

snímek 1

Chromatografické metody

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 2

Podstata

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

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 3

Chromatografie

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

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 4

Kapalinová chromatografie  
LC|

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

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 5

Provedení LC

- Papirová PC
- Tenkovrstvá TLC
- Kolonová CC

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 6

Teoretické aspekty  
chromatografie

---

---

---

---

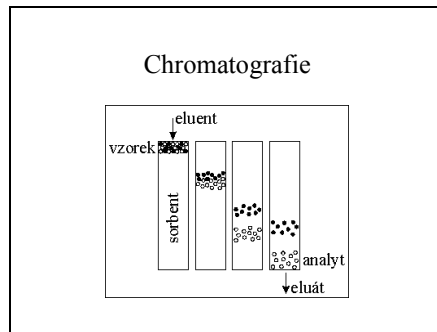
---

---

---

---

snímek 7



---

---

---

---

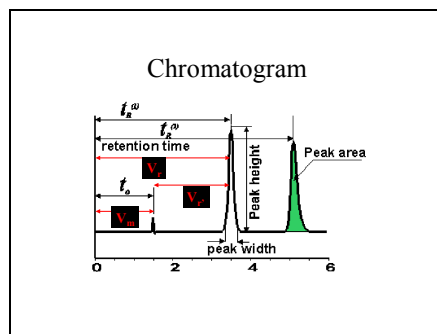
---

---

---

---

snímek 8



---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 9

**Retenční – eluční čas  $t_r$**

- Doba od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křivky

**Retenční – eluční objem  $V_r$**

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

$V_r = t_r \cdot F_m$

$F_m$  – objemová rychlost mobilní fáze

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 10

**Mrtvý objem**

$V_t = V_s + V_m$

$V_t$  – zdánlivý retenční objem

$V_r$  – redukovaný (skutečný) retenční objem

$V_m$  – mrtvý objem – mimokolonové příspěvky  
+ mimočásticový objem kolony

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 11

**Kapacitní faktor  $k'$**

$k' = \frac{V_t - V_m}{V_m} = \frac{V_r}{V_m} = K_D \cdot \frac{V_s}{V_m} \quad k' = 1 - 10$

$V_s$  – 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

---

---

---

---

---

---

---

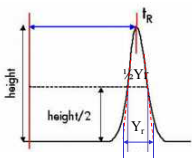
---

snímek 12

**Účinnost kolony  
počet teoretických pater  $N$**

$N = 16 \cdot \left(\frac{t}{Y}\right)^2$

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



---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 13

Účinnost kolony  
výškový ekvivalent teoretického  
patra H

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

I – délka kolony

---

---

---

---

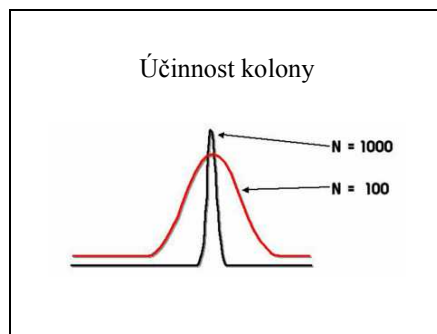
---

---

---

---

snímek 14



---

---

---

---

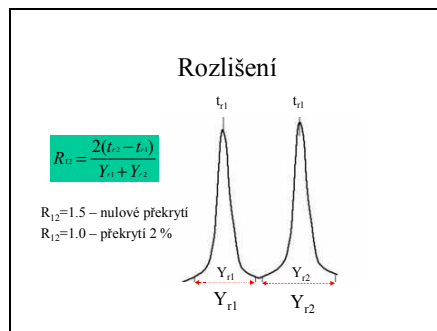
---

---

---

---

snímek 15



---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 16

Síly a efekty využívané  
při separaci

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

---

---

---

---

---

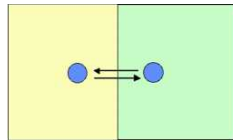
---

---

---

snímek 17

Rozdělovací chromatografie



---

---

---

---

---

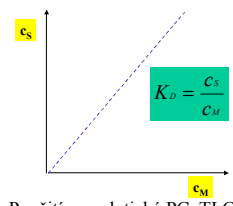
---

---

---

snímek 18

Rozdělovací chromatografie



Použití – analytická PC, TLC

---

---

---

---

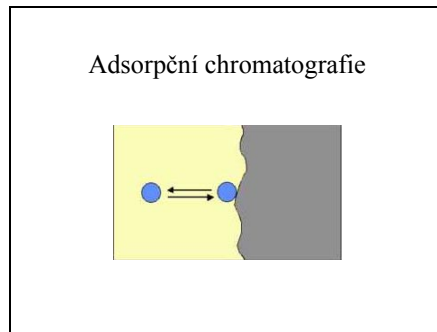
---

---

---

---

snímek 19



---

---

---

---

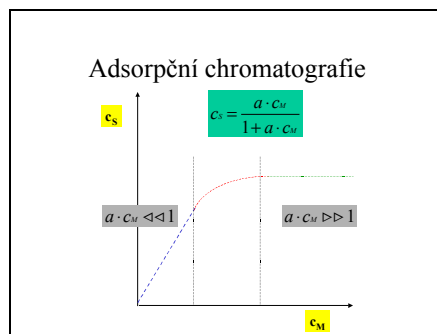
---

---

---

---

snímek 20



---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 21

Adsorpční chromatografie

- Stacionární fáze – polární

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

Oxid hlinitý  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{AlO}(\text{OH})$ ,  $\text{Al}(\text{OH})_3$

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

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 22

**Adsorpční chromatografie**

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

Eluotropická řada:  
uhlovodíky<subst.uhlovodíky<ketony<  
aldehdy<alkoholy<voda

---

---

---

---

---


---

---

---

snímek 23

**Reverzně fázová chromatografie**

- Stacionární fáze – nepolární  
C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub> 
- Mobilní fáze – polární – vodné roztoky  
pH → potlačit disociaci
- Eluce – snižováním polariry mobilní fáze  
ACN, MetOH,

---

---

---

---

---

---

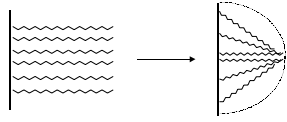
---

---

snímek 24

**Reverzně fázová chromatografie**

Kartáčový typ stacionární fáze H<sub>2</sub>O



Použití : analytické – až 90 % analýz

---

---

---

---

---

---

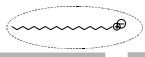
---

---



snímek 25

Iontově párová chromatografie



iontově párující činidlo    analyt

+ - SDS, HClO<sub>4</sub>  
- - tetrabutylamonium

---

---

---

---

---

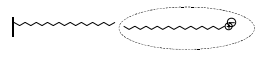
---

---

---

snímek 26

Iontově párová chromatografie



sorbent C<sub>18</sub>    iontový pár

Stacionární, mobilní fáze, eluce – RPC  
pH → plná ionizace analytu

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 27

Hydrofobní chromatografie

- Stacionární fáze – - C<sub>8</sub>, -fenyl
- Mobilní fáze – vodné roztoky  
1.7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Eluce – snižováním iontové síly

Použití : purifikace bílkovin

---

---

---

---

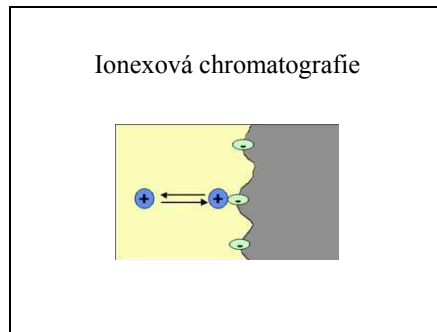
---

---

---

---

snímek 28



---

---

---

---

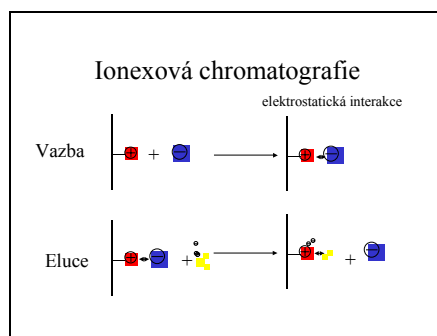
---

---

---

---

snímek 29



---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 30

Ionexy

- Katexy - - vazba kationtů  
silné - sulfo(S), sulfopropyl(SP)  $\text{OSO}_3^-$   
slabé - karboxy(C), karboxymetyl(CM)  $\text{COO}^-$
- Anexy - + vazba aniontů  
silné - dietylaminoetyl(DEAE)  
slabé - trietylaminoetyl(TEAE)

---

---

---

---

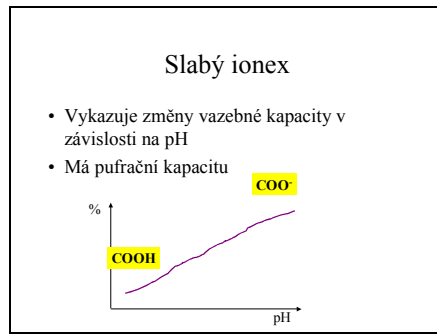
---

---

---

---

snímek 31



---

---

---

---

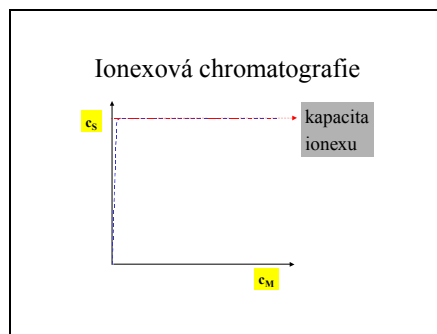
---

---

---

---

snímek 32



---

---

---

---

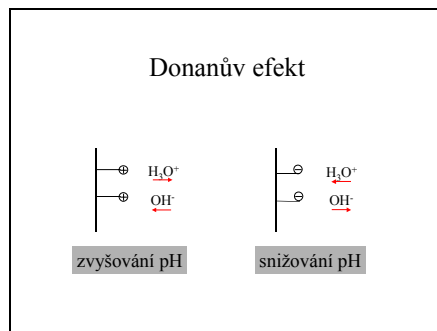
---

---

---

---

snímek 33



---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 34

**Ionexová chromatografie**

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

Použití – purifikace, zakoncentrování, výměna pufru

---

---

---

---

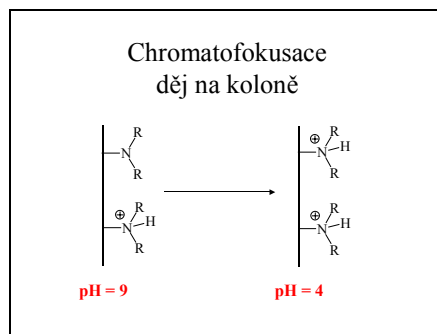
---

---

---

---

snímek 35



---

---

---

---

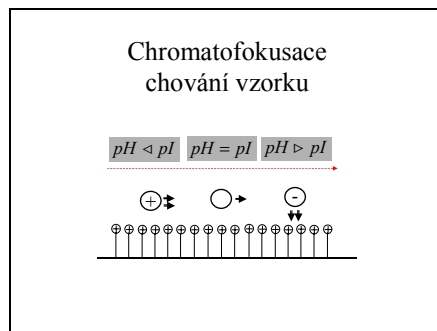
---

---

---

---

snímek 36



---

---

---

---

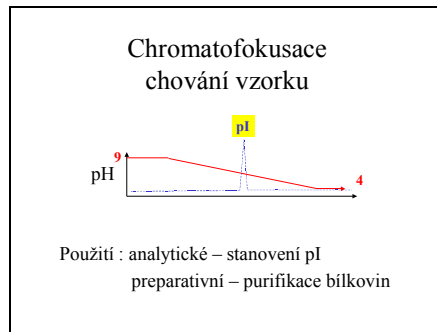
---

---

---

---

snímek 37



---

---

---

---

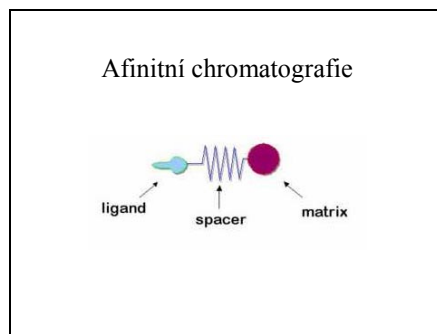
---

---

---

---

snímek 38



---

---

---

---

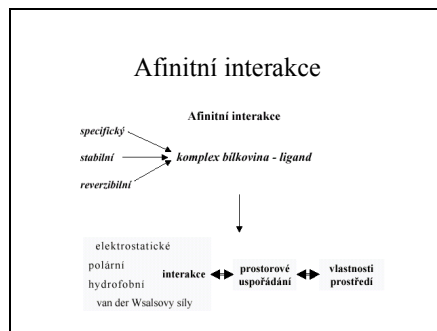
---

---

---

---

snímek 39



---

---

---

---

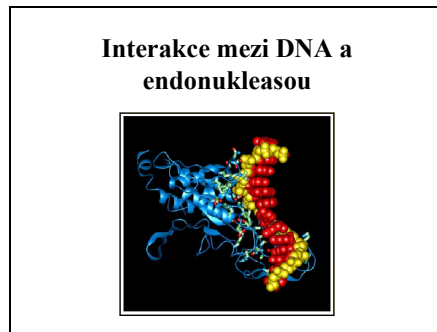
---

---

---

---

snímek 40



---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 41

**Afinitní páry**

Ligand	Bilkočina	$K_D$ (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	$10^{-14} - 10^{-6}$

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

---

---

---

---

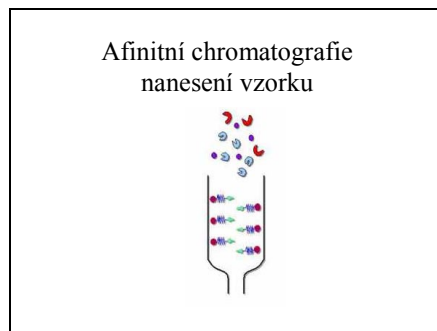
---

---

---

---

snímek 42



---

---

---

---

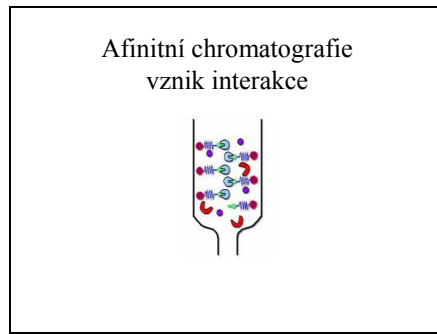
---

---

---

---

snímek 43



---

---

---

---

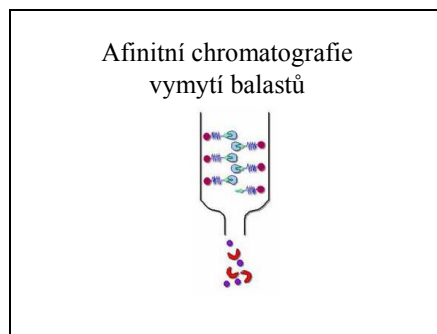
---

---

---

---

snímek 44



---

---

---

---

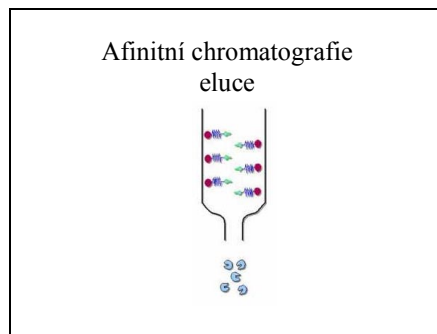
---

---

---

---

snímek 45



---

---

---

---

---

---


---

---

snímek 46

Předpoklady pro vznik komplexu

- Sterické – použití raménka (spacer)



- Optimální pH, iontová síla

---

---

---

---

---

---

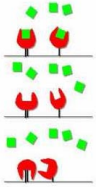
---

---

snímek 47

Předpoklady pro vznik komplexu

- Vazebné
- Konformační



---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 48

Provedení

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

Použití : analytické (stanovení K), purifikace

---

---

---

---

---

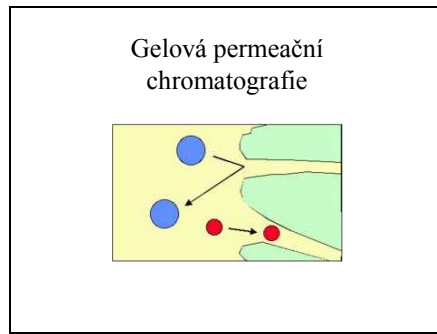
---

---

---



snímek 49



---

---

---

---

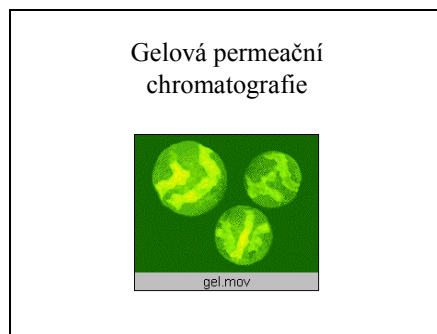
---

---

---

---

snímek 50



---

---

---

---

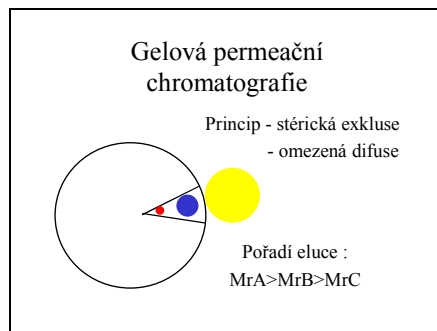
---

---

---

---

snímek 51



---

---

---

---

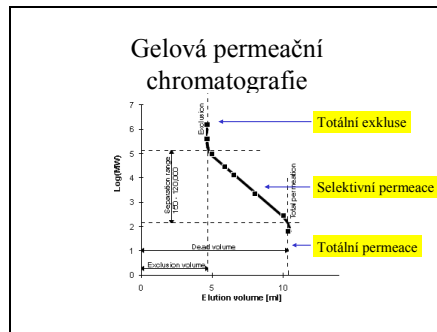
---

---

---

---

snímek 52



---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 53

### Gelová permeační chromatografie

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

Použití : stanovení  $M_r$ , odsolování, purifikace

---

---

---

---

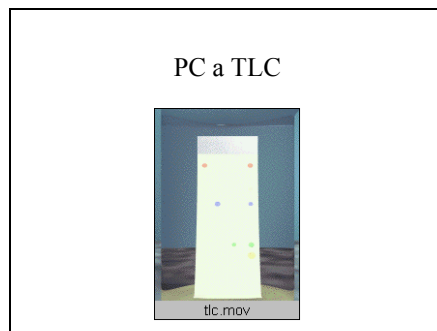
---

---

---

---

snímek 54



---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 55

**PC a TLC**

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

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 56

**Instrumentace PC a TLC**

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 57

**Chromatografický papír**

- Nemodifikovaný
  
- Modifikovaný – ionexy, acylace

f. Watman (Anglie)  
Schleicher-Schüll (Německo)

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 58

**TLC**

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

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 59

**PC a TLC - mody**

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

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 60

**Nanášení vzorku**

- Pipety
- Kapiláry

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 61

Provedení

- Vzestupné
- Sestupné
- Kruhové
- Dvojměrné

---

---

---

---

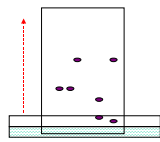
---

---

---

snímek 62

Vzestupné



---

---

---

---

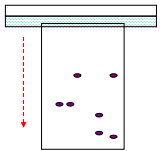
---

---

---

snímek 63

Sestupné



---

---

---

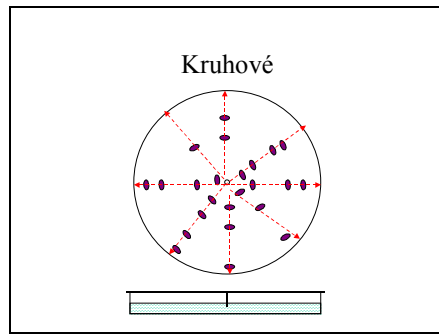
---

---

---

---

snímek 64



---

---

---

---

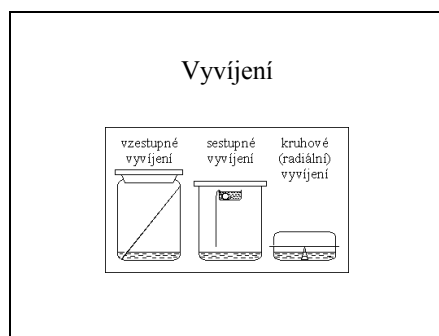
---

---

---

---

snímek 65



---

---

---

---

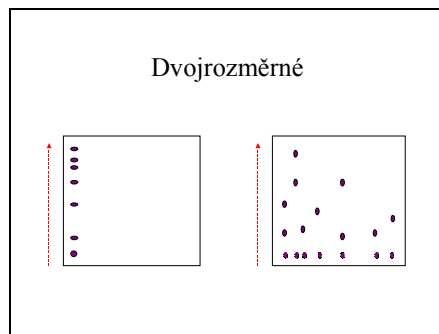
---

---

---

---

snímek 66



---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 67

Provedení

- Analytické
- Preparativní

---

---

---

---

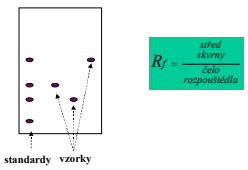
---

---

---

snímek 68

Analýza kvalitativní



standardy vzorky

$$R_f = \frac{\text{spot skvrny}}{\text{celá rozpouštědla}}$$

---

---

---

---

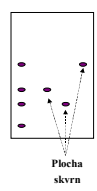
---

---

---

snímek 69

Analýza kvantitativní



- Planimetrie
- Denzitometrie

Plocha skvrn

---

---

---

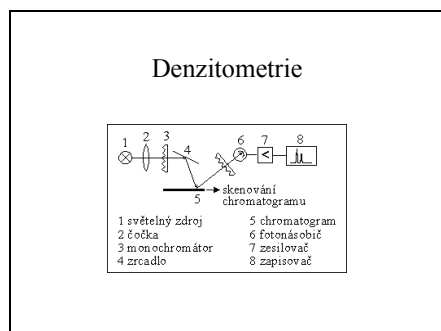
---

---

---

---

snímek 70



---

---

---

---

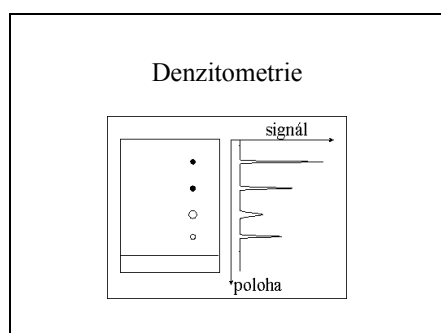
---

---

---

---

snímek 71



---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 72

**Preparace**

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

---

---

---

---

---

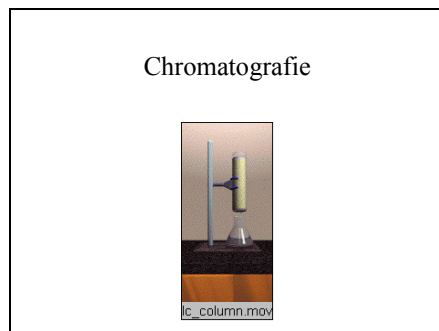
---

---

---



snímek 73



---

---

---

---

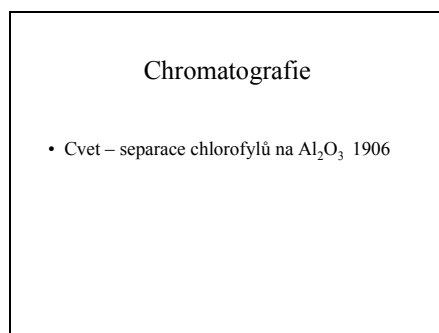
---

---

---

---

snímek 74



---

---

---

---

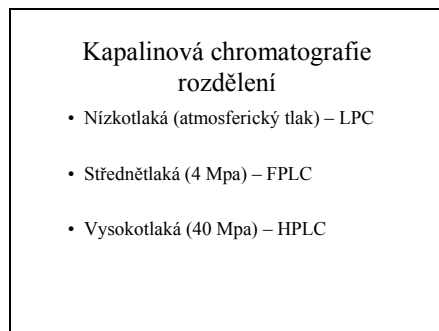
---

---

---

---

snímek 75



---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 76

Kapalinová chromatografie  
využití

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

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 77

Kapalinová chromatografie  
doba trvání

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

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 78

Zařízení pro LPC



---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 79

**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

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 80

**Instrumentace pro FPLC a HPLC**

---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 81

**Zařízení pro HPLC**

The diagram illustrates the components of an HPLC system. It includes a reservoir of mobile phase (eluent), an injection valve, a pump, a column, a detector interface, and a data station. A loop is also shown connected to the injection valve. Labels with leader lines point to each of these components.

---

---

---

---

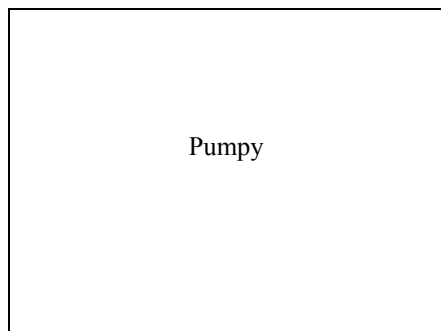
---

---

---

---

snímek 82



---

---

---

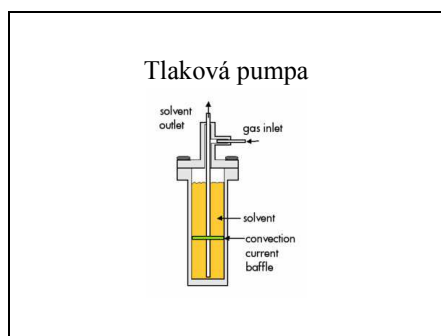
---

---

---

---

snímek 83



---

---

---

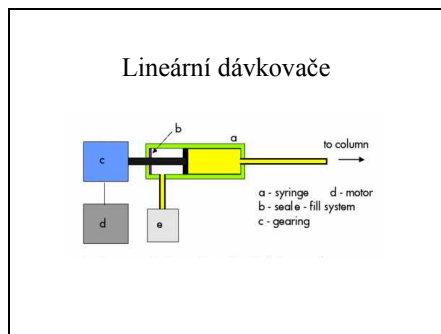
---

---

---

---

snímek 84



---

---

---

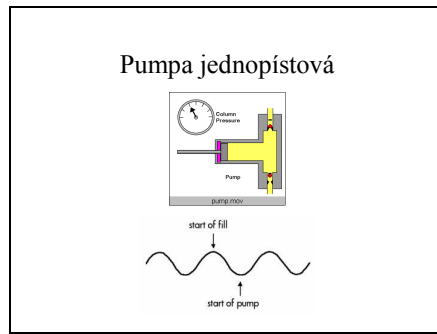
---

---

---

---

snímek 85



---

---

---

---

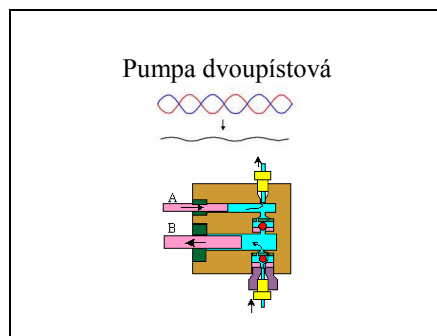
---

---

---

---

snímek 86



---

---

---

---

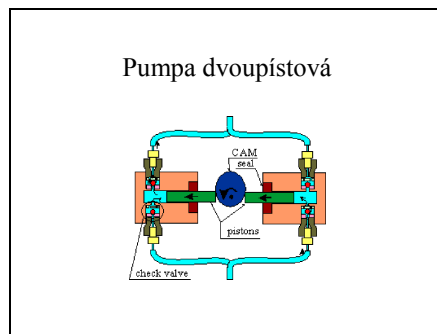
---

---

---

---

snímek 87



---

---

---

---

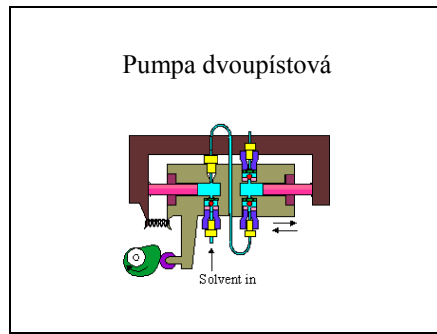
---

---

---

---

snímek 88



---

---

---

---

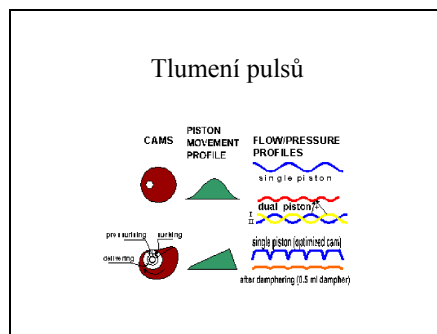
---

---

---

---

snímek 89



---

---

---

---

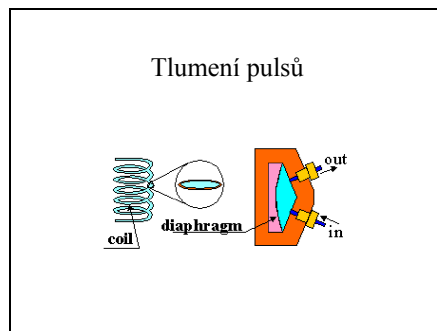
---

---

---

---

snímek 90



---

---

---

---

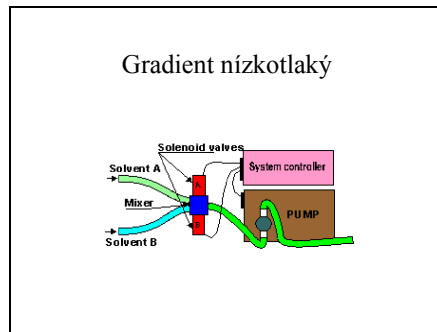
---

---

---

---

snímek 91



---

---

---

---

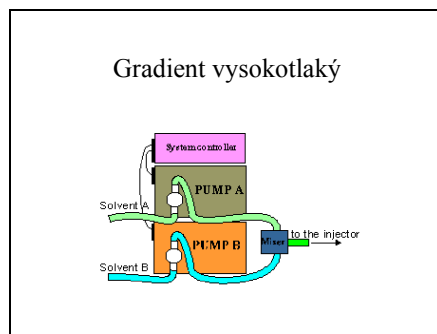
---

---

---

---

snímek 92



---

---

---

---

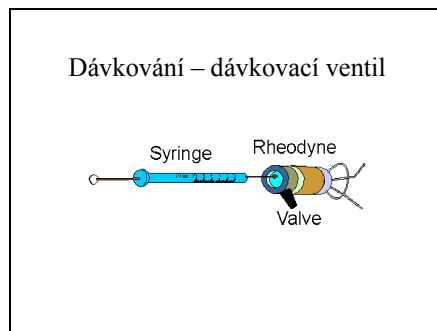
---

---

---

---

snímek 93



---

---

---

---

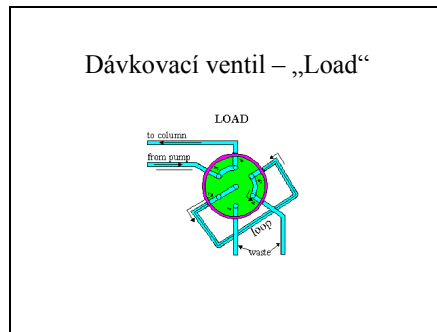
---

---

---

---

snímek 94



---

---

---

---

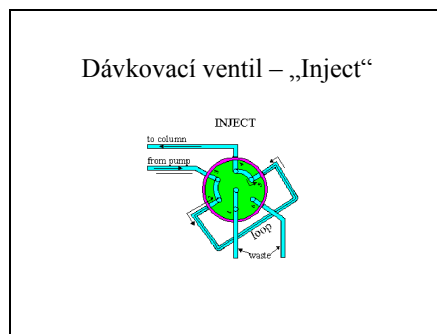
---

---

---

---

snímek 95



---

---

---

---

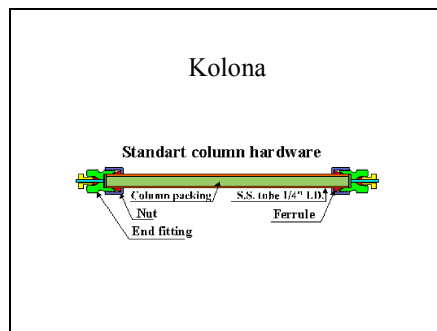
---

---

---

---

snímek 96



---

---

---

---

---

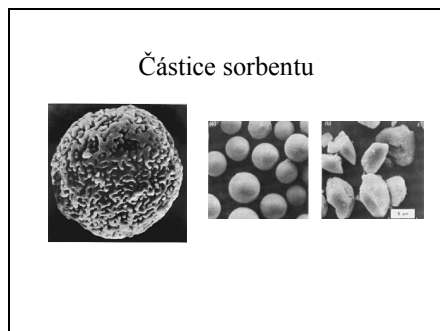
---

---

---



snímek 97



---

---

---

---

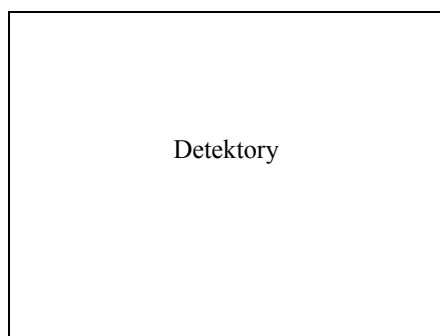
---

---

---

---

snímek 98



---

---

---

---

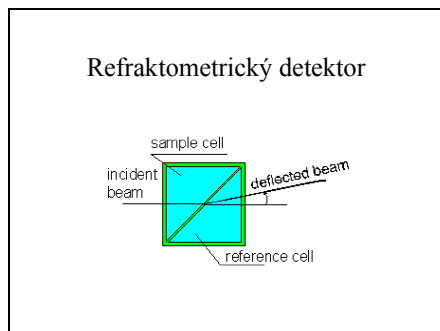
---

---

---

---

snímek 99



---

---

---

---

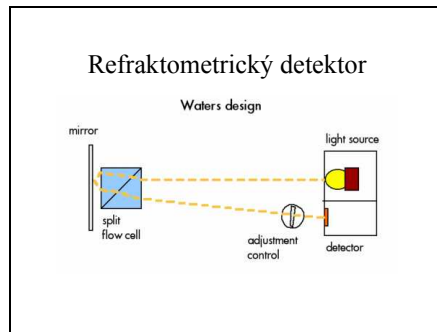
---

---

---

---

snímek 100



---

---

---

---

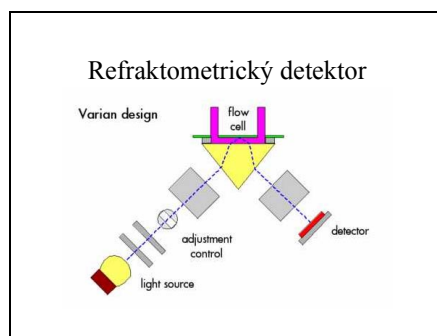
---

---

---

---

snímek 101



---

---

---

---

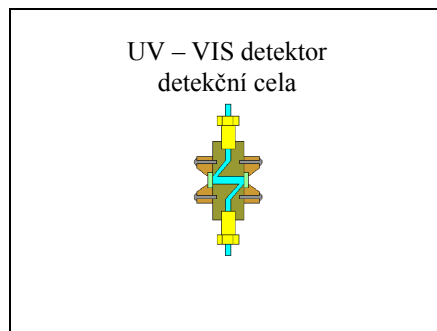
---

---

---

---

snímek 102



---

---

---

---

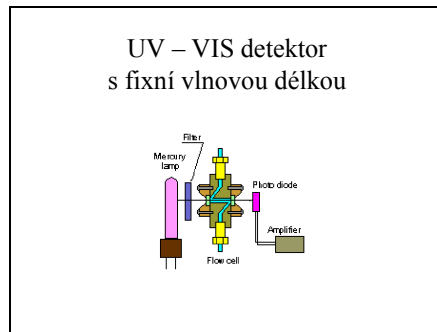
---

---

---

---

snímek 103



---

---

---

---

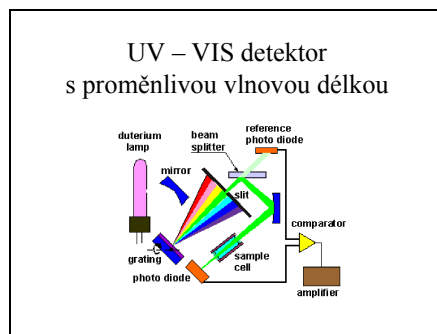
---

---

---

---

snímek 104



---

---

---

---

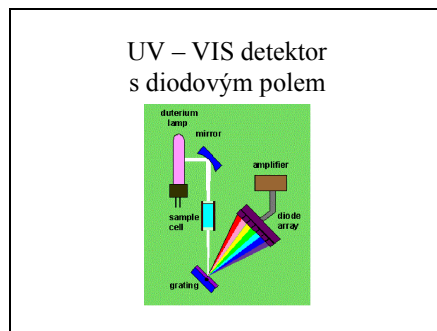
---

---

---

---

snímek 105



---

---

---

---

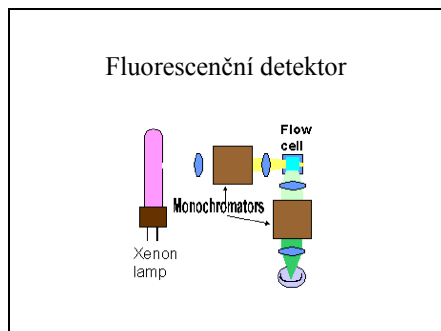
---

---

---

---

snímek 106



---

---

---

---

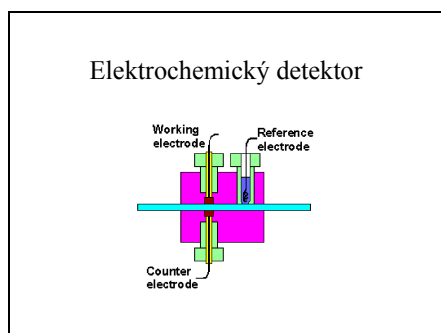
---

---

---

---

snímek 107



---

---

---

---

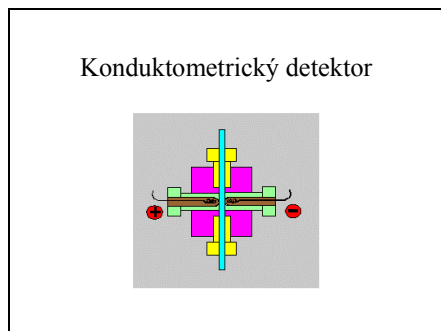
---

---

---

---

snímek 108



---

---

---

---

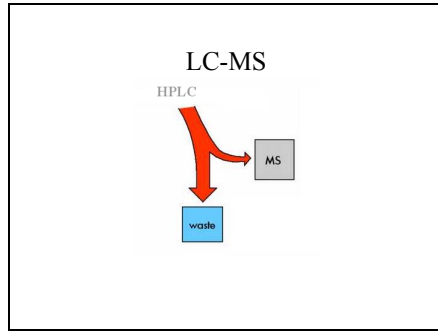
---

---

---

---

snímek 109



---

---

---

---

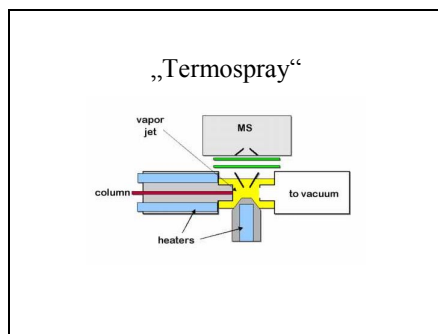
---

---

---

---

snímek 110



---

---

---

---

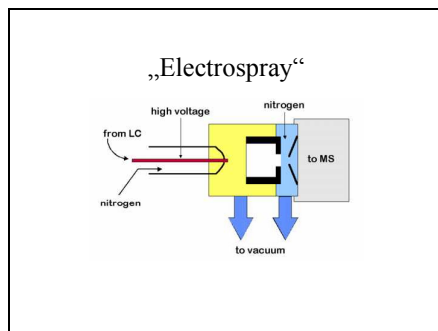
---

---

---

---

snímek 111



---

---

---

---

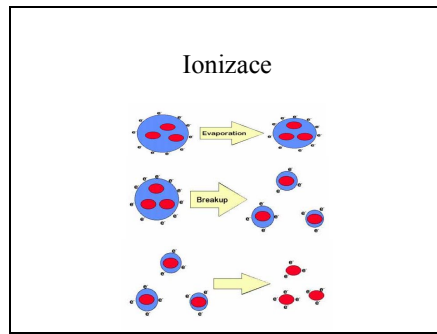
---

---

---

---

snímek 112



---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 113

### Derivatizace

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

---

---

---

---

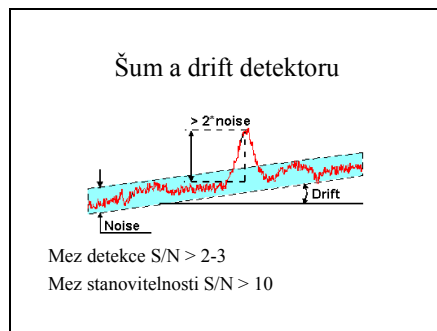
---

---

---

---

snímek 114



---

---

---

---

---

---

---

---

snímek 115

**Vyhodnocení**

- Zapisovače
- Integratory
- Integrovaný software + PC

---

---

---

---

---

---

---

snímek 116

**Provedení**

- Analytické
- Preparativní

---

---

---

---

---

---

---

snímek 117

**Analýza kvalitativní**

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

---

---

---

---

---

---

---

snímek 118

Analýza kvantitativní

↓

Plocha (výška) píku

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

---

---

---

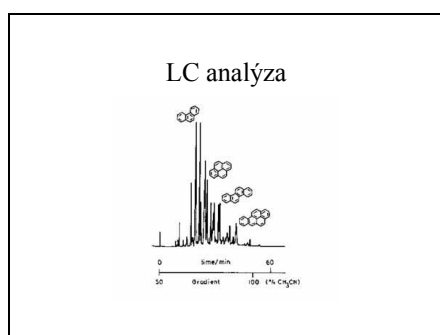
---

---

---

---

snímek 119



---

---

---

---

---

---

---