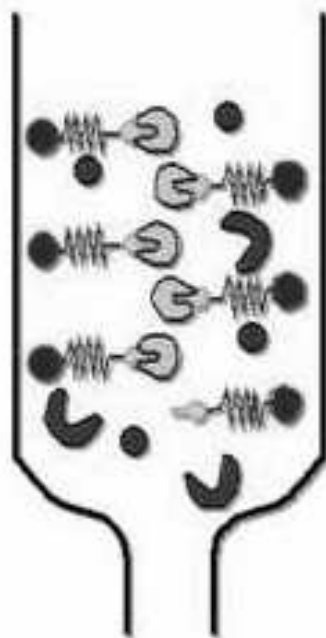
Ligand	Bílkovina	K_D (M)
antigen	polyklonální protilátka	$10^{-8} - 10^{-6}$
antigen	monoklonální protilátka	$10^{-12} - 10^{-8}$
biotin	avidin	10^{-15}
sacharid	lektin	$10^{-6} - 10^{-3}$
hormon, toxin	vazebný protein	$10^{-9} - 10^{-12}$
substrát	enzym	$10^{-7} - 10^{-3}$
inhibitor	enzym	$10^{-14} - 10^{-6}$

$$K_D = 10^{-8} - 10^{-6} \text{ M}$$

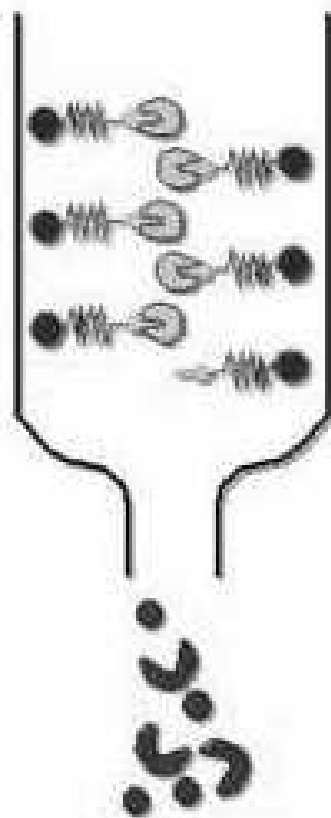
Afinní chromatografie nanesení vzorku



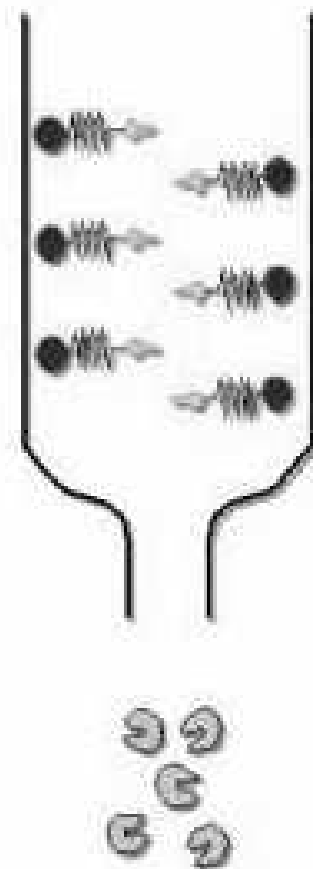
Afinní chromatografie vznik interakce



Afinní chromatografie vymytí balastů



Afinní chromatografie eluce



Předpoklady pro vznik komplexu

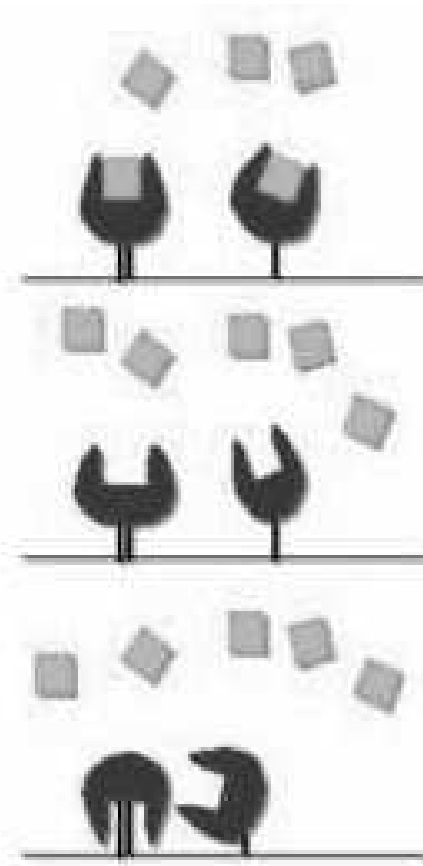
- Sterické – použití raménka (spacer)



- Optimální pH, iontová síla

Předpoklady pro vznik komplexu

- Vazebné
- Konformační

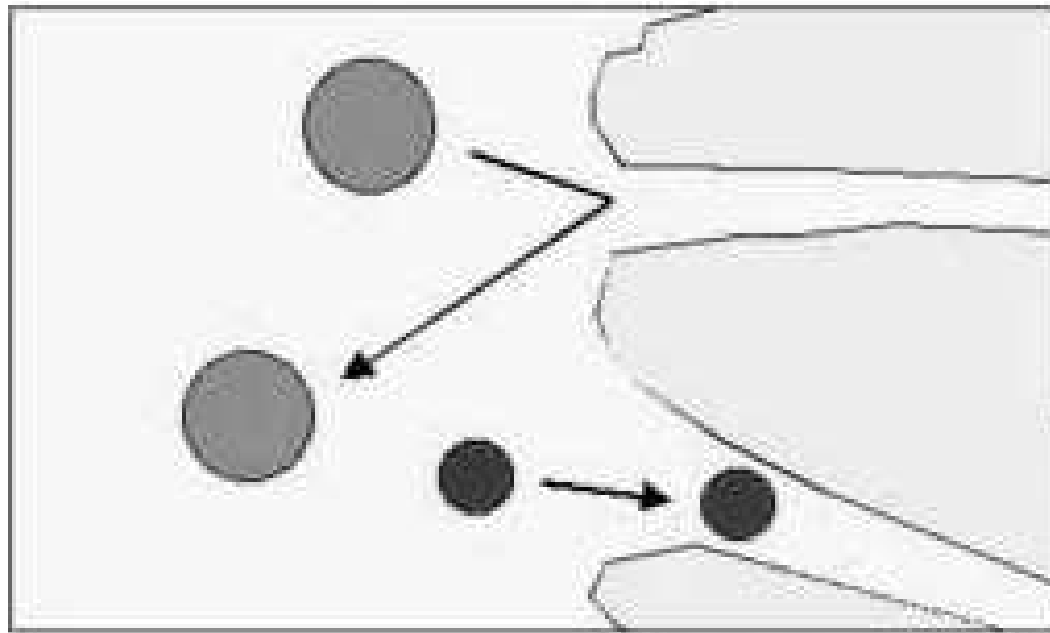


Provedení

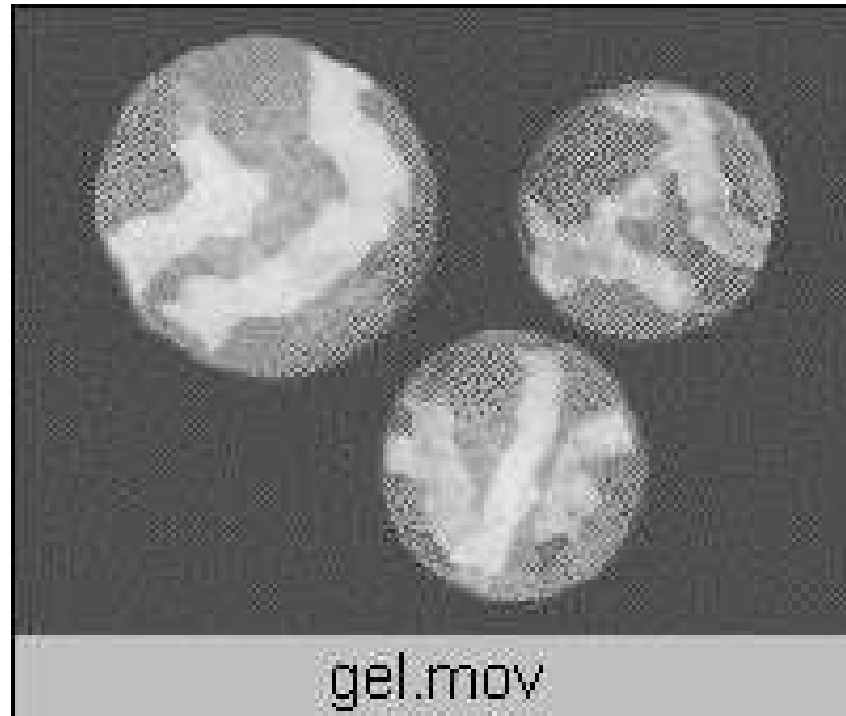
- Nanesení vzorku – nízká iontová síla
- Eluce – selektivní - volným ligandem
 - neselektivní - změna pH, iontové síly, polarity

Použití : analytické (stanovení K), purifikace

Gelová permeační chromatografie

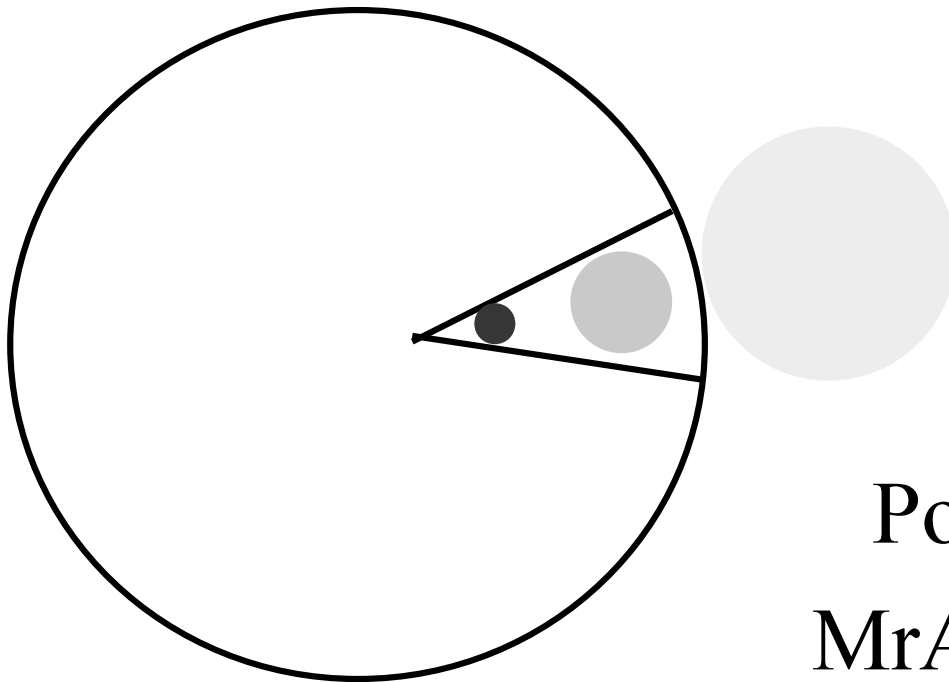


Gelová permeační chromatografie



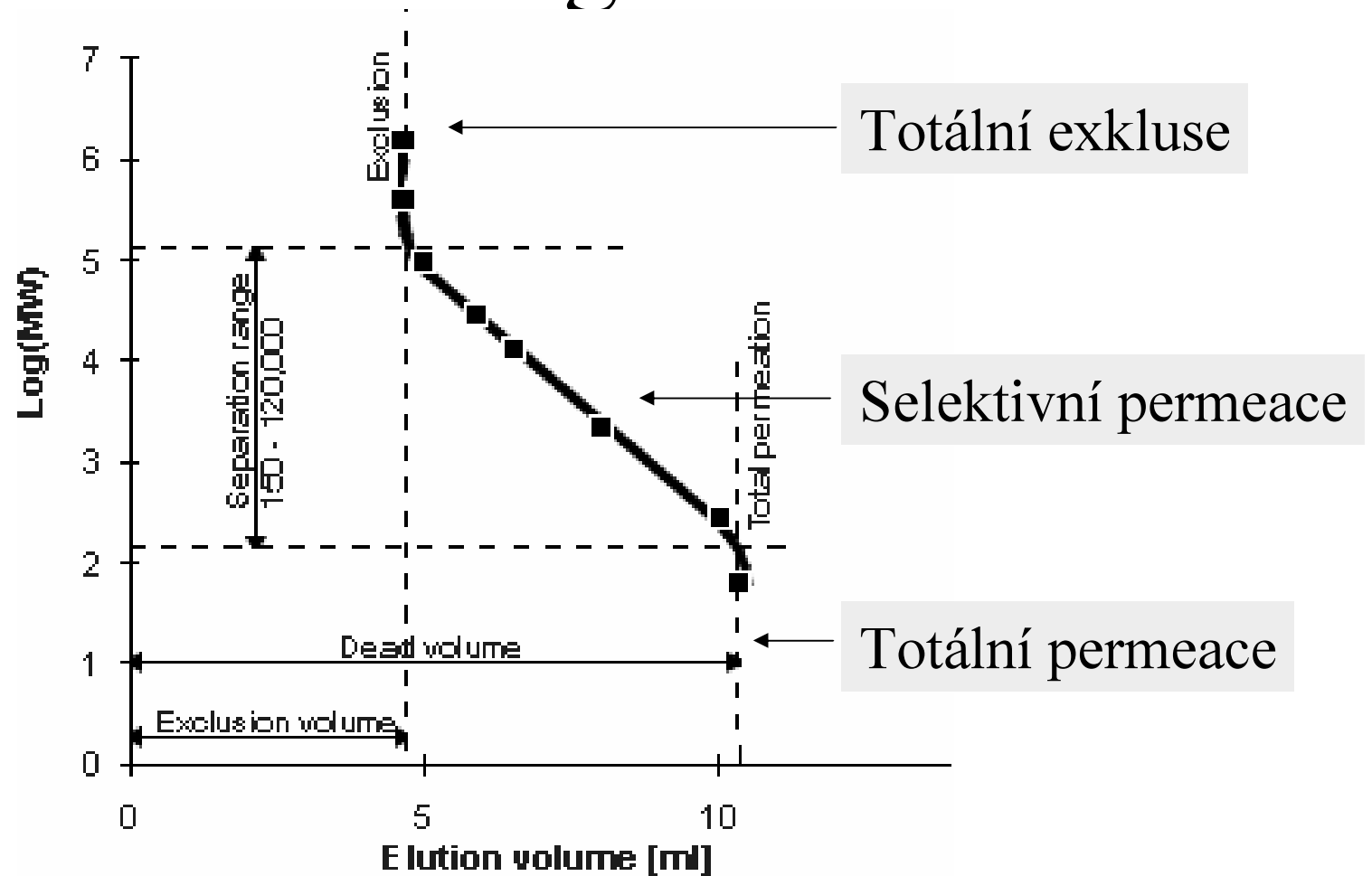
Gelová permeační chromatografie

Princip - stérická exkluze
- omezená difuze



Pořadí eluce :
 $MrA > MrB > MrC$

Gelová permeační chromatografie

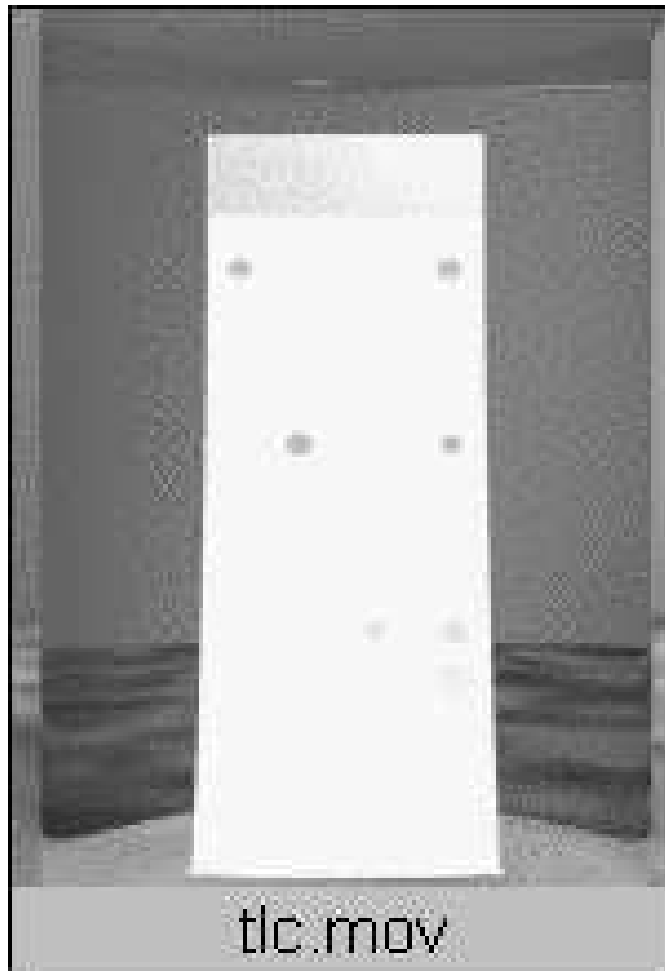


Gelová permeační chromatografie

- Nanášení vzorku – objem vzorku $< 2\%$ objemu kolony
- Eluce – izokratická

Použití : stanovení Mr, odsolování, purifikace

PC a TLC



PC a TLC

- 1944 – Martin, Snyge - PC aminokyselin
(Nobelova cena)
- 1952 – TLC nahrazuje PC

Instrumentace PC a TLC

Chromatografický papír

- Nemodifikovaný
- Modifikovaný – ionexy, acylace

f. Watman (Anglie)

Schleicher-Schüll (Německo)

TLC

- Vlastní příprava - sypané, nalévané
- Komerčně dostupné - Siluful (Cz)
Watman

PC a TLC - mody

- rozdělovací
- adsorpční
- ionexová
- hydrofobní – RP a HIC
- gelová permeační

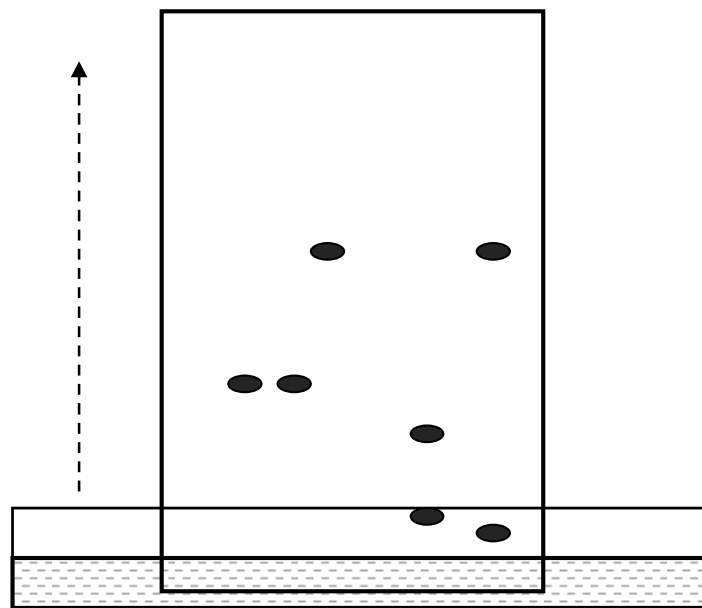
Nanášení vzorku

- Pipety
- Kapiláry

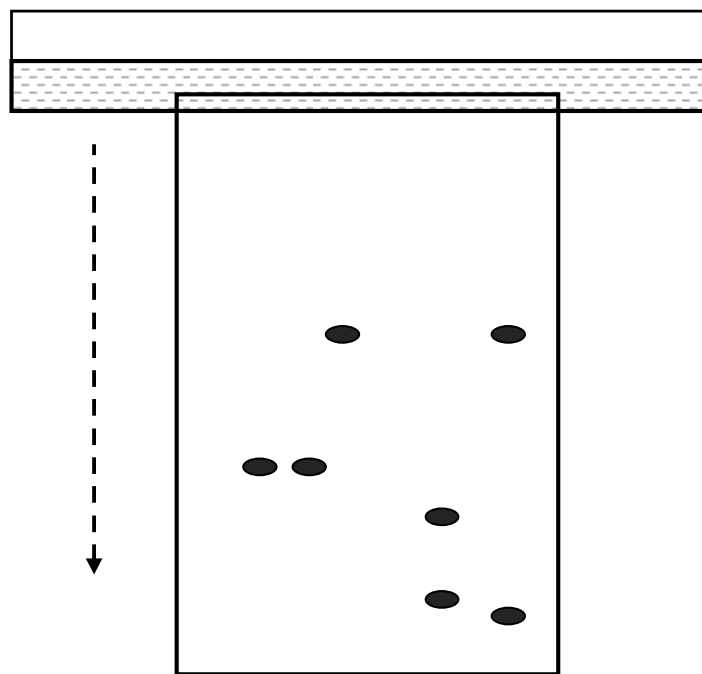
Provedení

- Vzestupné
- Sestupné
- Kruhové
- Dvojrozměrné

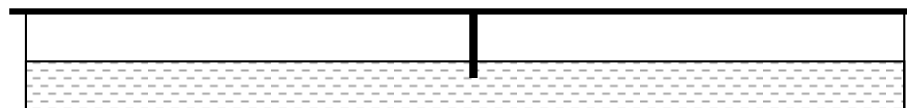
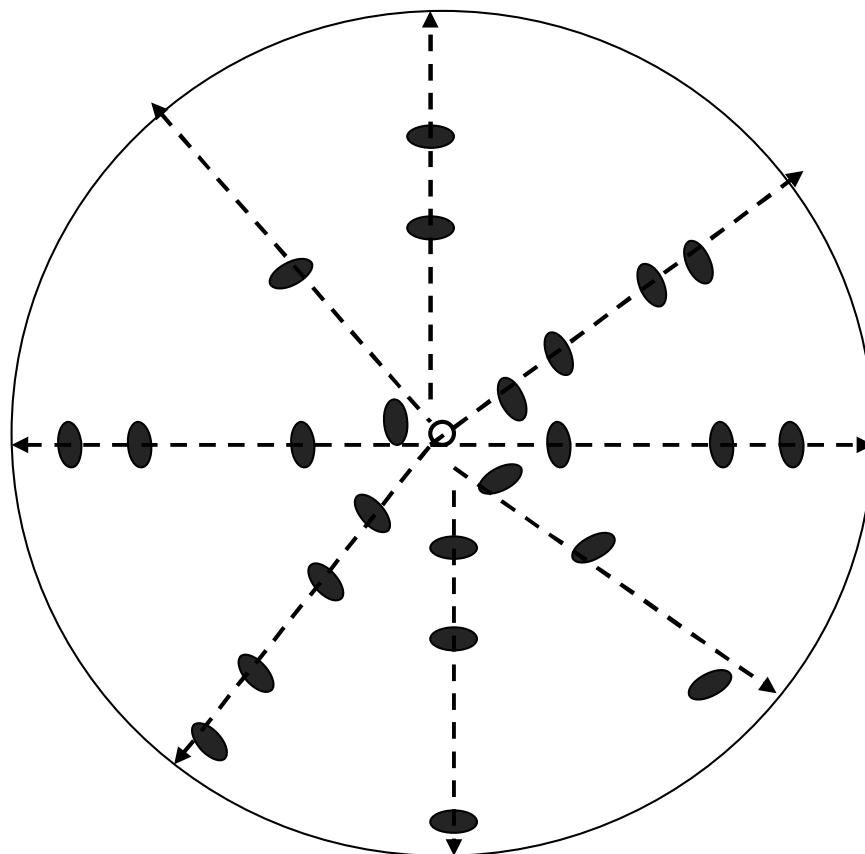
Vzestupné



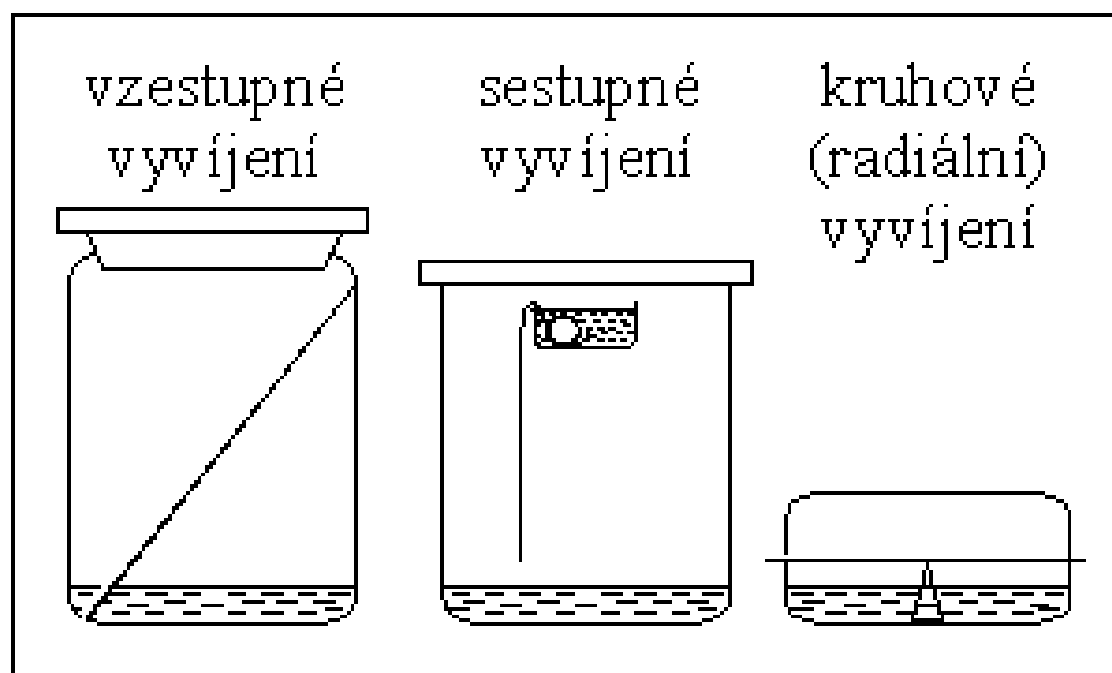
Sestupné



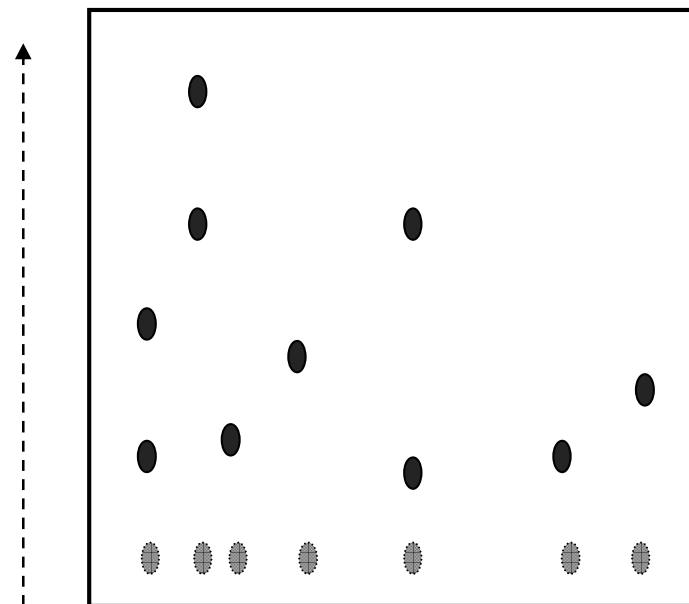
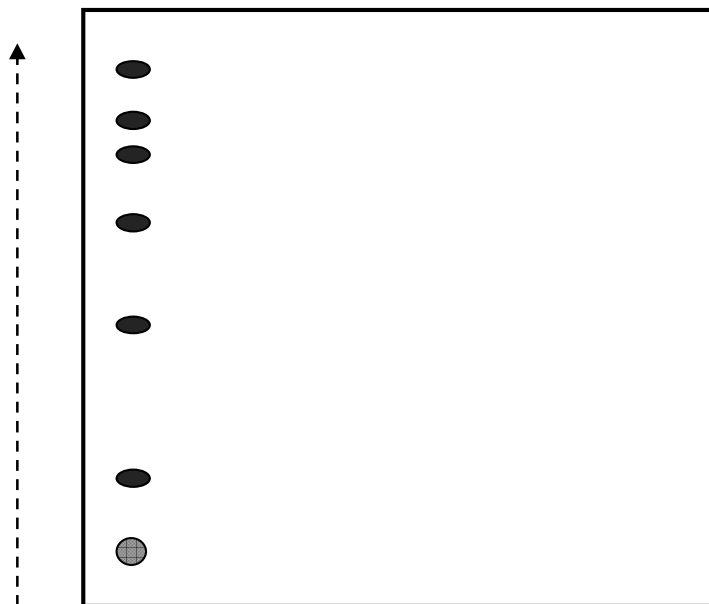
Kruhové



Vyvíjení



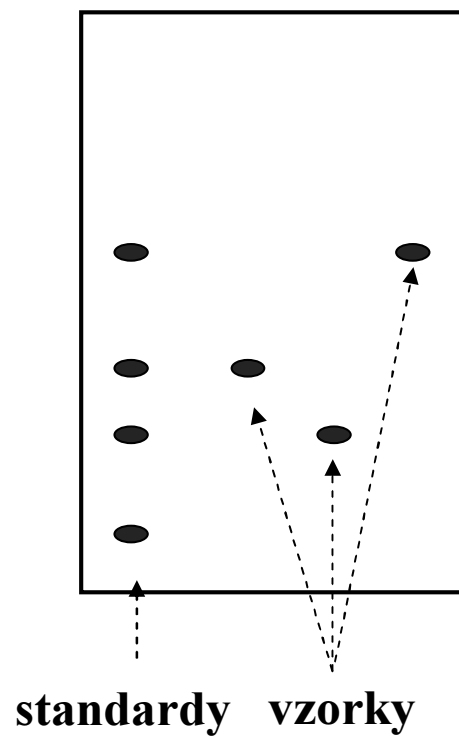
Dvojrozměrné



Provedení

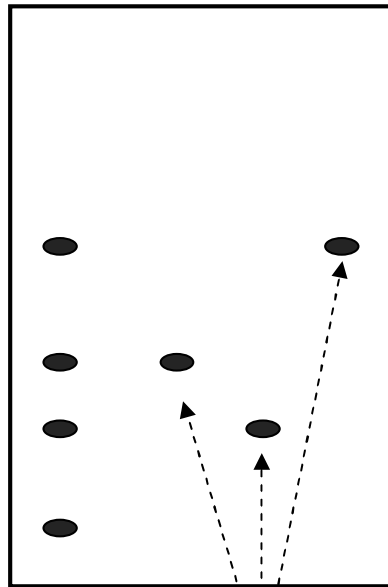
- Analytické
- Preparativní

Analýza kvalitativní



$$R_f = \frac{\textit{střed skvrny}}{\textit{čelo rozpouštědla}}$$

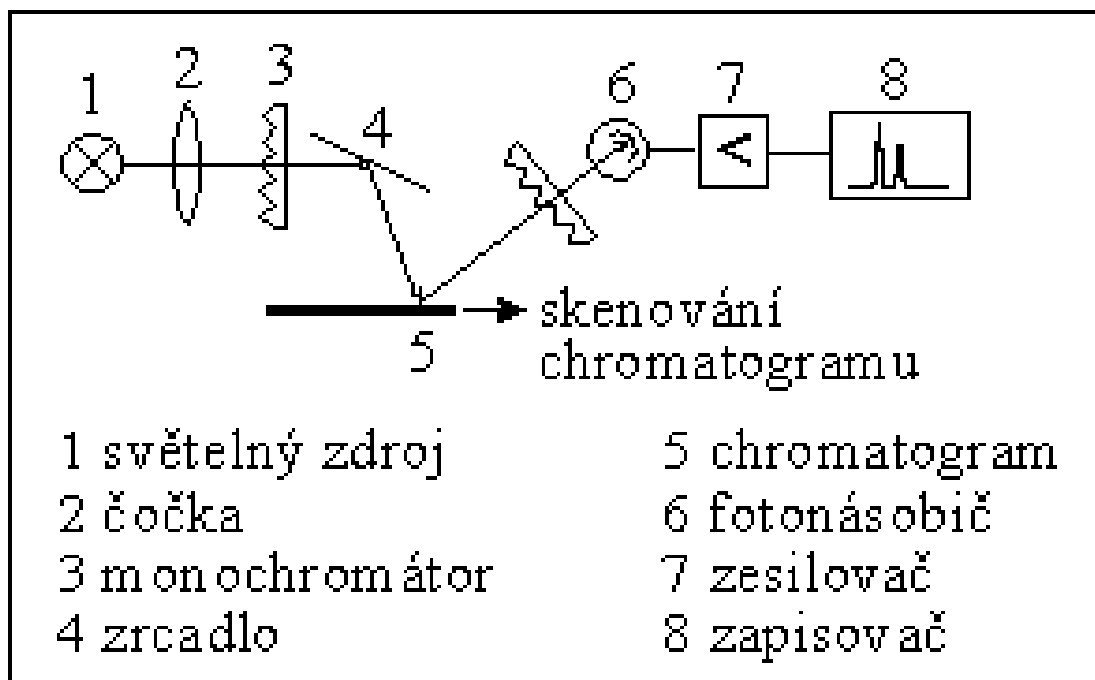
Analýza kvantitativní



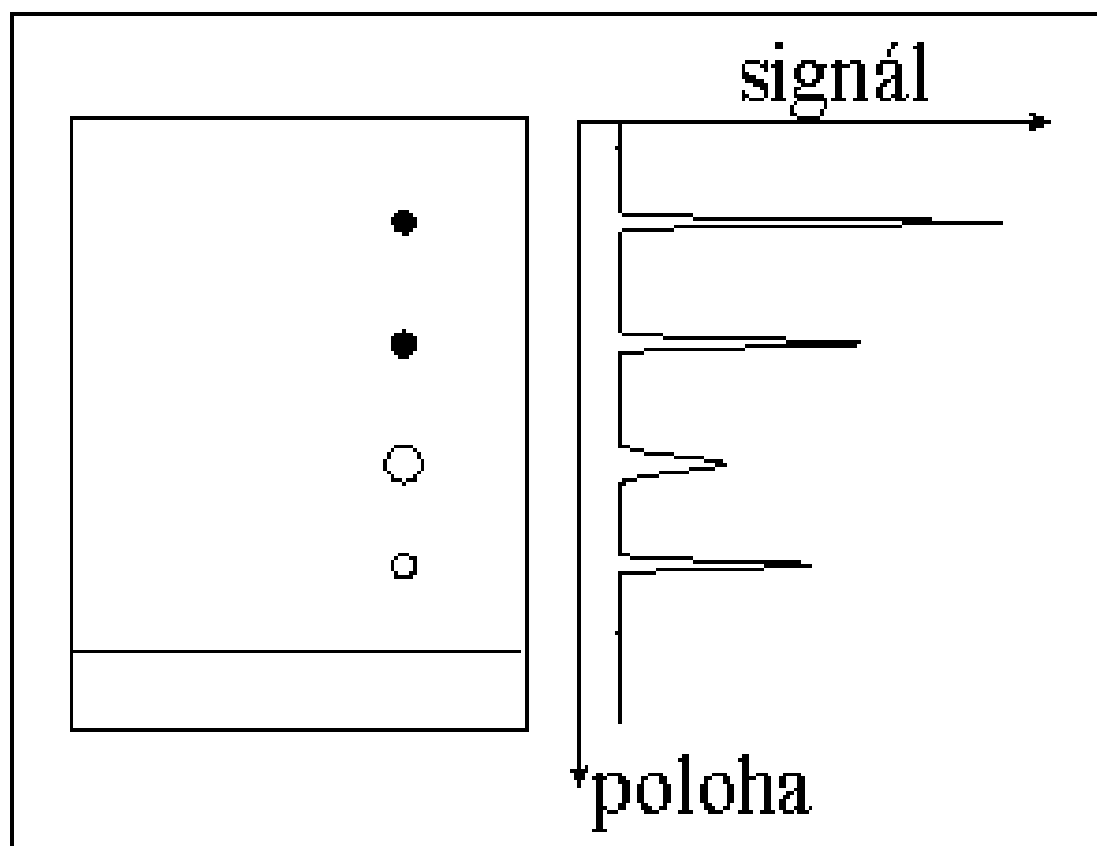
**Plocha
skvrn**

- Planimetrie
- Denzitometrie

Denzitometrie



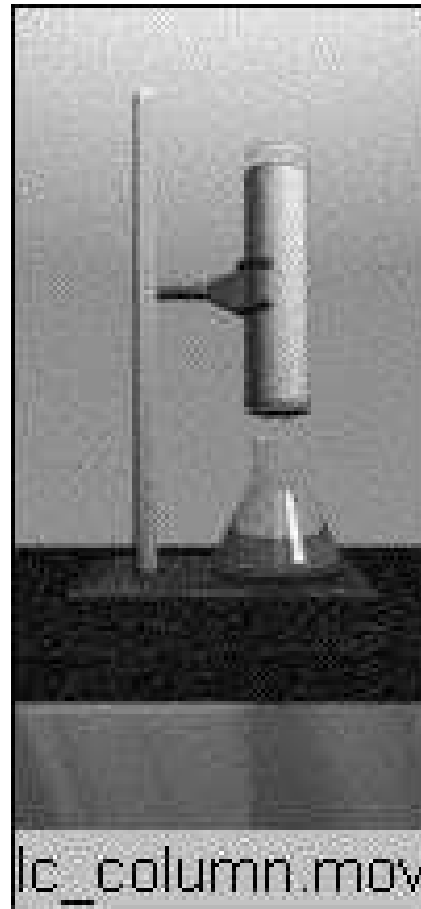
Denzitometrie



Preparace

- PC – vystřížení a eluce skvrny
- TLC – vyškrábání a eluce skvrny
– odsání a eluce skvrny

Chromatografie



Chromatografie

- Cvet – separace chlorofylů na Al_2O_3 1906

Kapalinová chromatografie rozdělení

- Nízkotlaká (atmosferický tlak) – LPC
- Střednětlaká (4 Mpa) – FPLC
- Vysokotlaká (40 Mpa) – HPLC

Kapalinová chromatografie využití

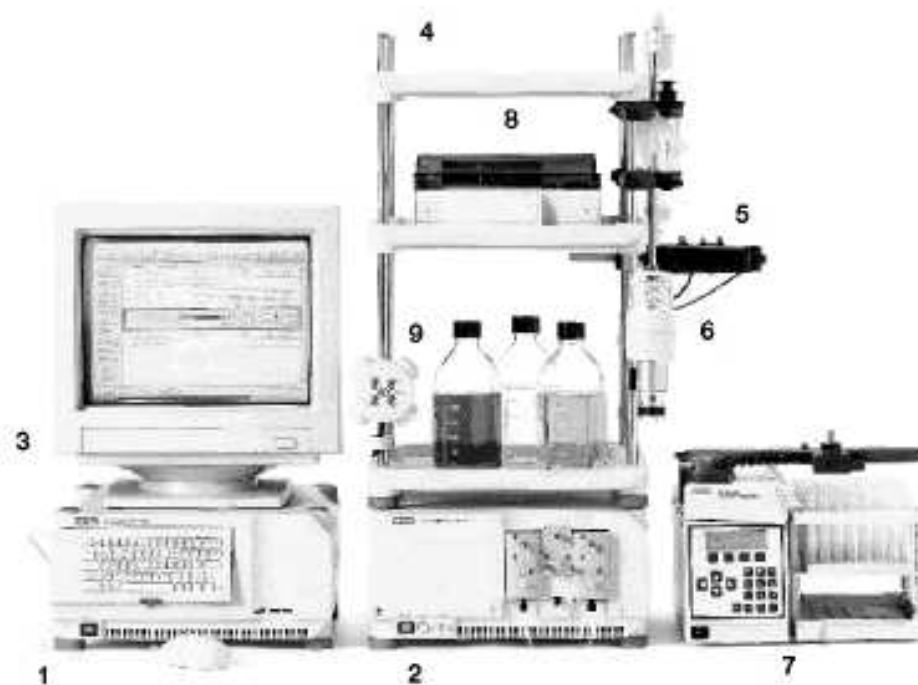
- LPC – semipreparativní
- FPLC – semipreparativní a analytická
- HPLC – analytická

Kapalinová chromatografie

doba trvání

- LPC – hodiny
- FPLC – desítky minut
- HPLC – minuty

Zařízení pro LPC

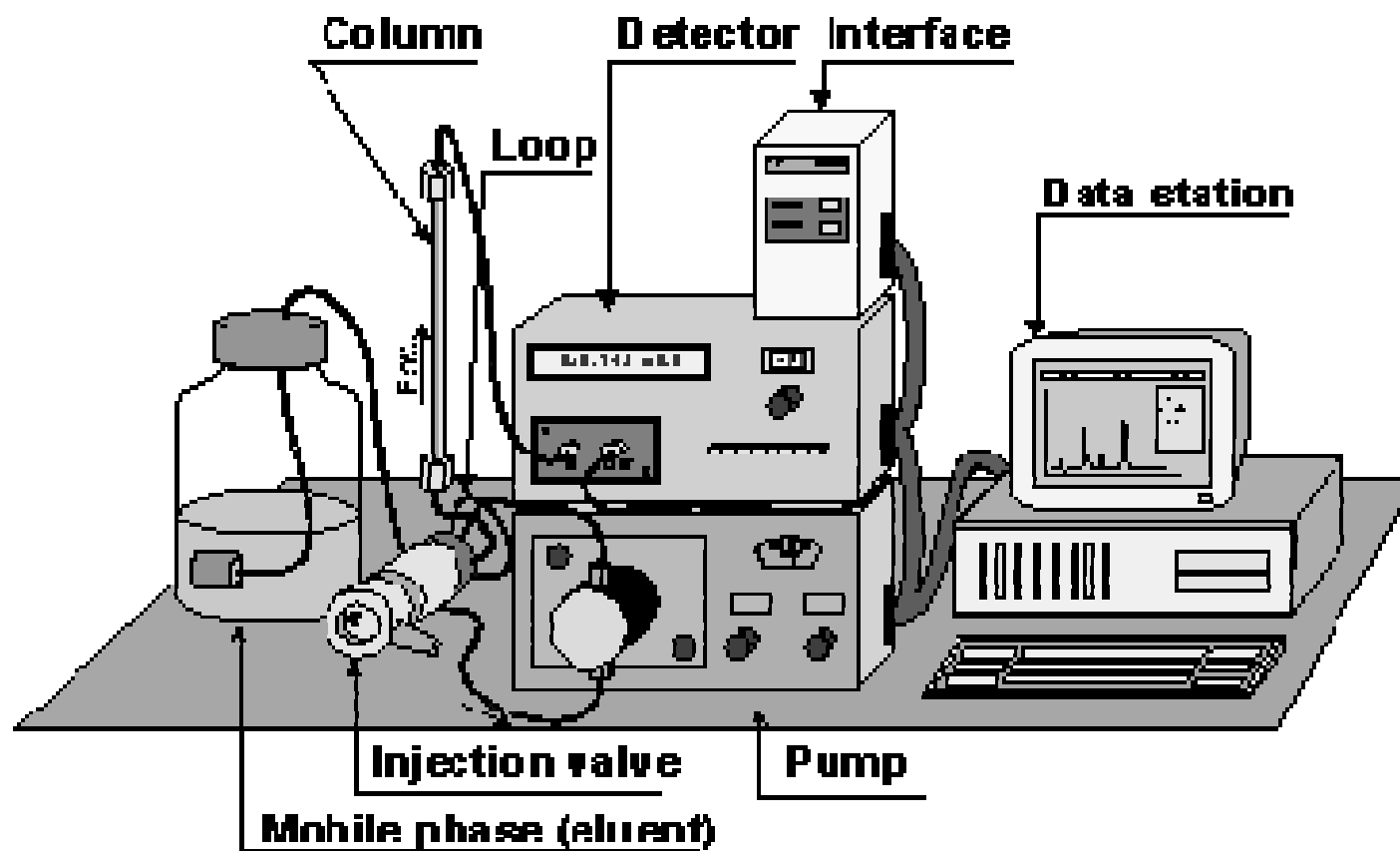


Instrumentace pro LPC

- Pumpa – peristaltická nebo gravitace
- Gradient – mísič gradientu
- Dávkování – přímo pumpou na kolonu
- Kolony – skleněné
- Detekce – spektrofotometrická 254, 280 nm
- Vyhodnocování – zapisovač
- Sběrač frakcí – programovatelný

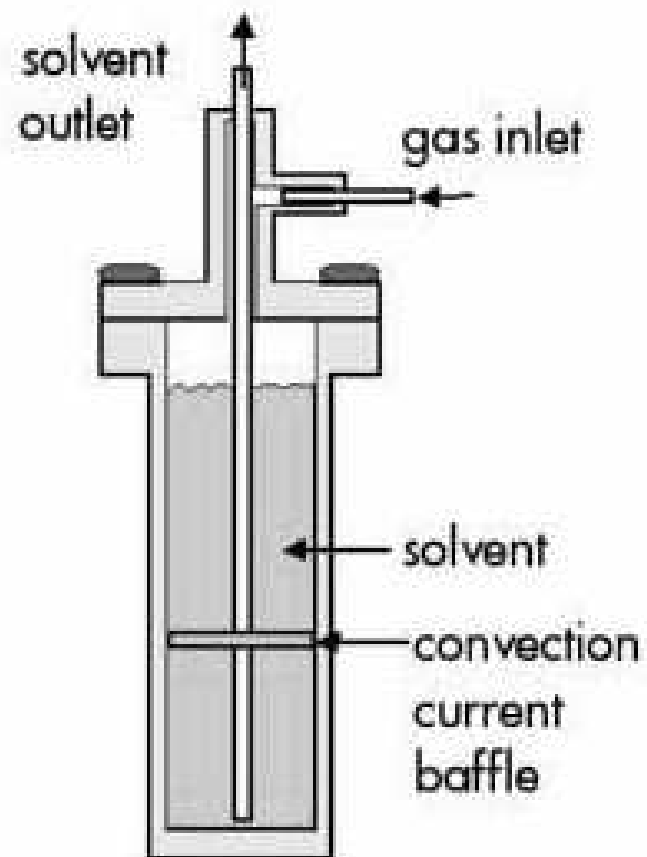
Instrumentace pro FPLC a HPLC

Zařzení pro HPLC

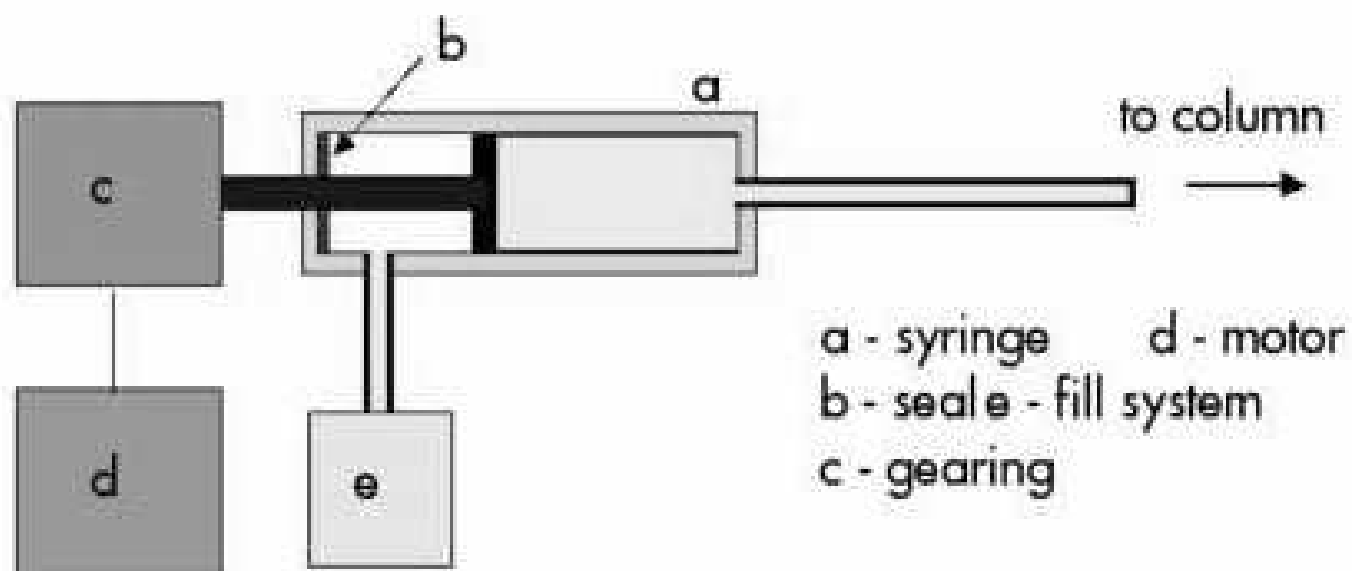


Pumpy

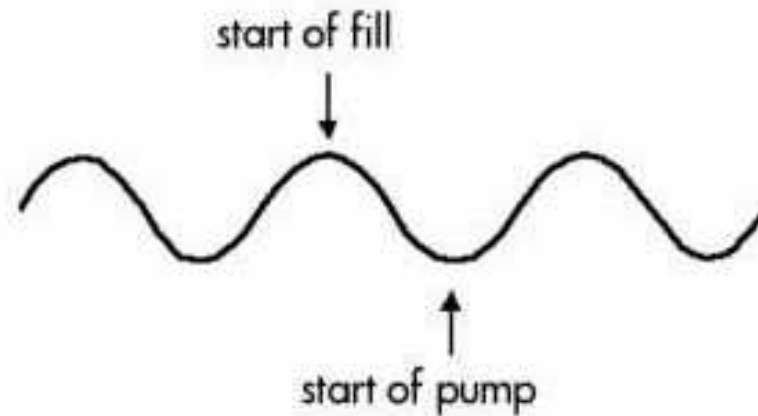
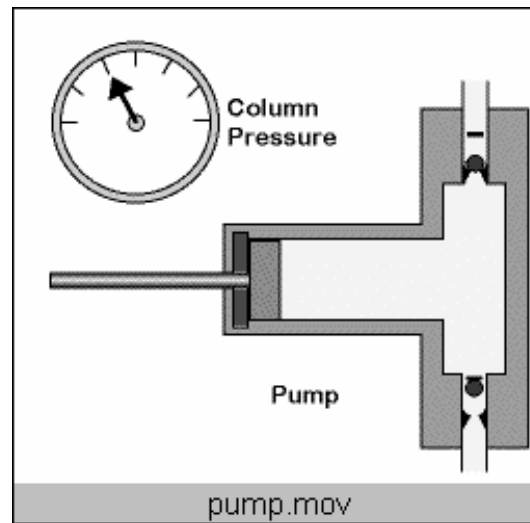
Tlaková pumpa



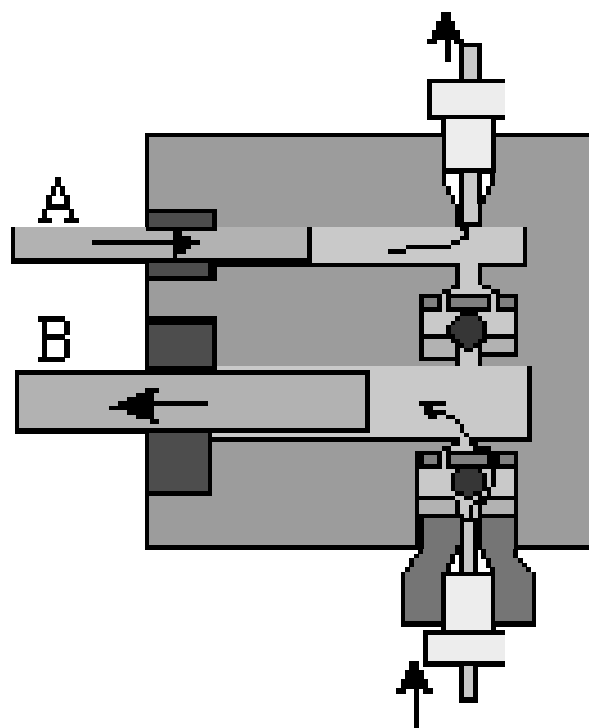
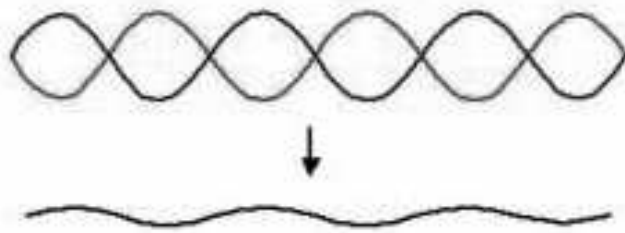
Lineární dávkovače



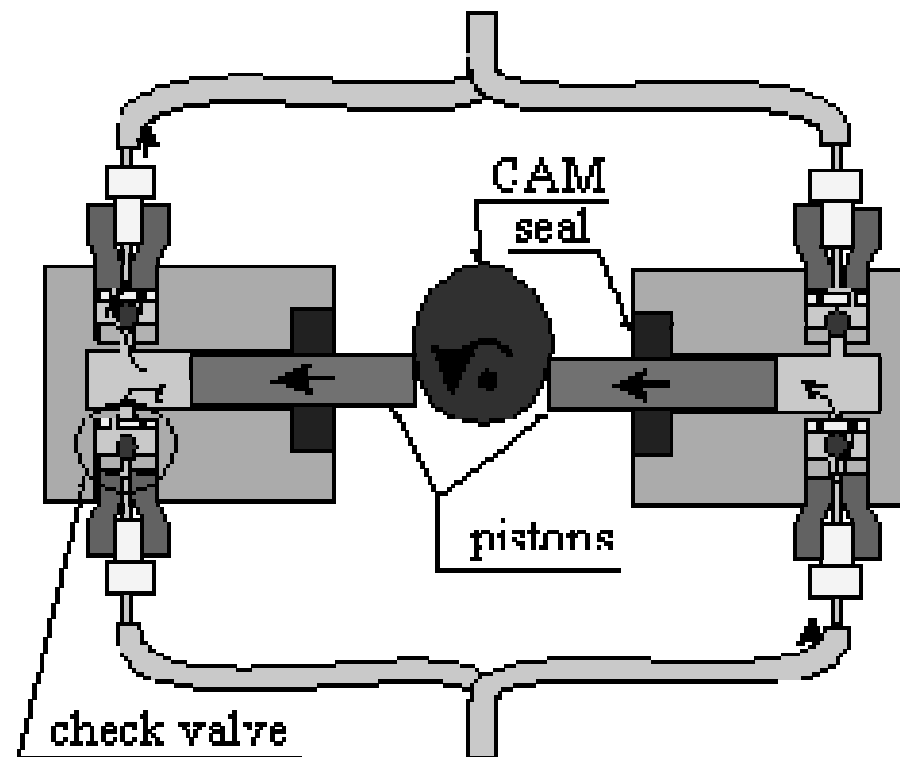
Pumpa jednopístová



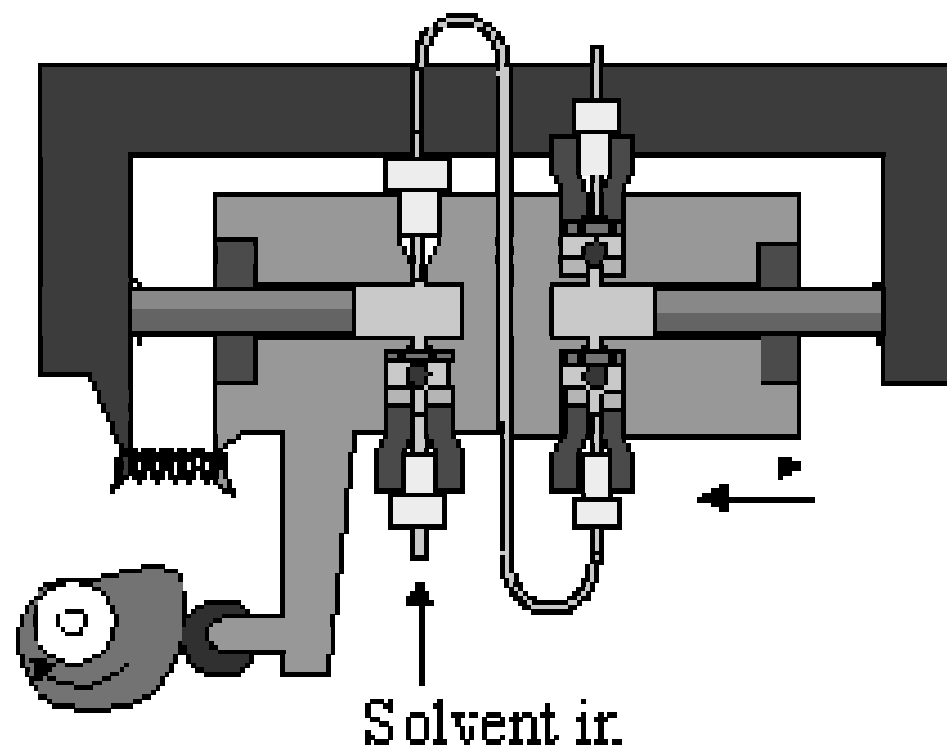
Pumpa dvoupístová



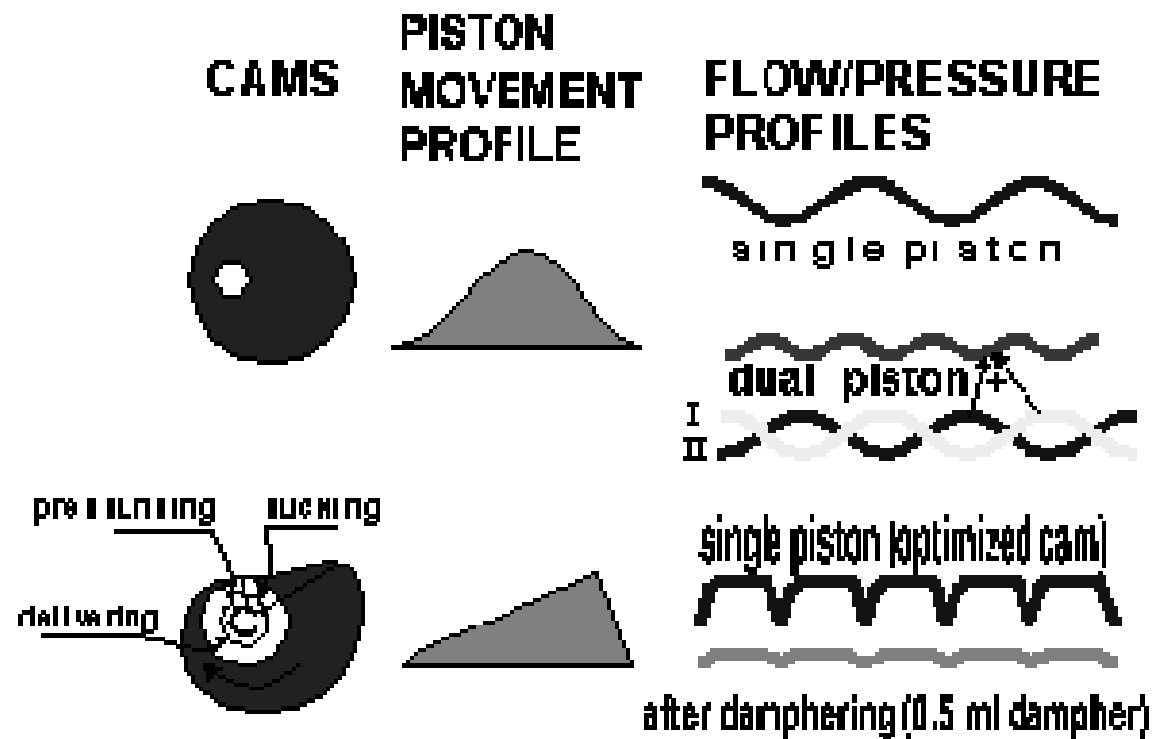
Pumpa dvoupístová



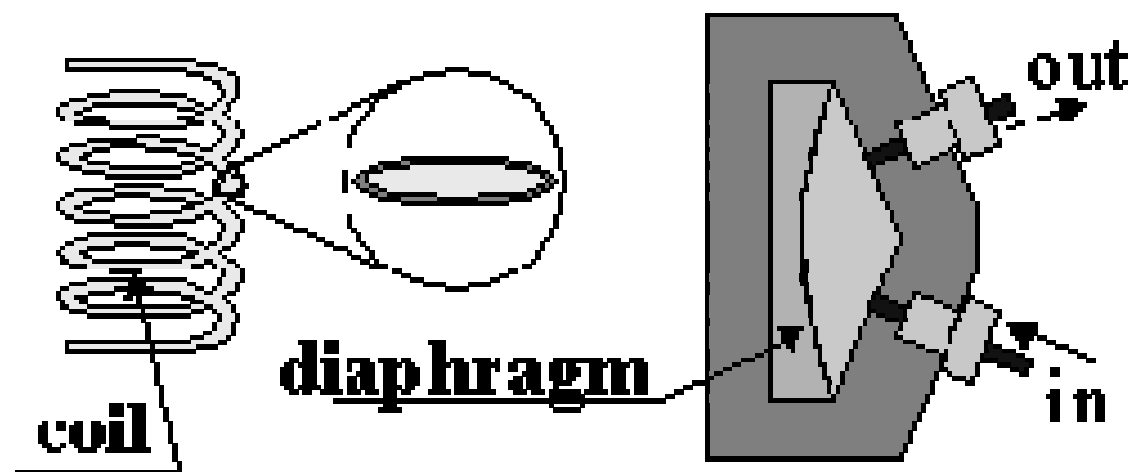
Pumpa dvoupístová



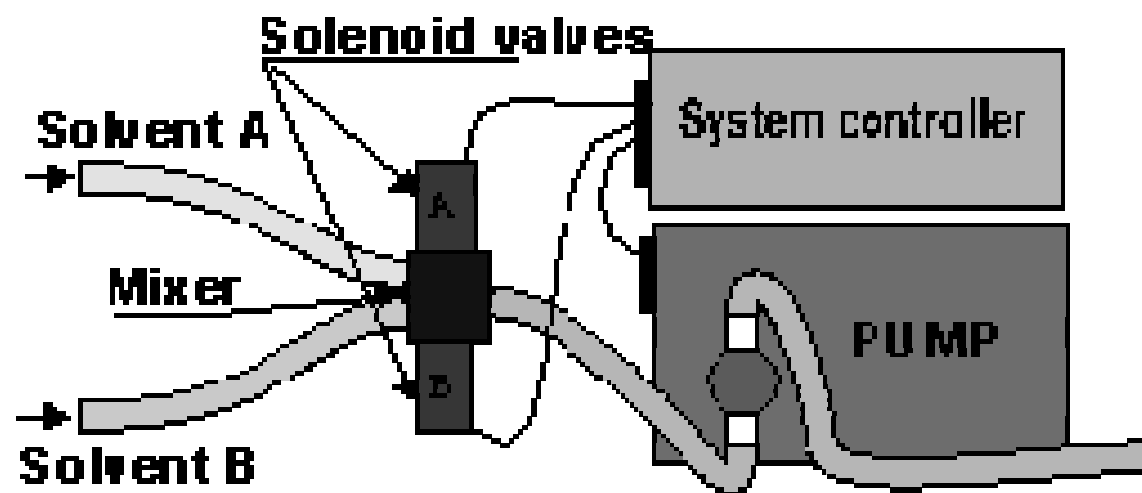
Tlumení pulsů



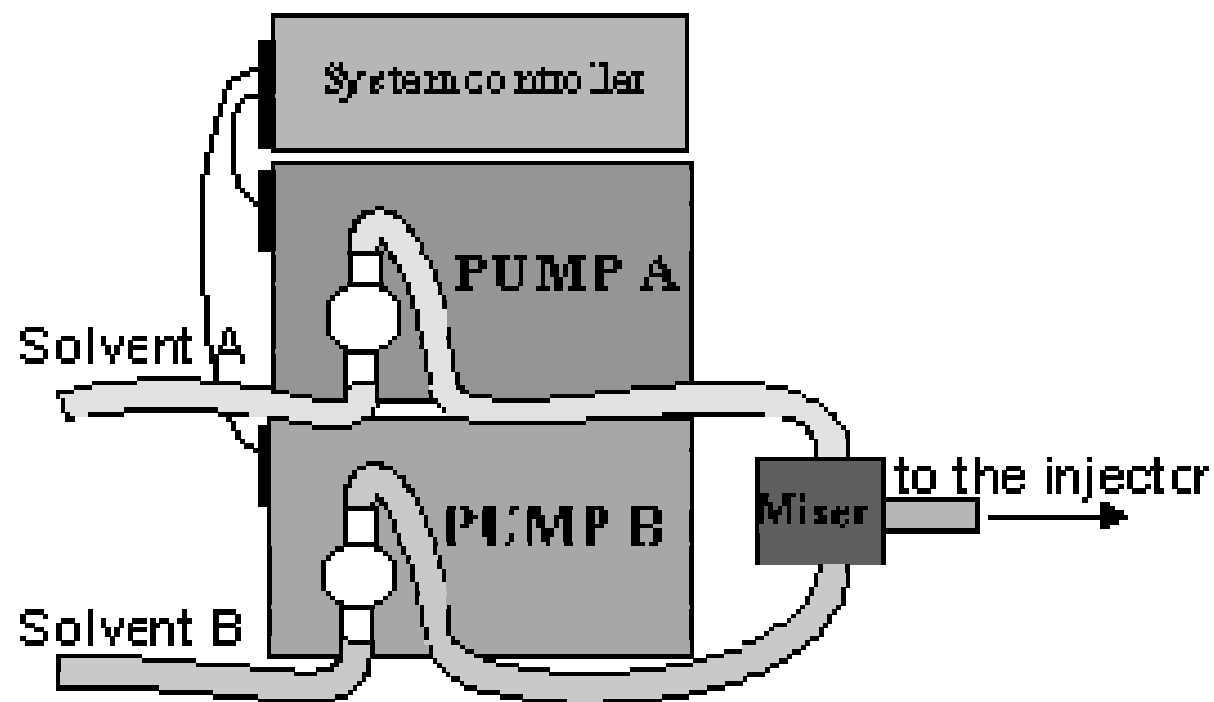
Tlumení pulsů



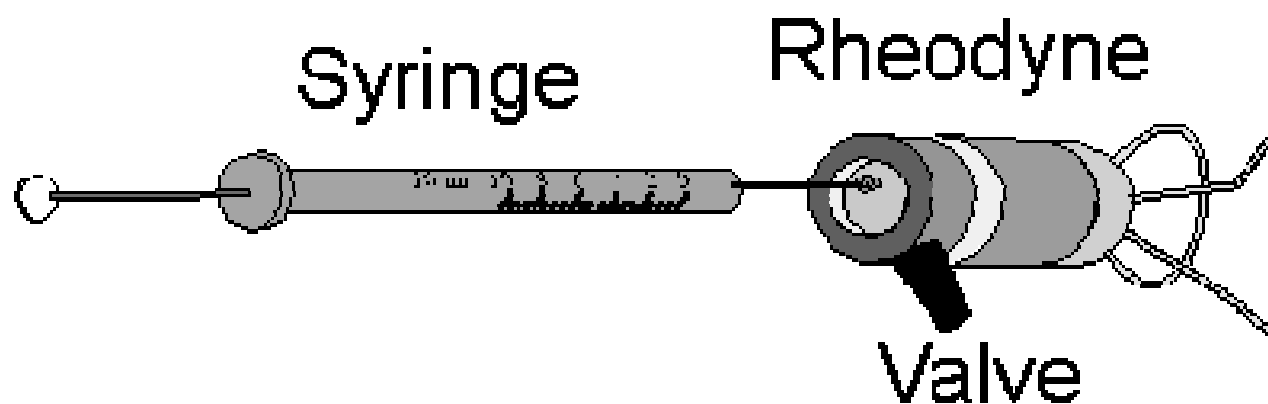
Gradient nízkotlaký



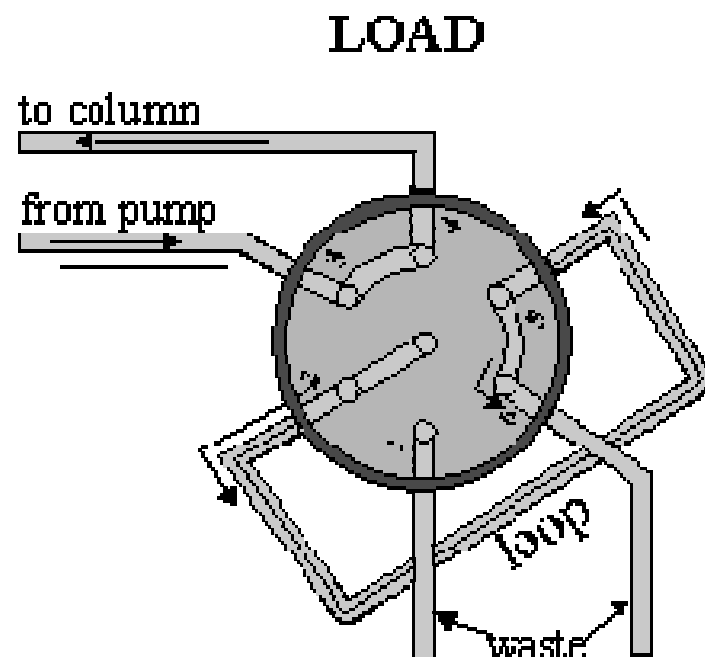
Gradient vysokotlaký



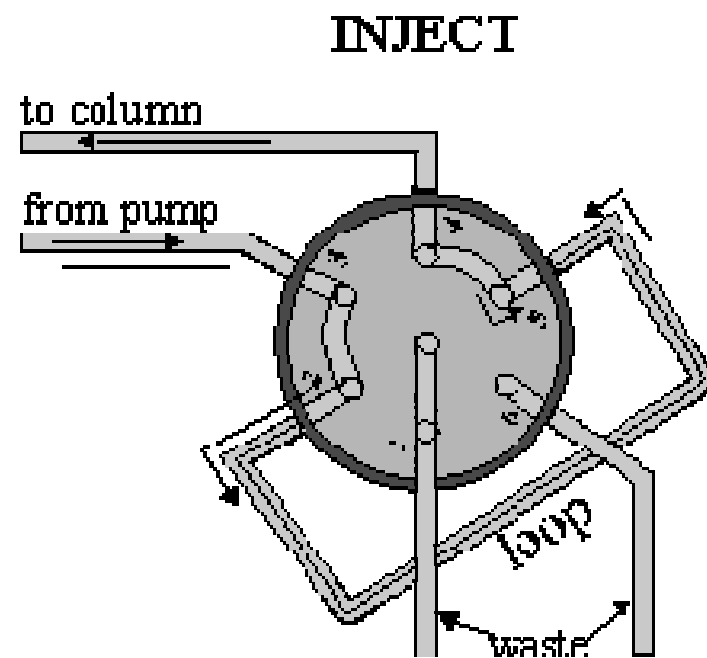
Dávkování – dávkovací ventil



Dávkovací ventil – „Load“



Dávkovací ventil – „Inject“

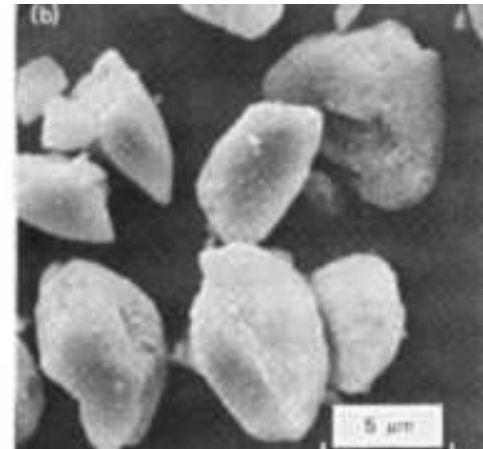
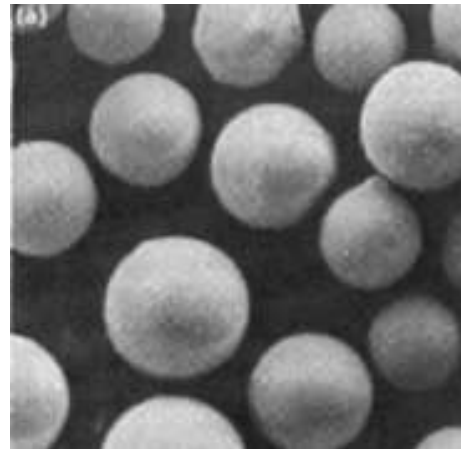
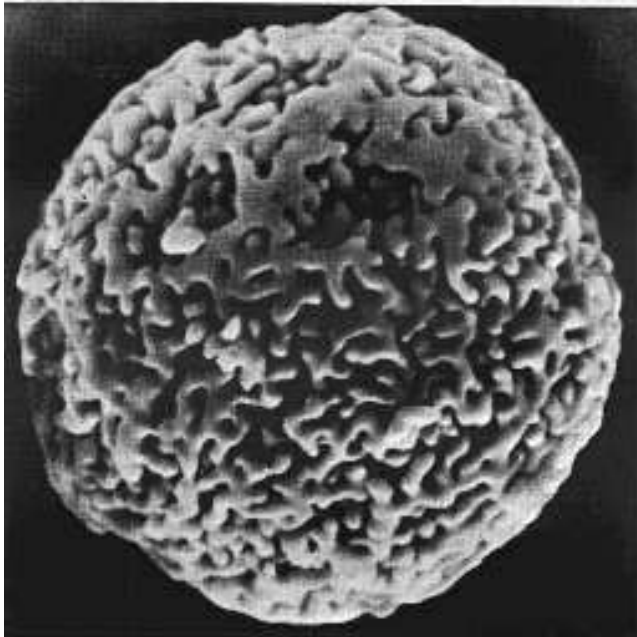


Kolona

Standart column hardware

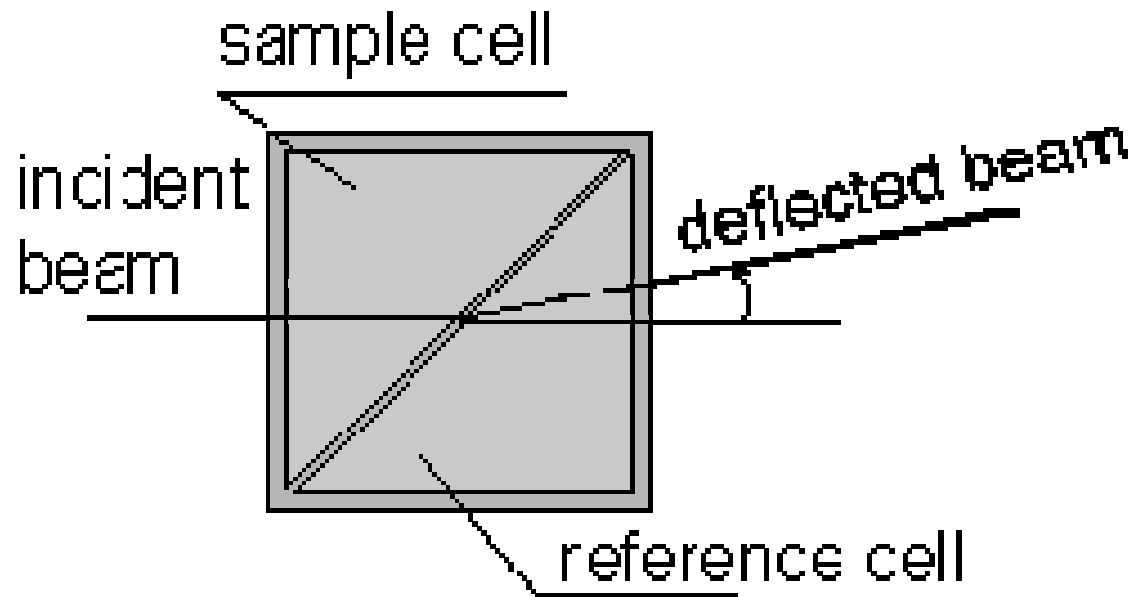


Částice sorbentu



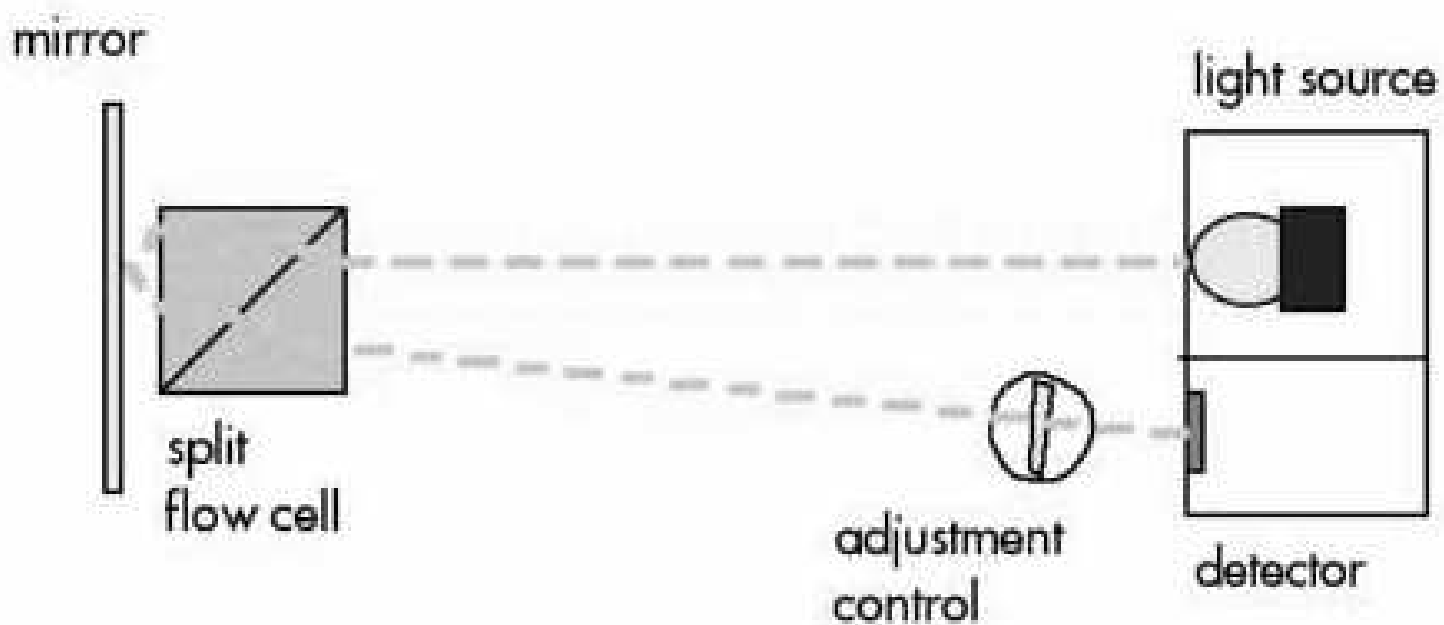
Detektory

Refraktometrický detektor



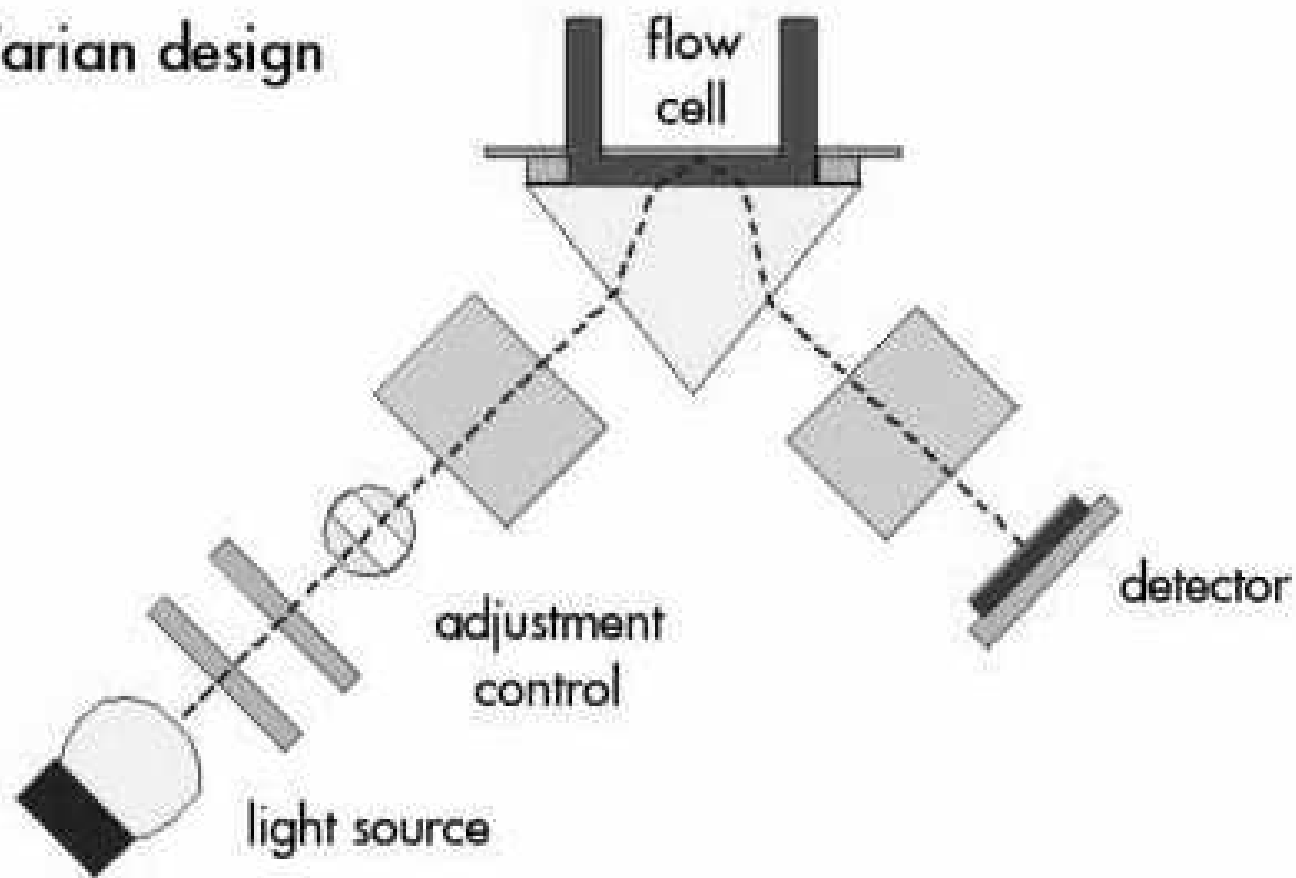
Refraktometrický detektor

Waters design



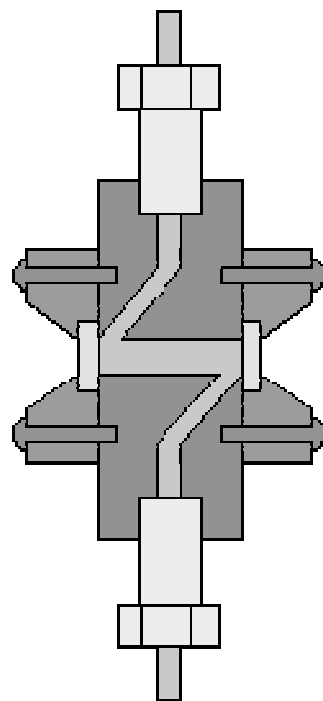
Refraktometrický detektor

Varian design

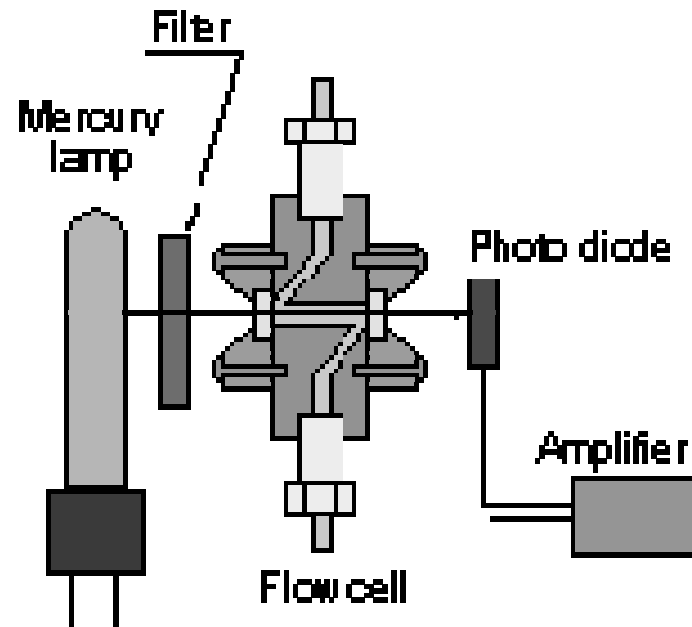


UV – VIS detektor

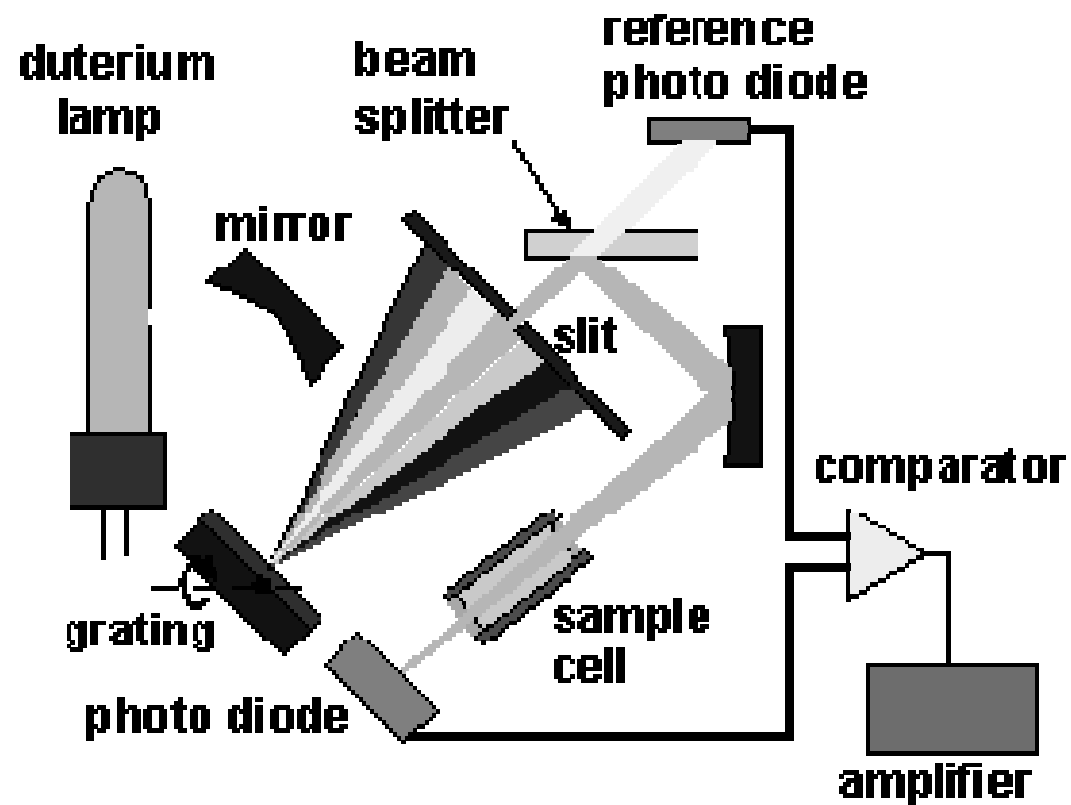
detekční cela



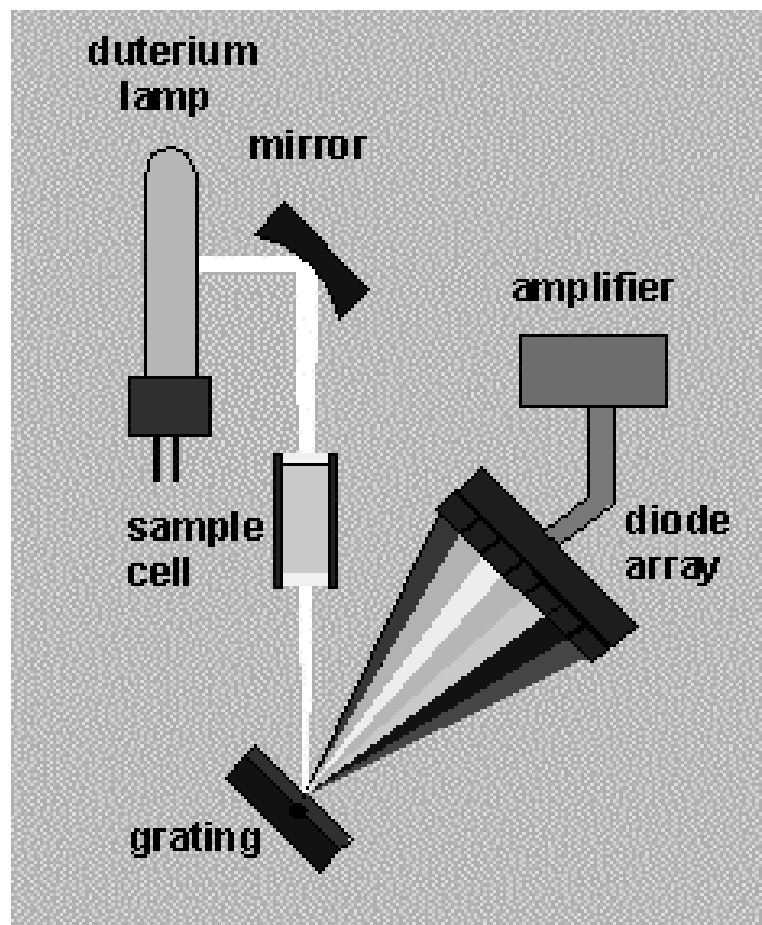
UV – VIS detektor s fixní vlnovou délkou



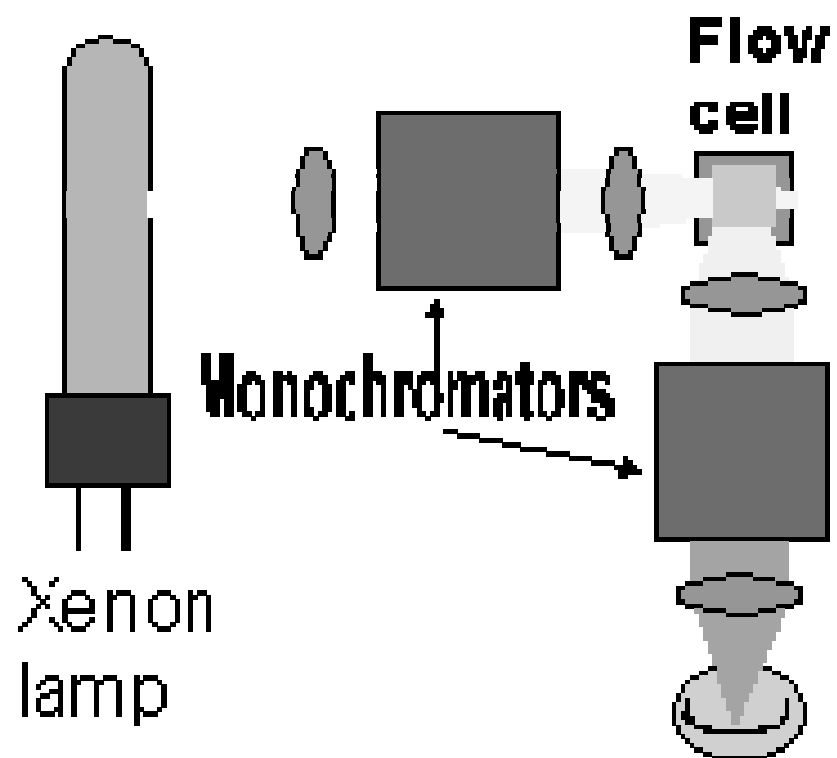
UV – VIS detektor s proměnlivou vlnovou délkou



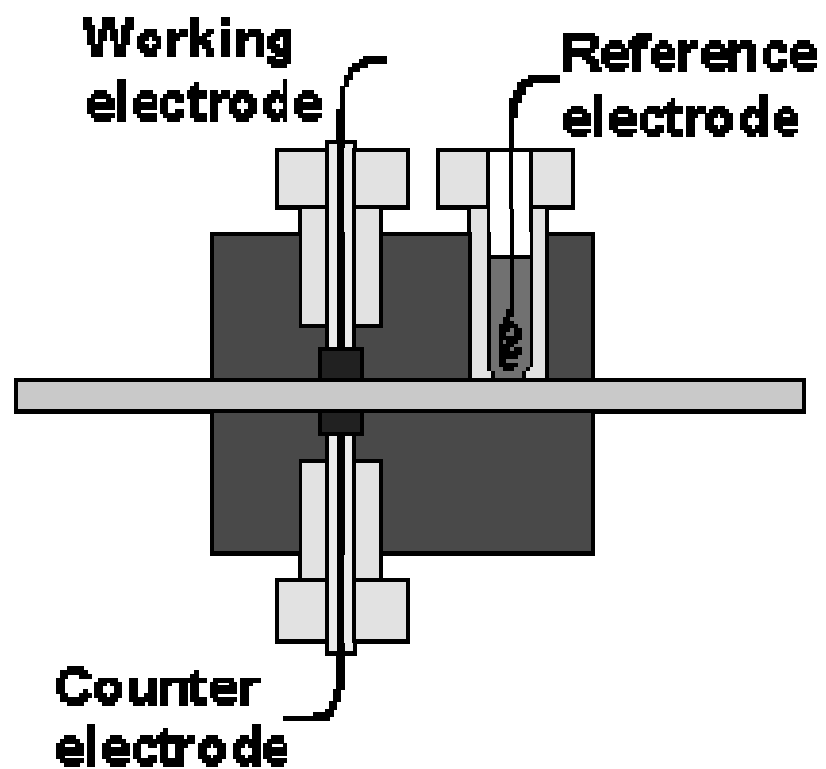
UV – VIS detektor s diodovým polem



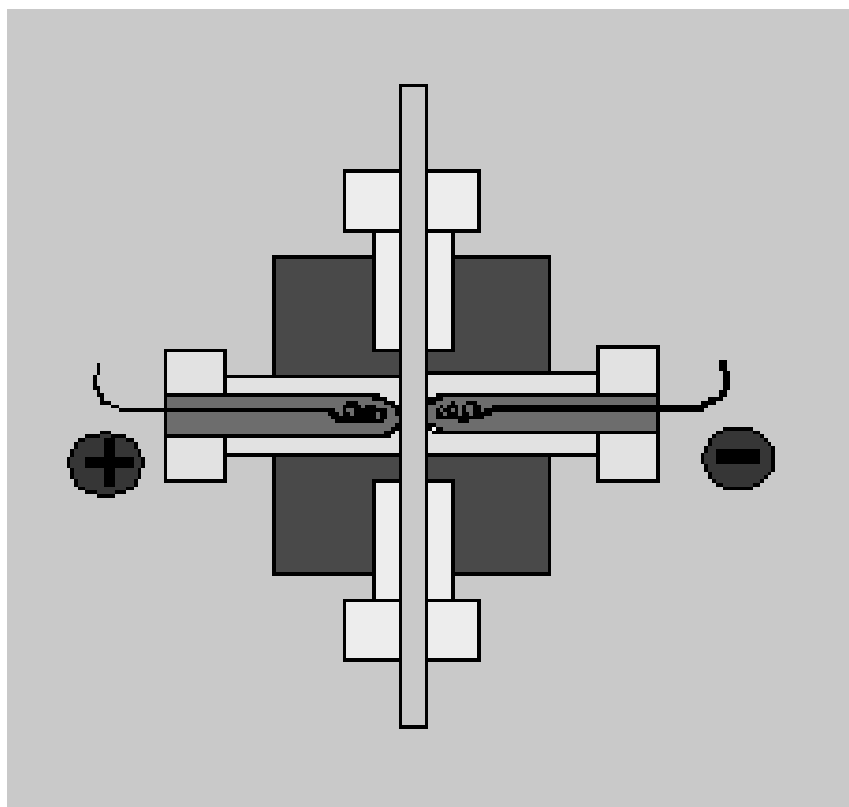
Fluorescenční detektor



Elektrochemický detektor

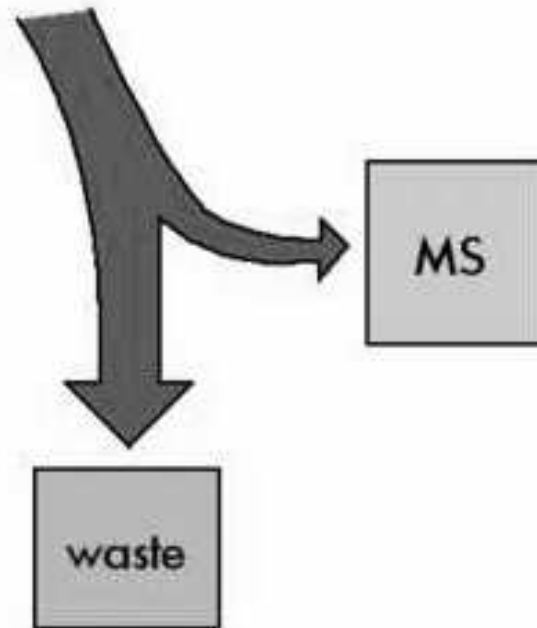


Konduktometrický detektor

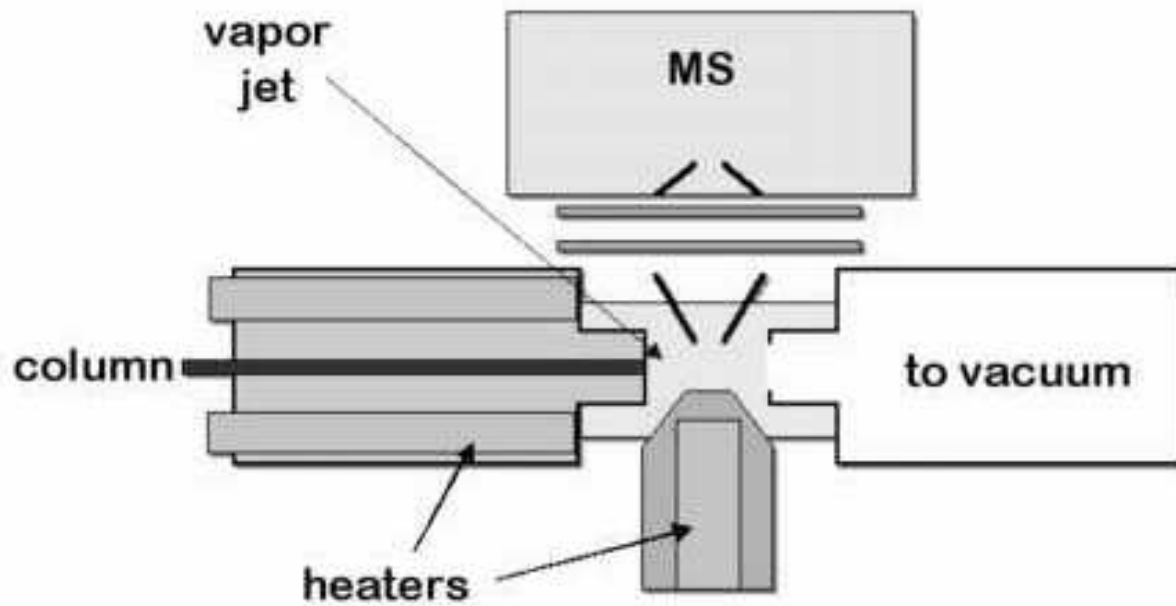


LC-MS

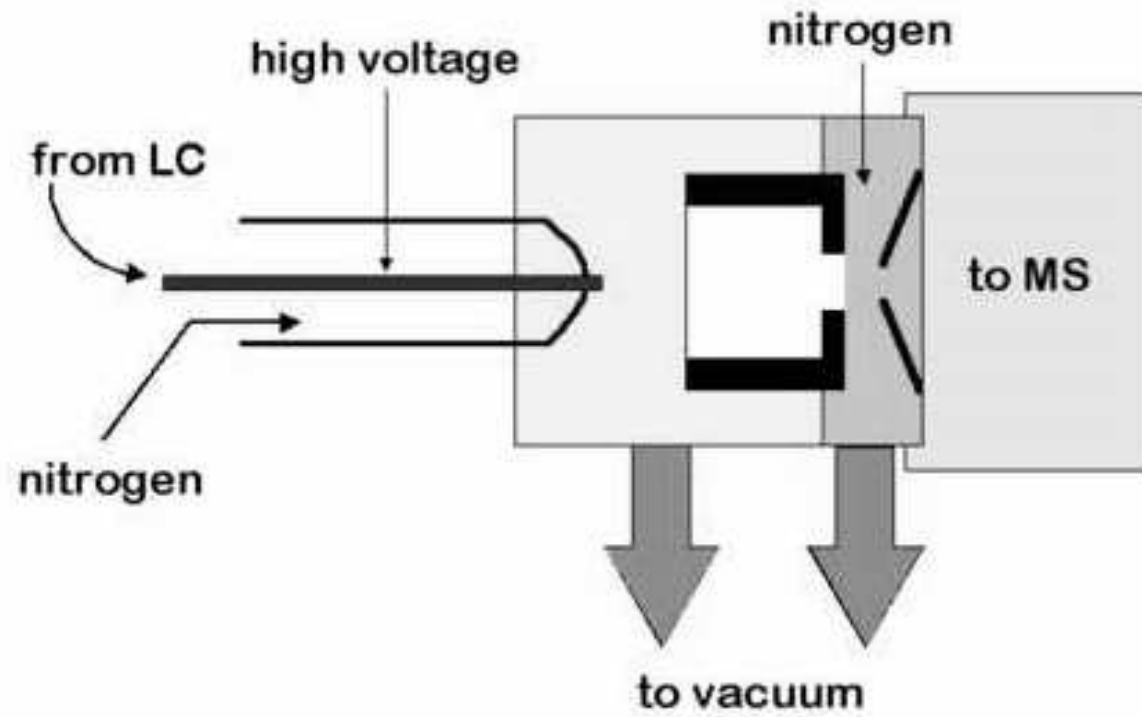
HPLC



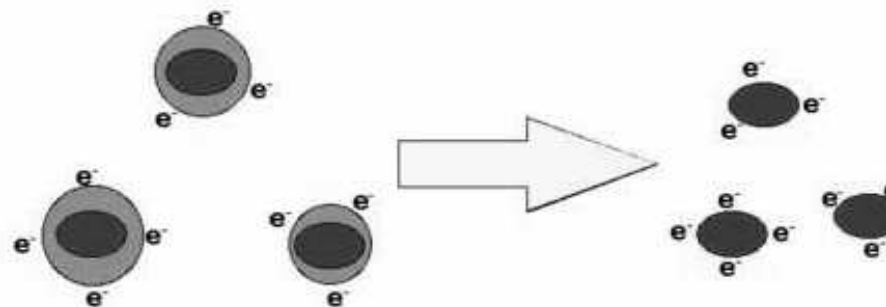
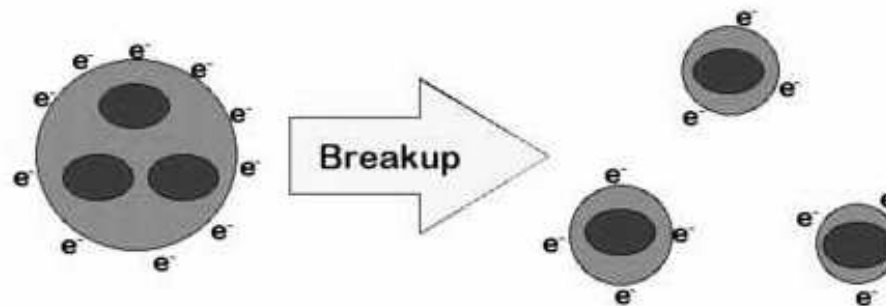
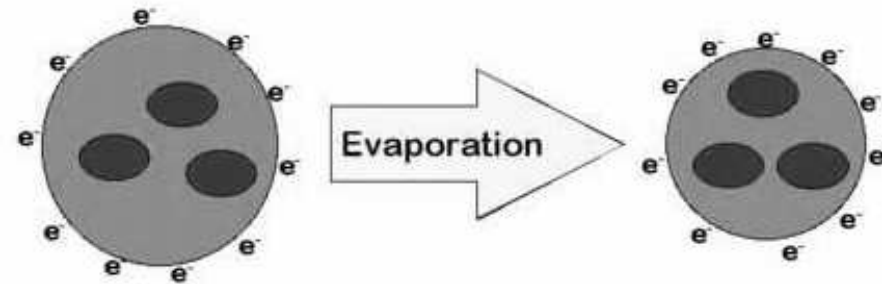
„Termospray“



„Electrospray“



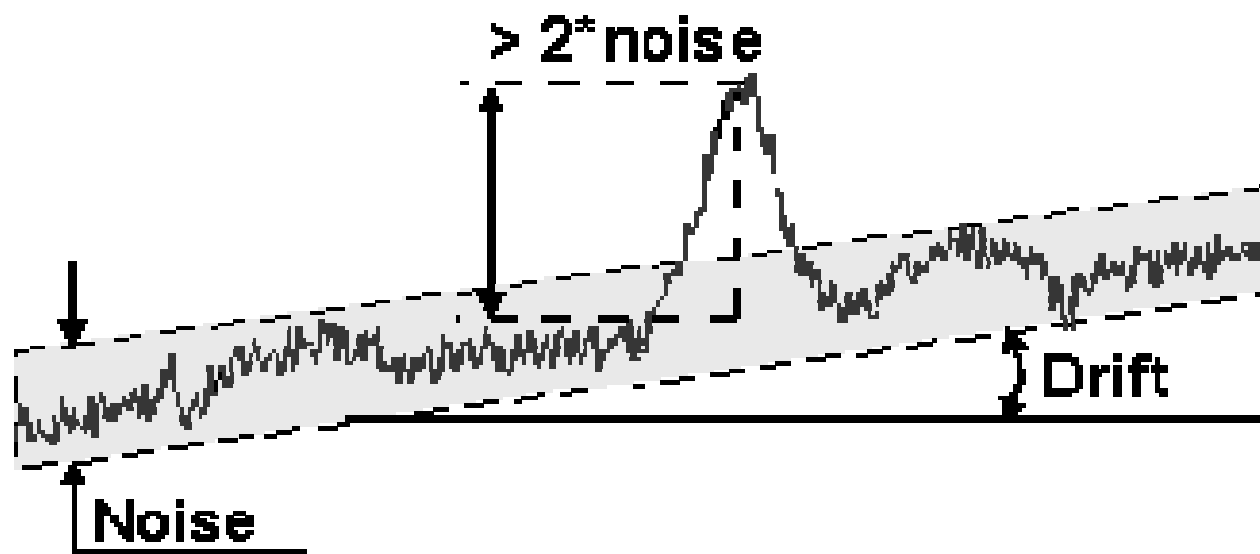
Ionizace



Derivatizace

- „pre-column“ - před vlastní analýzou
- „post-column“ – za kolonou po analýze

Šum a drift detektoru



Mez detekce $S/N > 2-3$

Mez stanovitelnosti $S/N > 10$

Vyhodnocení

- Zapisovače
- Integratory
- Integrovaní software + PC

Provedení

- Analytické
- Preparativní

Analýza kvalitativní

- Srovnání retenčních časů (objemů) píků u vzorku a standardů
- „spiking“ – přidání standardu do vzoru →
nárůst výšky píků
- Specifická detekce – UV-VIS, fluorescence,
elektrochemická
- MS

Analýza kvantitativní



Plocha (výška) píku

- Metoda externího standardu
- Metoda vnitřního standardu
- Metoda standardního přídatku

LC analýza

