

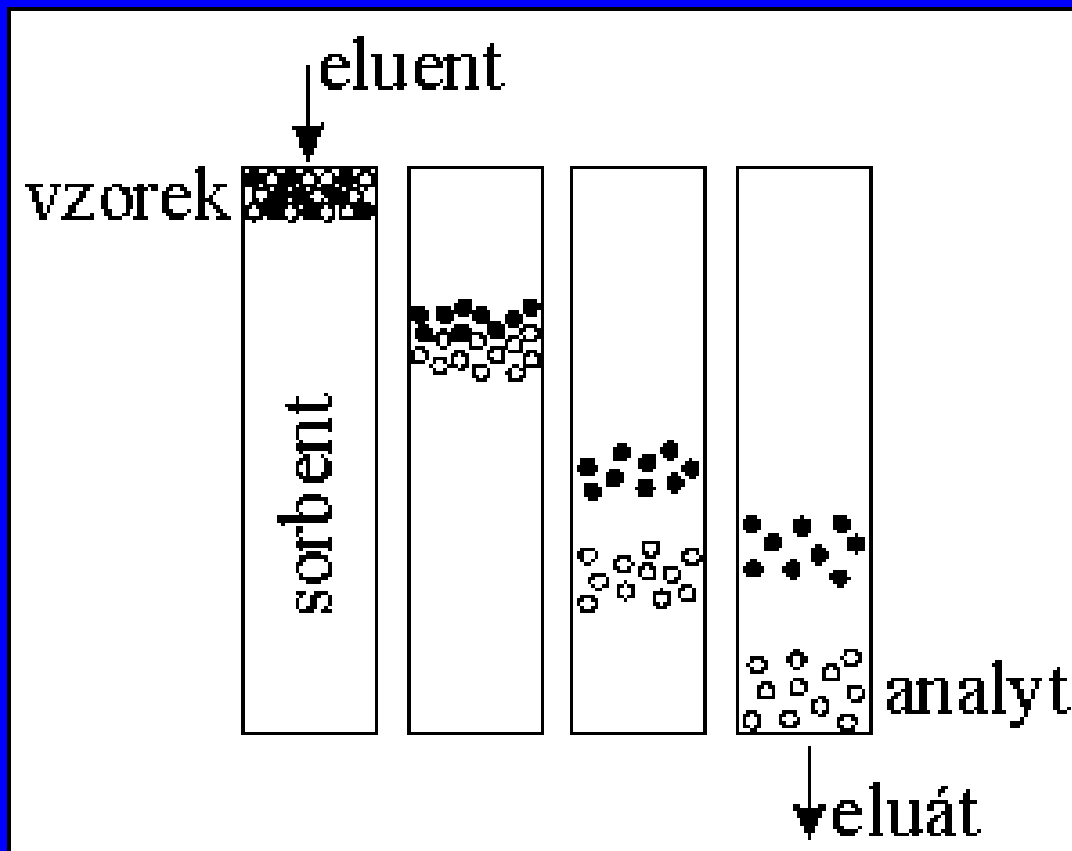
Chromatografické metody

Zdeněk Glatz

Podstata

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

Chromatografie



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

Teorie

„Ideální lineární chromatografie“

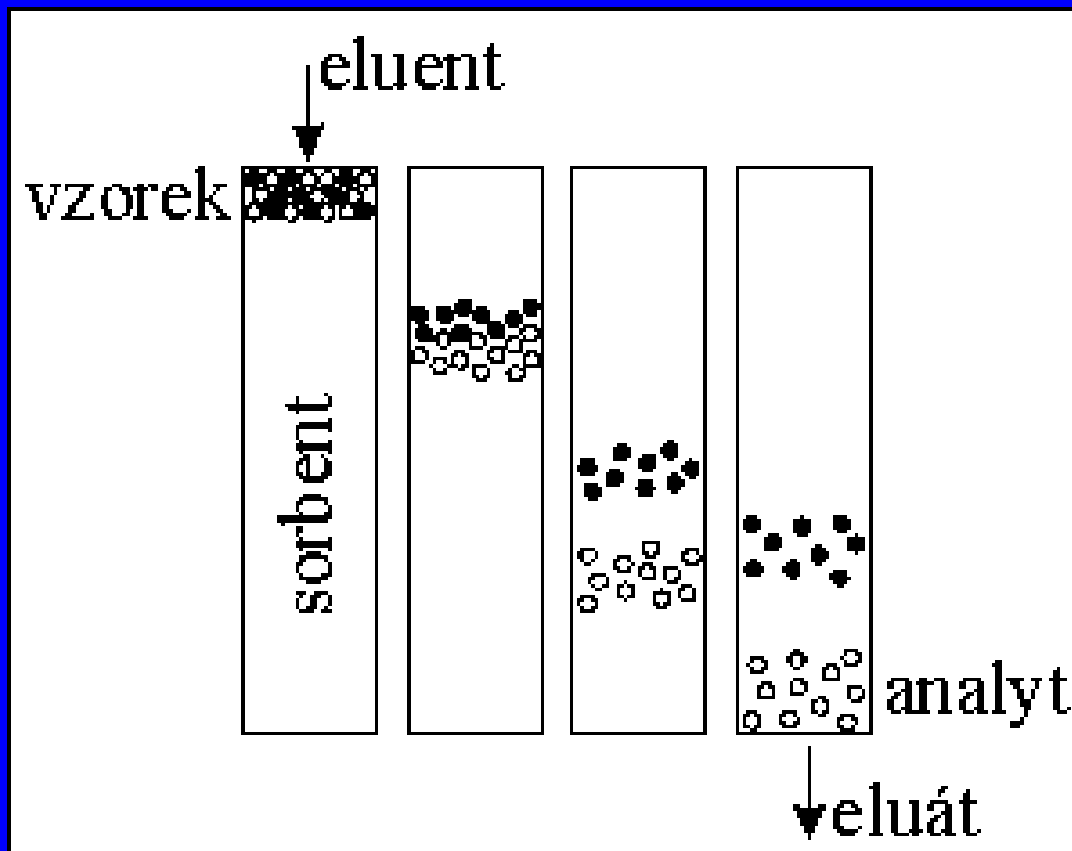
Martin, Synge

Teorie

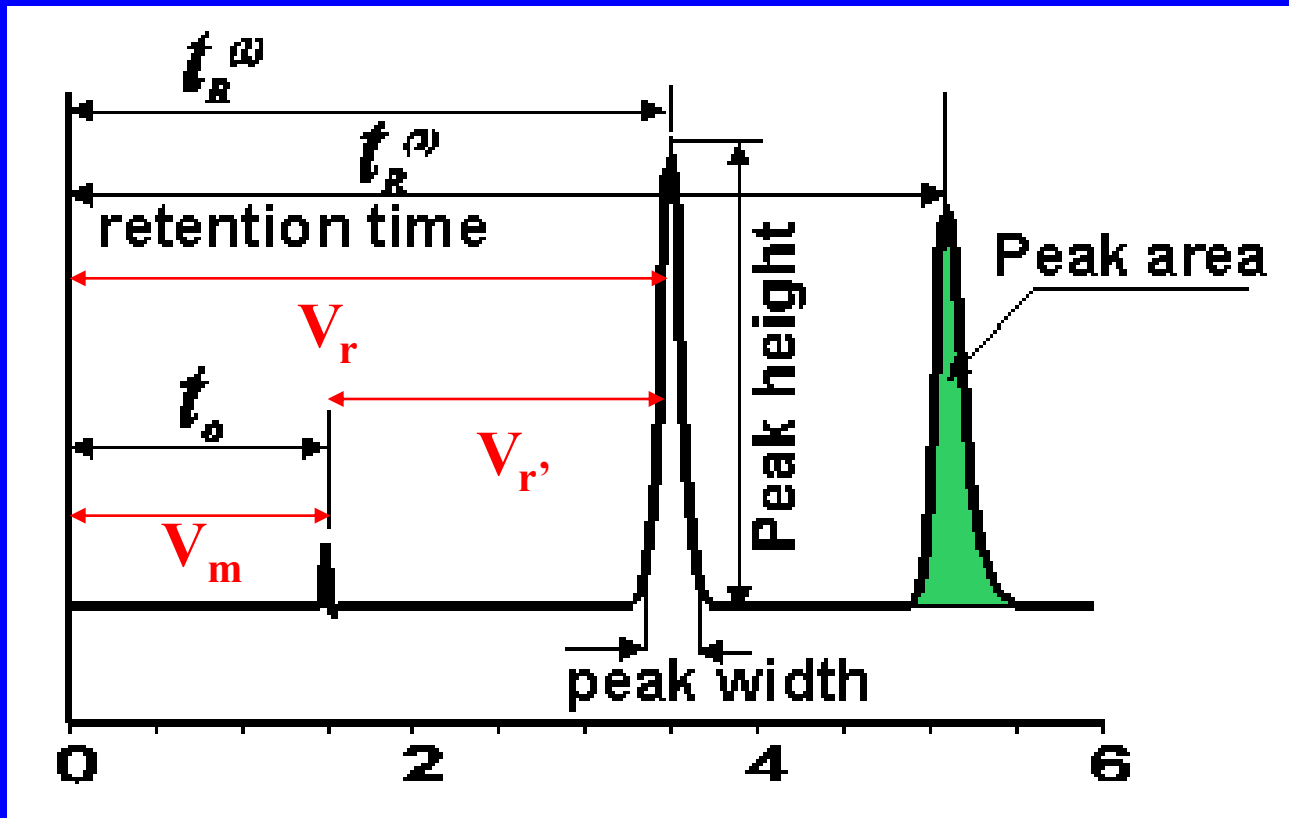
„Ideální lineární chromatografie“

1. Nekonečně rychlé ustavení rovnovah
2. Pístový tok mobilní fáze
3. Nulová difuze
4. Lineární sorpční isoterma

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

Selektivita

Retenční faktor α

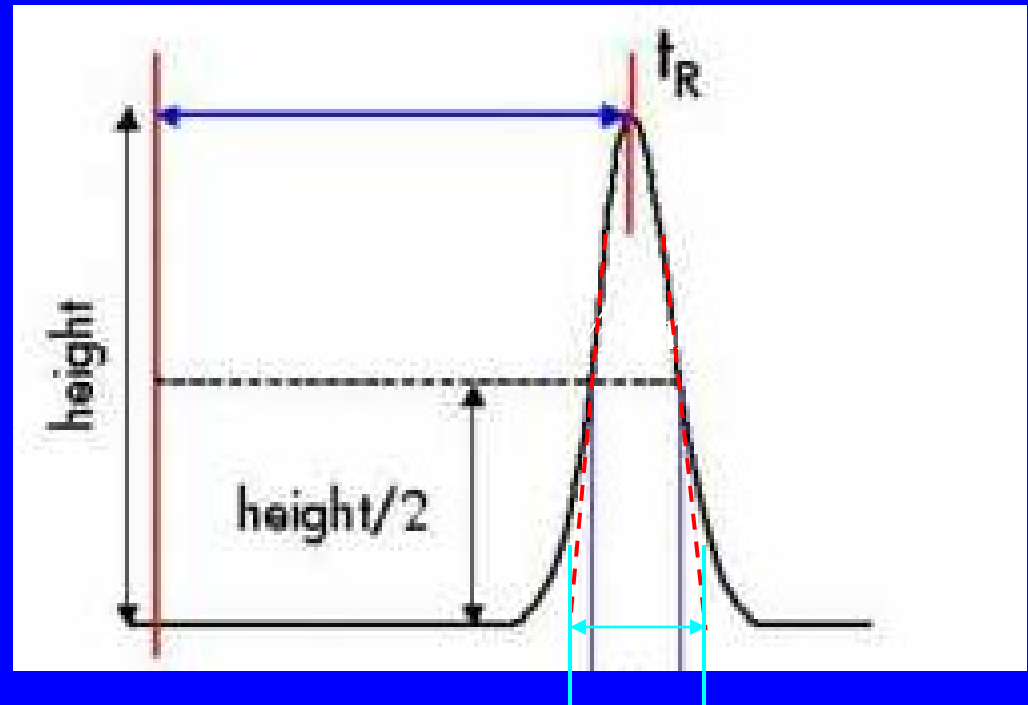
$$\alpha = \frac{V_{r2}}{V_{r1}} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Účinnost kolony

počet teoretických pater N

$$N = 6 \cdot \left(\frac{t_r}{Y_r} \right)^2$$

$$N = .545 \cdot \left(\frac{t_r}{1/2 Y_r} \right)^2$$

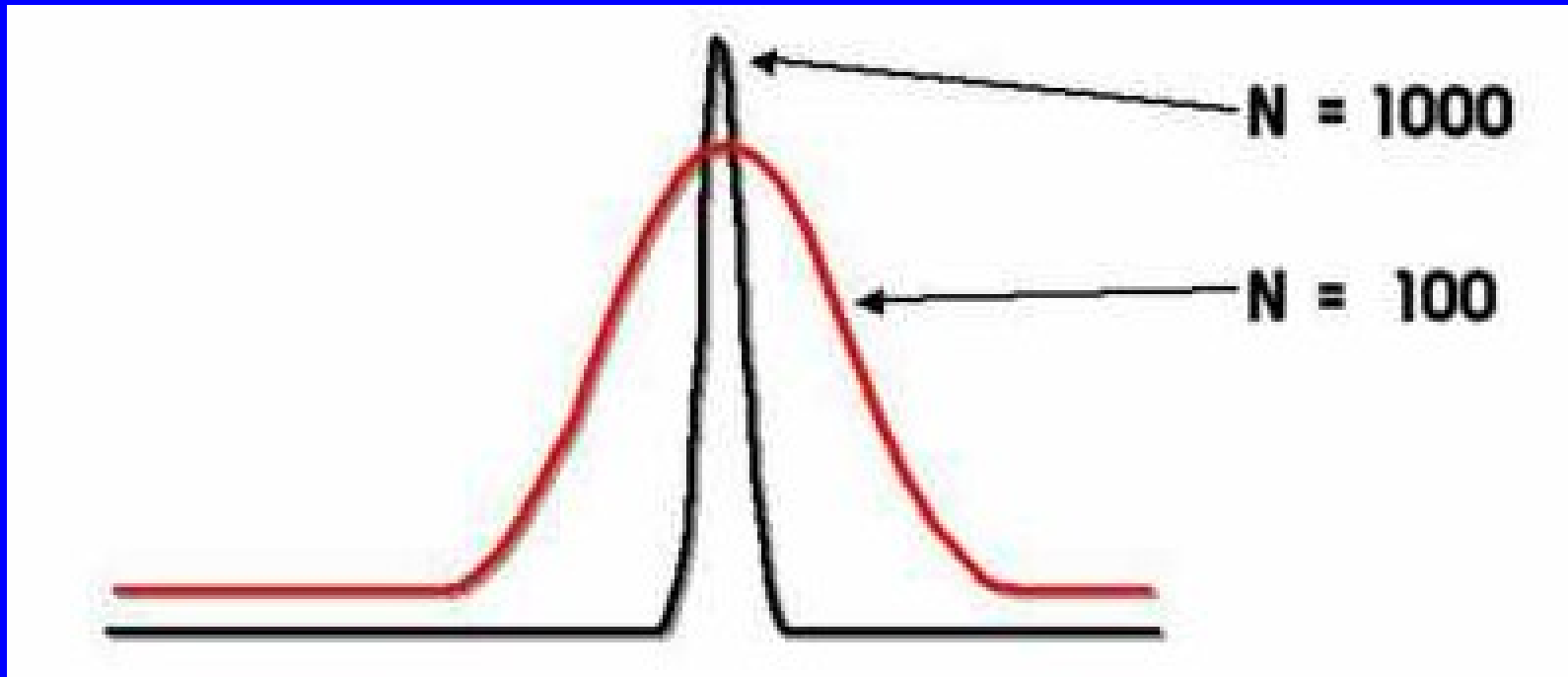


Účinnost kolony výškový ekvivalent teoretického patra H

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

l – délka kolony

Účinnost kolony

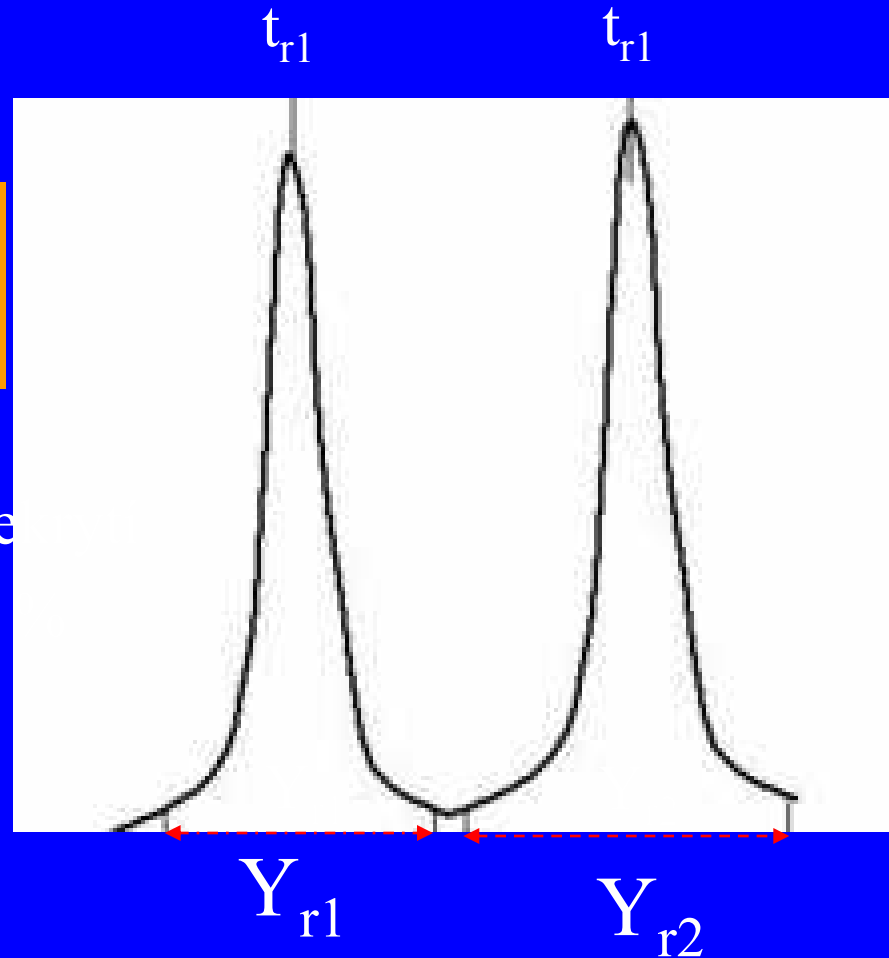


Rozlišení

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

$R_{12}=1.5$ – nulové překrytí

$R_{12}=1.0$ – překrytí 20%



Vliv jednotlivých faktorů na rozlišení

$$R_{12} = \frac{1}{4} \cdot \frac{\alpha}{\alpha + 1} \cdot \frac{k'}{1 + k'} \cdot \sqrt{N}$$

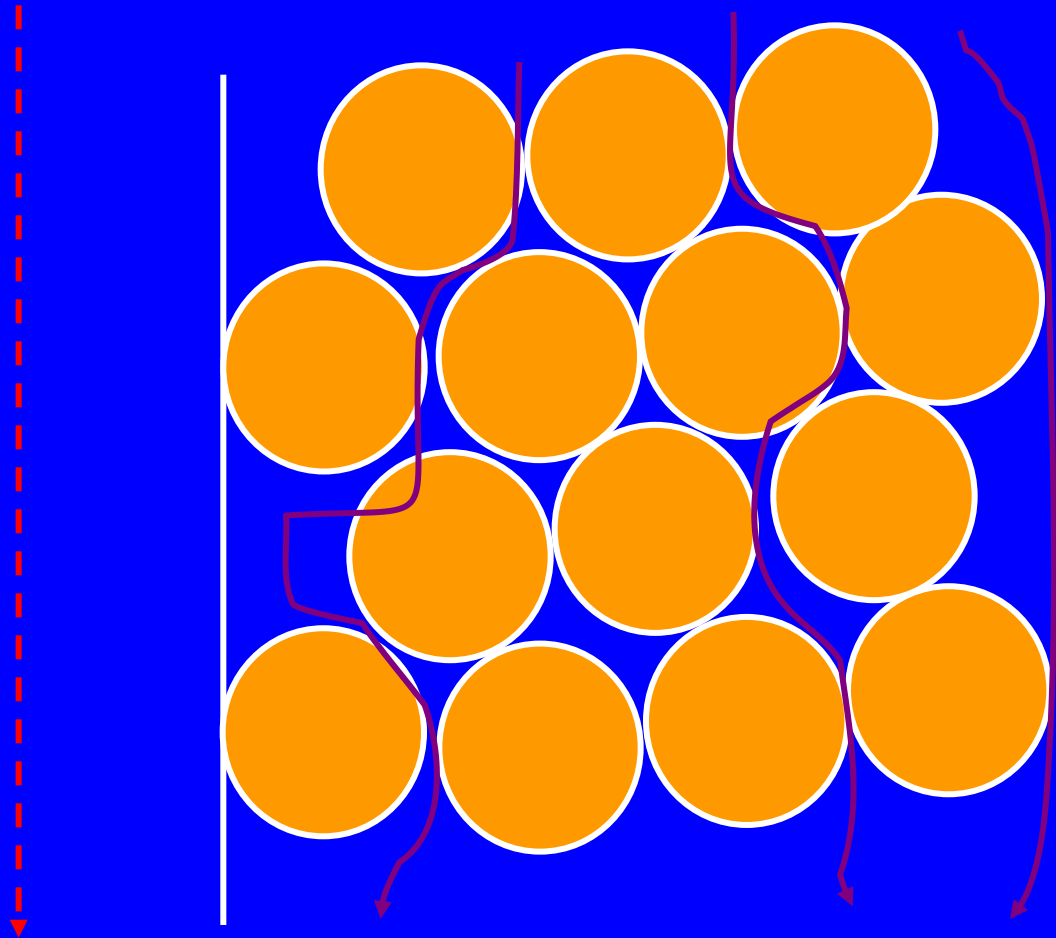
„Dynamická difuzní teorie“

Van Deemter

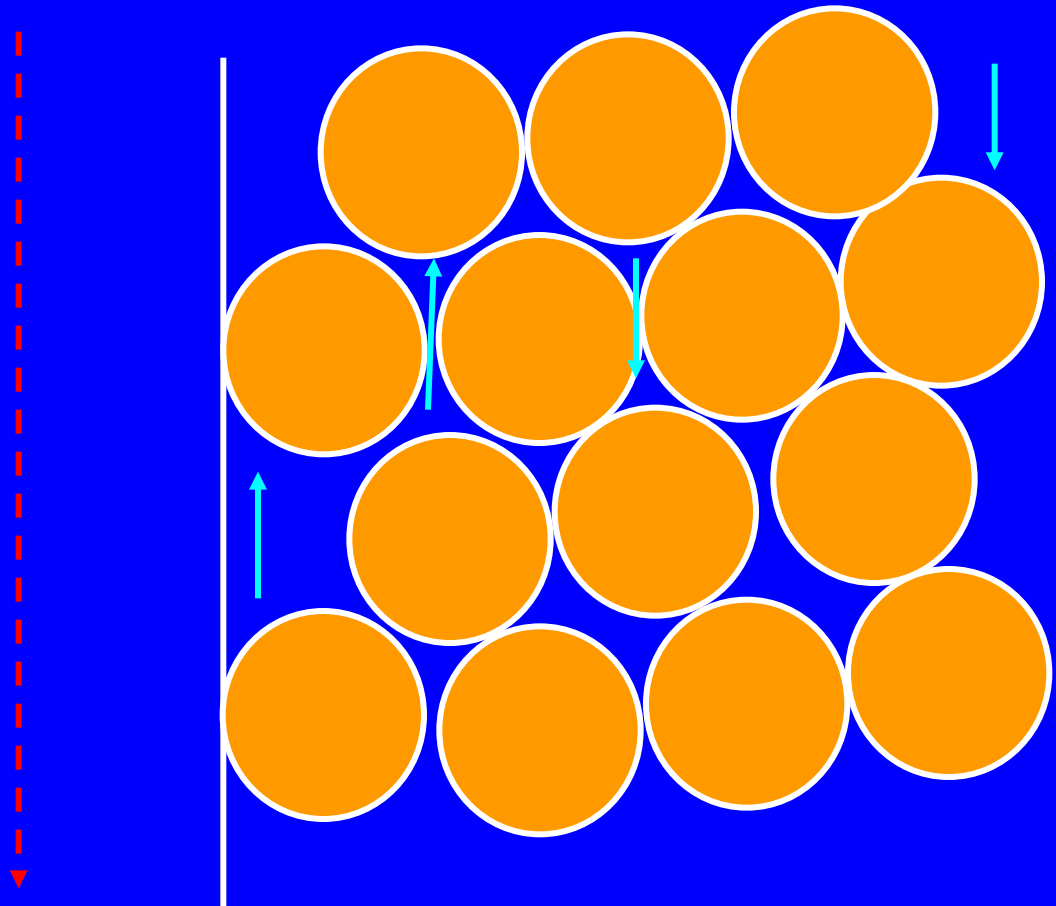
Van Deemterova difuzní teorie

- Difuze turbulentní
- Difuze molekulová
- Odpor proti převodu hmoty

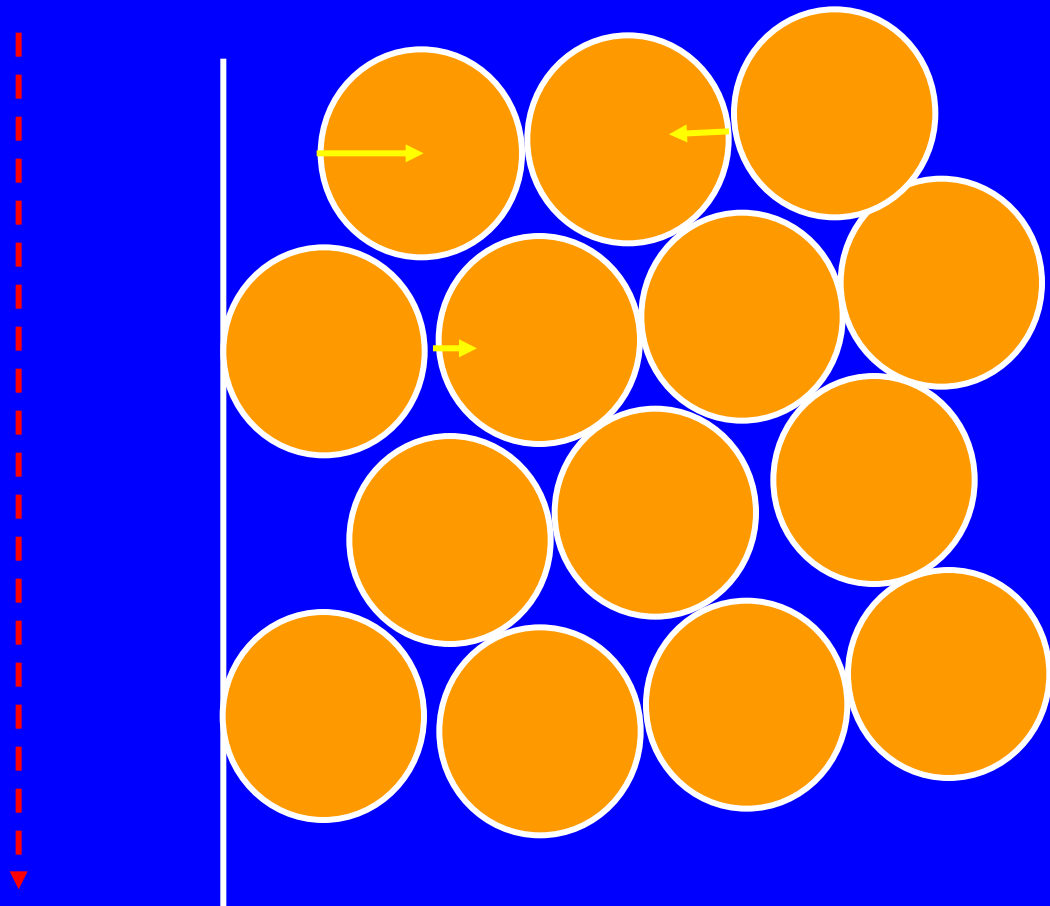
Difuze turbulentní A



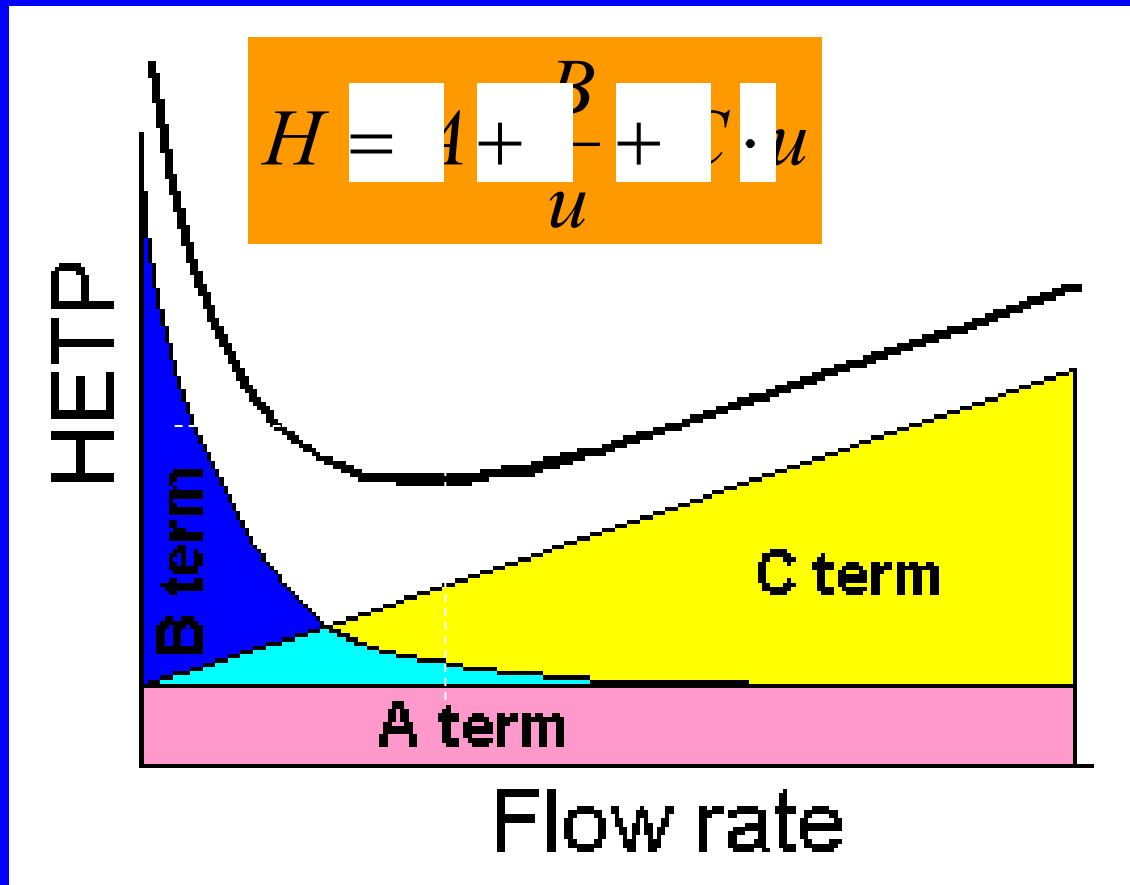
Difúze molekulová B



Odpor proti převodu hmoty C



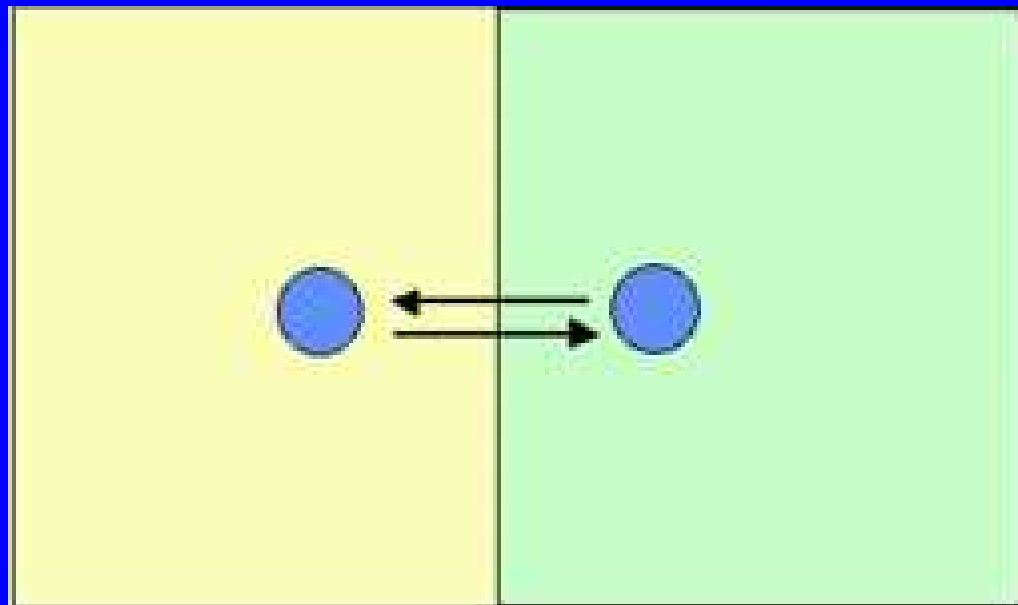
Van Deemterova rovnice



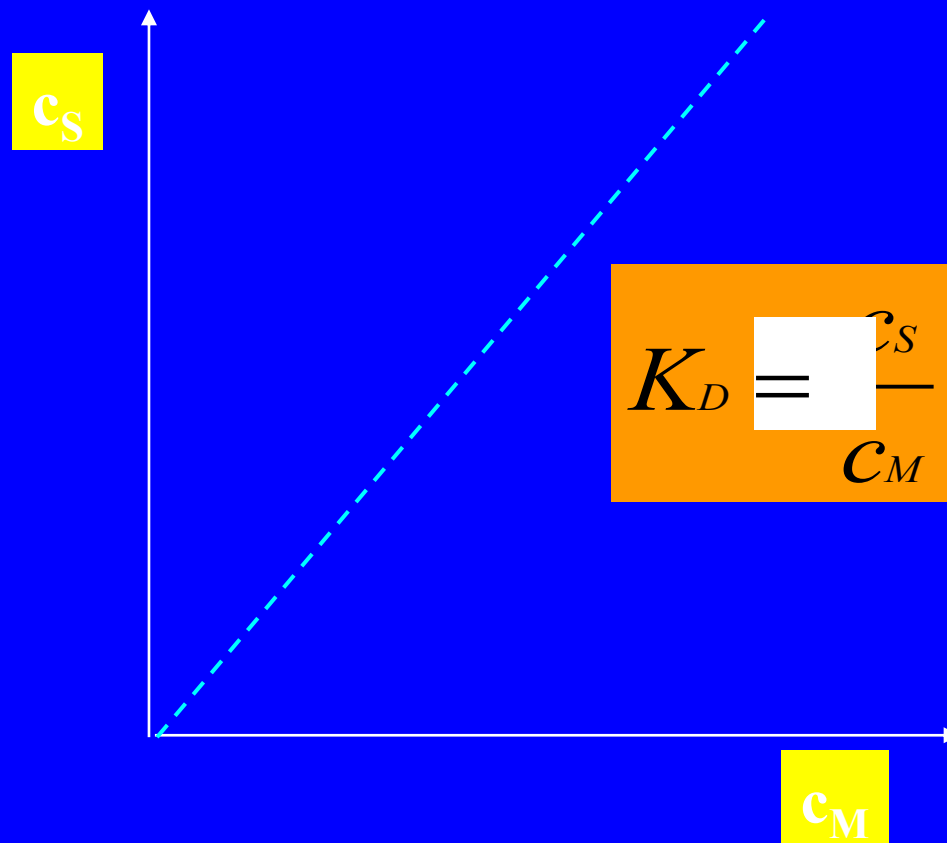
Síly a efekty využívané při separaci

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

Rozdělovací chromatografie

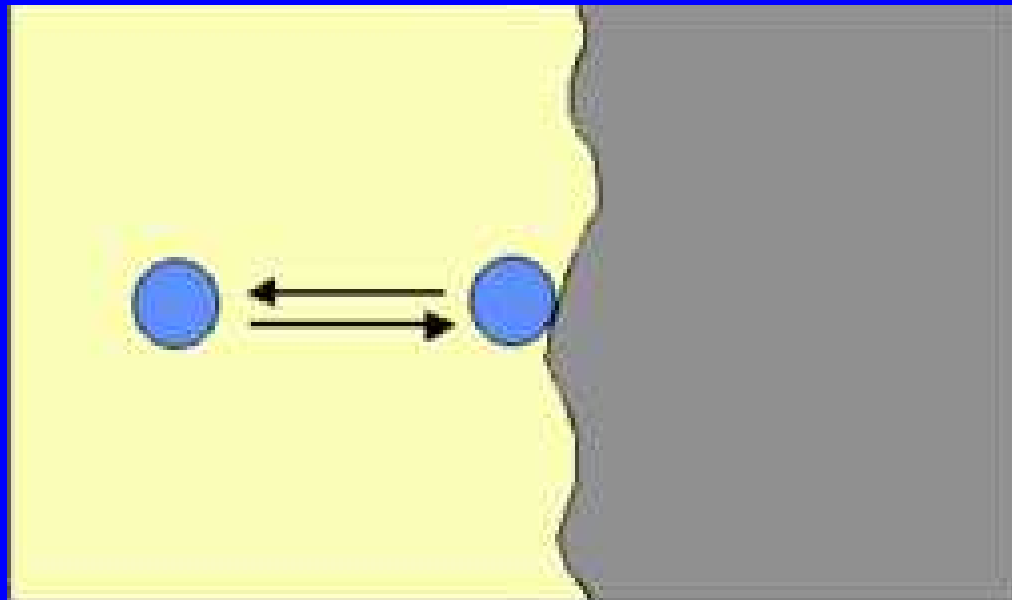


Rozdělovací chromatografie

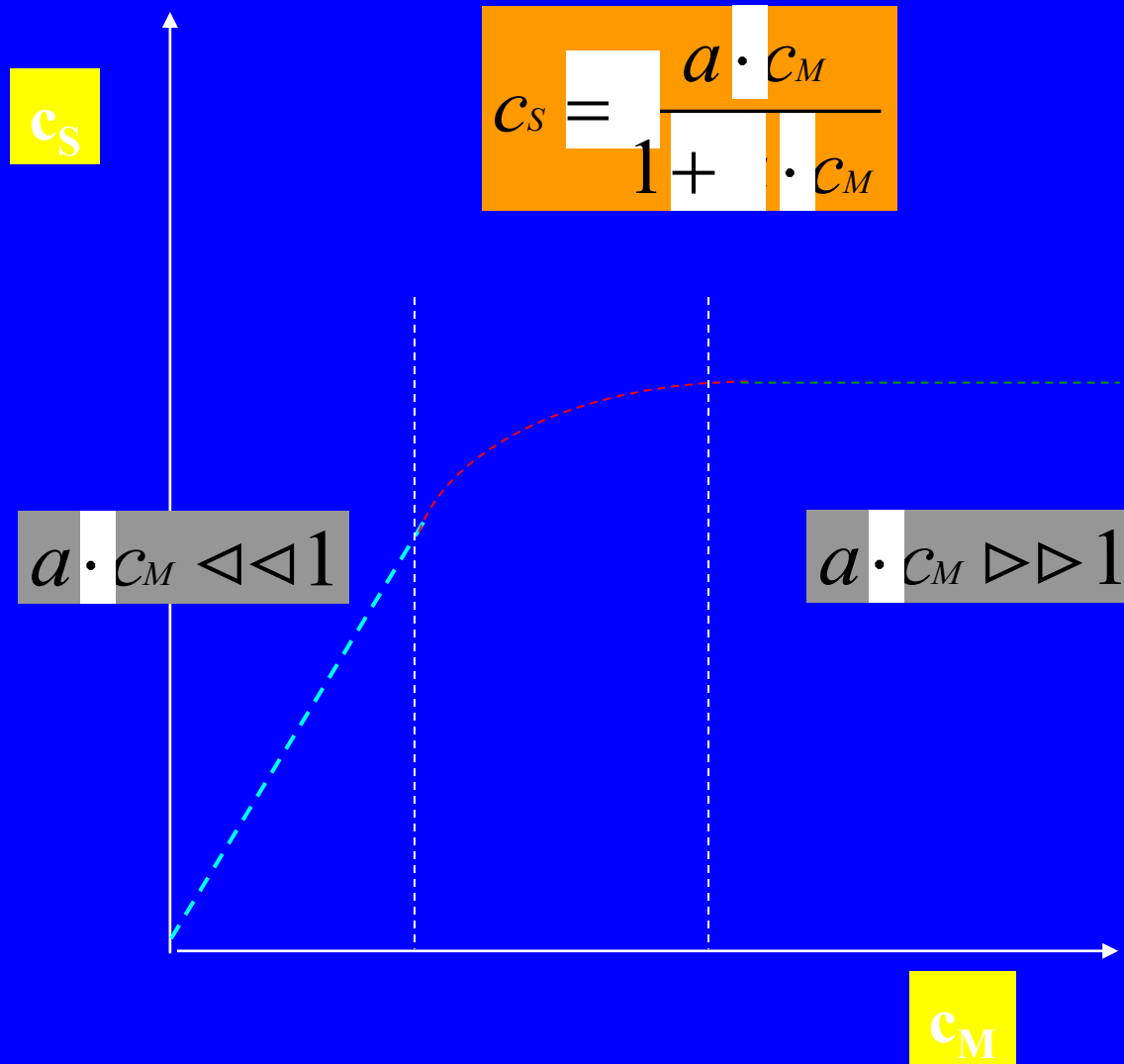


Použití – analytická PC, TLC

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 polarity mobilní fáze

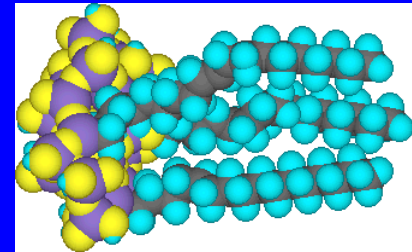
Eluotropická řada:

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

Reverzně fázová chromatografie

- Stacionární fáze – nepolární

C_8, C_{18}



- Mobilní fáze – polární – vodné roztoky

pH tlačit disociaci

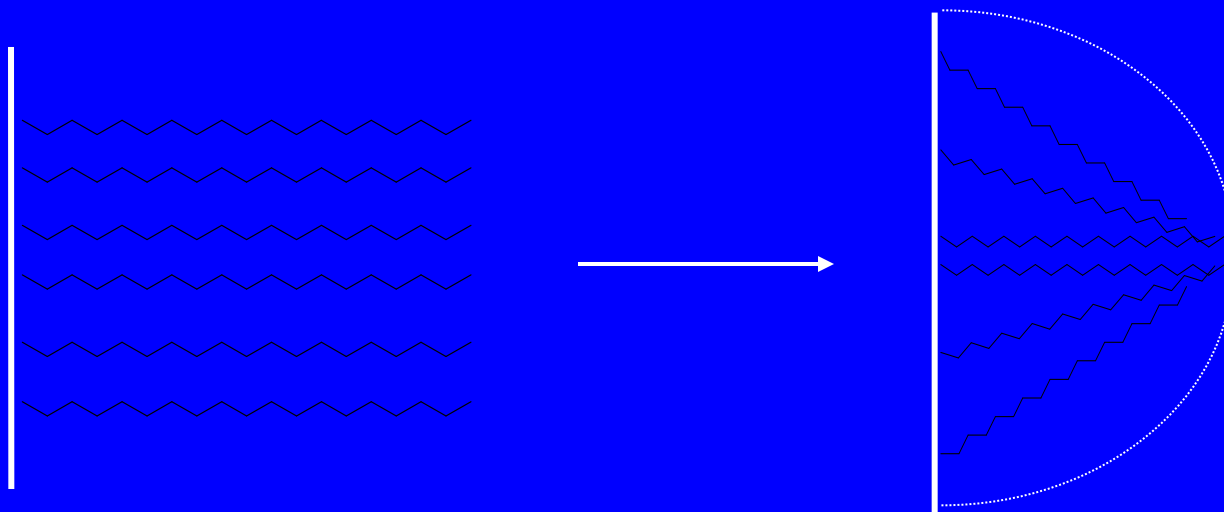
- Eluce – snižováním polarity mobilní fáze

ACN, MetOH,

Reverzně fázová chromatografie

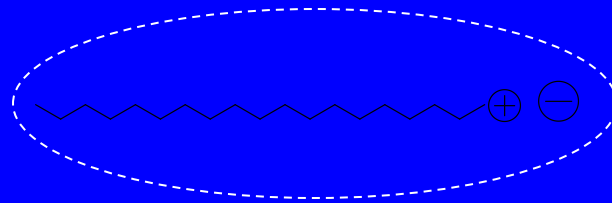
Kartáčový typ stacionární fáze

H₂O



Použití : analytické – až 90 % analýz

Iontově párová chromatografie



iontově párující činidlo

analyt

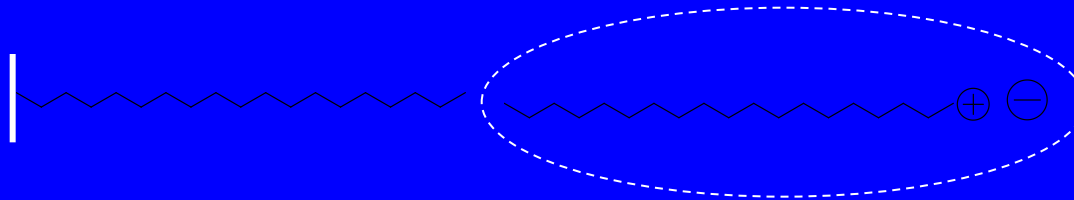
+ - SDS, HClO_4

- - tetrabutylamonium

Iontově párová chromatografie

sorbent C₁₈

iontový pár



Stacionární, mobilní faze, eluce – RPC

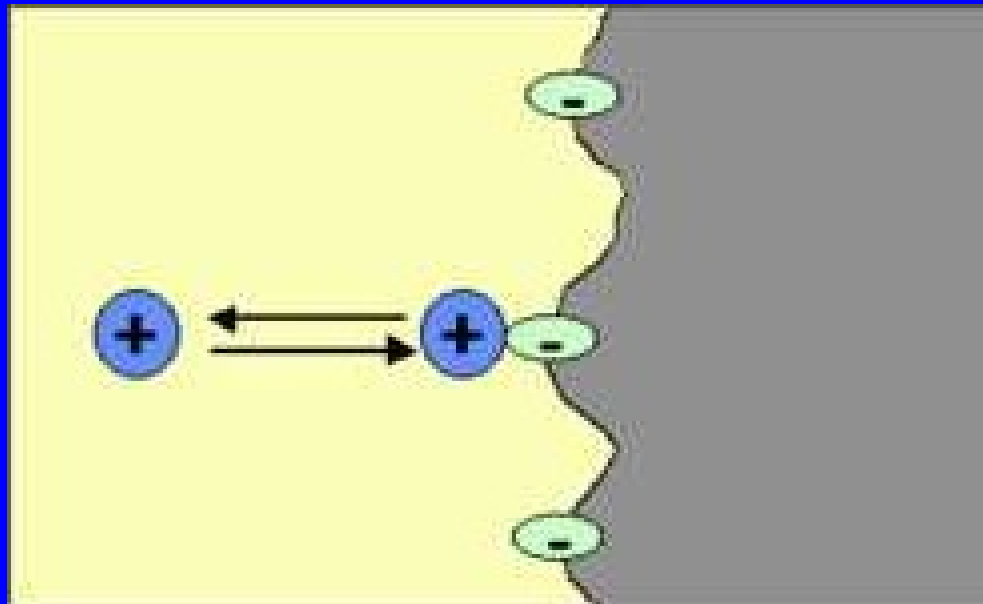
pH ná ionizace analytu

Hydrofobní chromatografie

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

Použití : purifikace bílkovin

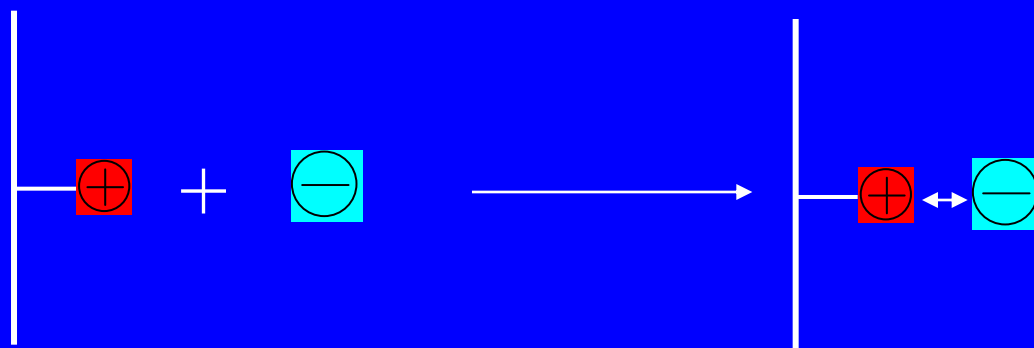
Ionexová chromatografie



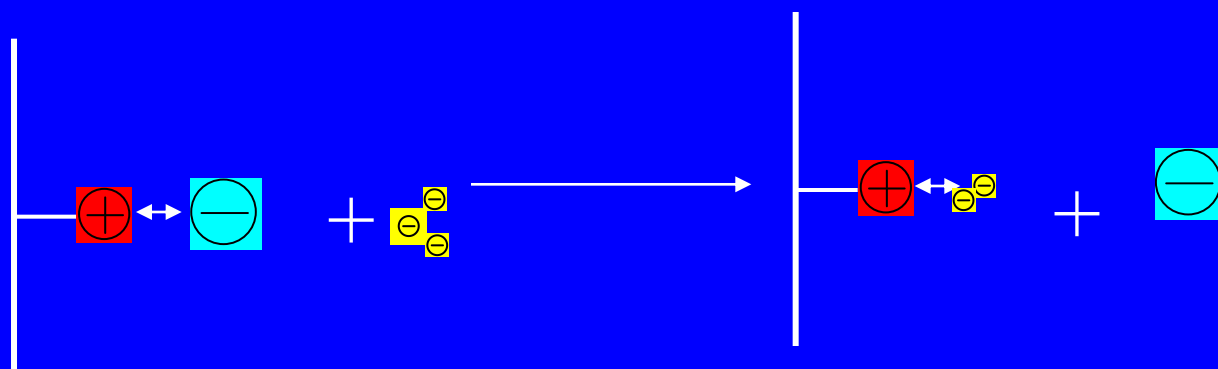
Ionexová chromatografie

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)

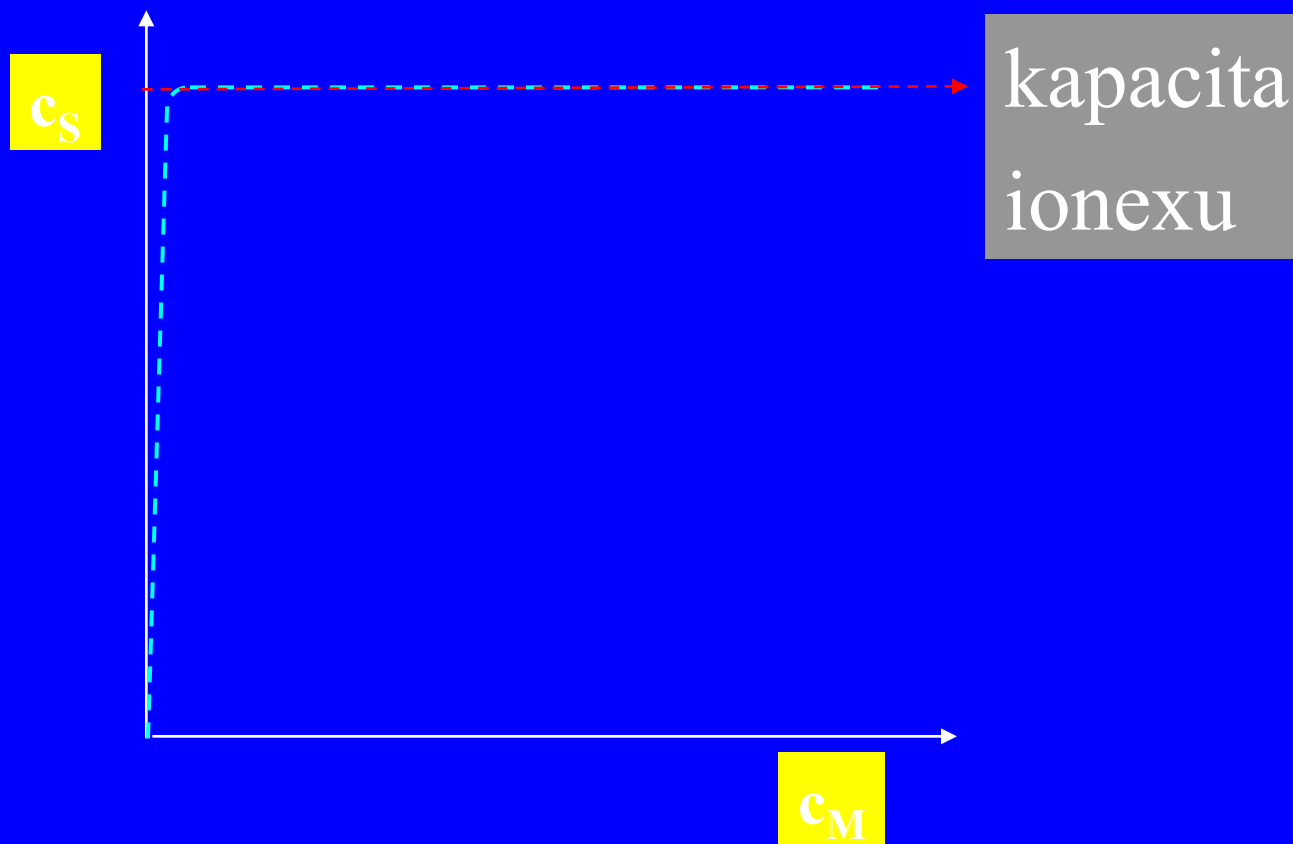
slabé – trietylaminoetyl(TEAE)

Slabý ionex

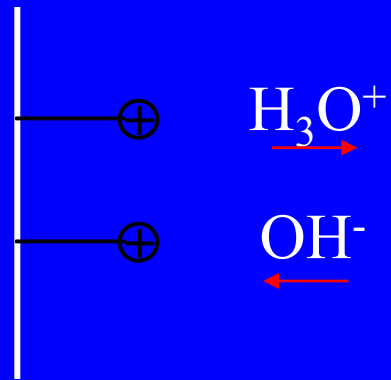
- Vykazuje změny vazebné kapacity v závislosti na pH
- Má pufrální kapacitu



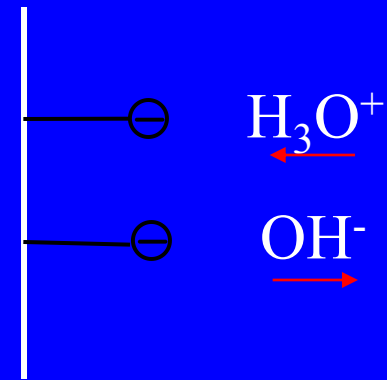
Ionexová chromatografie



Donanův efekt



zvyšování pH



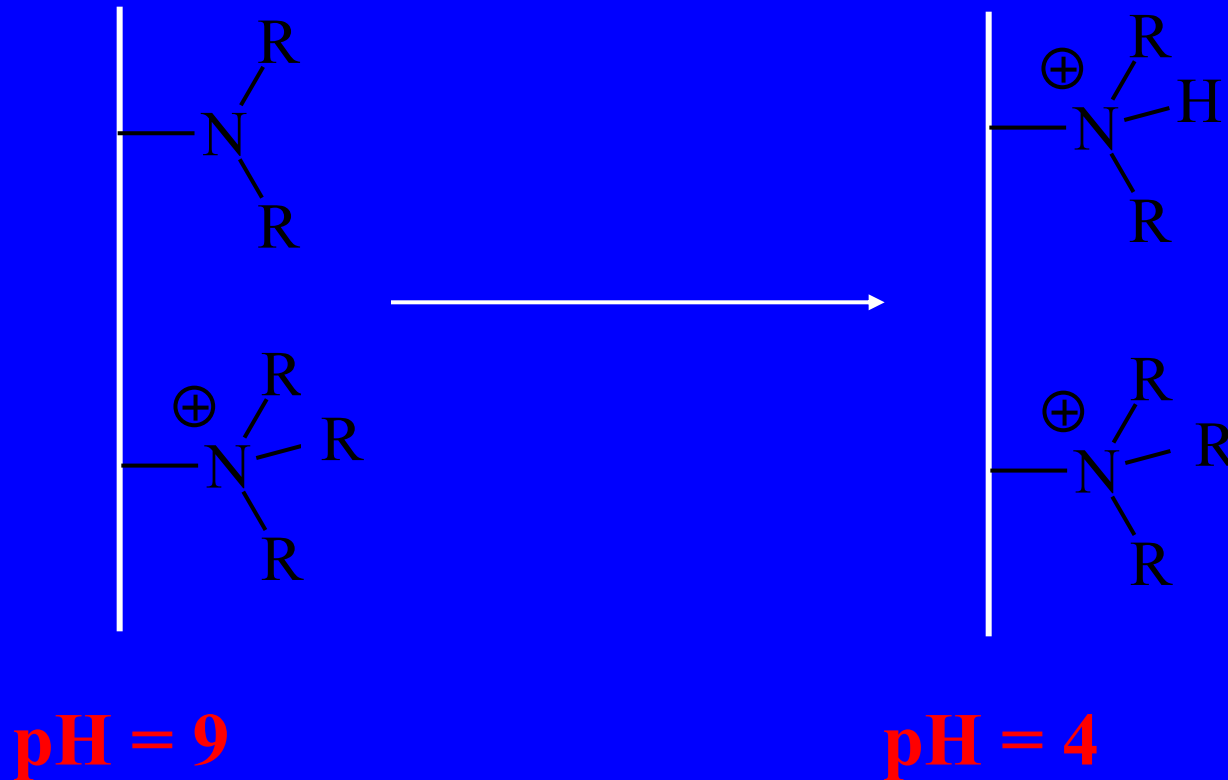
snižování pH

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

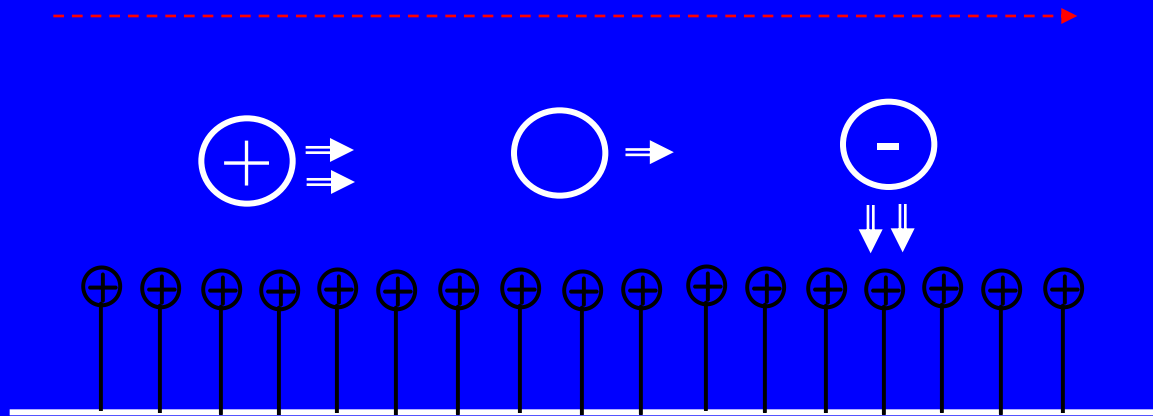


Chromatofokusace chování vzorku

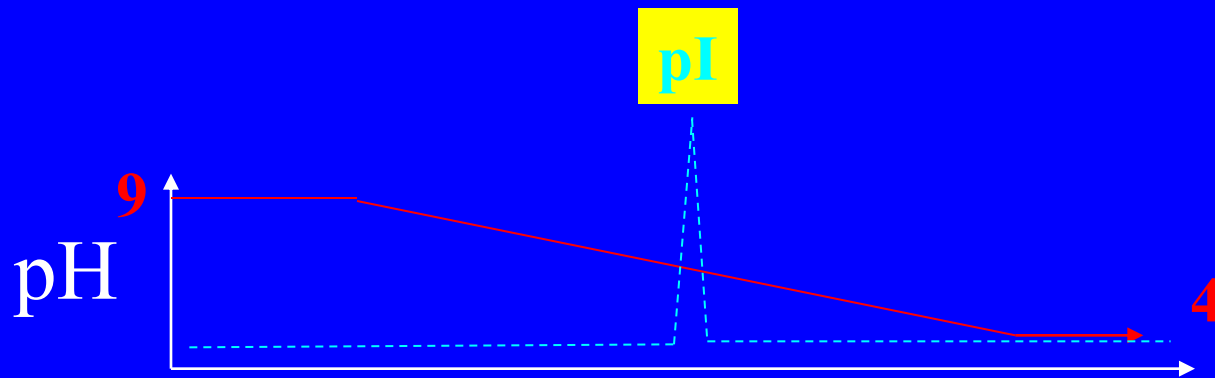
$pH \triangleleft pI$

$pH = pI$

$pH \triangleright pI$



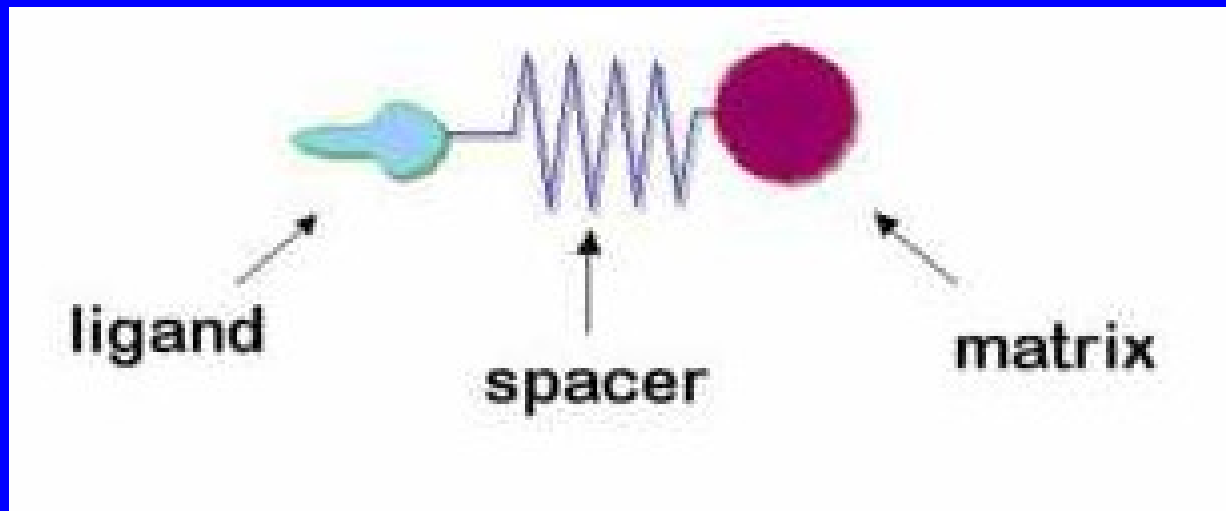
Chromatofokusace chování vzorku



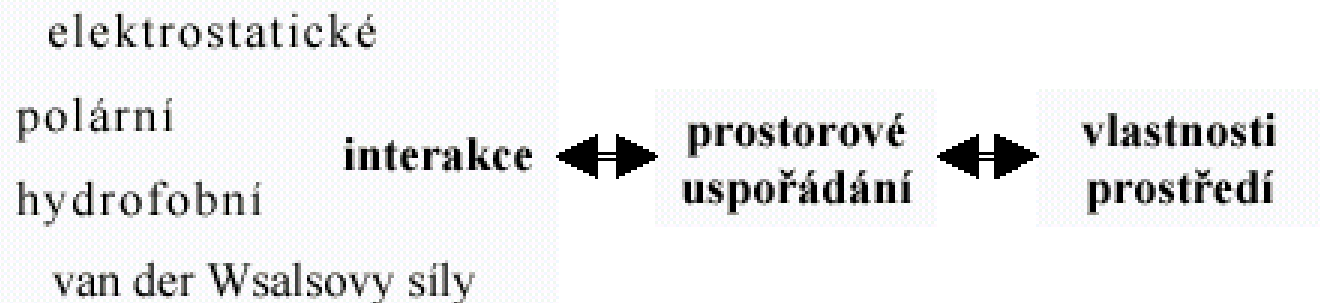
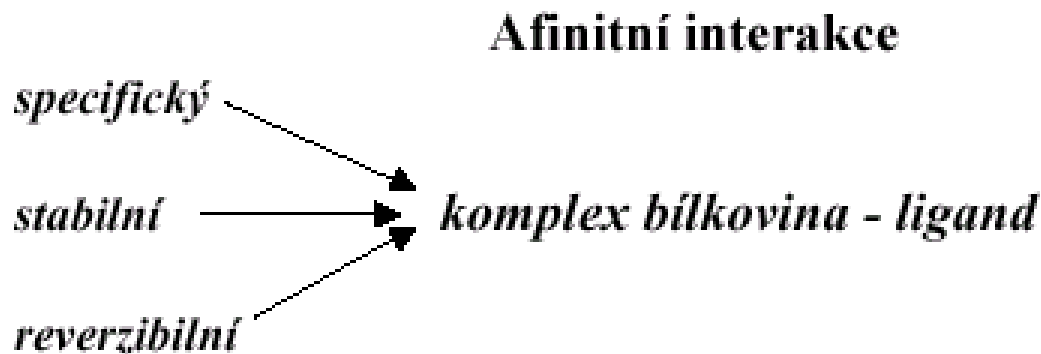
Použití : analytické – stanovení pI

preparativní – purifikace bílkovin

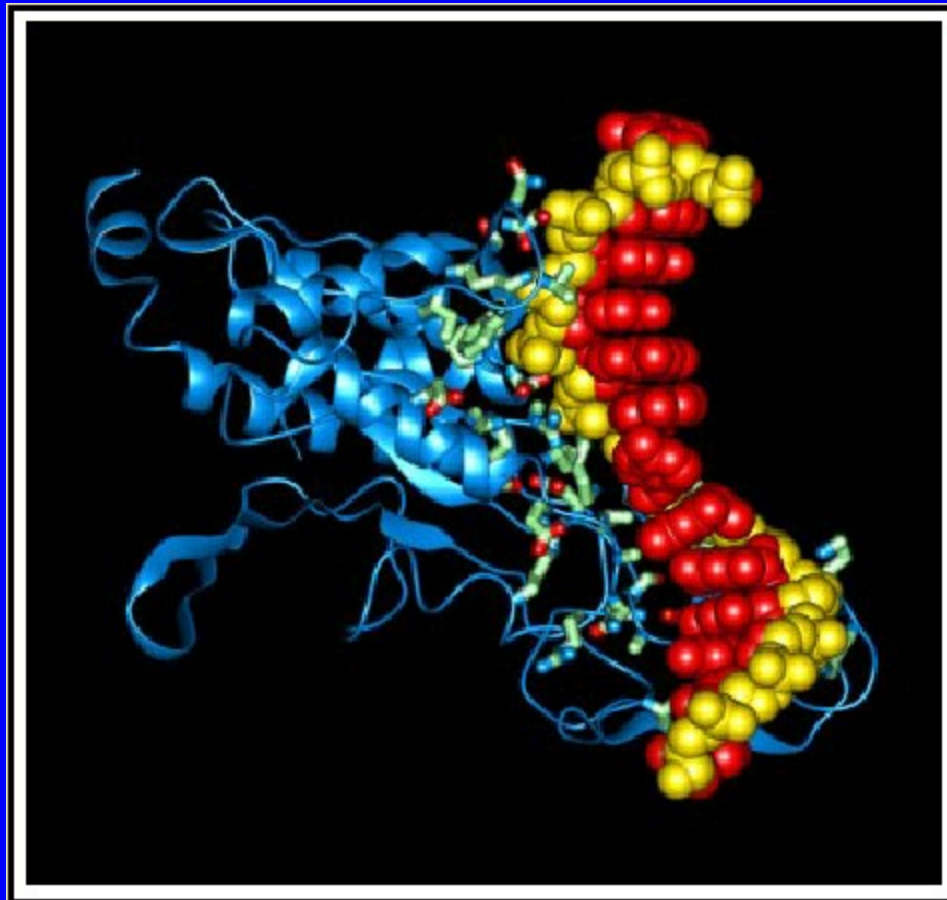
Afinní chromatografie



Afinitní interakce



Interakce mezi DNA a endonukleasou

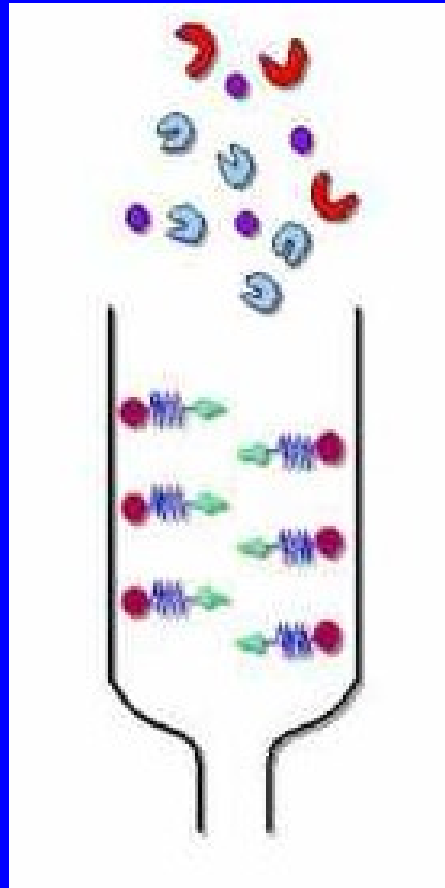


Afinitní páry

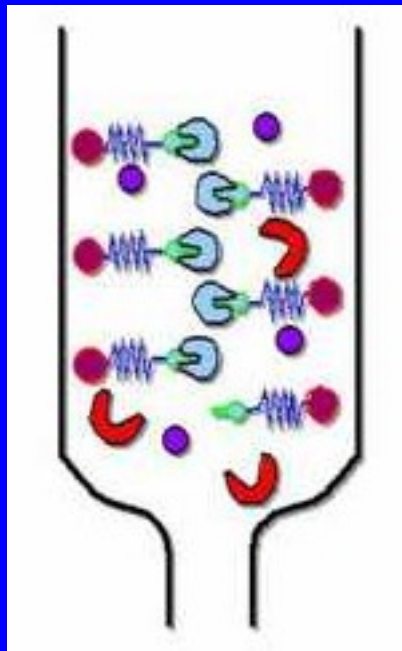
Ligand	Bílkovina	K_D (M)
antigen	polyklonální protilátka	$10^{-8} - 10^{-6}$
antigen	monoklonální protilátka	$10^{-12} - 10^{-8}$
biotin	avidin	10^{-15}
sacharid	lektin	$10^{-6} - 10^{-3}$
hormon, toxin	vazebný protein	$10^{-9} - 10^{-12}$
substrát	enzym	$10^{-7} - 10^{-3}$
inhibitor	enzym	$10^{-14}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

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

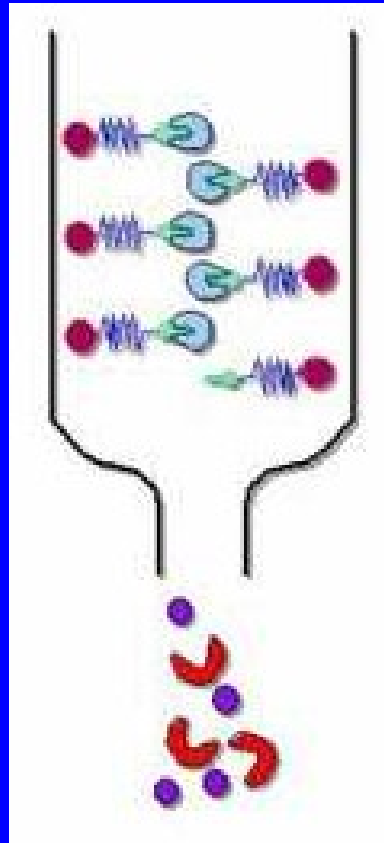
Afinní chromatografie nanesení vzorku



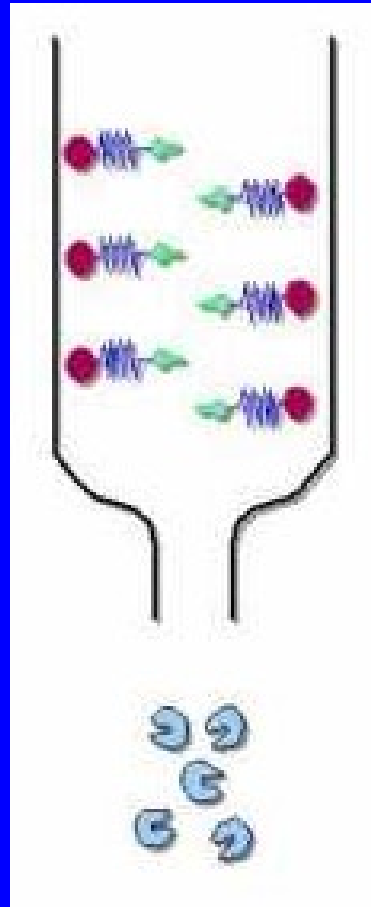
Afinní chromatografie vznik interakce



Afinní chromatografie vymytí balastů



Afinní chromatografie eluce



Předpoklady pro vznik komplexu

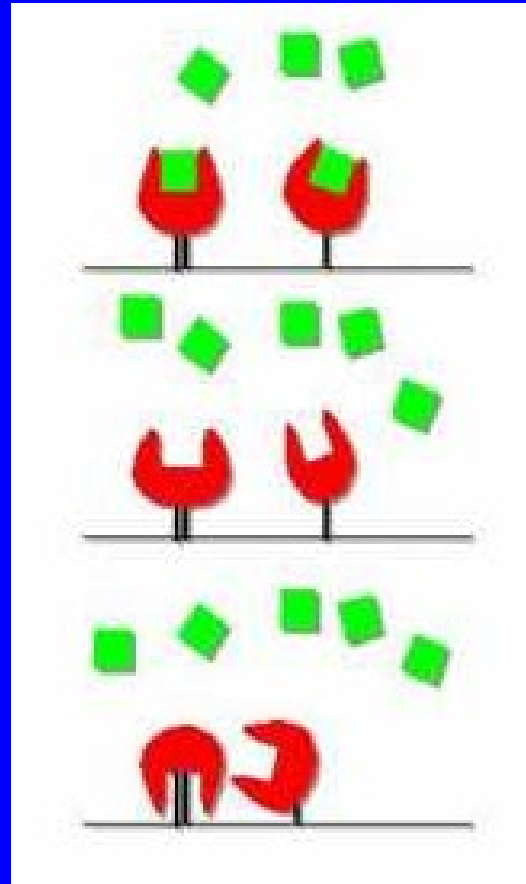
- Sterické – použití raménka (spacer)



- Optimální pH, iontová síla

Předpoklady pro vznik komplexu

- Vazebné
- Konformační

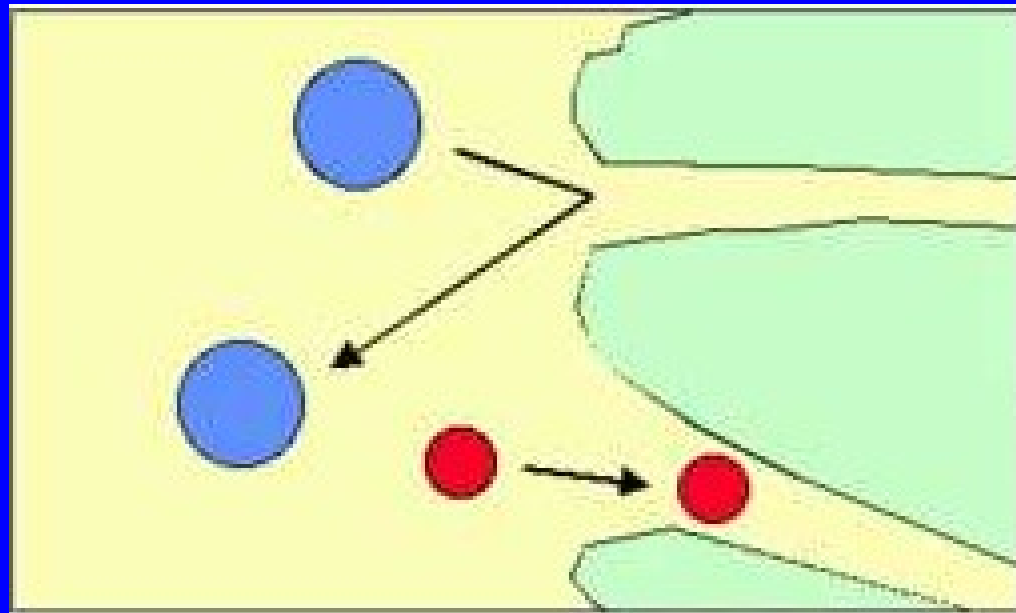


Provedení

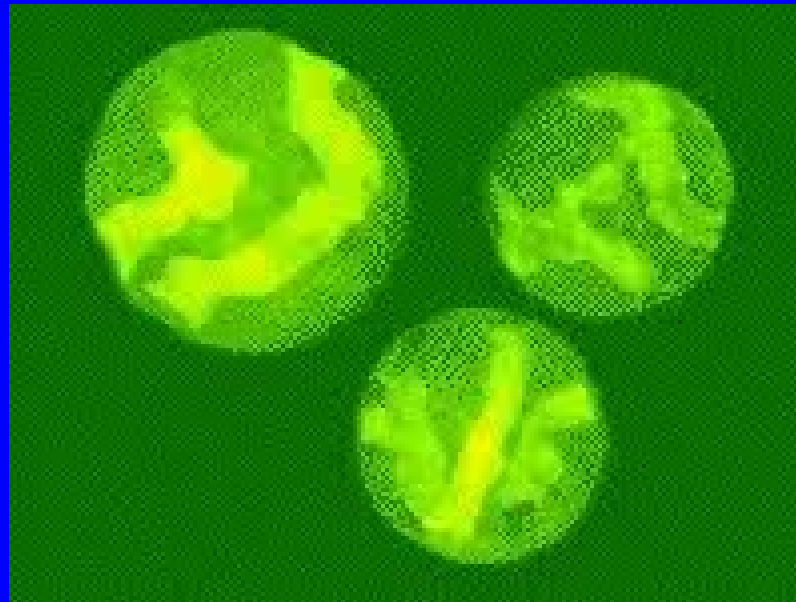
- Nanesení vzorku – nízká iontová síla
- Eluce – selektivní - volným ligandem
– neselektivní - změna pH, iontové síly, polarity

Použití : analytické (stanovení K), purifikace

Gelová permeační chromatografie

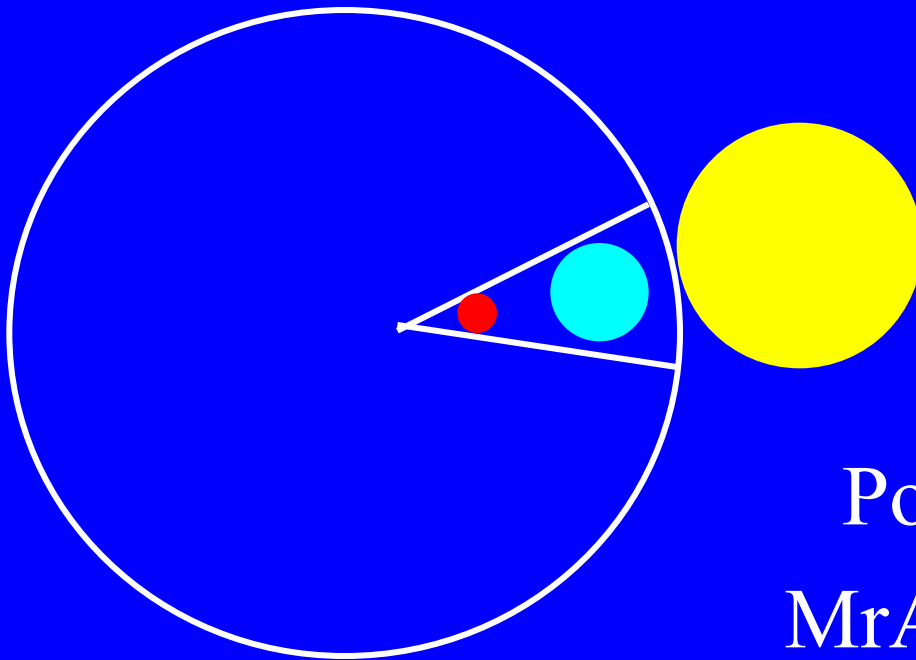


Gelová permeační chromatografie



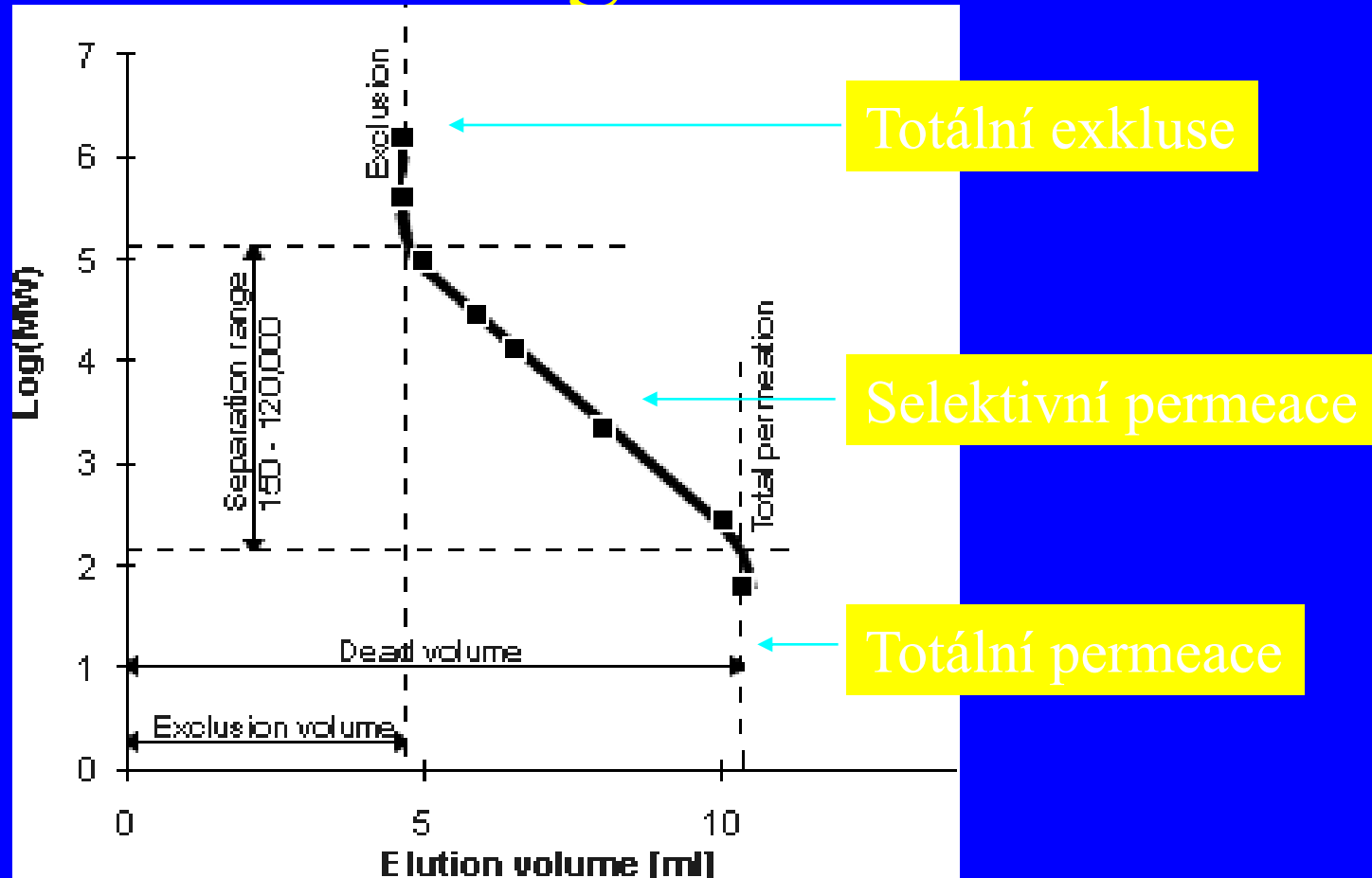
Gelová permeační chromatografie

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 - Silufol (Cz)
Watman

PC a TLC - mody

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

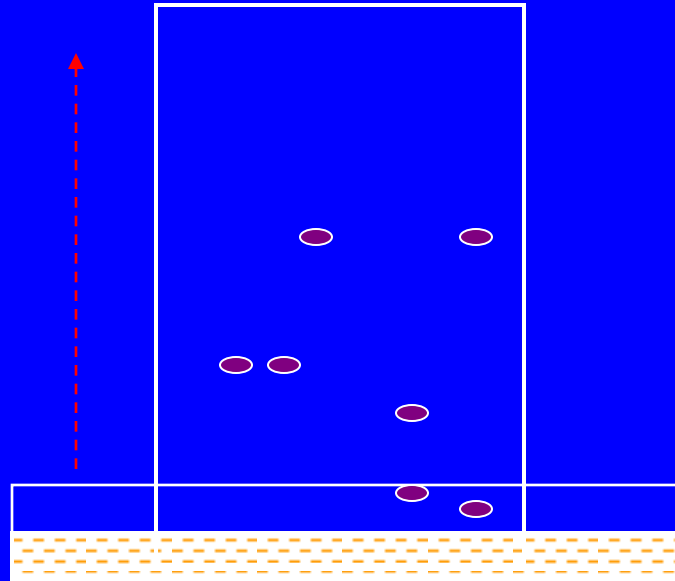
Nanášení vzorku

- Pipety
- Kapiláry

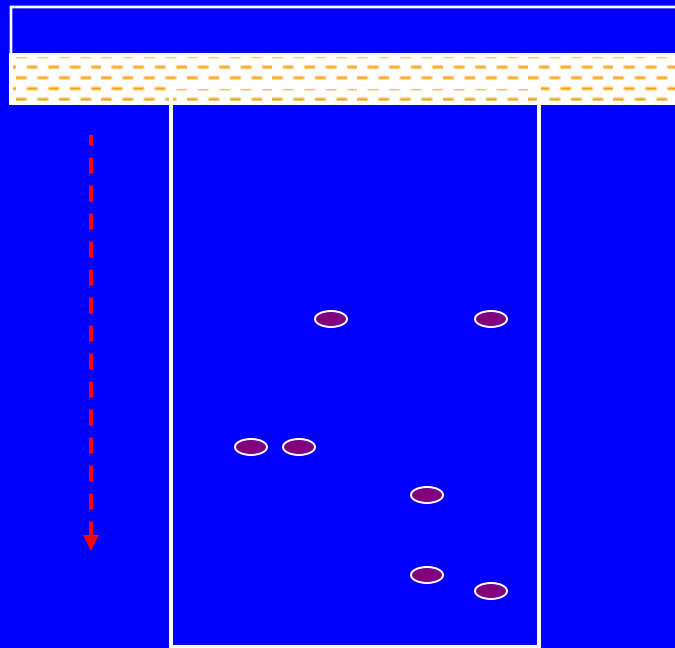
Provedení

- Vzestupné
- Sestupné
- Kruhové
- Dvojrozměrné

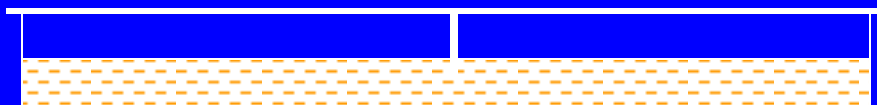
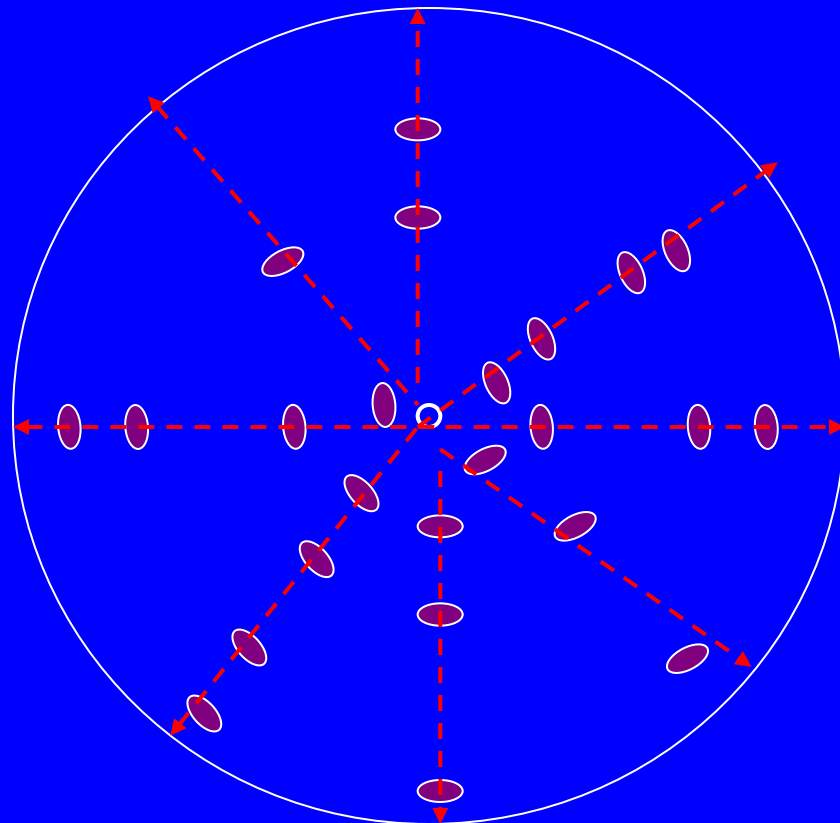
Vzestupné



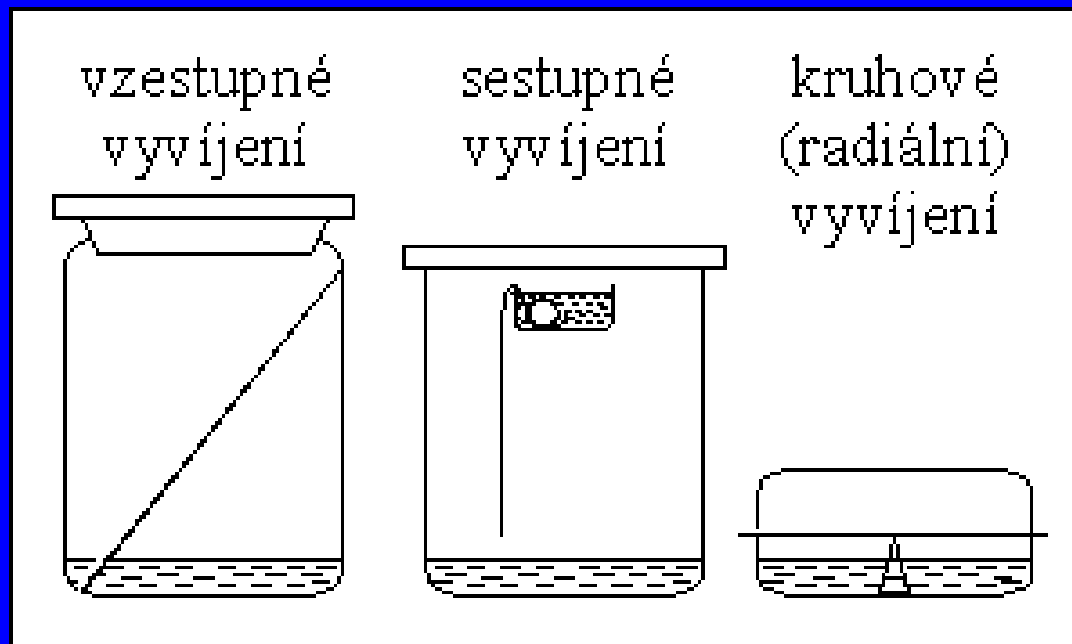
Sestupné



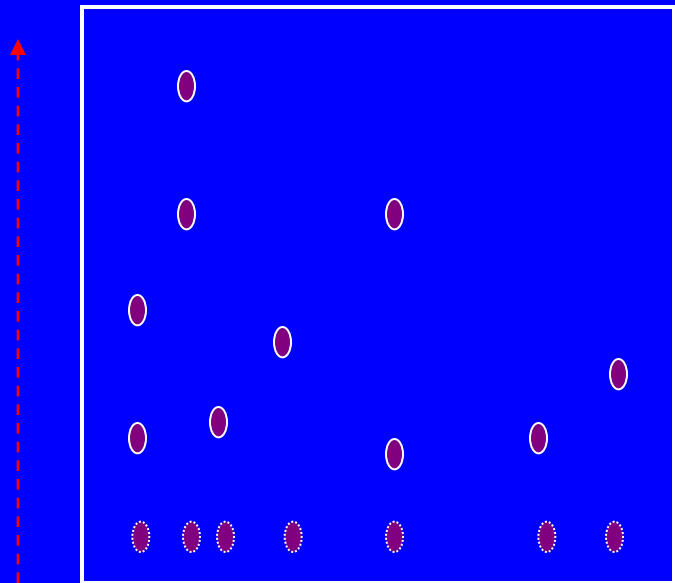
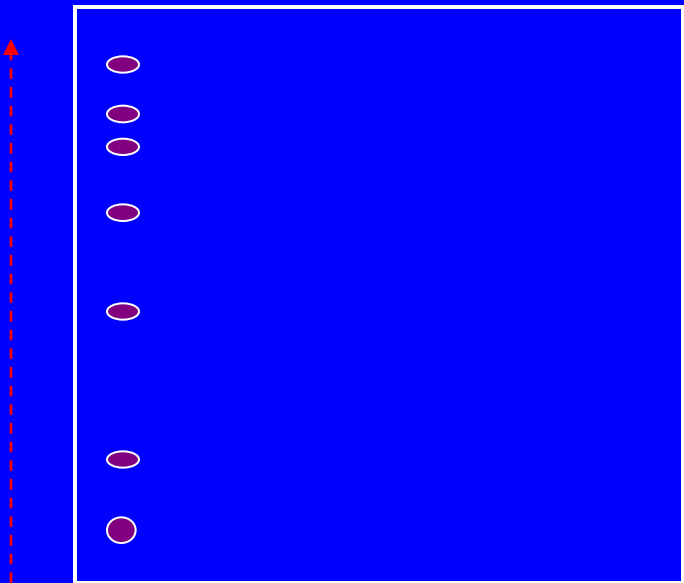
Kruhové



Vyvíjení



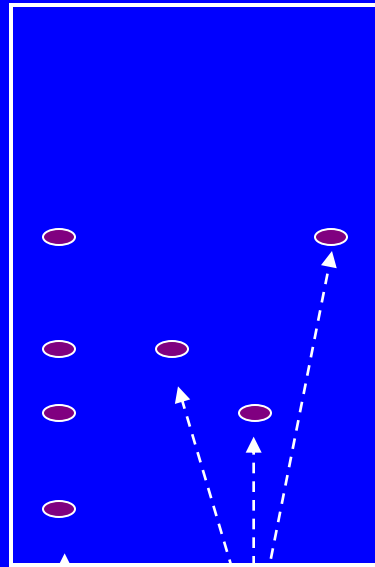
Dvojrozměrné



Provedení

- Analytické
- Preparativní

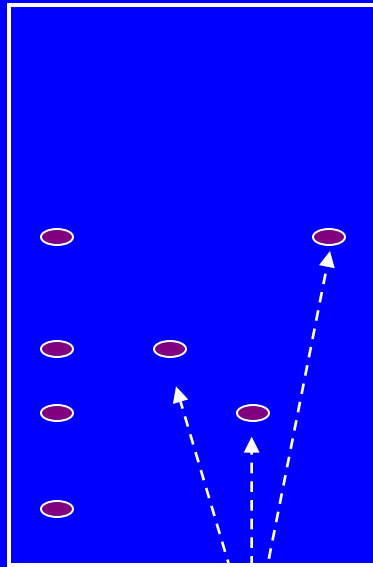
Analýza kvalitativní



standards vzorky

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

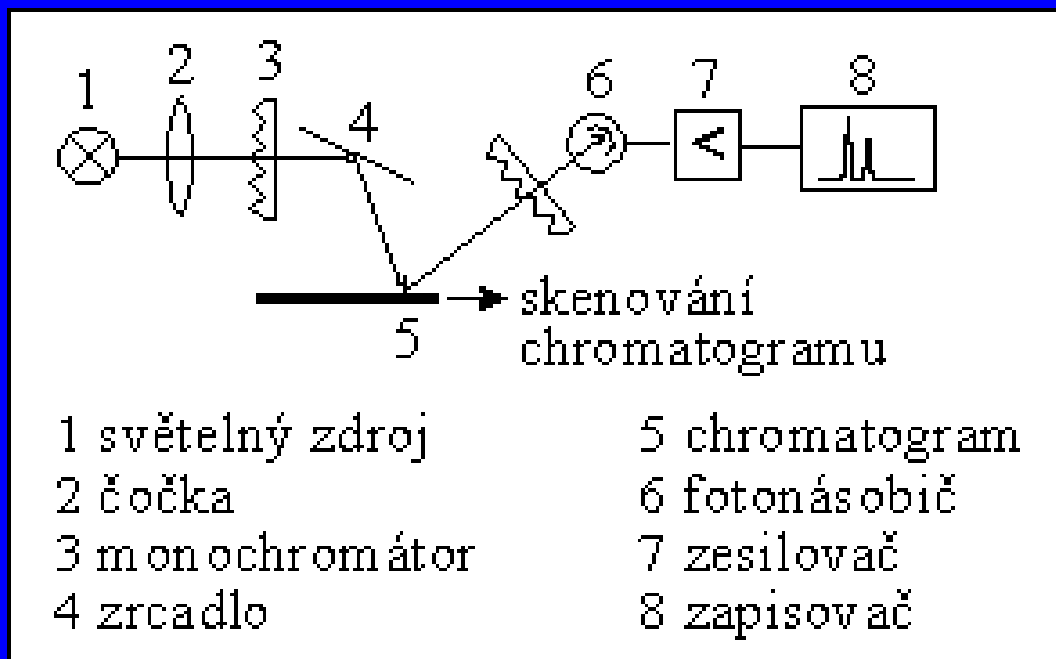
Analýza kvantitativní



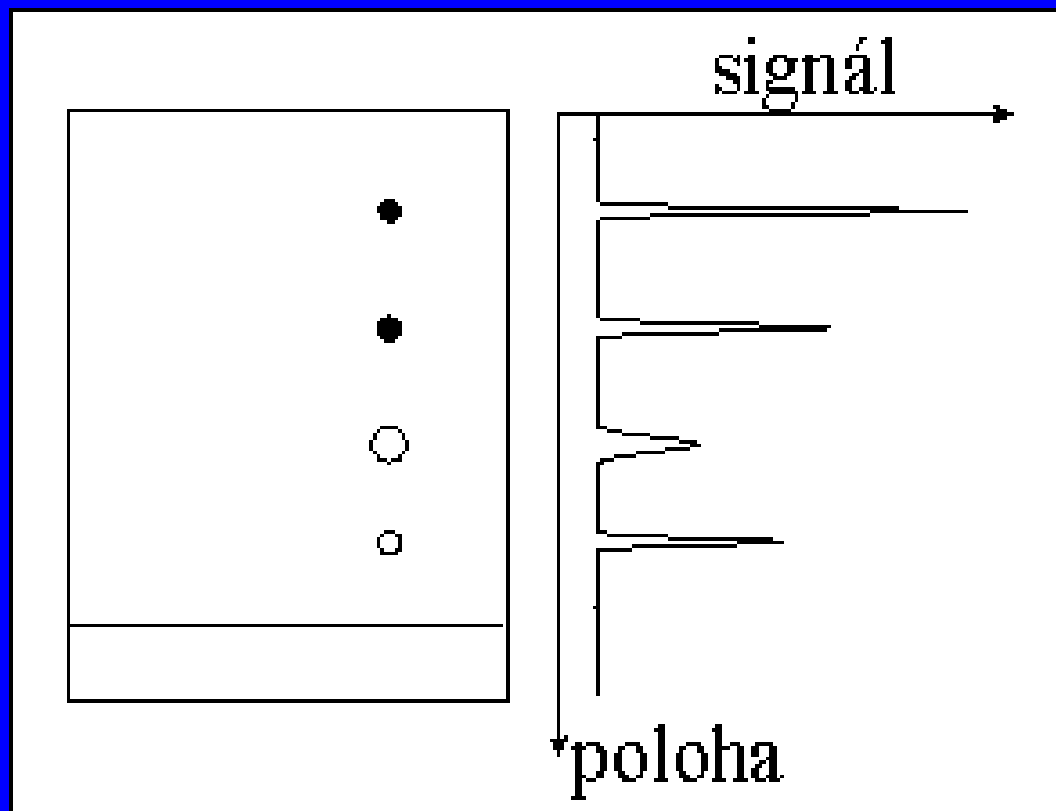
**Plocha
skvrn**

- Planimetrie
- Densitometrie

Denzitometrie



Denzitometrie



Preparace

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

Chromatografie



Chromatografie

- Cvet – separace chlorofylů na CaCO_3 1901
termín „Chromatografie“ 1906

Kapalinová chromatografie rozdělení

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

Kapalinová chromatografie využití

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

Kapalinová chromatografie

doba trvání

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

Zařízení pro LPC

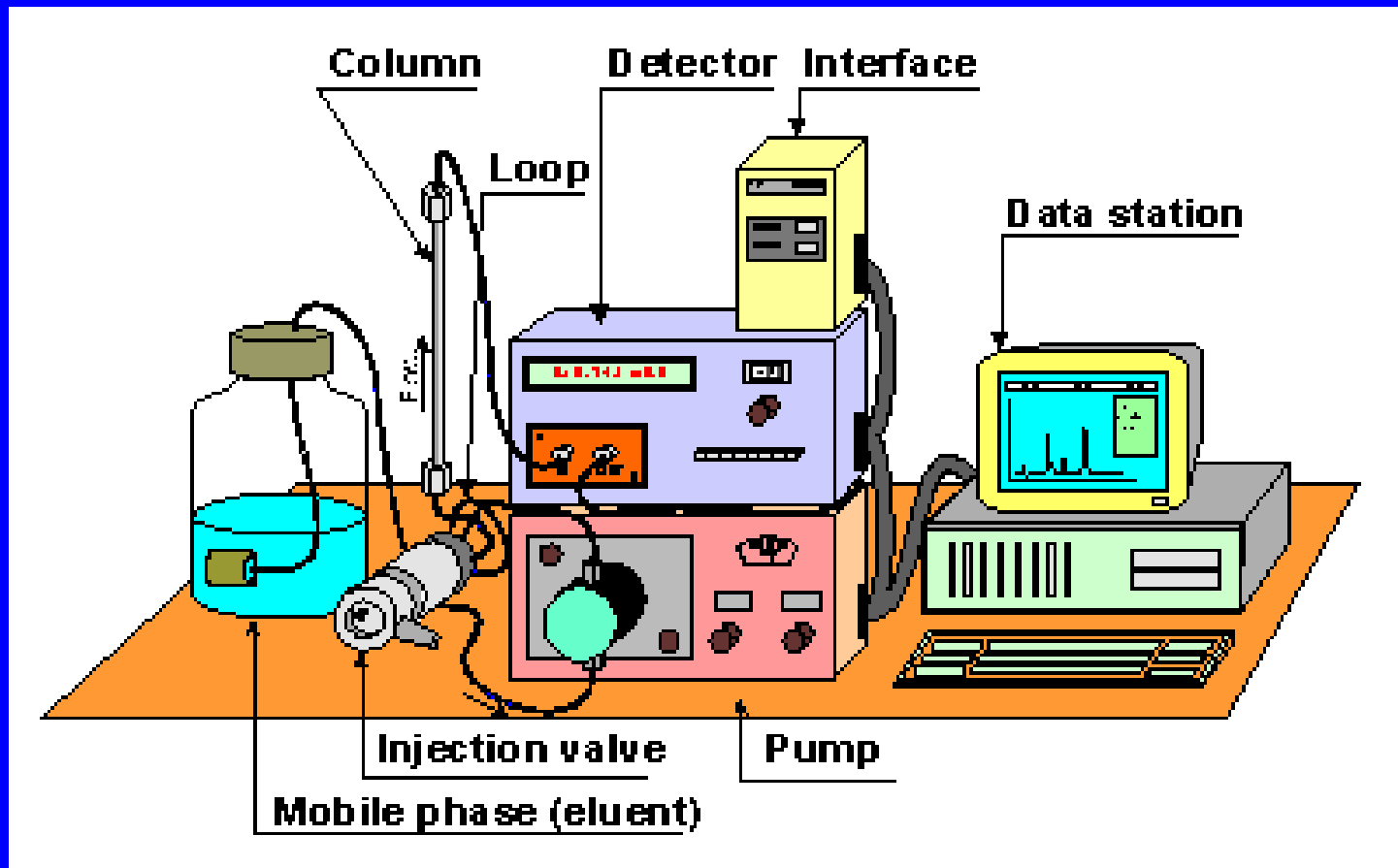


Instrumentace pro LPC

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

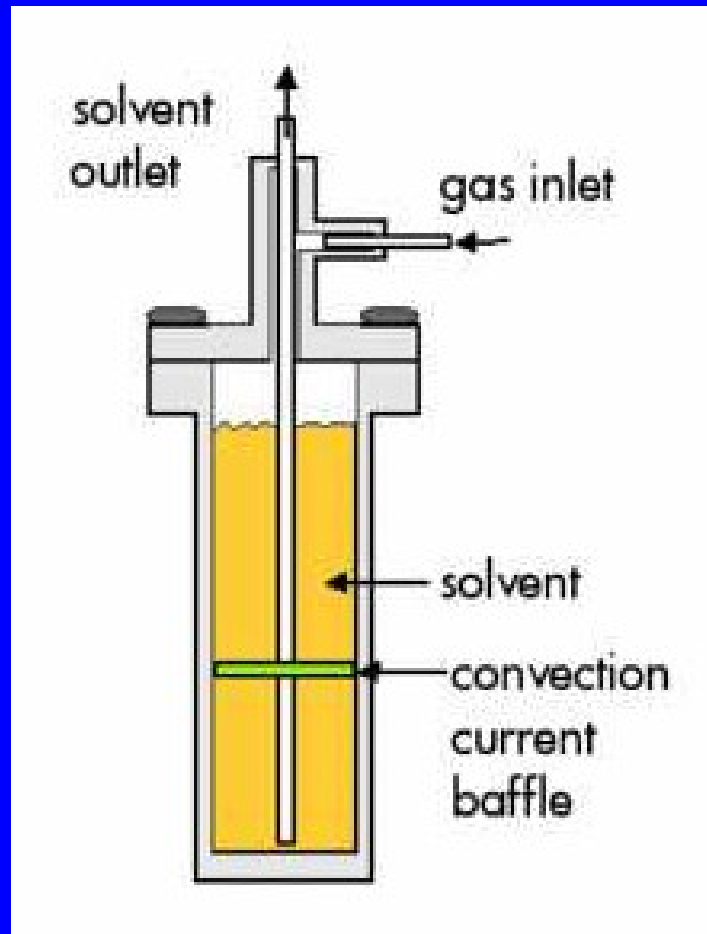
Instrumentace pro FPLC a HPLC

Zařízení pro HPLC

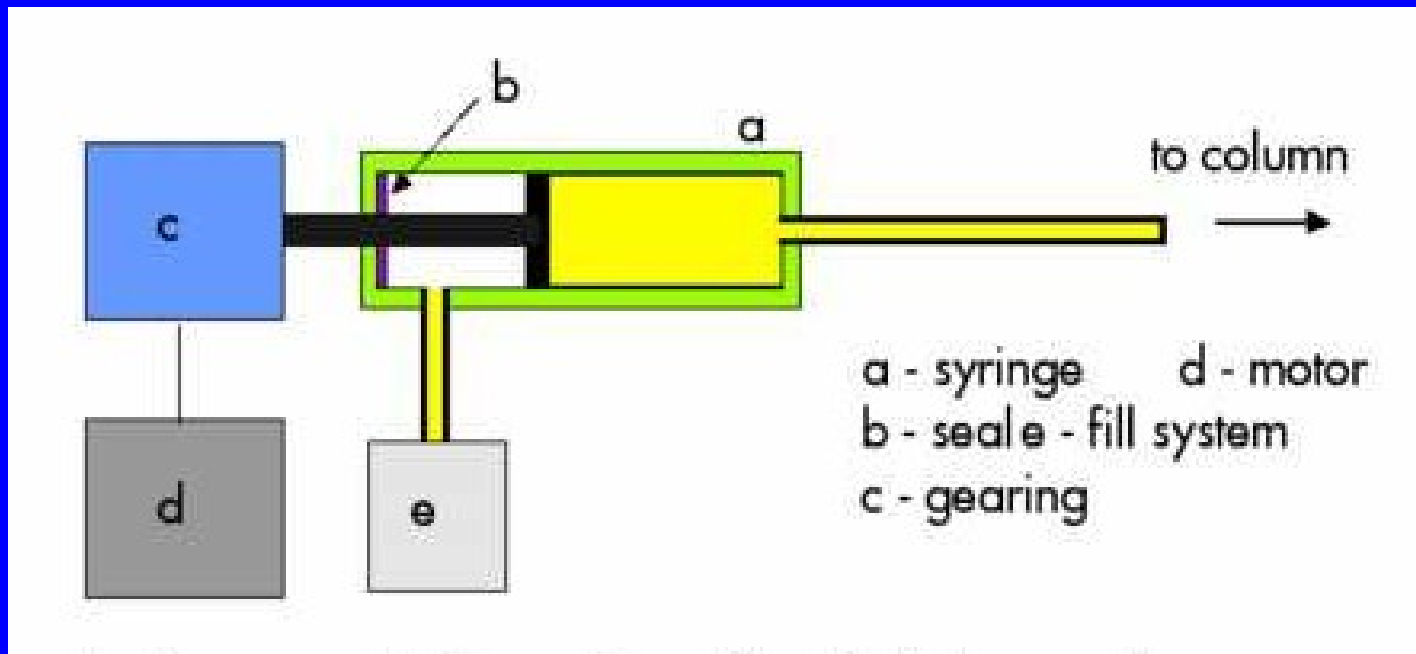


Pumpy

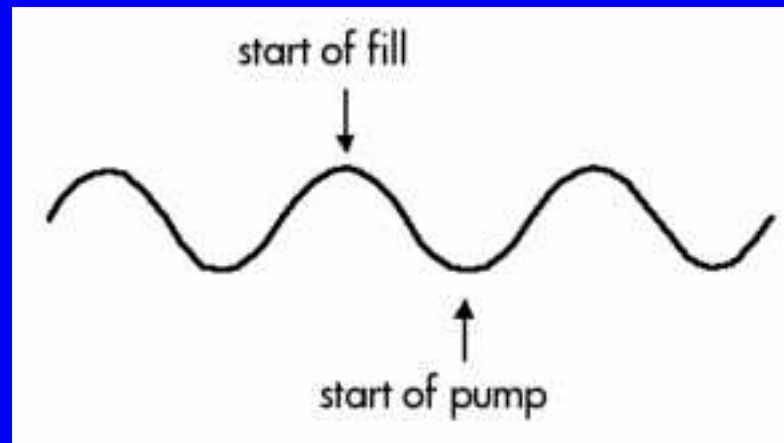
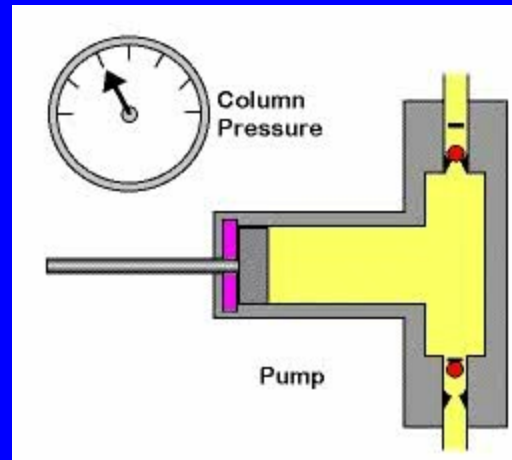
Tlaková pumpa



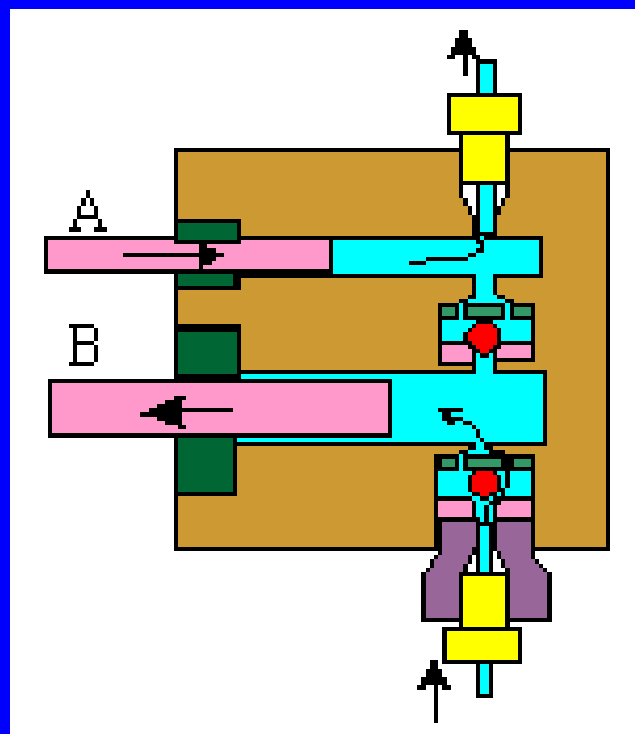
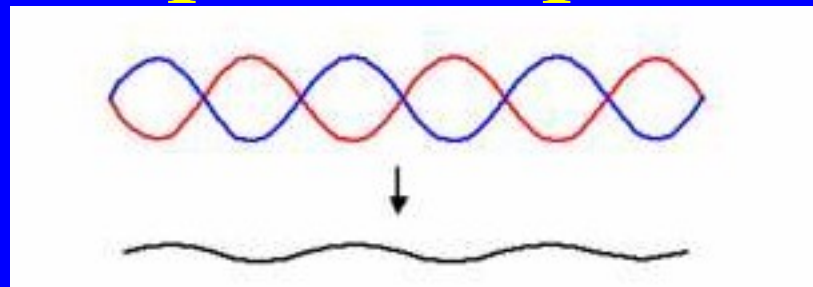
Lineární dávkovače



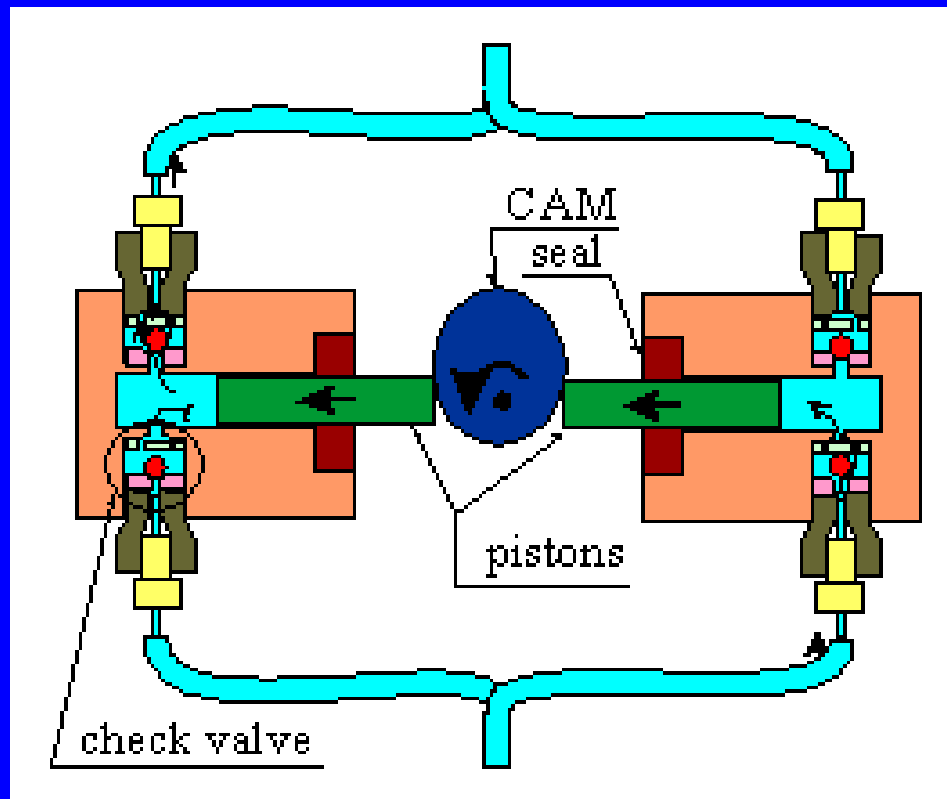
Pumpa jednopístová



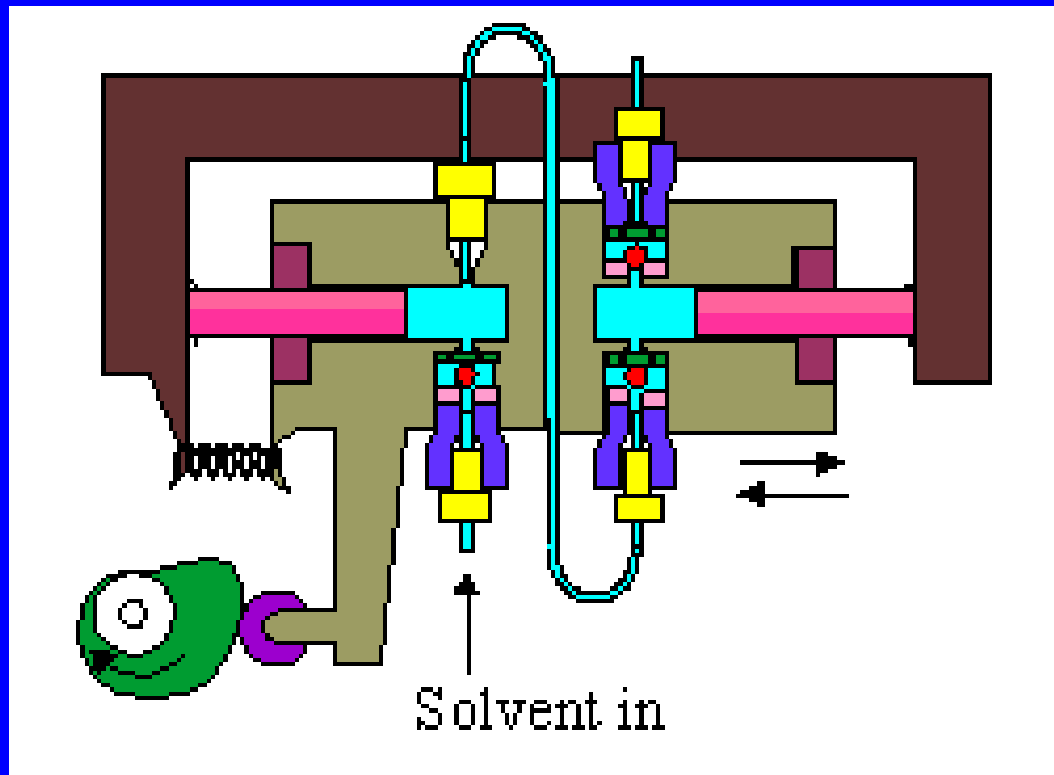
Pumpa dvoupístová



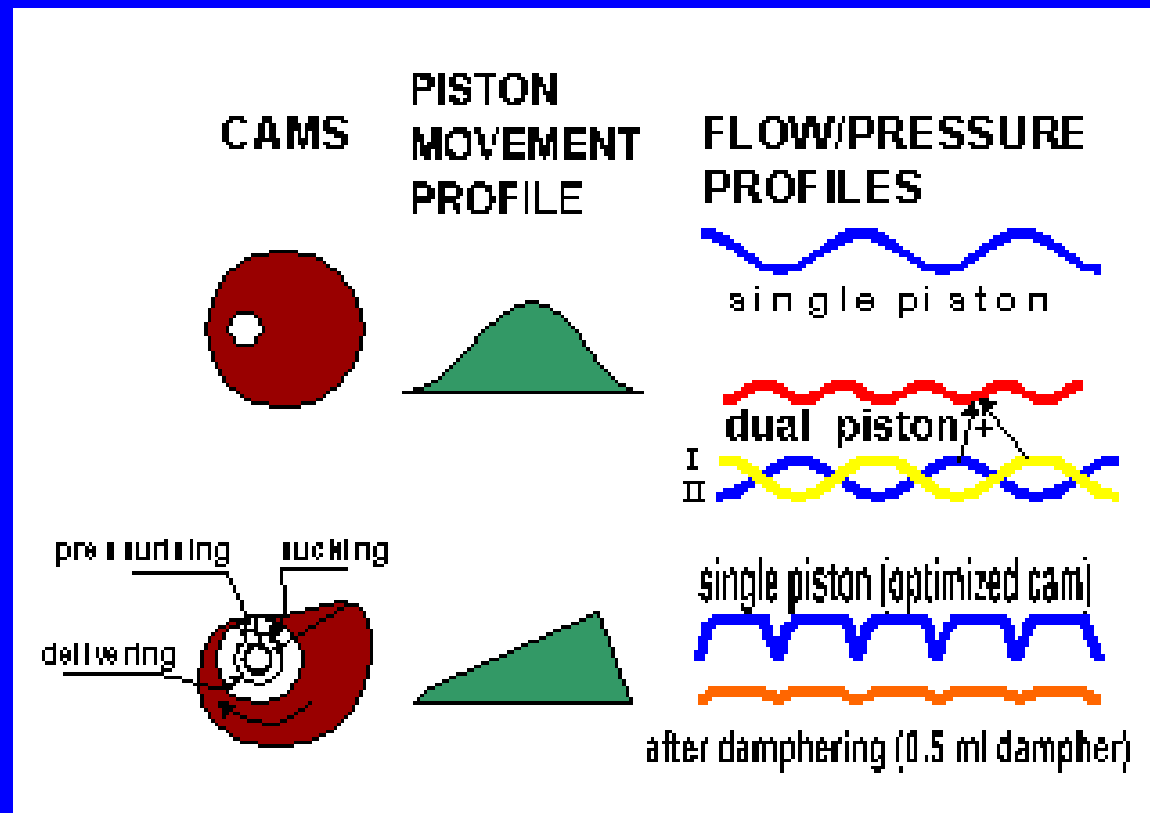
Pumpa dvoupístová



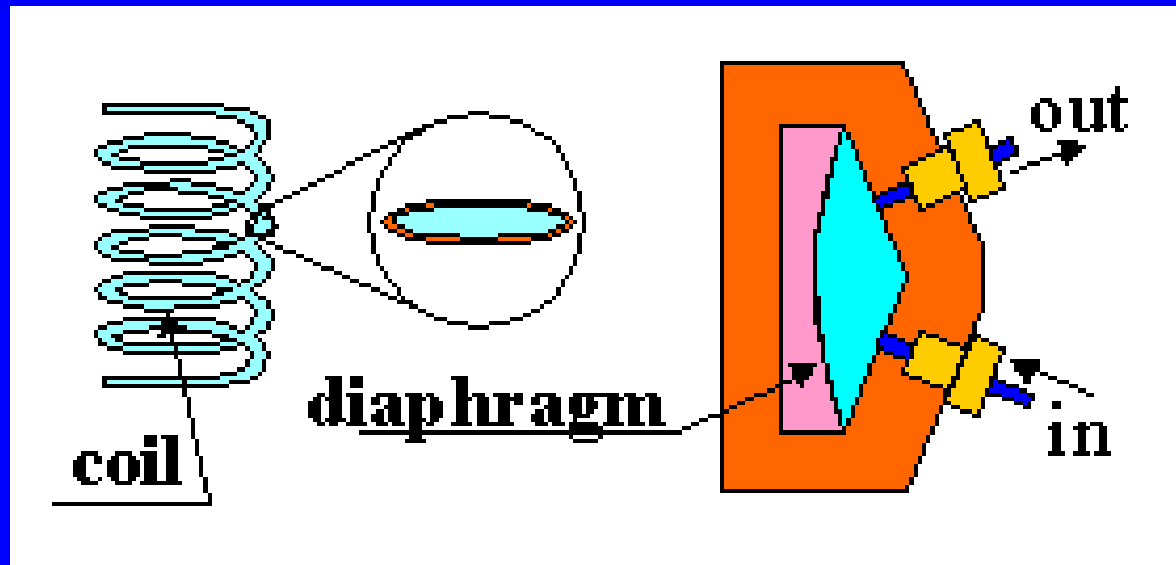
Pumpa dvoupístová



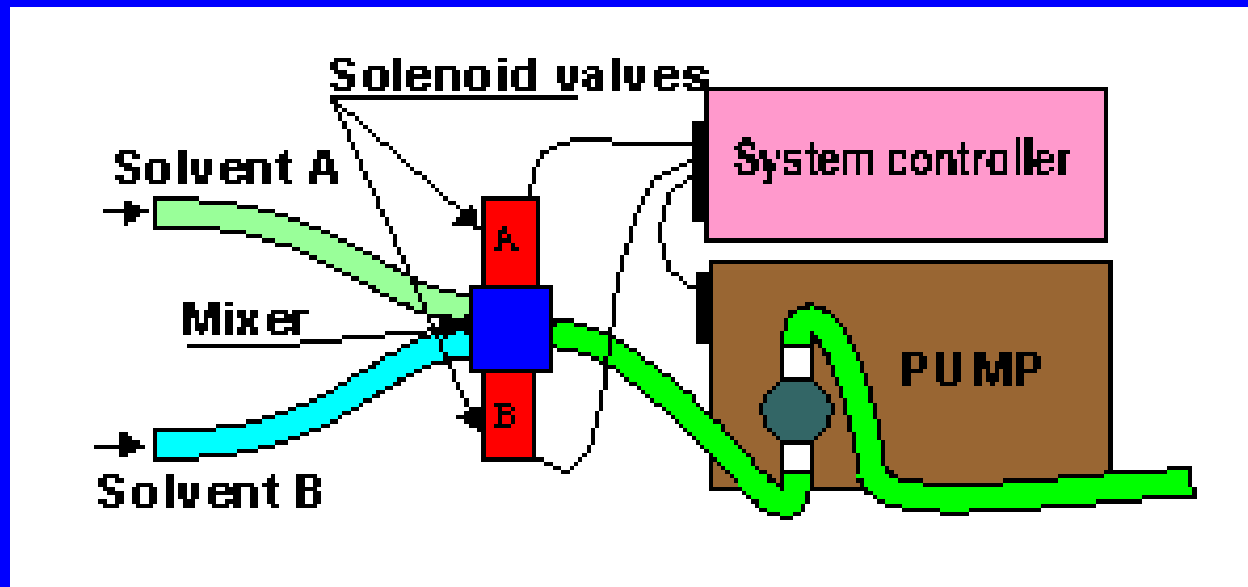
Tlumení pulsů



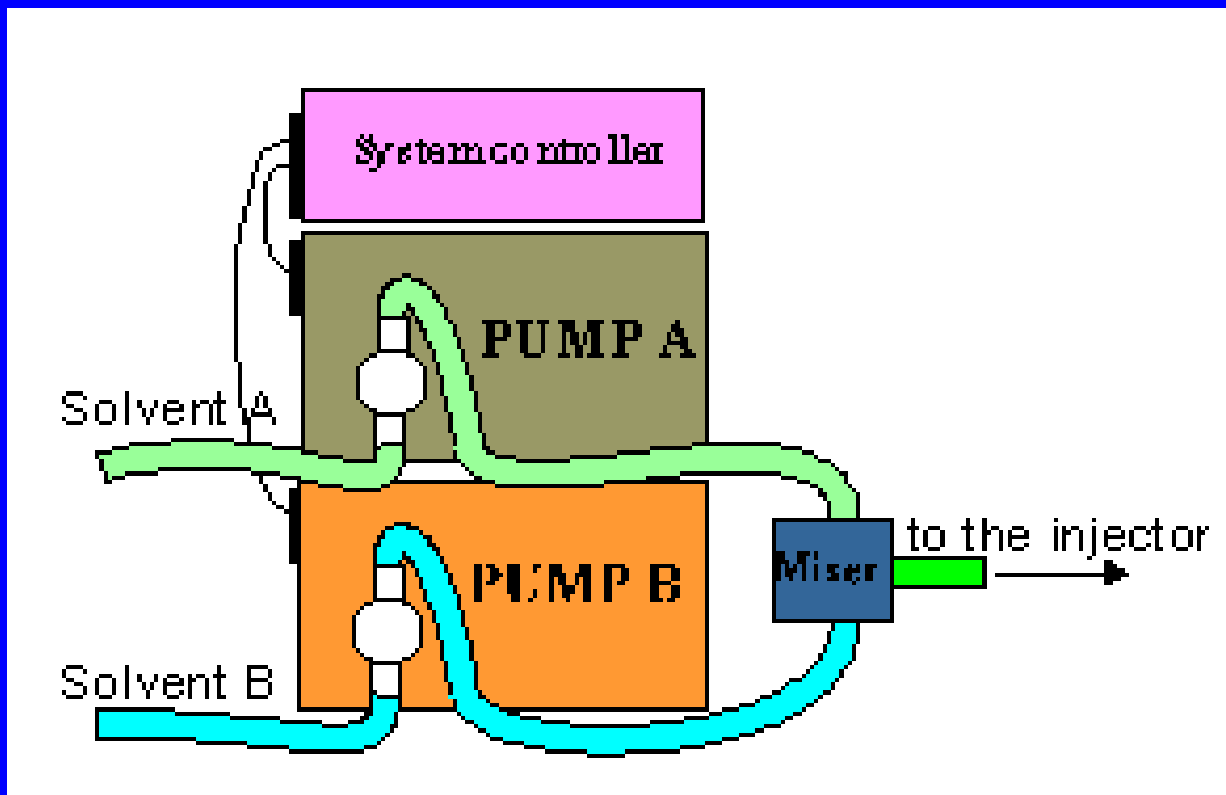
Tlumení pulsů



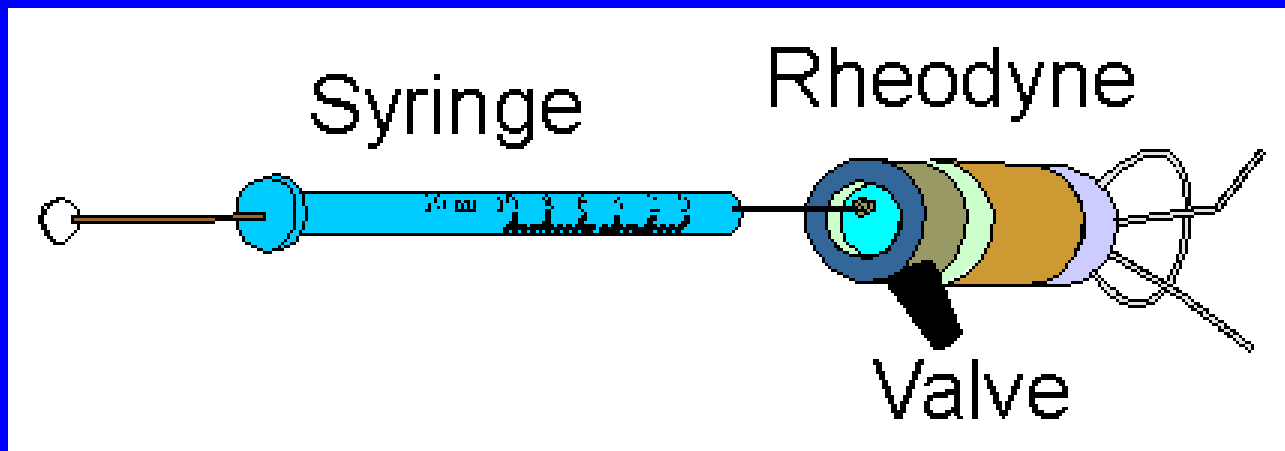
Gradient nízkotlaký



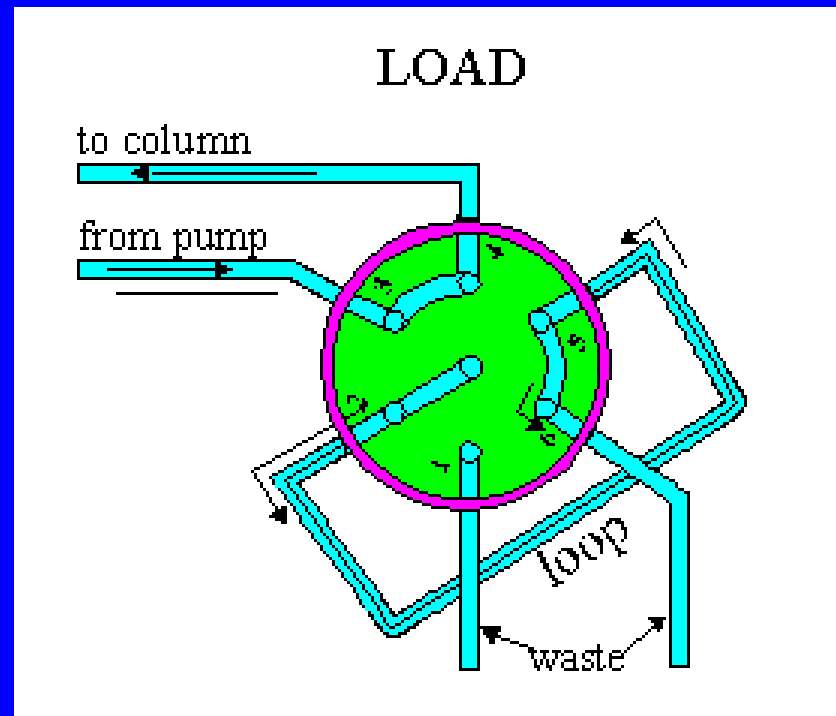
Gradient vysokotlaký



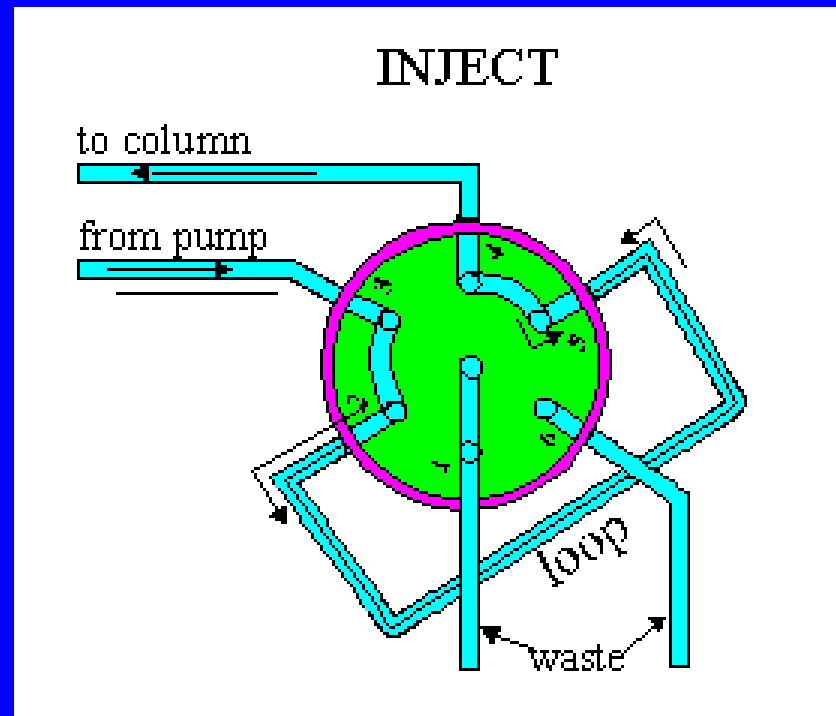
Dávkování – dávkovací ventil



Dávkovací ventil – „Load“

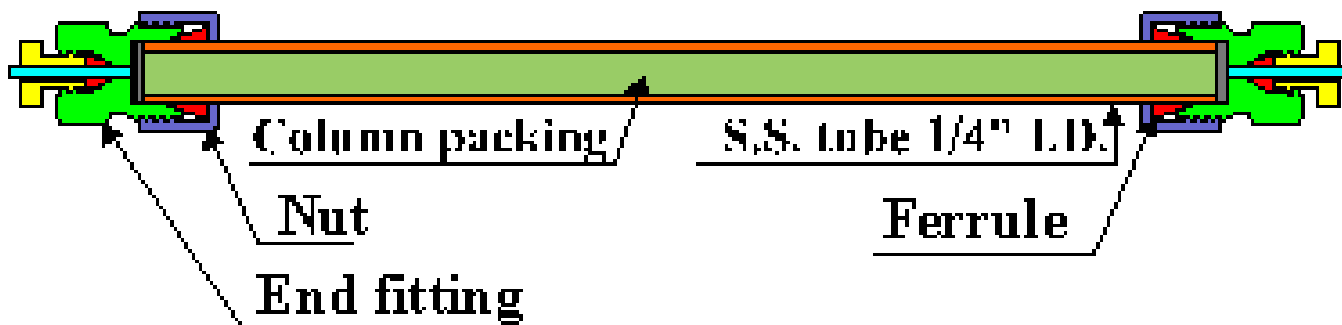


Dávkovací ventil – „Inject“

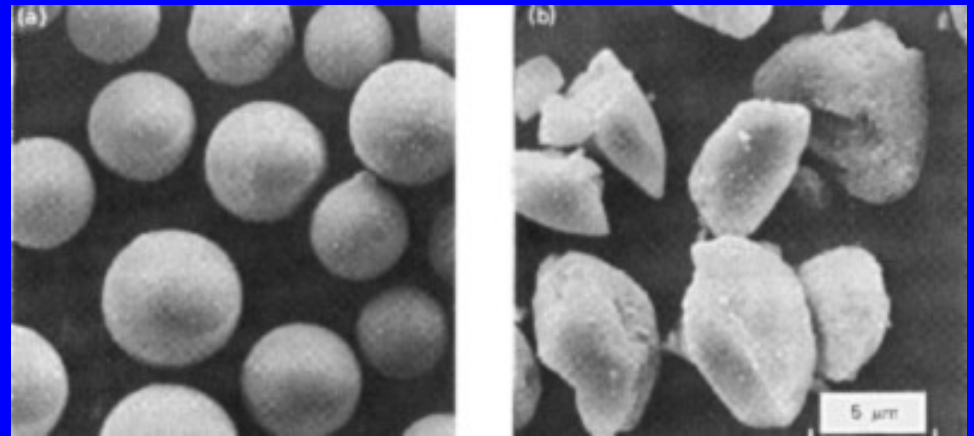
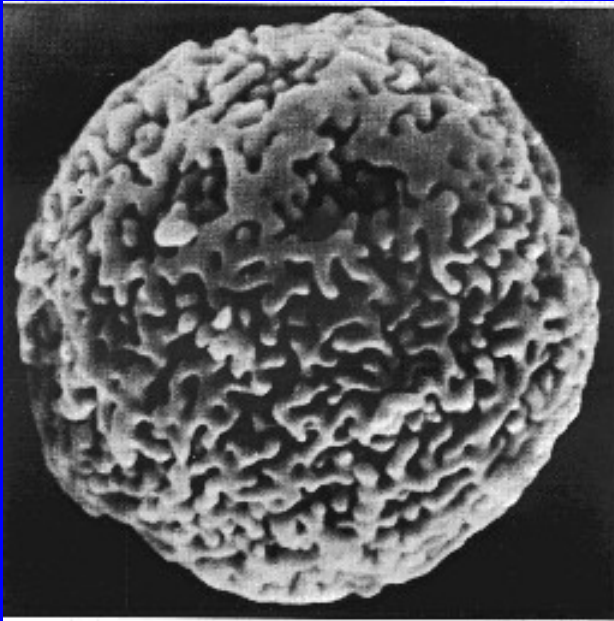


Kolona

Standart column hardware

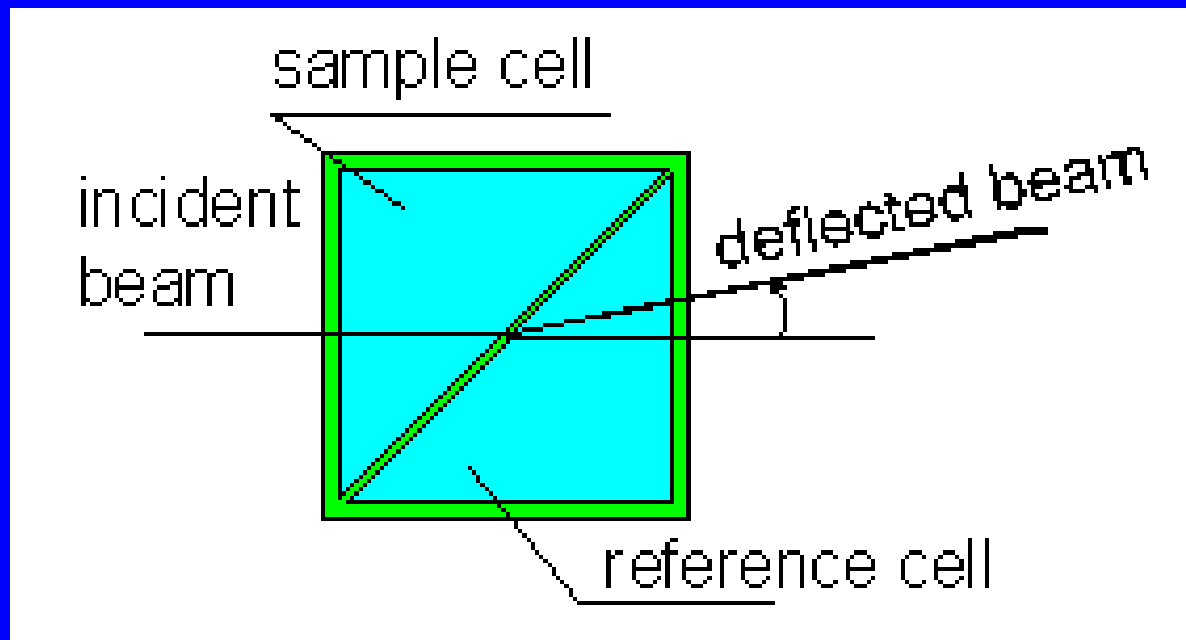


Částice sorbentu

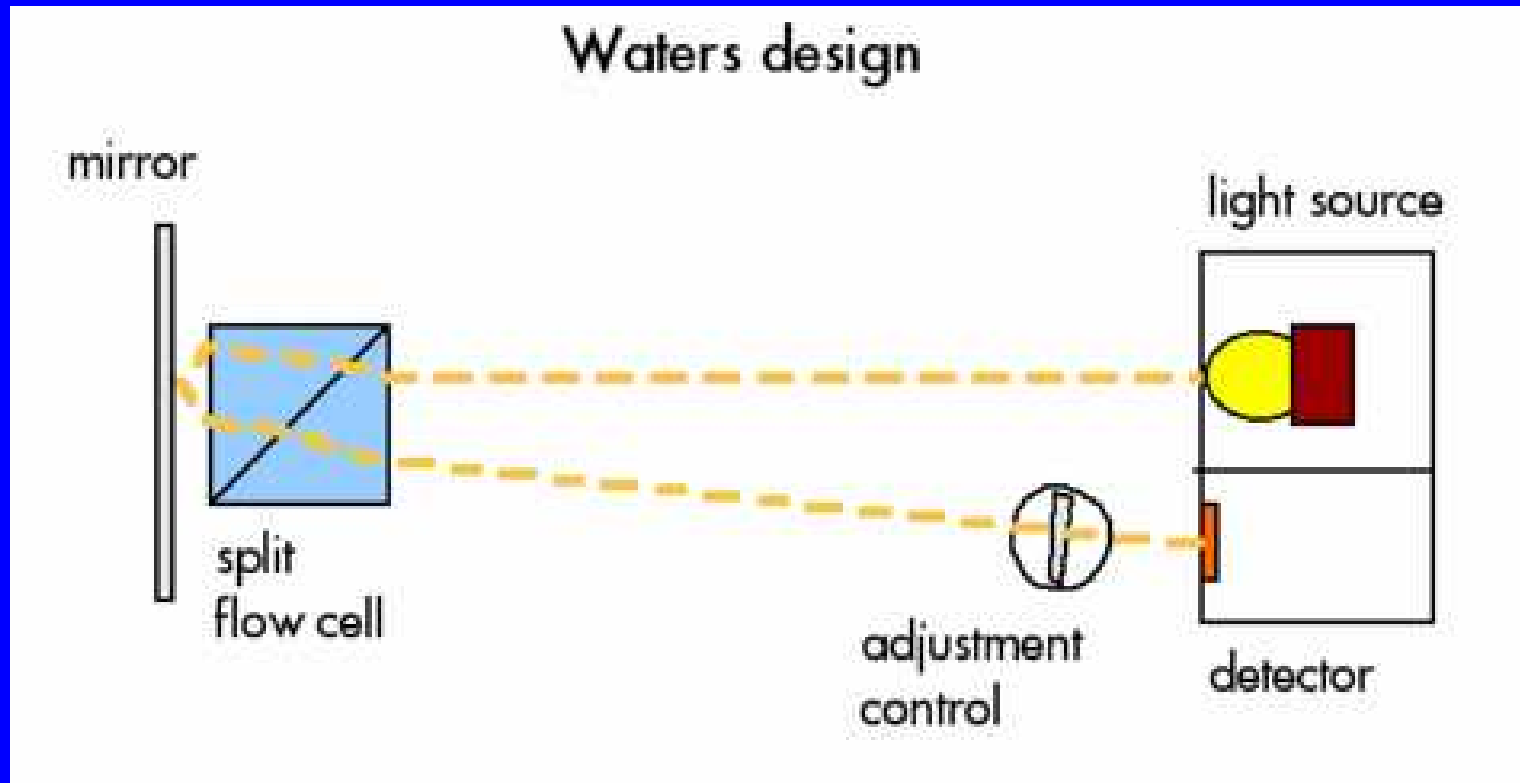


Detektory

Refraktometrický detektor

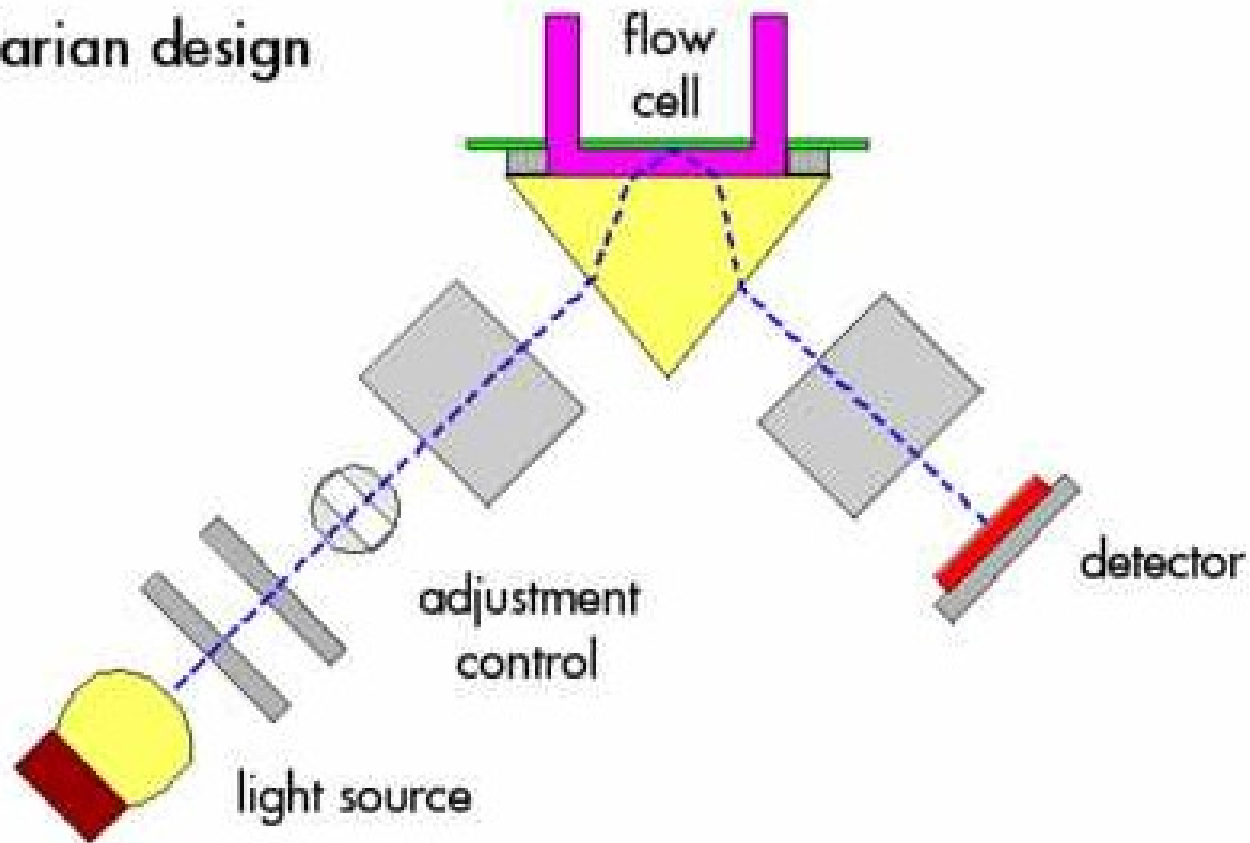


Refraktometrický detektor



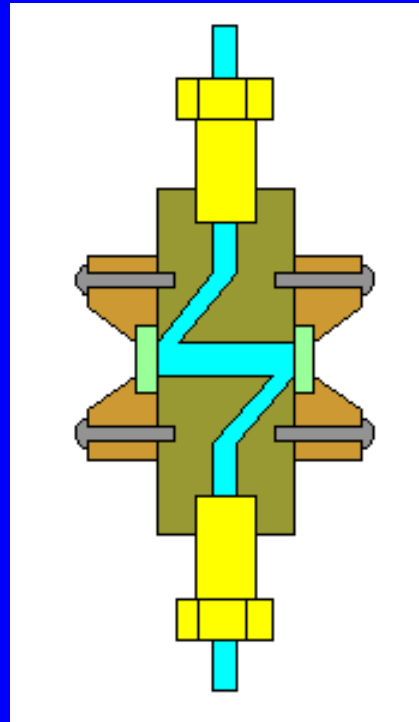
Refraktometrický detektor

Varian design

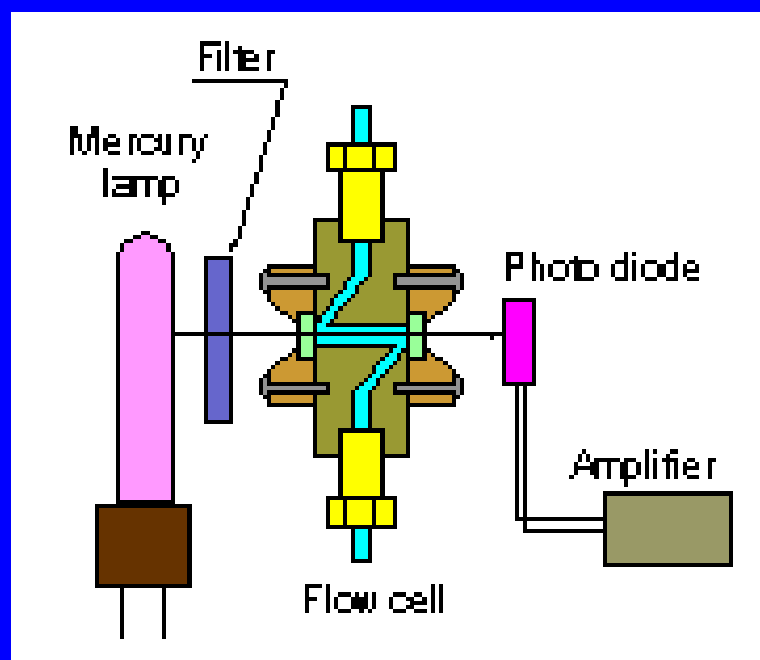


UV – VIS detektor

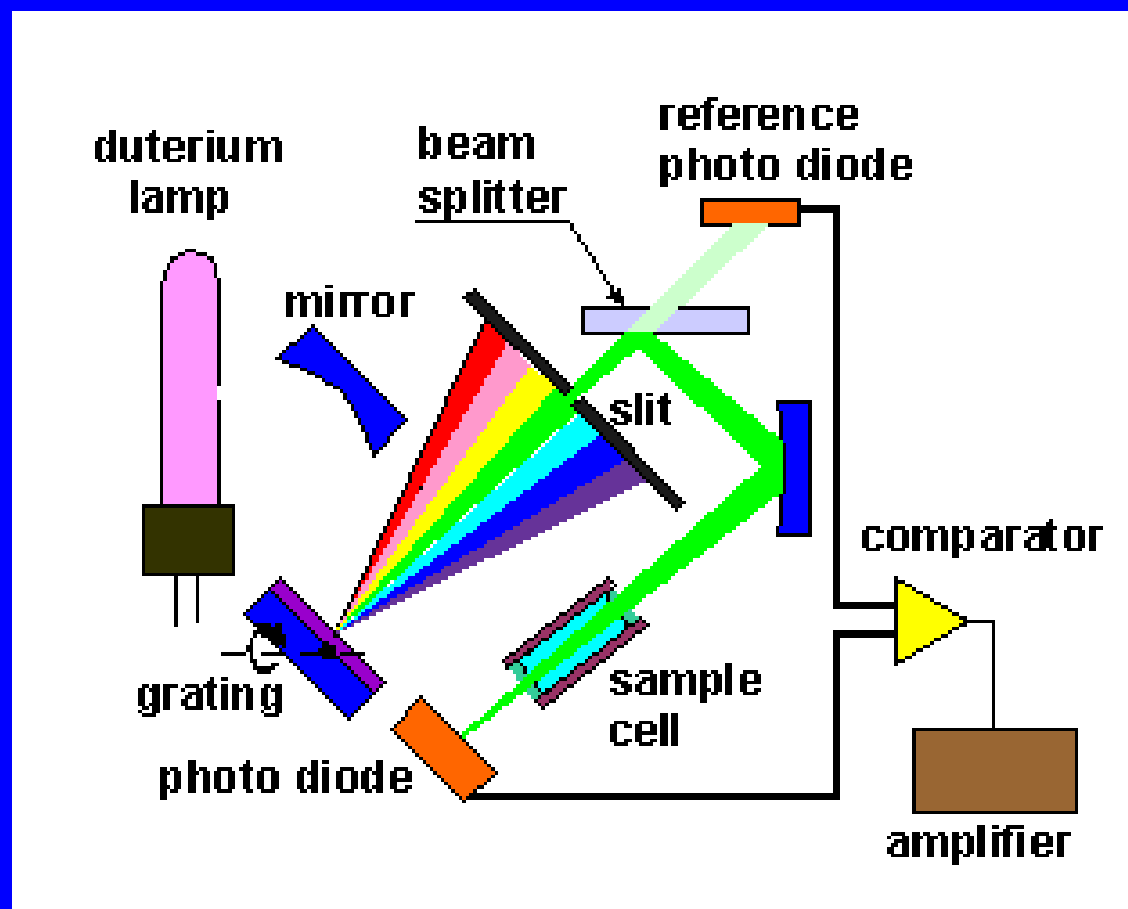
detekční cela



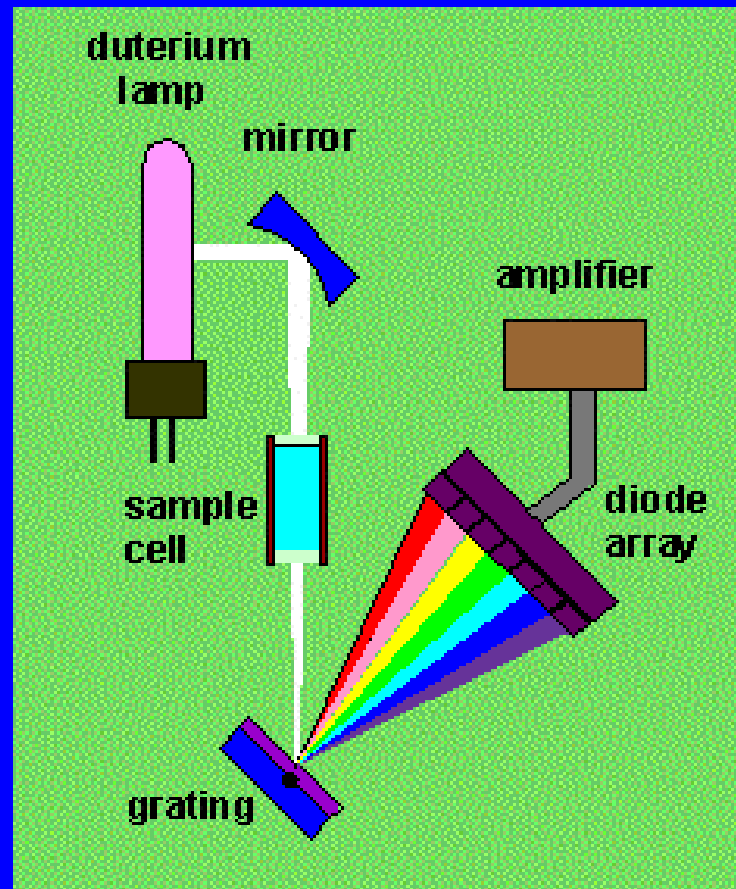
UV – VIS detektor s fixní vlnovou délkou



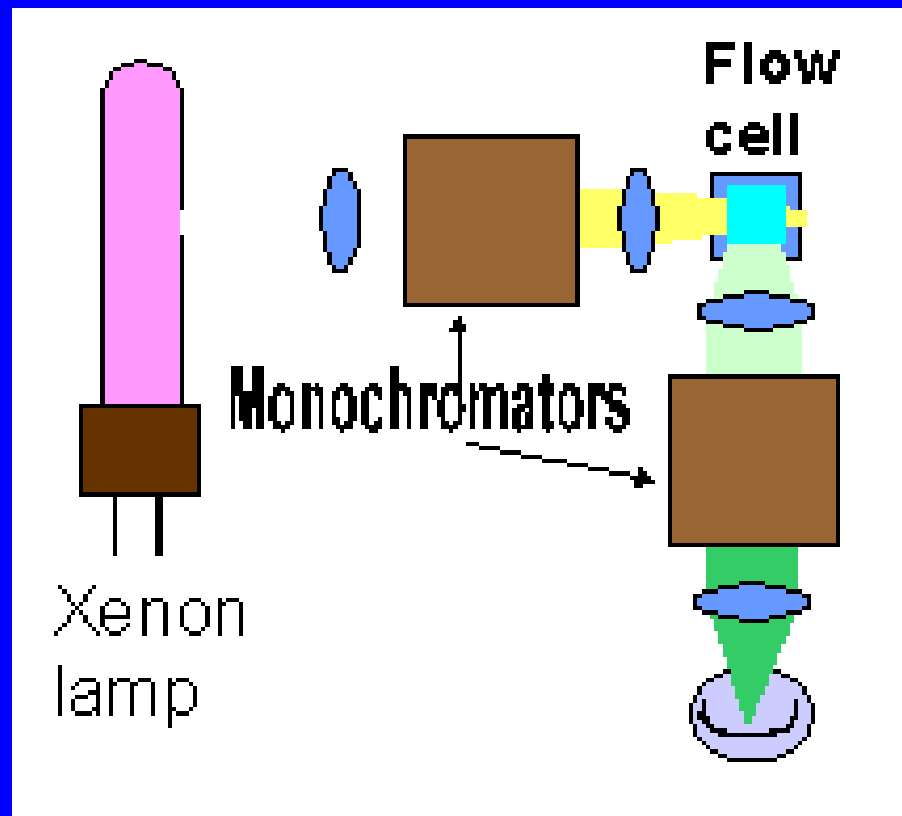
UV – VIS detektor s proměnlivou vlnovou délkou



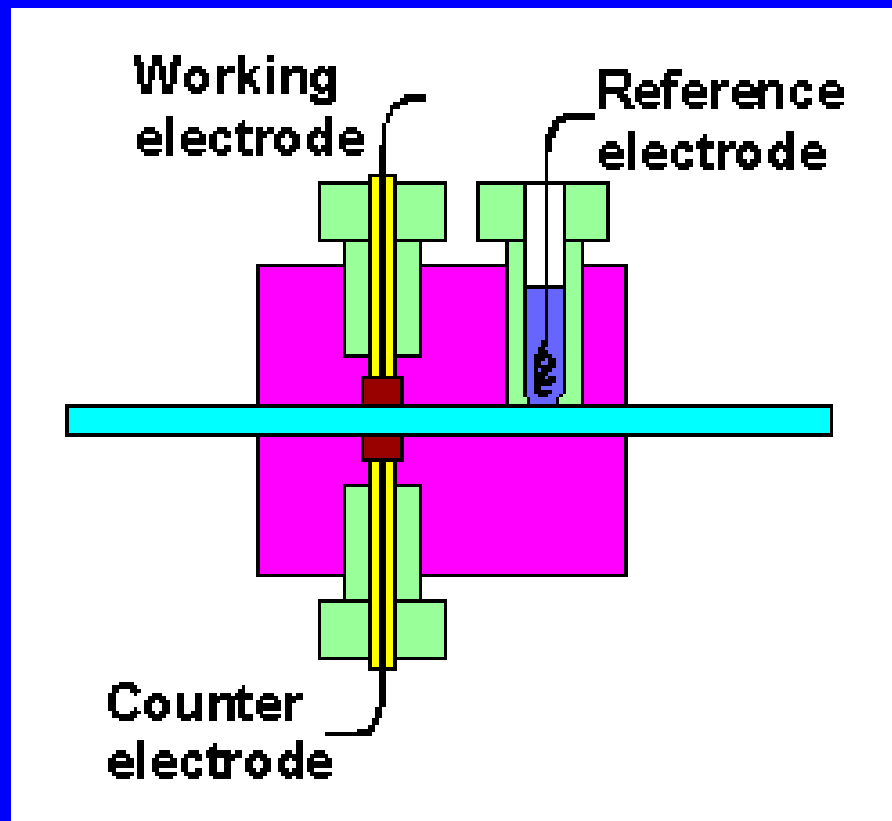
UV – VIS detektor s diodovým polem



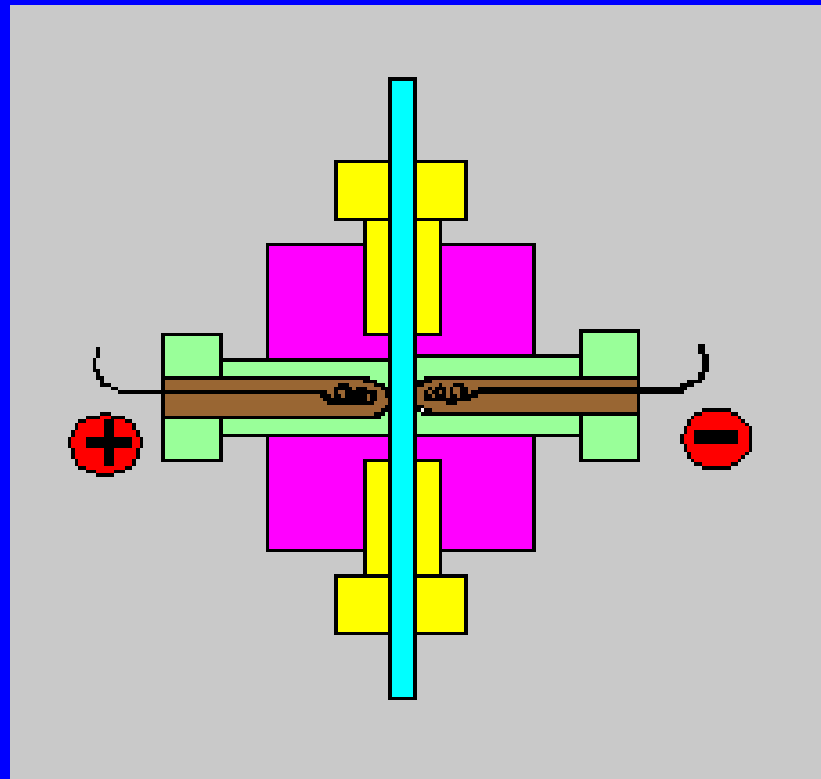
Fluorescenční detektor



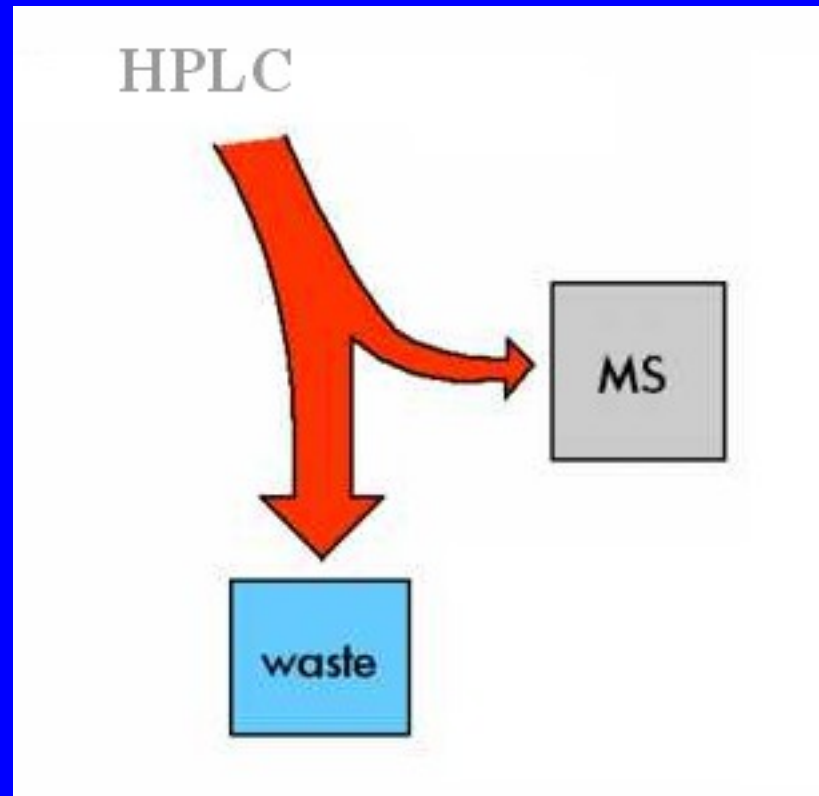
Elektrochemický detektor



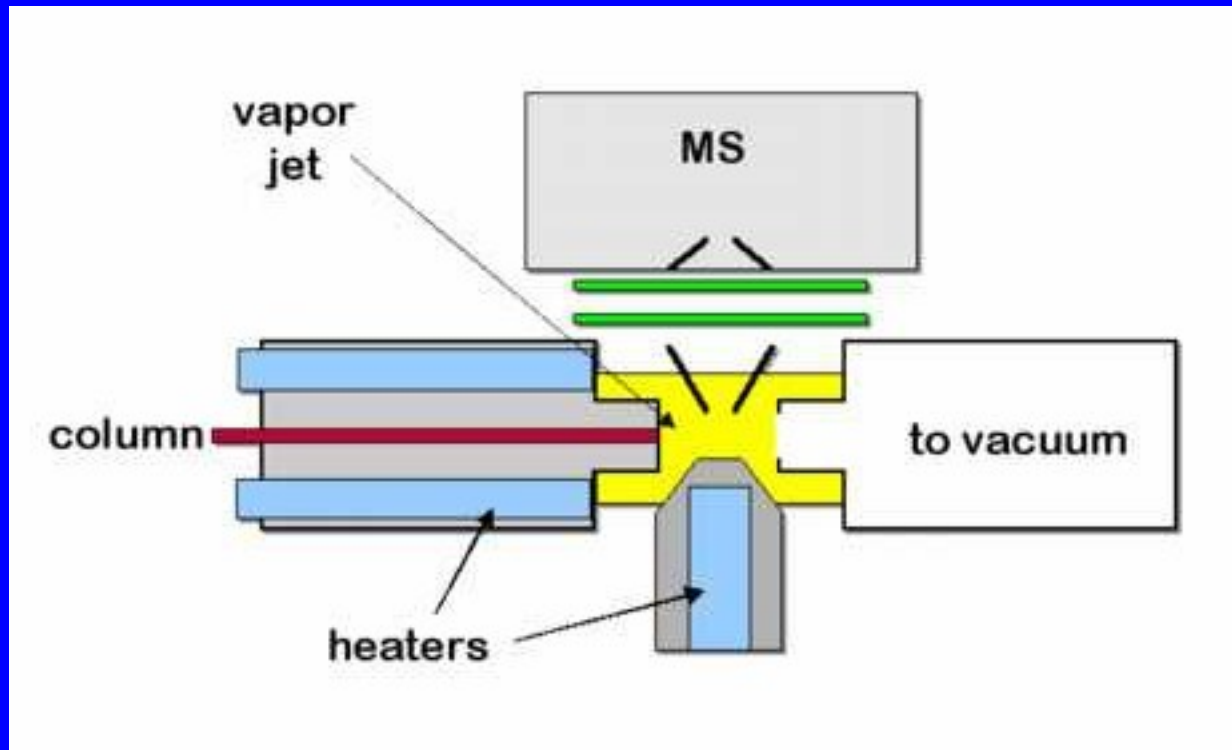
Konduktometrický detektor



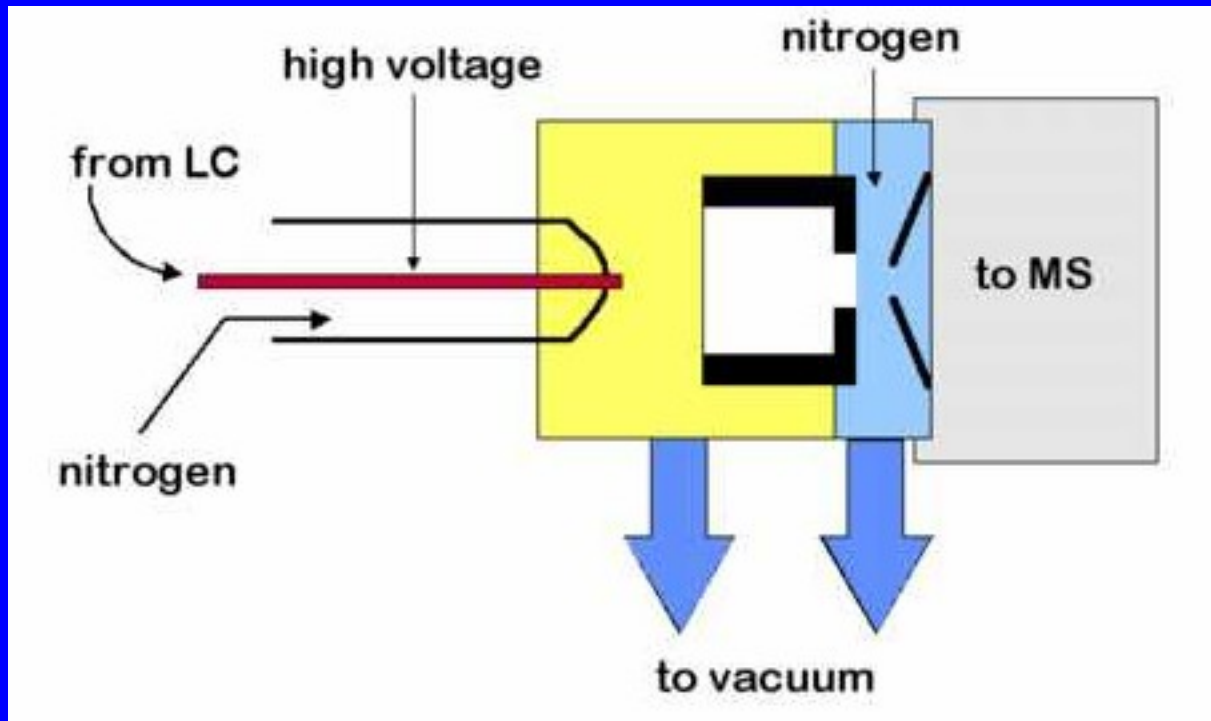
LC-MS



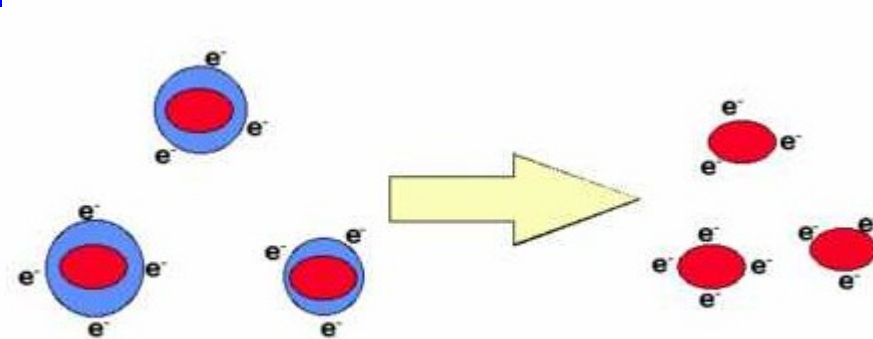
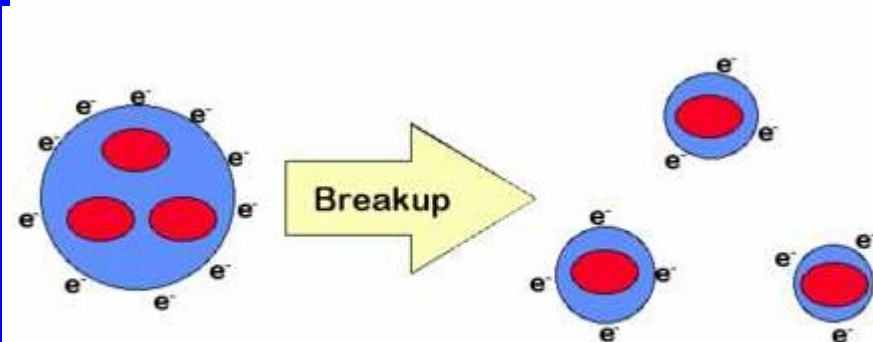
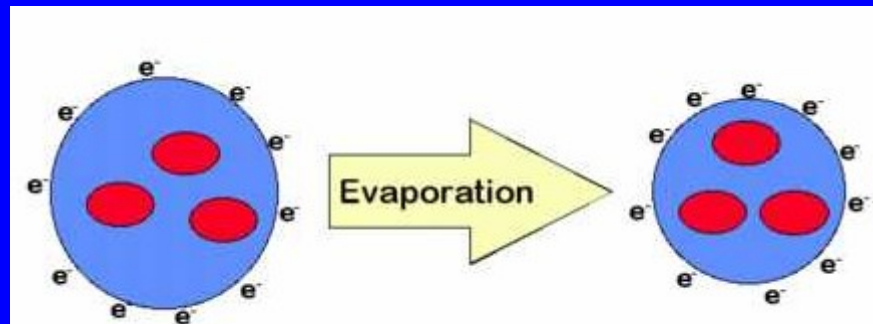
„Termospray“



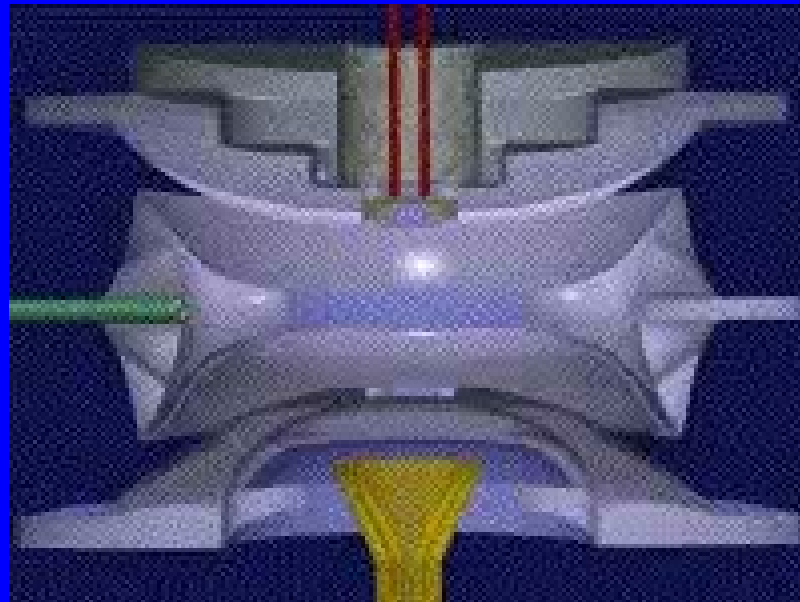
„Electrospray“



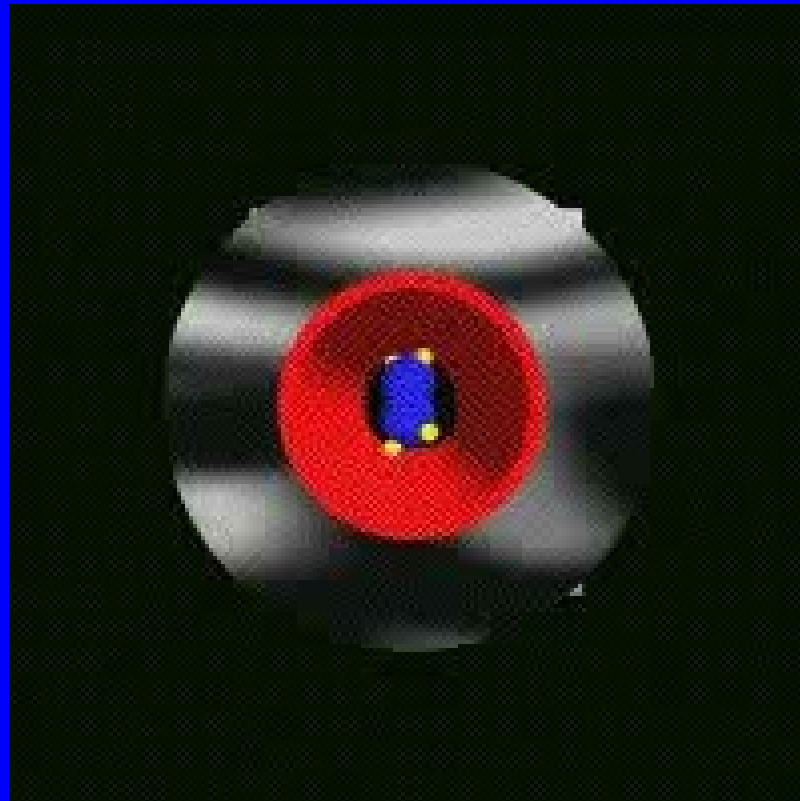
Ionizace



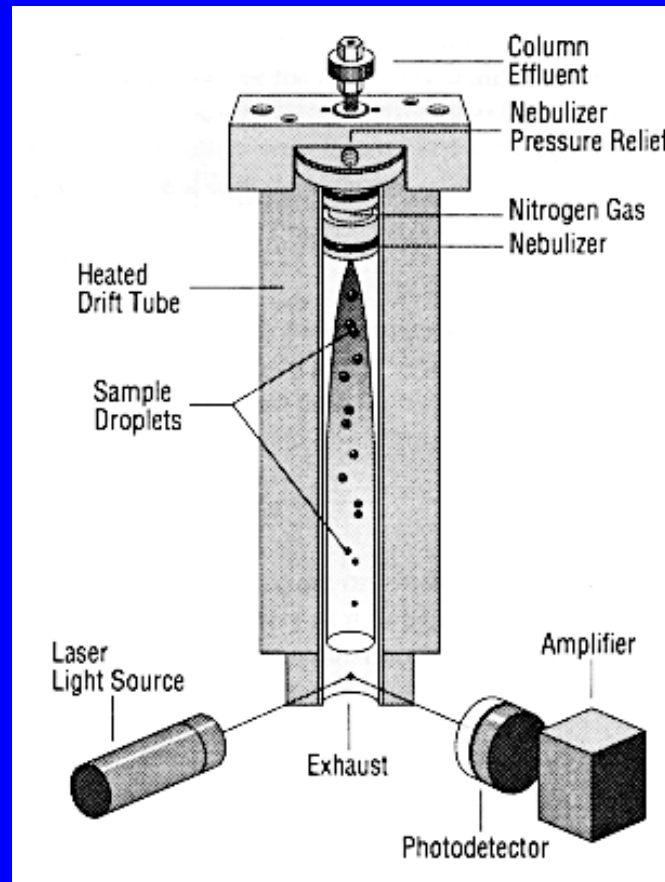
Ion Trap



Kvadrupol



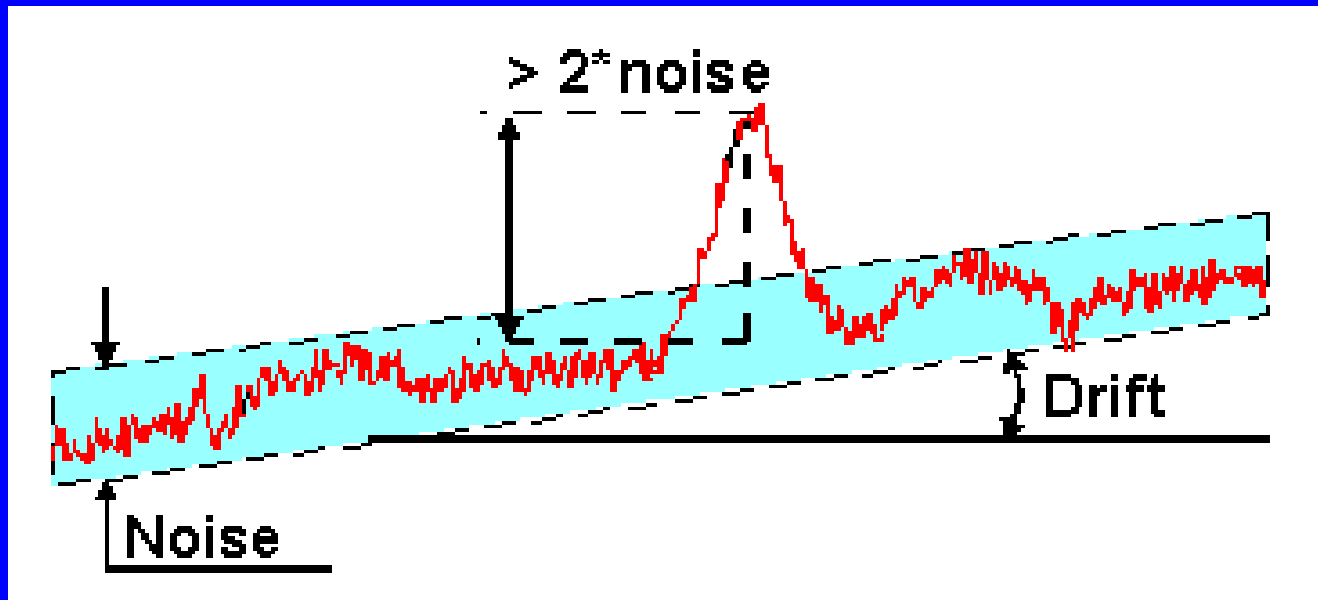
„Light scattering“ detektor



Derivatizace

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

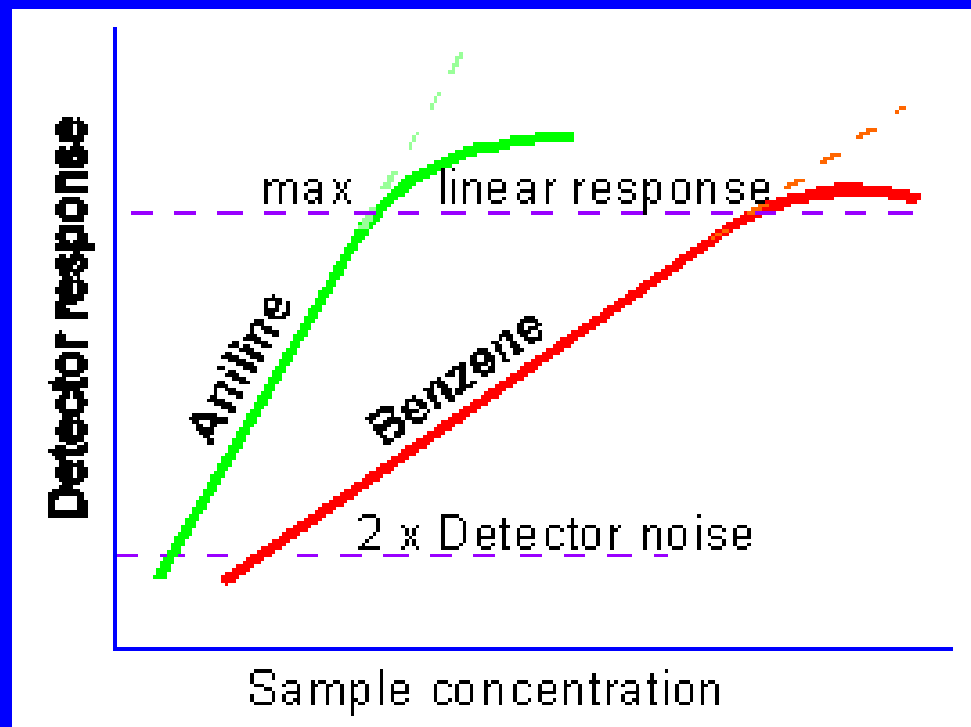
Šum a drift detektoru



Mez detekce $S/N > 2-3$

Mez stanovitelnosti $S/N > 10$

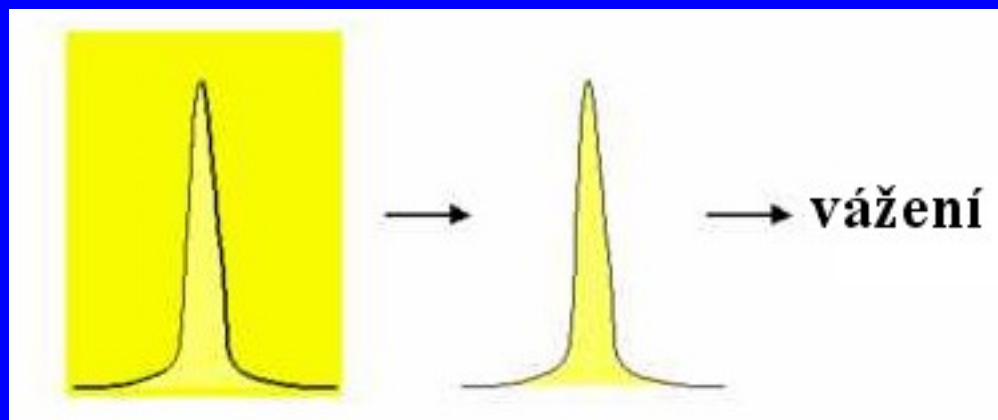
Lineární rozsah detektoru



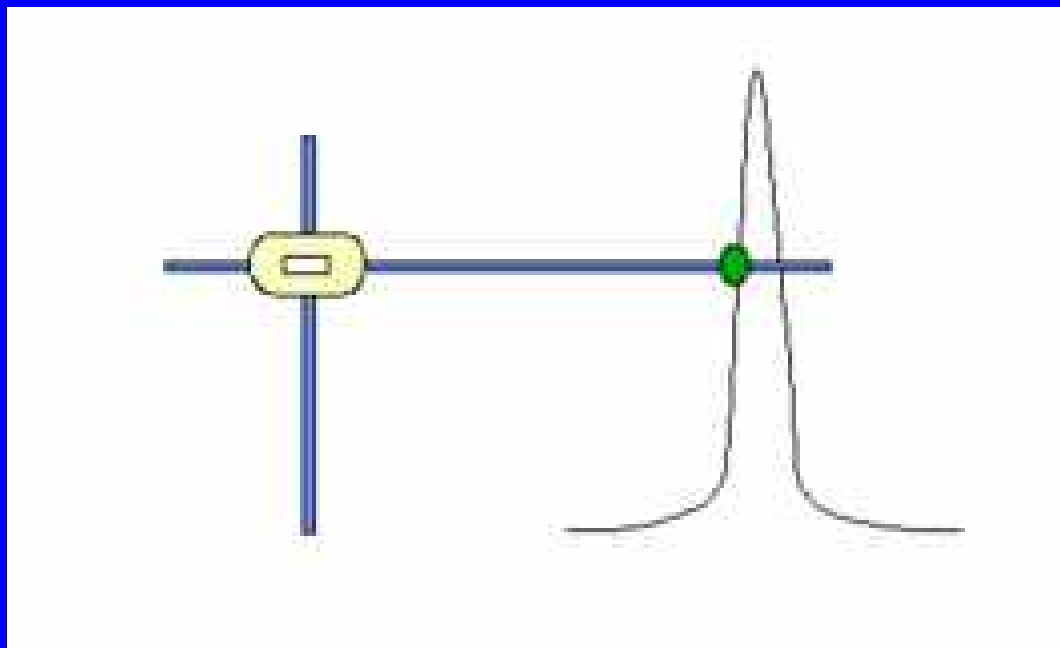
Vyhodnocení

- Zapisovače
- Integratory
- Integrační software + PC

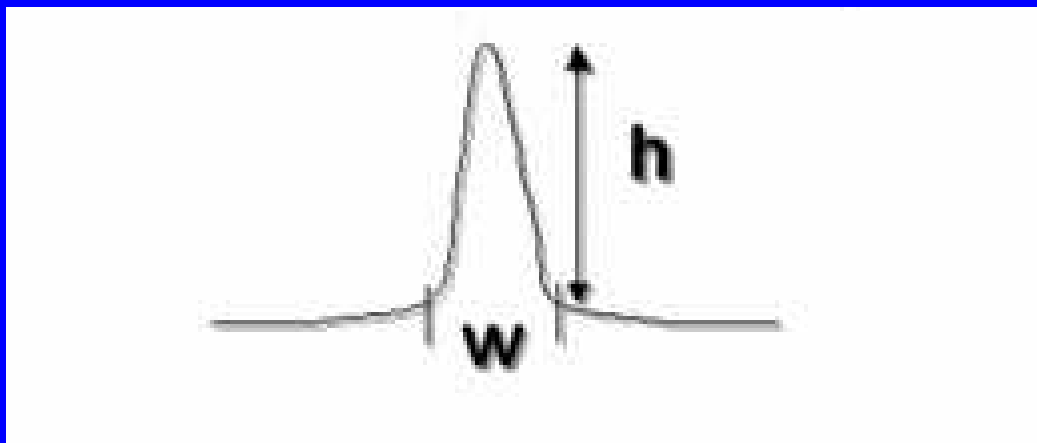
Zjištění plochy píků u zapisovačů vážením



Zjištění plochy píků u zapisovačů planimetrem

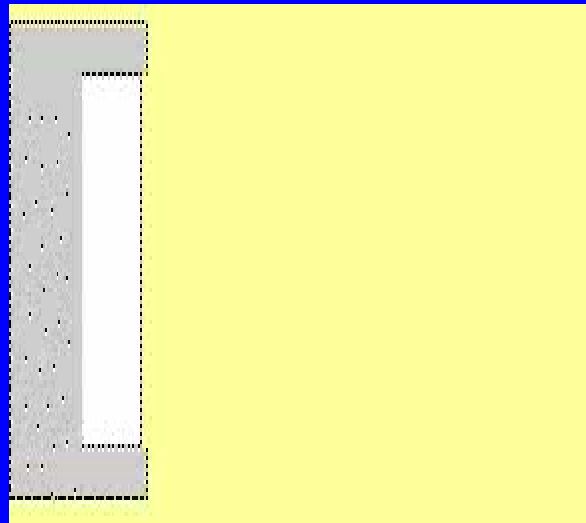


Zjištění plochy píků u zapisovačů výpočtem



plocha = základna x výška


Integrator



Provedení

- Analytické
- Preparativní

Analýza kvalitativní

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

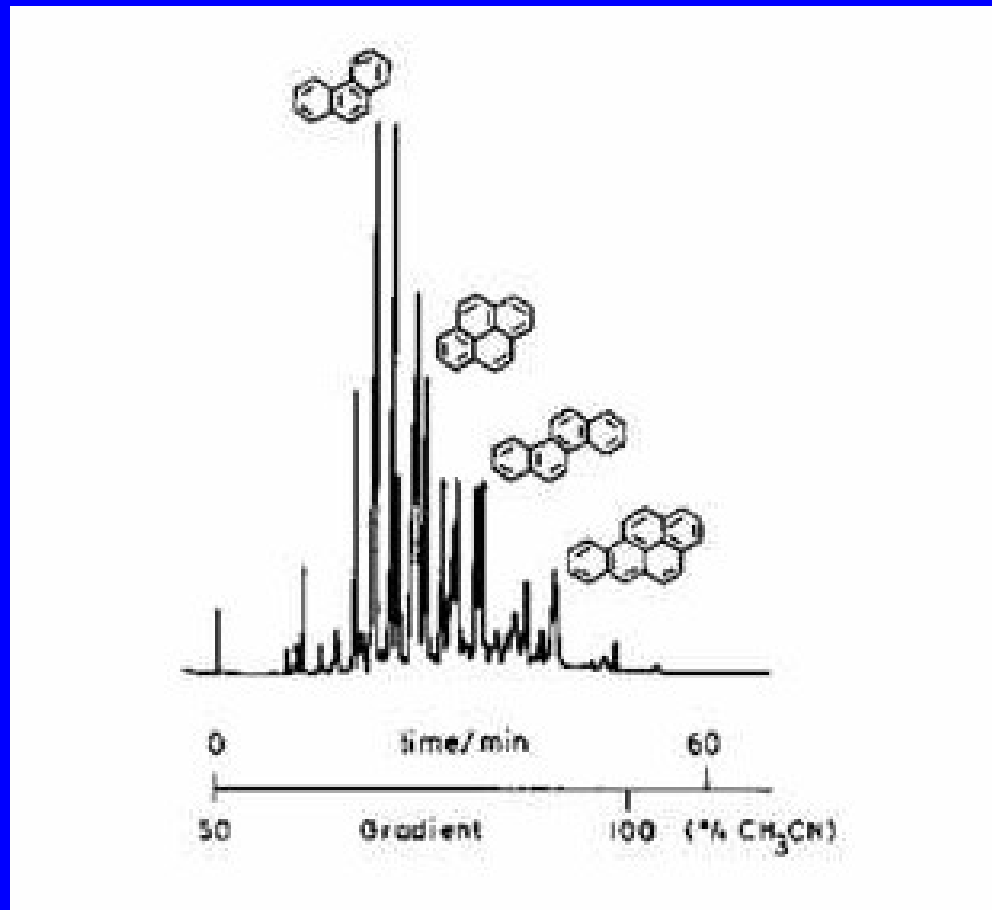
Analýza kvantitativní



Plocha (výška) píku

- Metoda externího standardu
- Metoda vnitřního standardu
- Metoda standardního přídavku

LC analýza



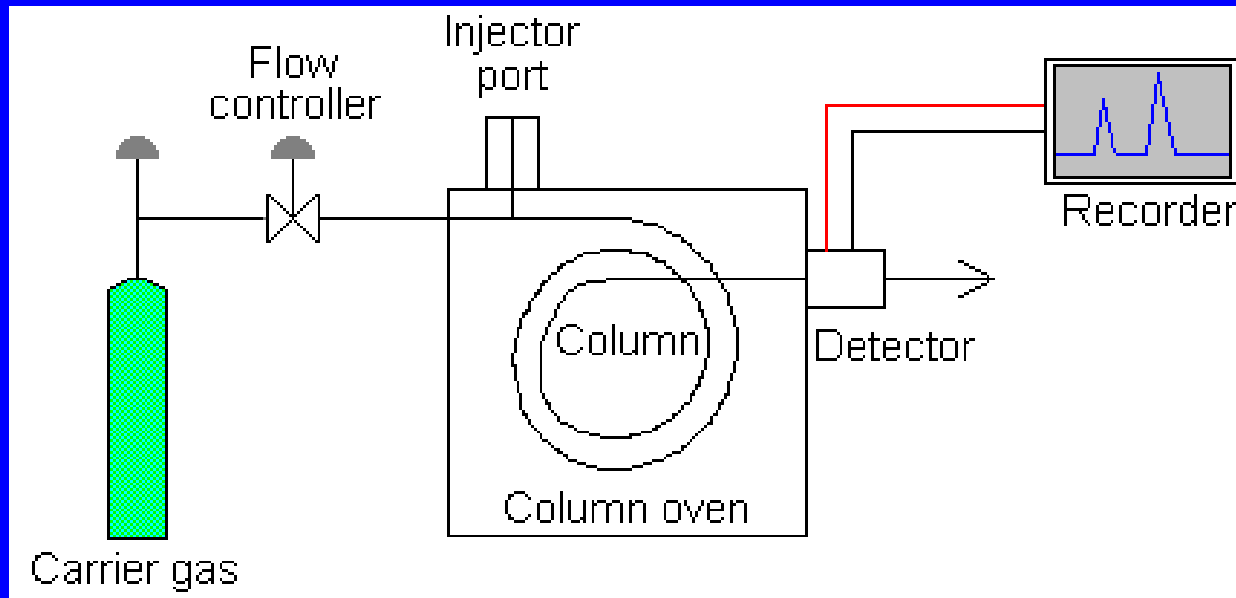
Plynová chromatografie

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

Výhody

- Nižší viskozita mobilní fáze
- Rychlejší difuze

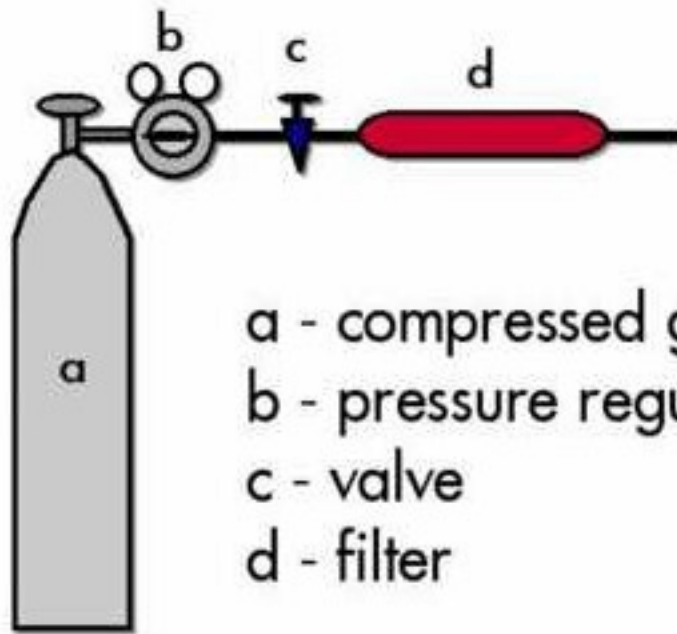
Schéma plynového chromatografu



Plynový chromatograf

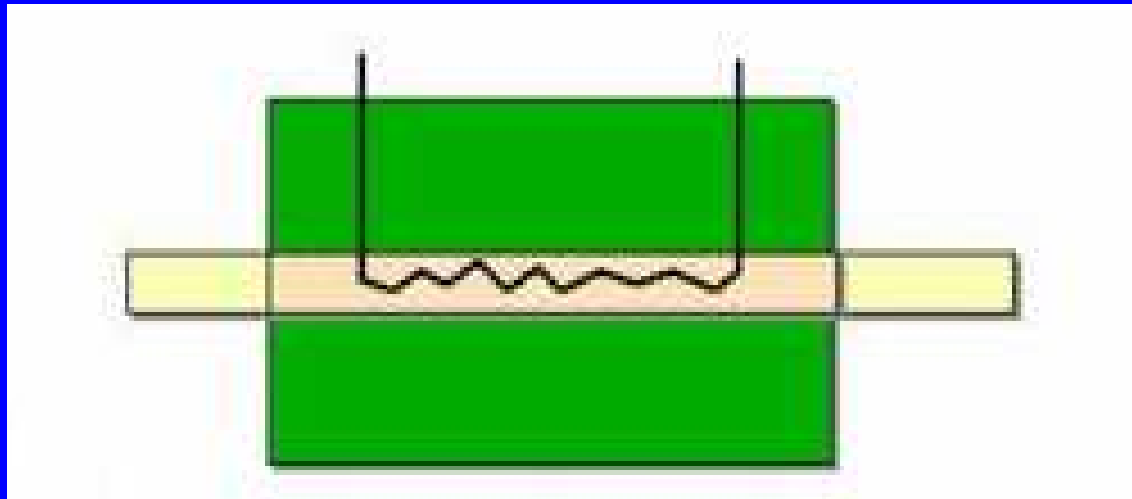


Zdroj nosného plynu



- a - compressed gas cylinder
- b - pressure regulator
- c - valve
- d - filter

Elektrické měření průtoku



Nosné plyny

Plyn	Výhody	Nevýhody
N_2	levný, bezpečná práce	nízká tepelná vodivost
H_2	vysoká tepelná vodivost	explosivní
He	inertní	drahý
Ar	inertní	drahý

Příprava vzorků pro GC

- Plyny, kapaliny - přímo
- Pevné látky - po derivatizaci

Objemy dávkovaných vzorků

• Plyny - 0.5 – 5 ml

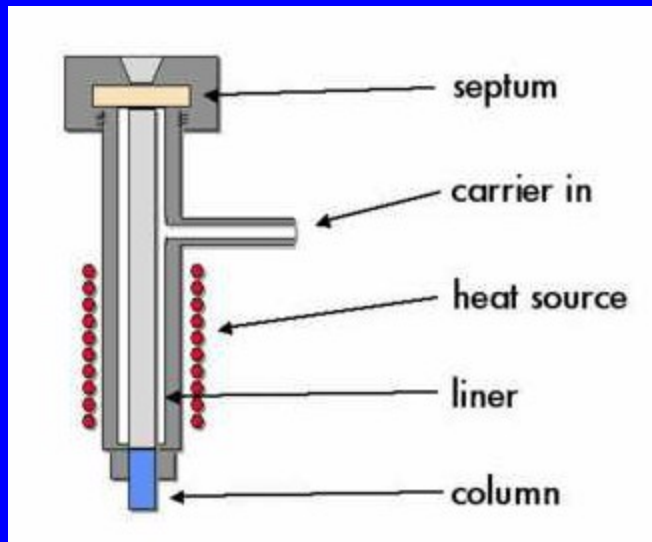
• Kapaliny - 0.1 – 10 ■

Způsoby dávkování vzorků

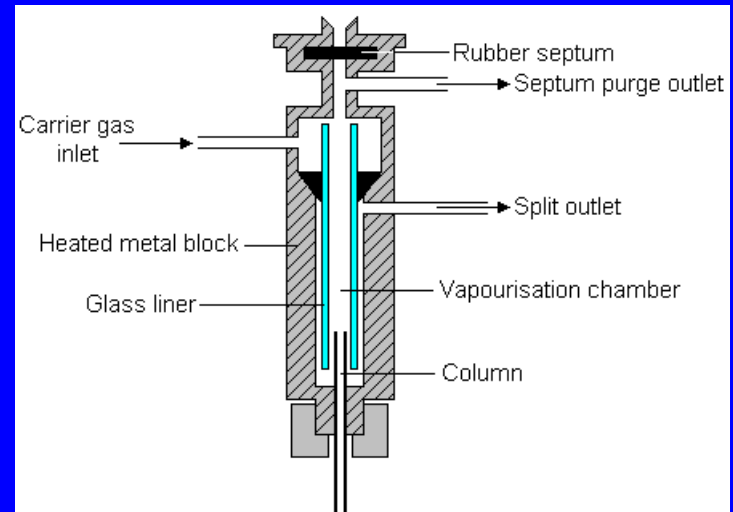
- Přes septum
- Ventilem
- Termální desorpcí

Stríkačkou

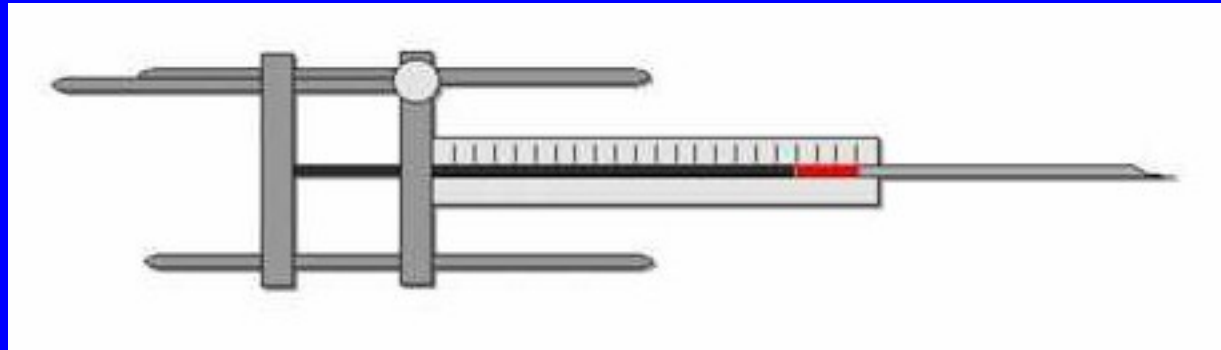
„splitless“



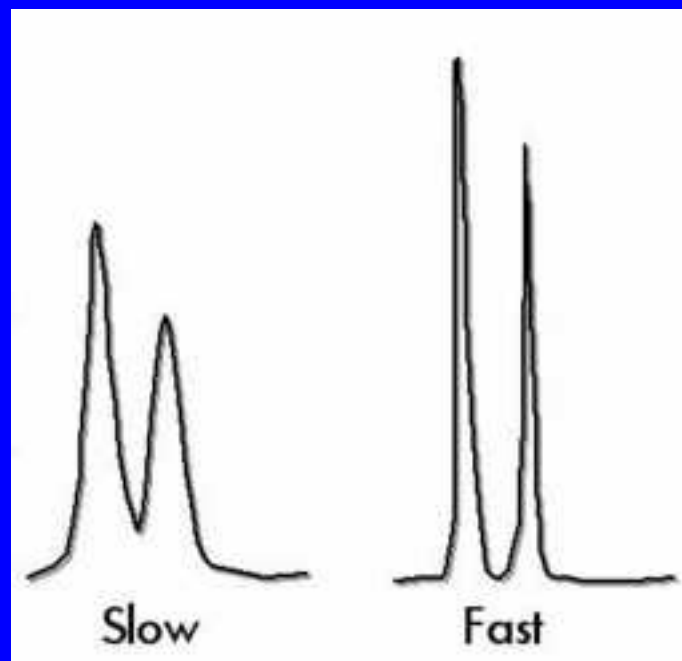
„split“



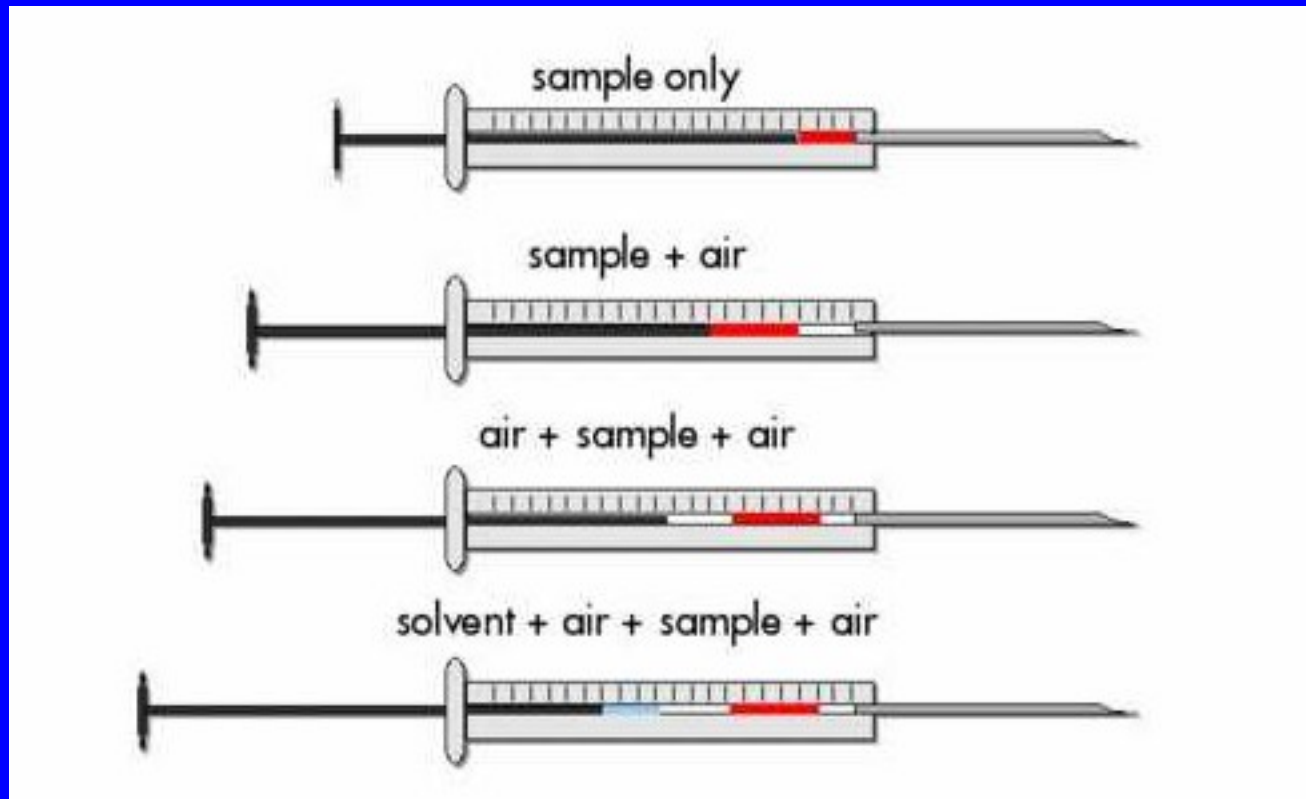
Dávkovací stříkačka



Rychlost dávkování



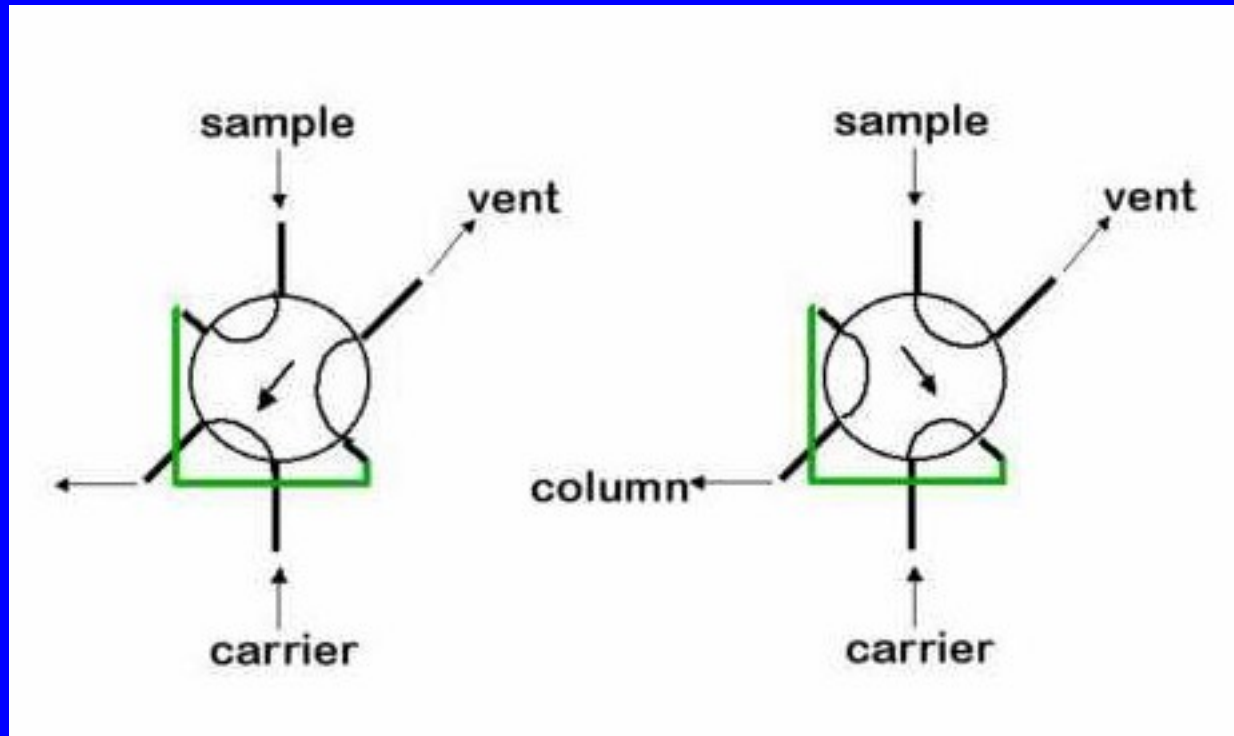
Způsob dávkování



Automatické dávkovače



Ventilem



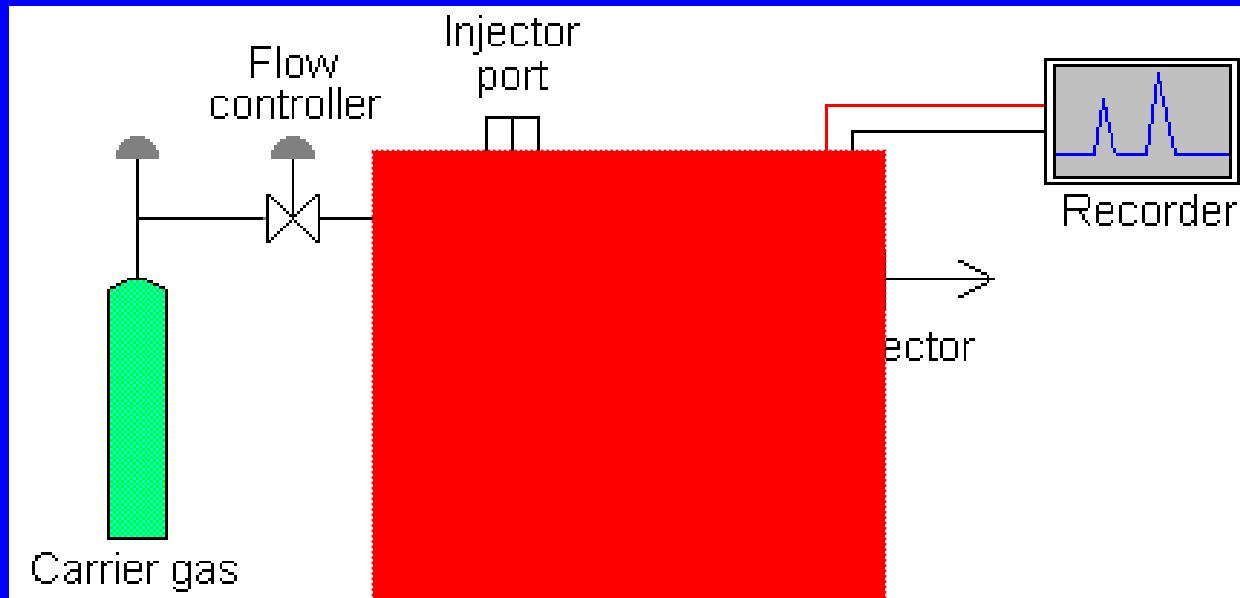
Ventil



Dávkování termální desorpcí



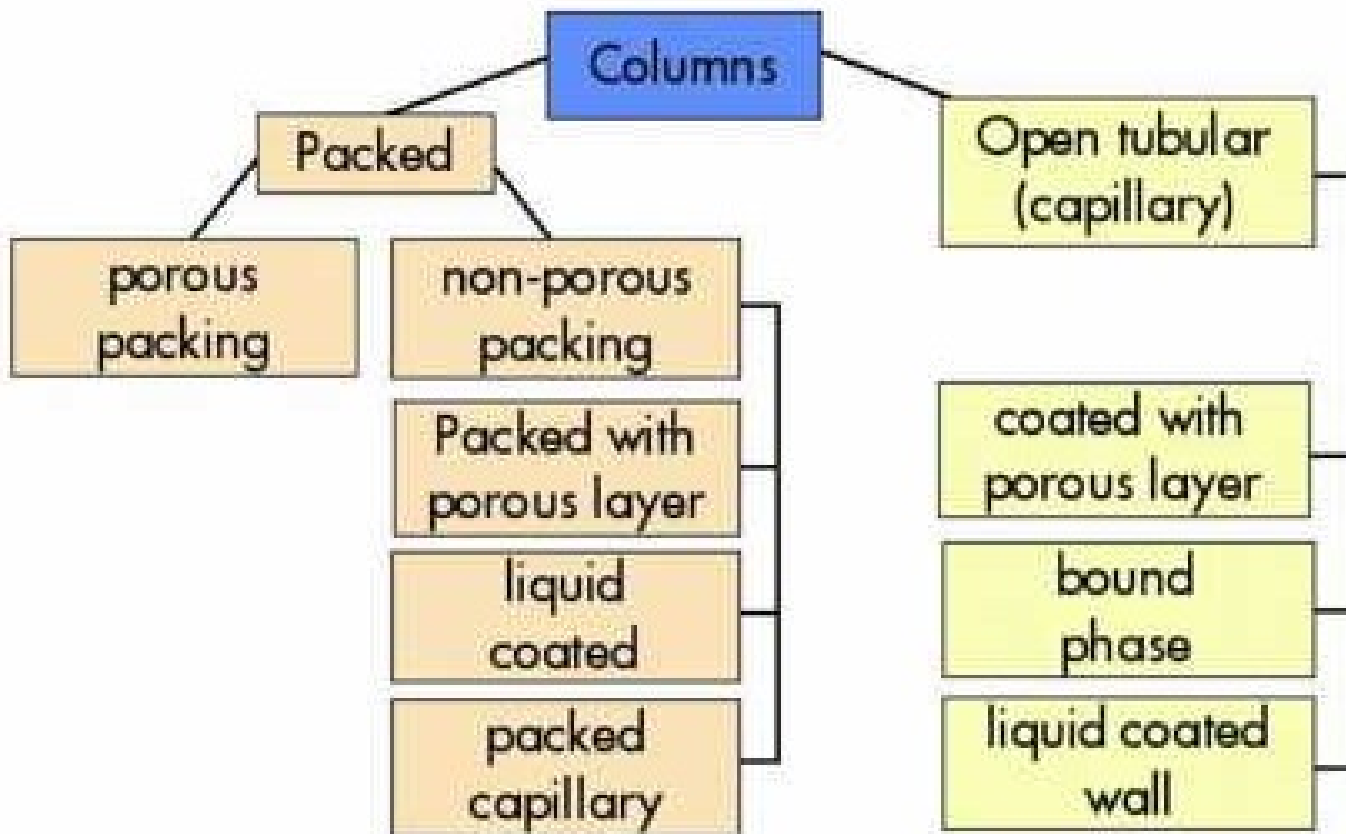
Termosttování



Kolony

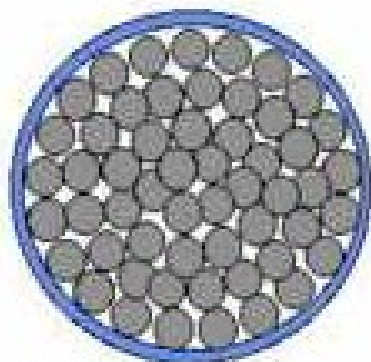
- Náplňové – ¼“ OD – ocel, sklo
délka
- Kapilární – 0.1 – 0.5 mm ID - křemen, ocel,
sklo
délka –10 - 100 metrů

Kolony



Kolony

Packed



● bead column

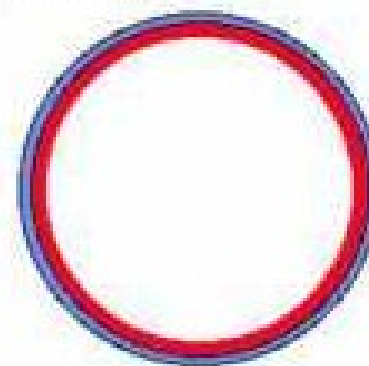
● porous layer

● conventional

open (capillary)



Porous
Layer
Open
Tube

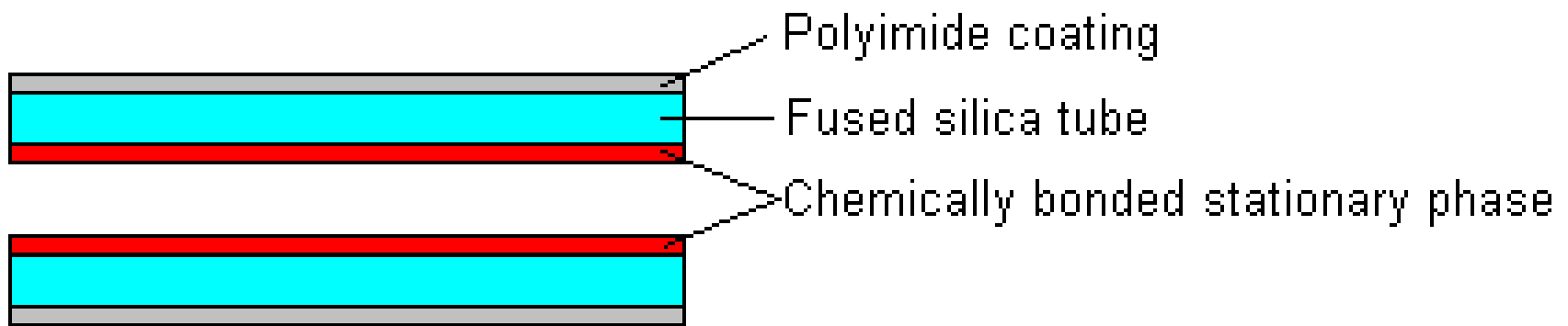


Wall
Coated
Open
Tube

Náplňová kolona



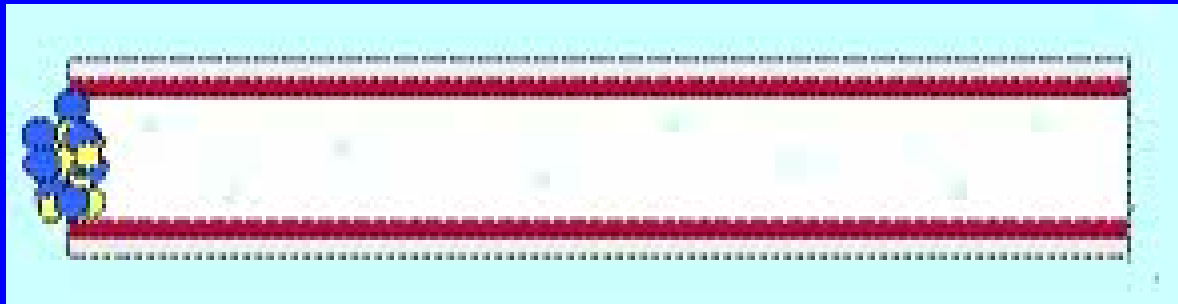
Kapilární kolona



Kapilární kolona



Eluce



Eluce

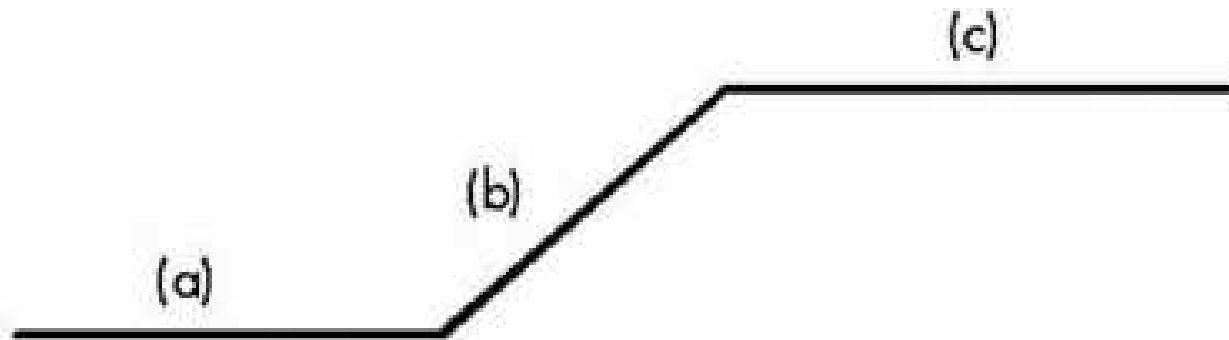
- Izotermální



- Gradientová – zvyšování teploty – 400 °C



Eluce



a - initial temperature and time

b - ramp ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

c - final hold time and temperature

Detektory

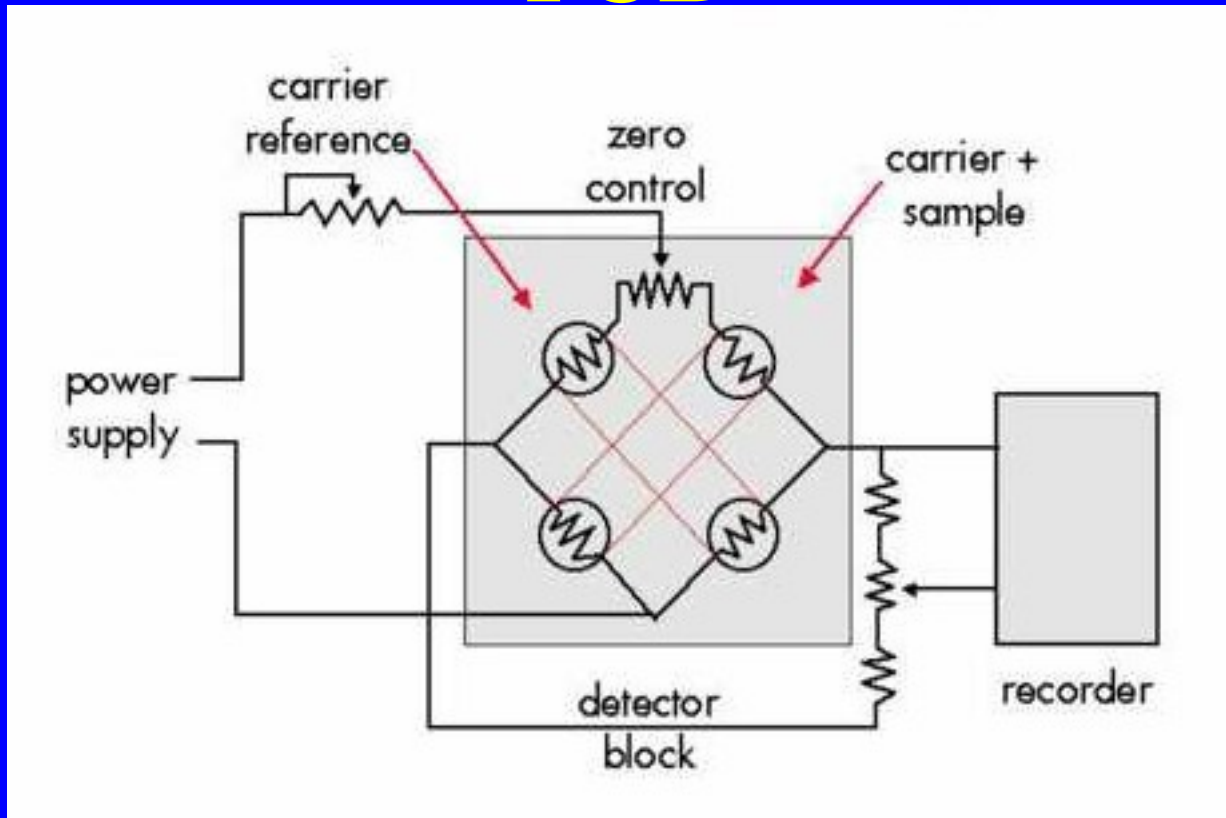
Destruktivní x Nedestruktivní

Universální x Selektivní

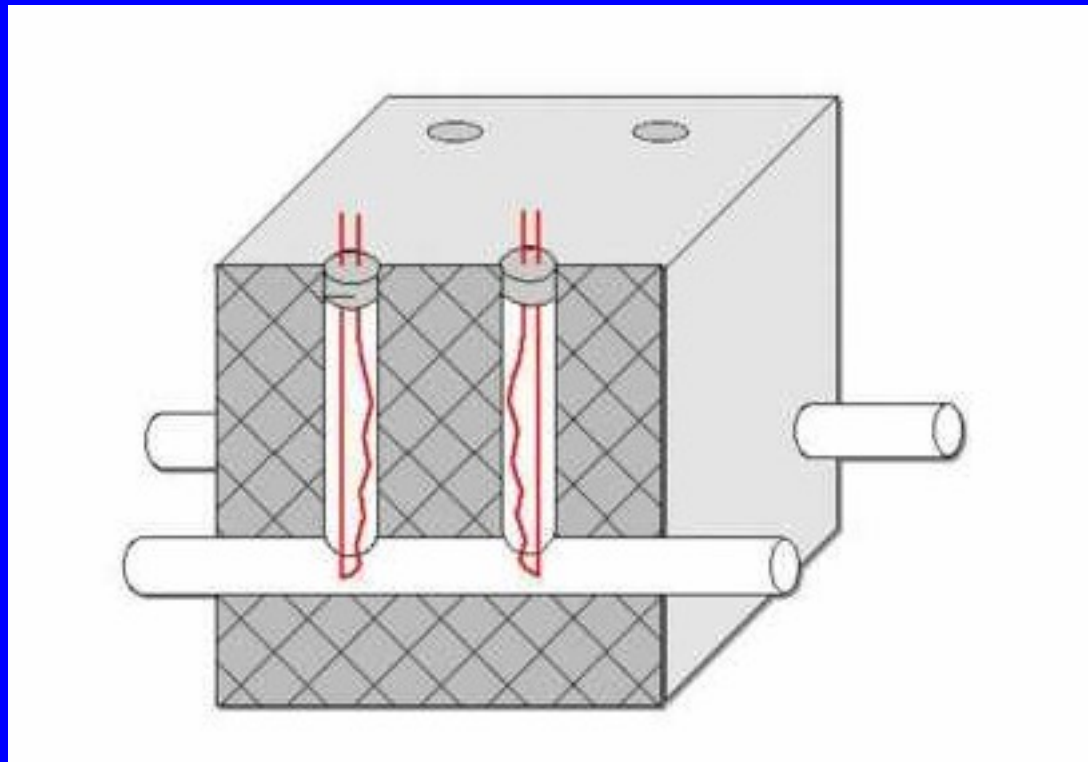
Teplotně vodivostní detektor TCD

- Universální detektor
- Nedestruktivní detektor
- Lineární rozsah – 10^6
- Princip – změna tepelné vodivosti eluentu

Teplotně vodivostní detektor TCD



Teplotně vodivostní detektor TCD

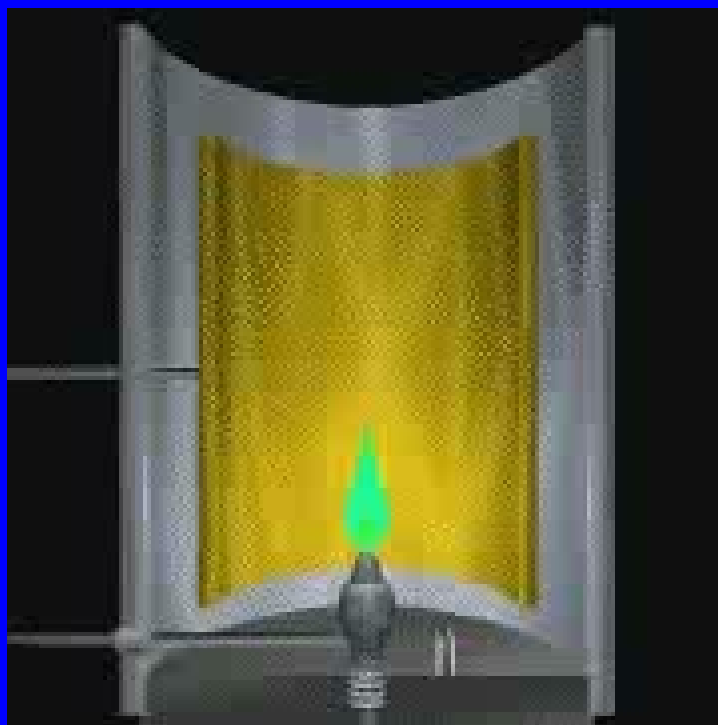


Plamenově ionizační detektor

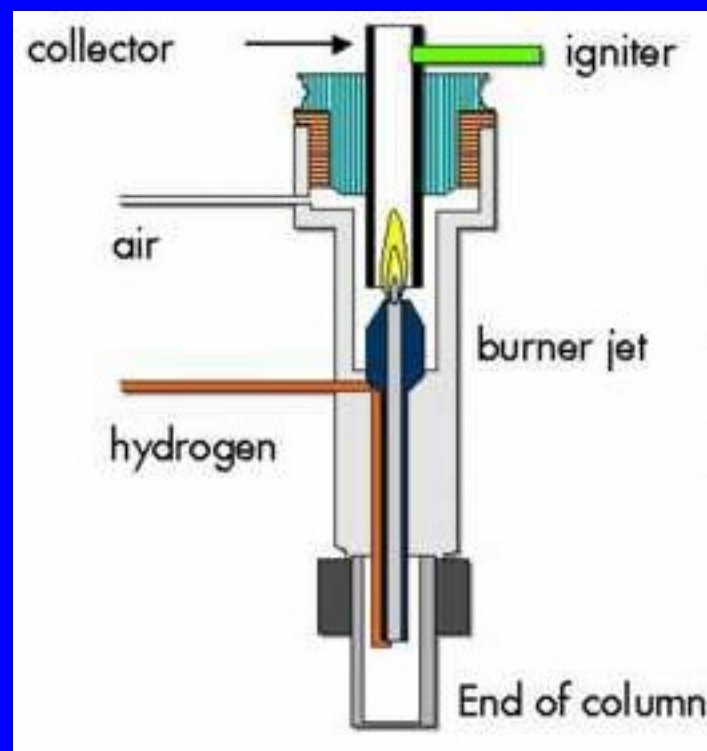
FID

- Specifický
- Destruktivní
- Lineární rozsah – 10^7
- Princip – ionty vznikající spalováním vzorku vyvolávají nárůst proudu

Plamenově ionizační detektor FID



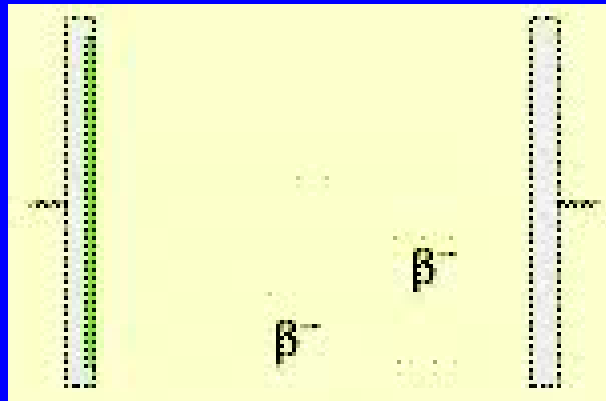
Plamenově ionizační detektor FID



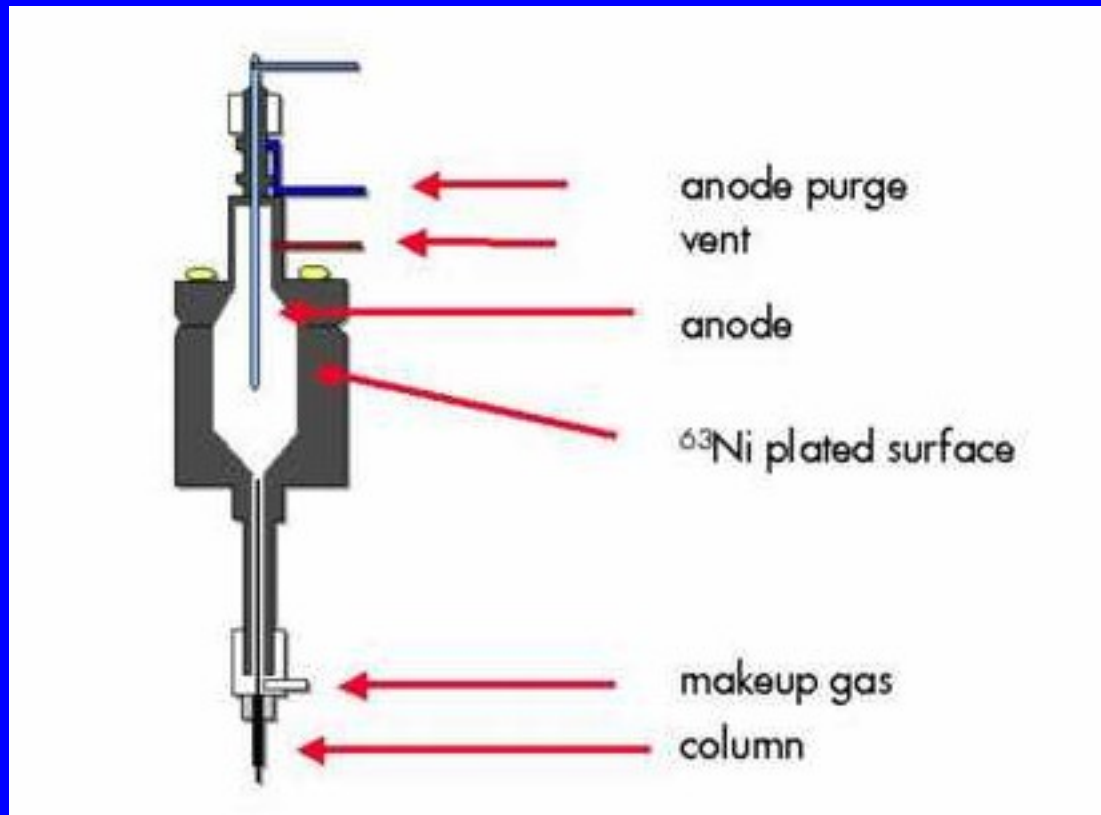
Detektor elektronového záchytu ECD

- Specifický
- Nedestruktivní
- Lineární rozsah - 10^4
- Princip – interakce ■ částic se vzorkem
vyvolává pokles proudu

Detektor elektronového záchytu ECD

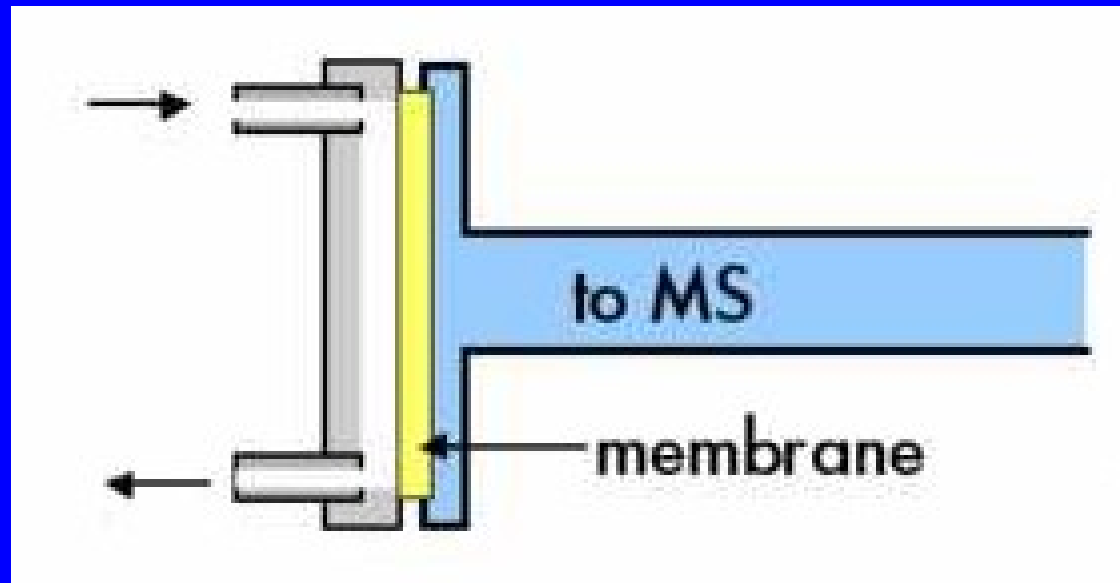


Detektor elektronového záchytu ECD



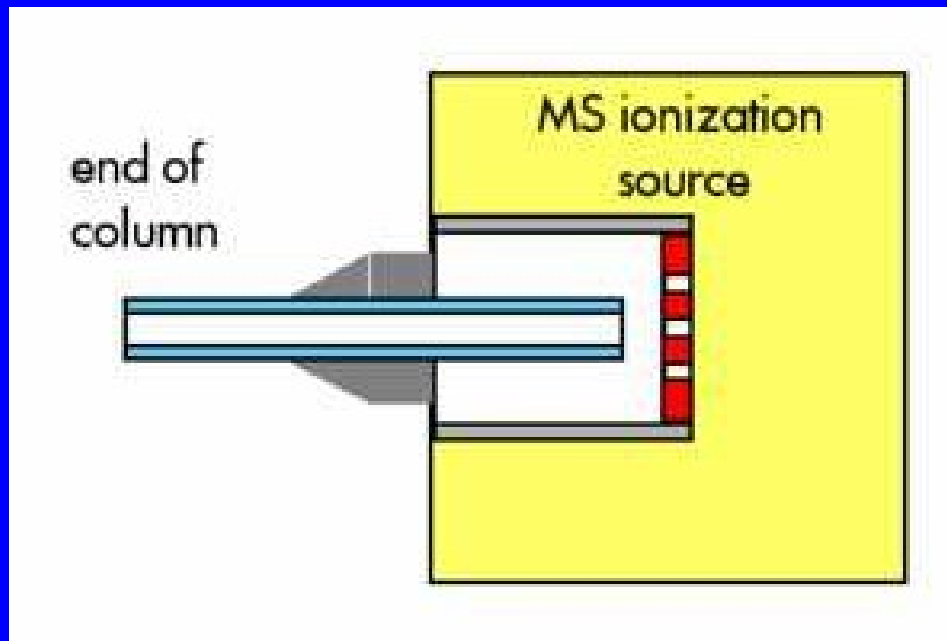
GC MS

permeační interface

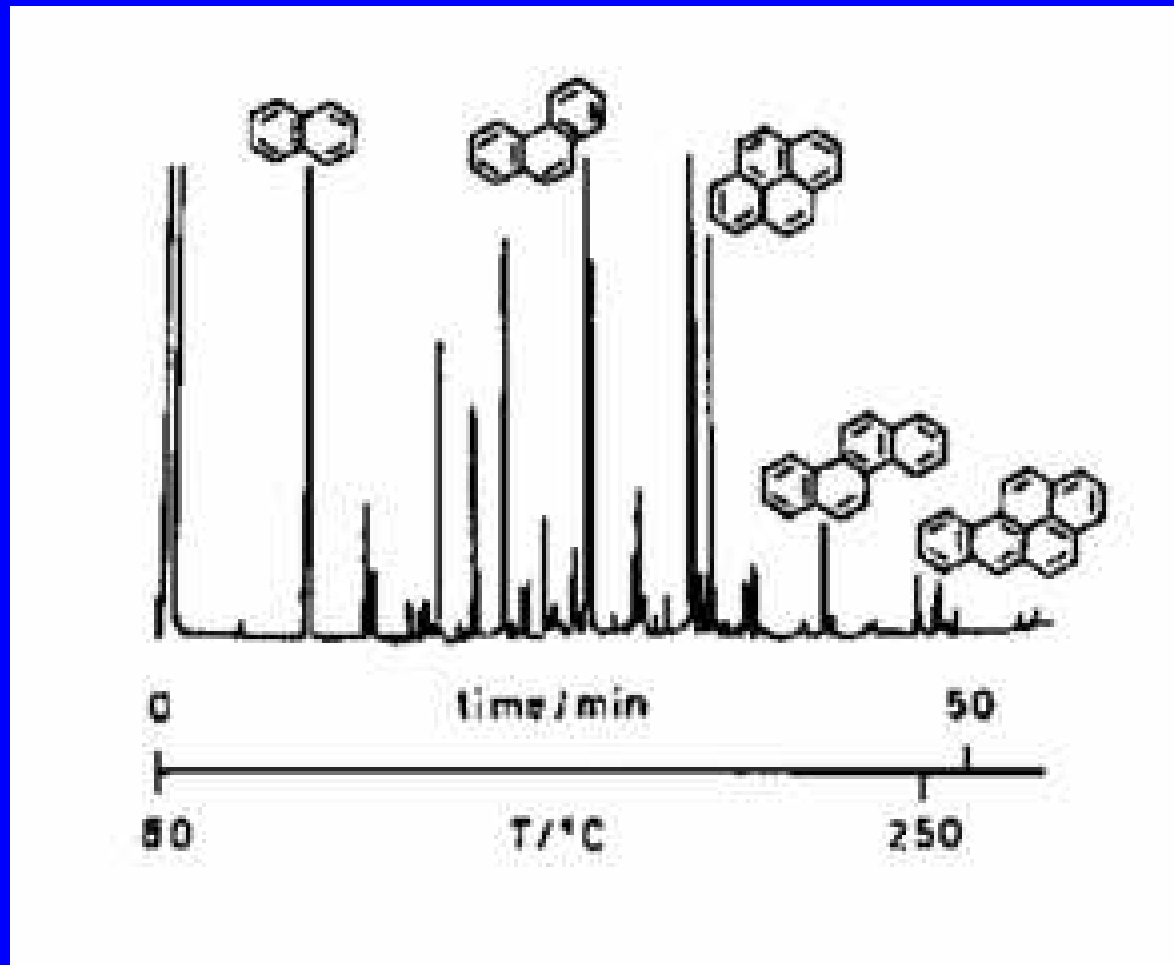


GC MS

přímé spojení



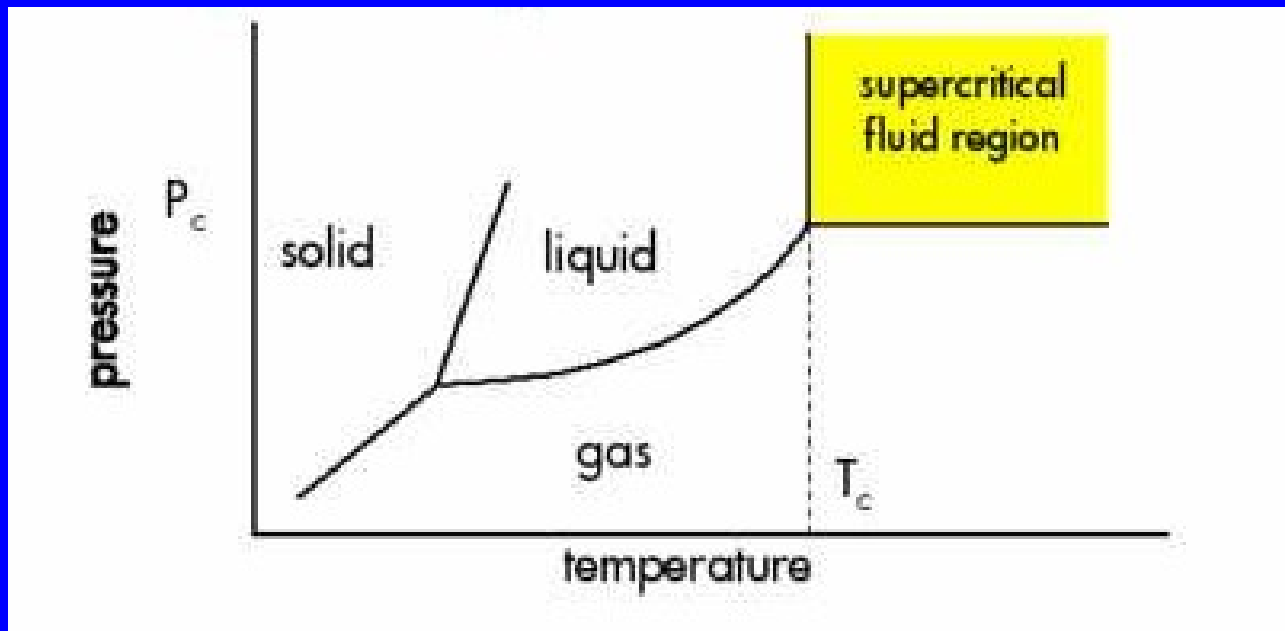
GC analysa



Superkritická fluidní chromatografie

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

Superkritická kapalina

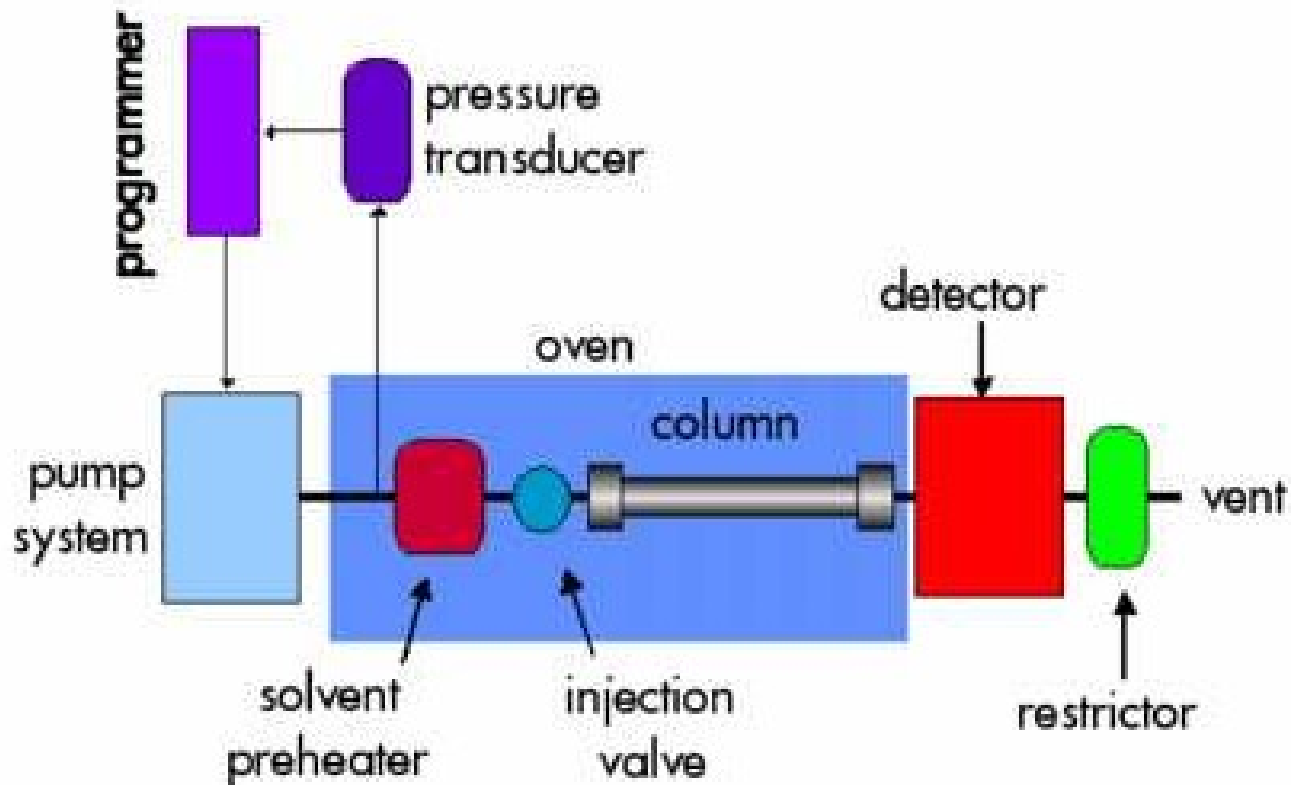


Superkritická kapalina

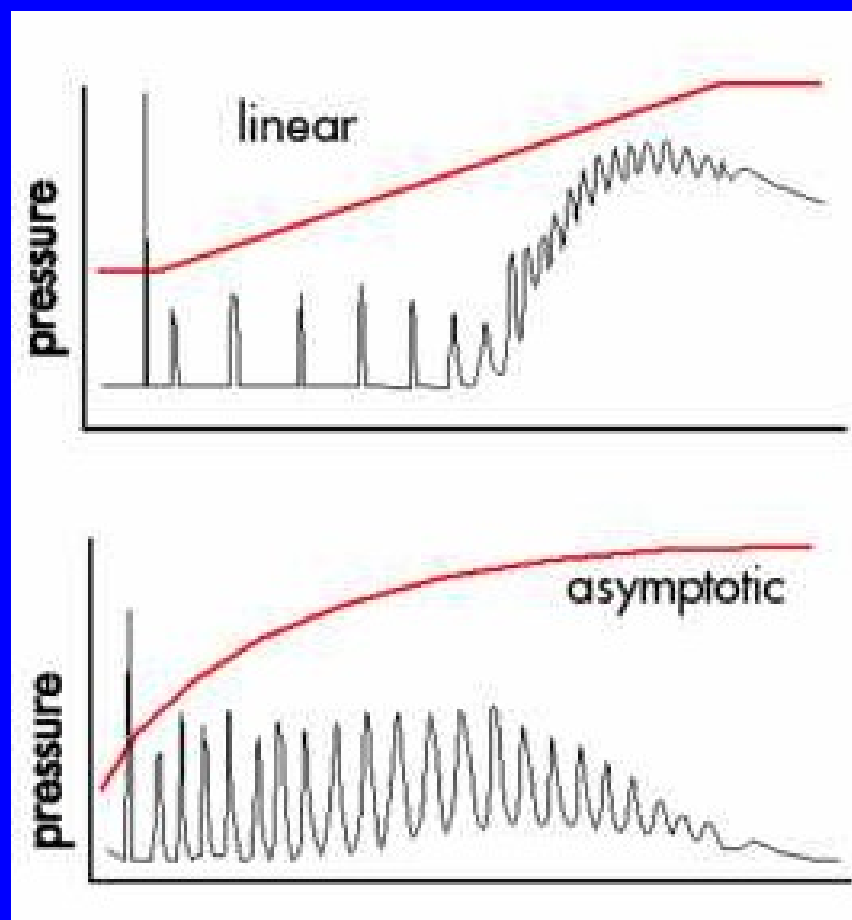
Fluid	$T_{c'}$, °C	$P_{c'}$, atm	d'
CO ₂	31.3	72.9	0.96
N ₂ O	36.5	72.5	0.94
NH ₃	132.5	112.5	0.40
n-C ₅	196.6	33.3	0.51
n-C ₄	152.0	37.5	0.50
CCl ₂ F ₂	111.8	40.7	1.12
CHF ₃	25.9	46.9	-----

*density in g/ml at 400 atm

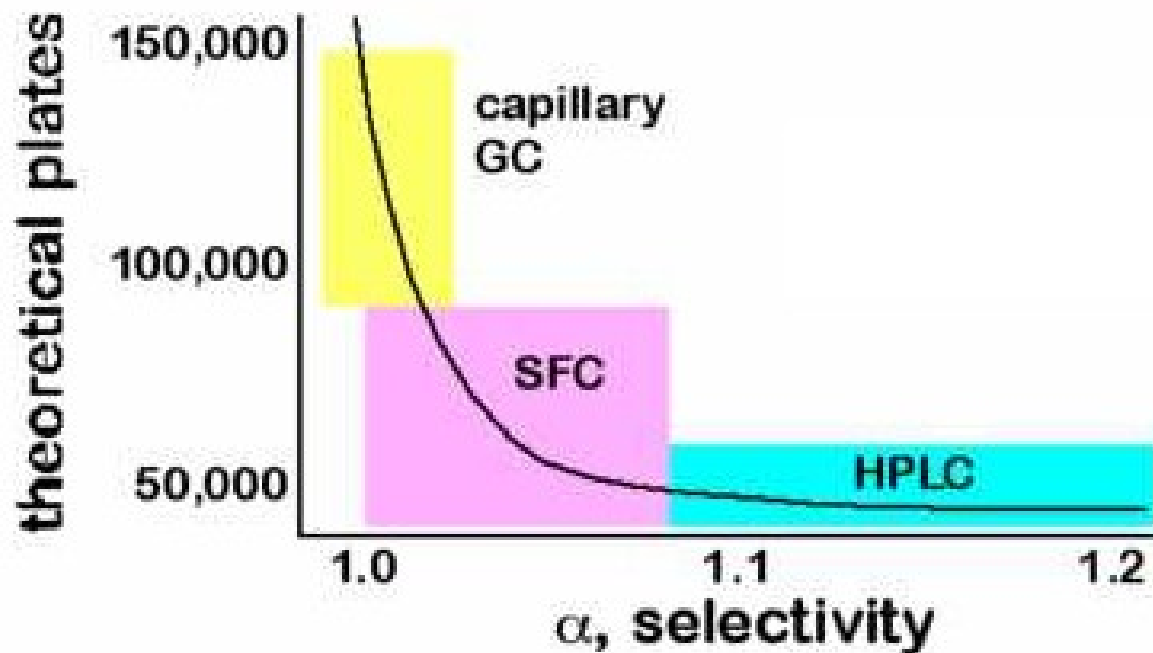
Superkritická fluidní chromatografie



Superkritická fluidní chromatografie

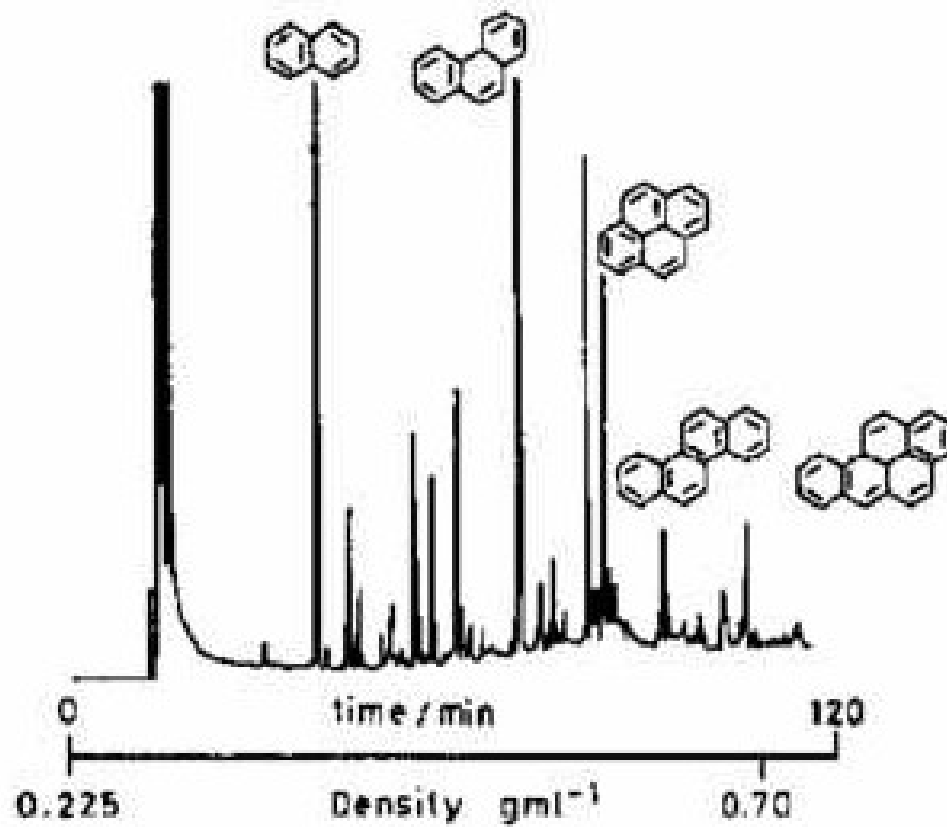


Superkritická fluidní chromatografie

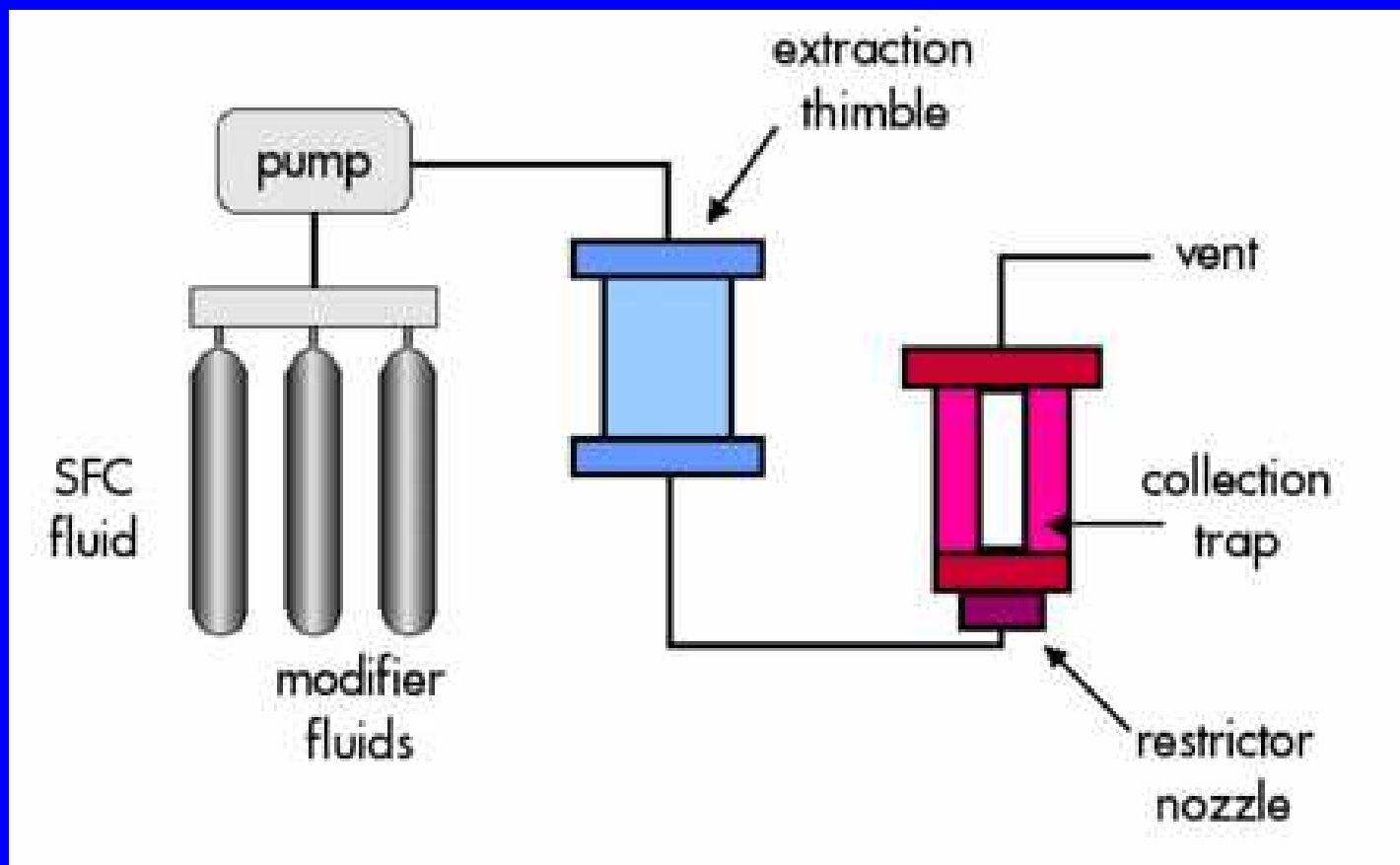


Number of plates required to achieve a separation with $R_s = 1.5$ and $k' = 2$

SFC analyza



Superkritická fluidní extrakce



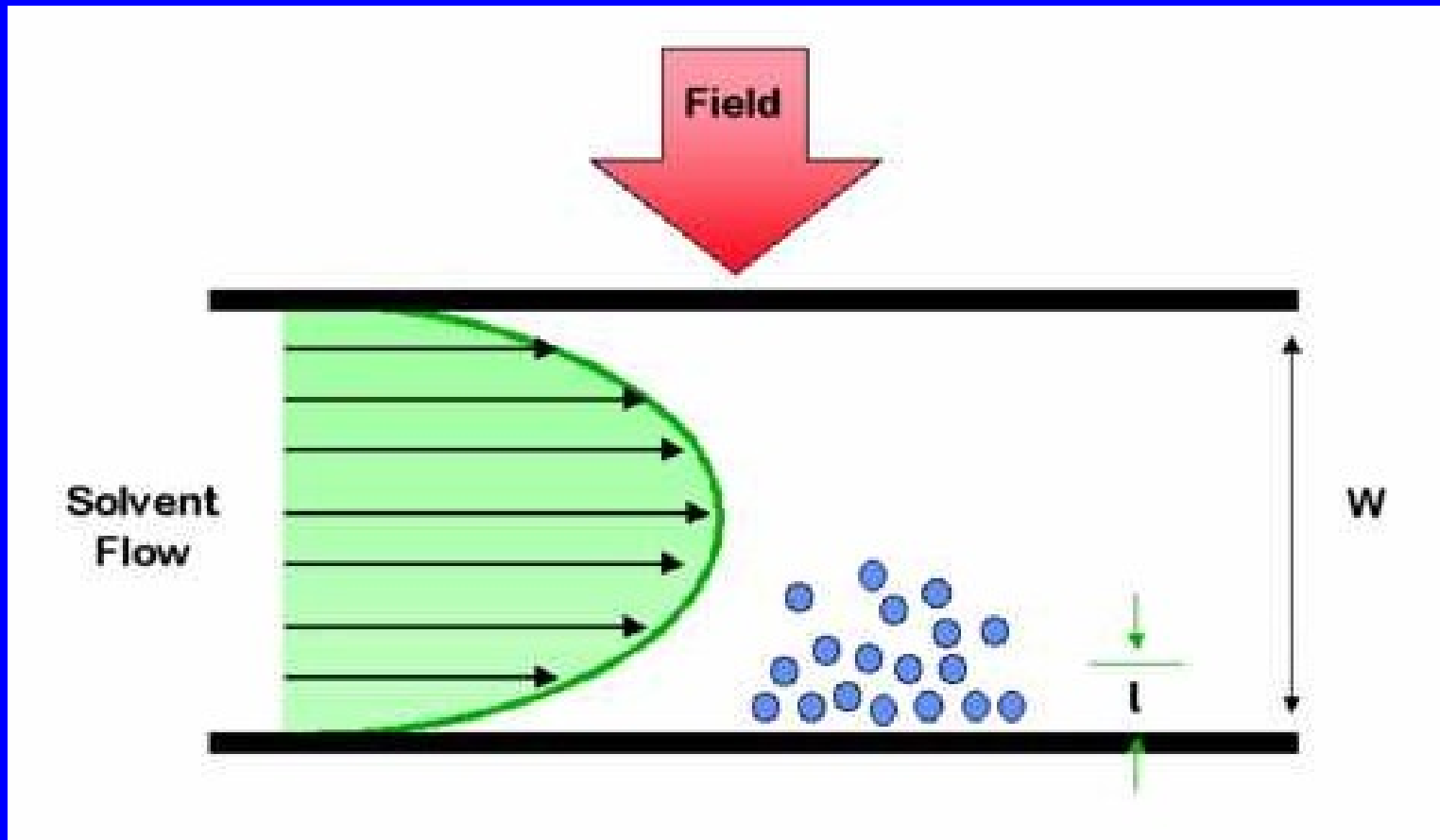
Superkritická fluidní extrakce

- Používané kapaliny - CO₂
 - levný,
 - netoxický
 - nízká kritická teplota
- Používané modifikátory
 - HCl – kyselé prostředí
 - NH₃ – bazické prostředí

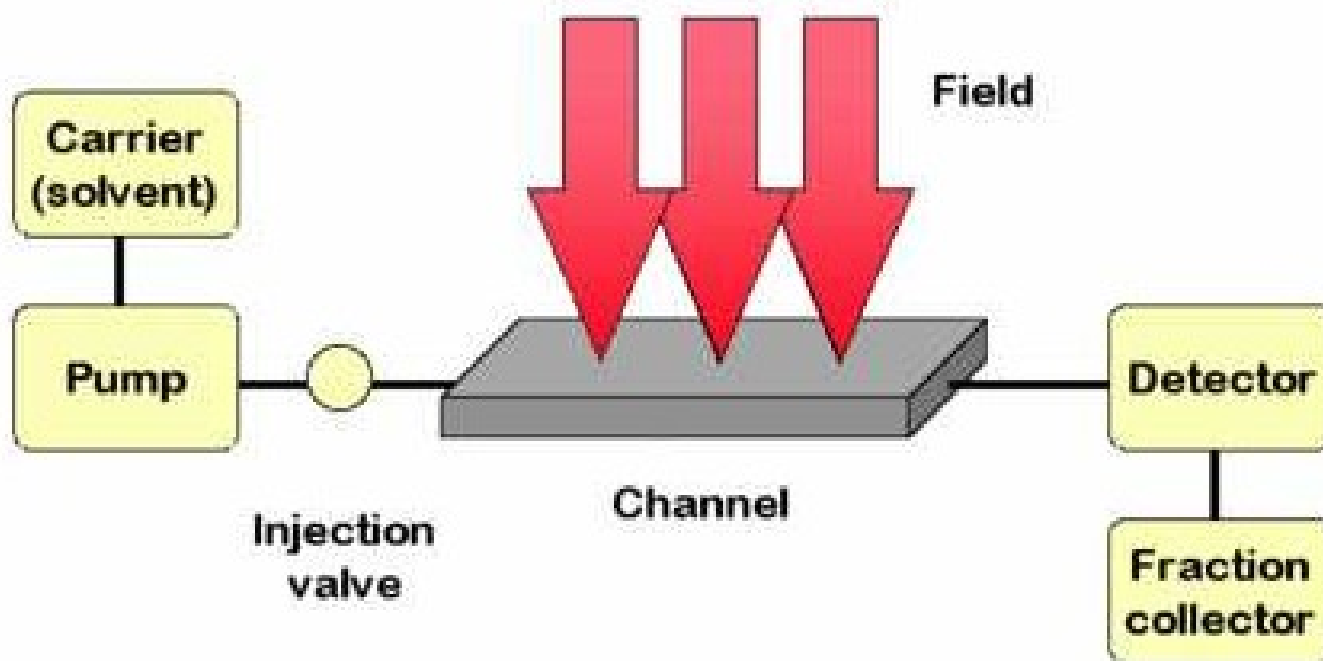
FFF

Field Flow Fractionation

Field Flow Fractionation princip



Field Flow Fractionation instrumentace



Používaná pole

- Sedimentační
- Termální
- Hydraulické
- Elektrické

Preparativní FFF

