

# 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|

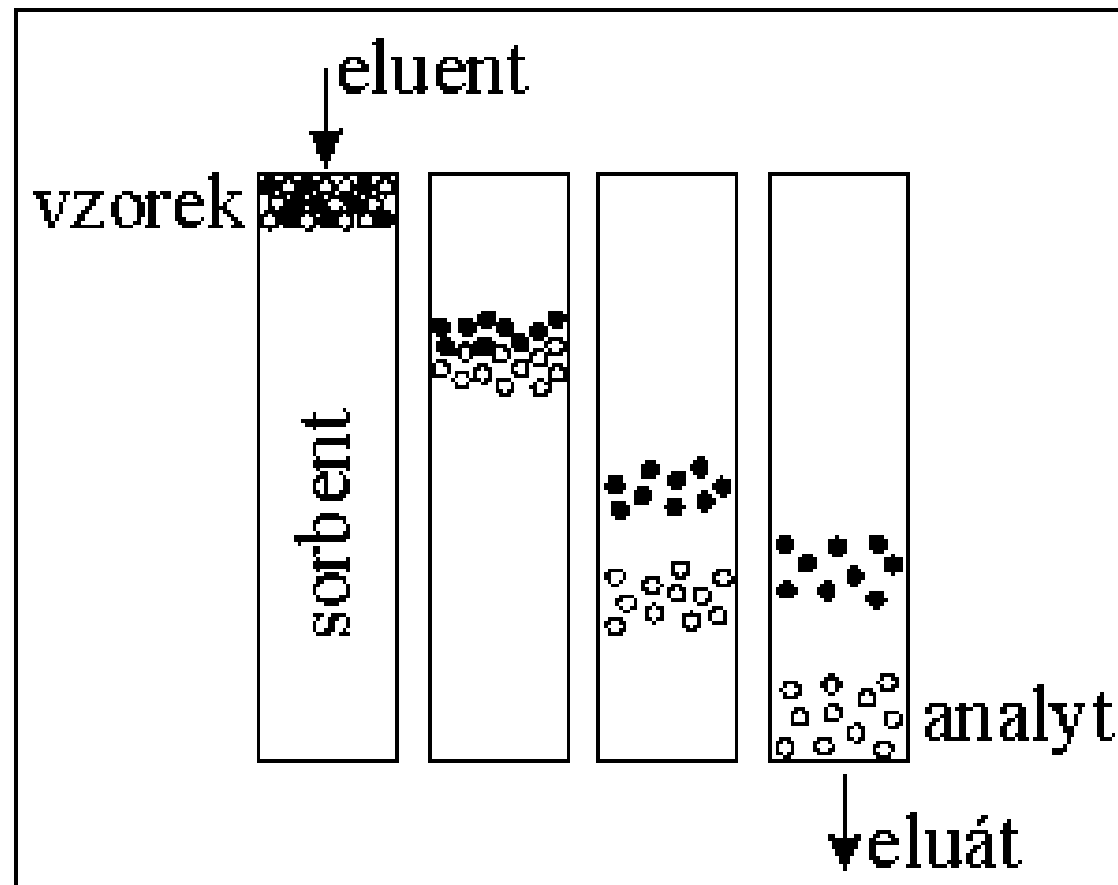
- Mobilní fáze - kapalina
- Stacionární fáze - pevná fáze,  
kapalina

# Provedení LC

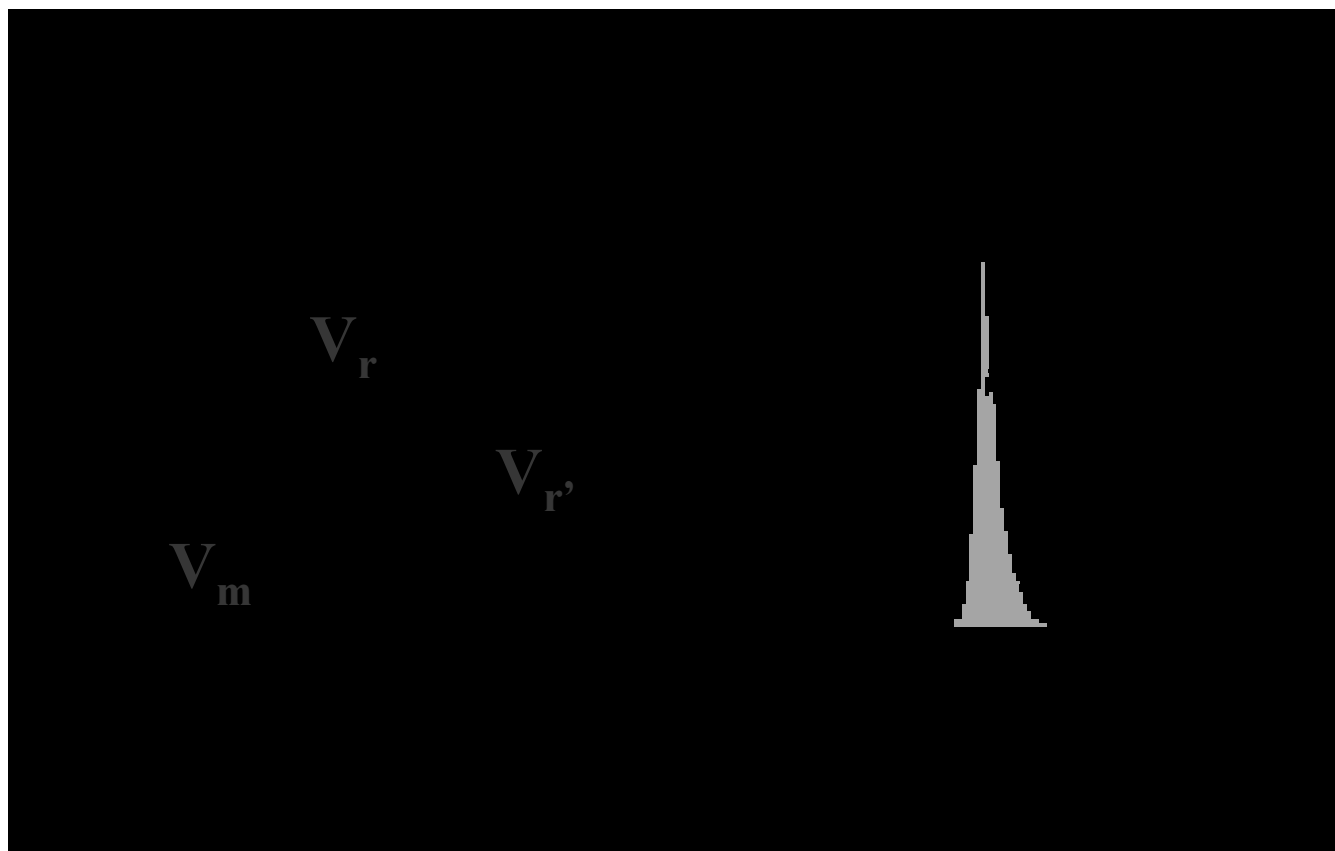
- Papírová PC
- Tenkovrstvá TLC
- Kolonová CC

# 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

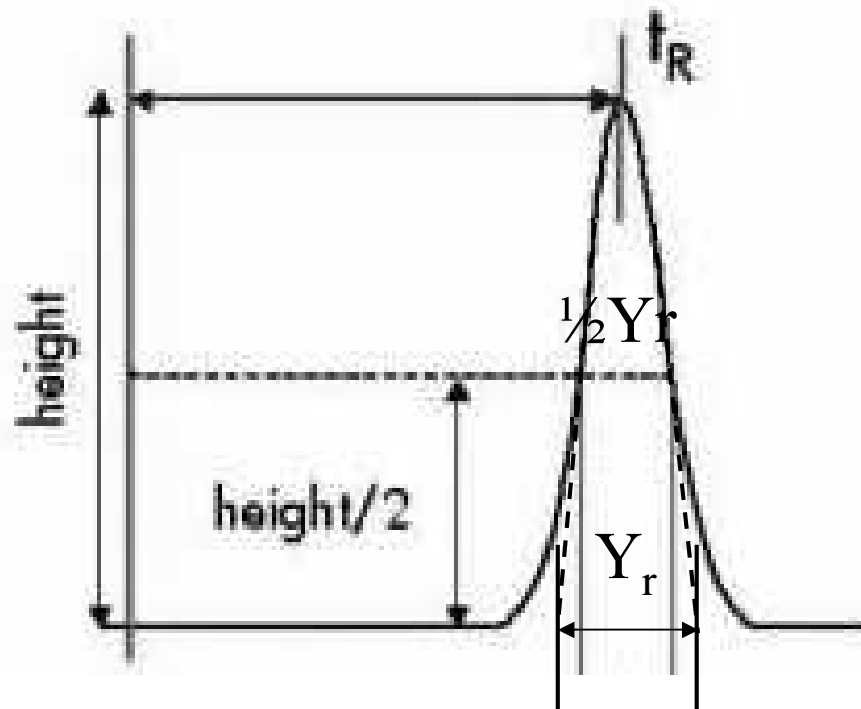
$c_M$  – rovnovážná koncentrace látky ve mobilní fázi

# Účinnost kolony

## počet teoretických pater $N$

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

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

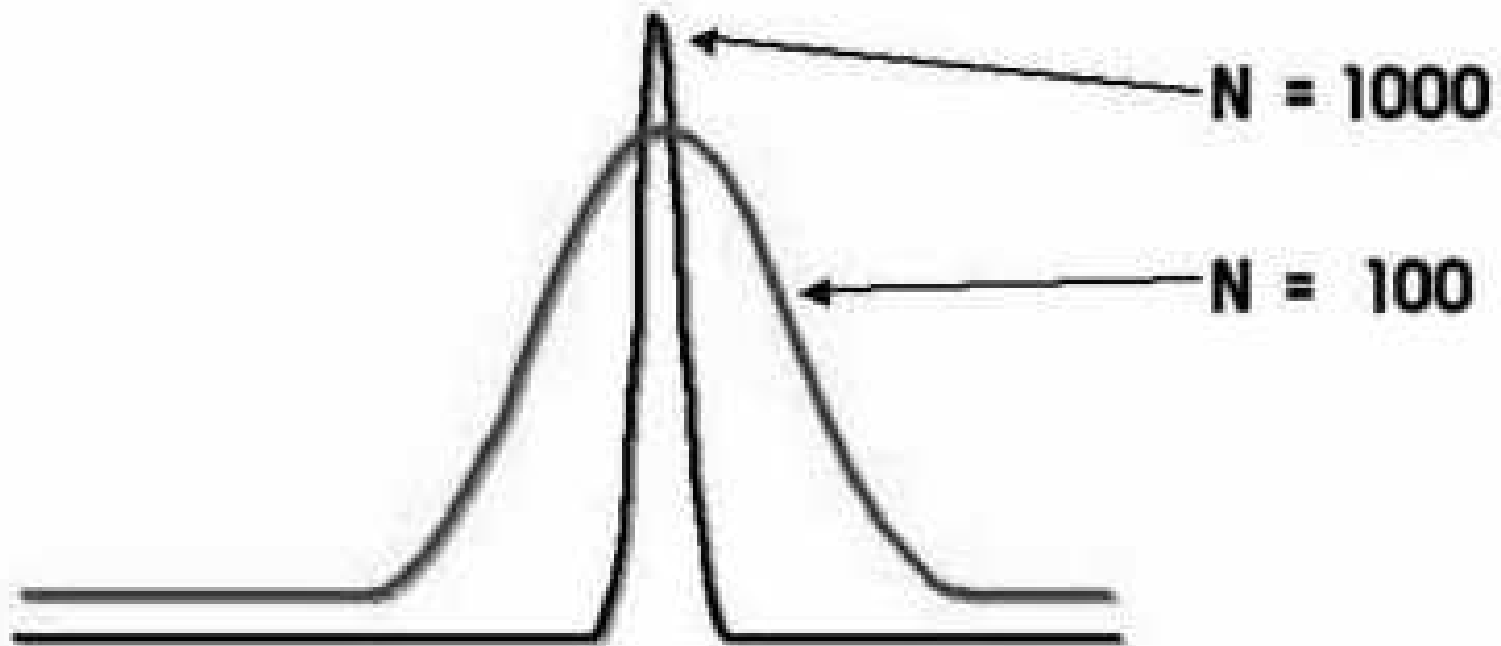


# Účinnost kolony výškový ekvivalent teoretického patra H

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

$l$  – délka kolony

# Účinnost kolony

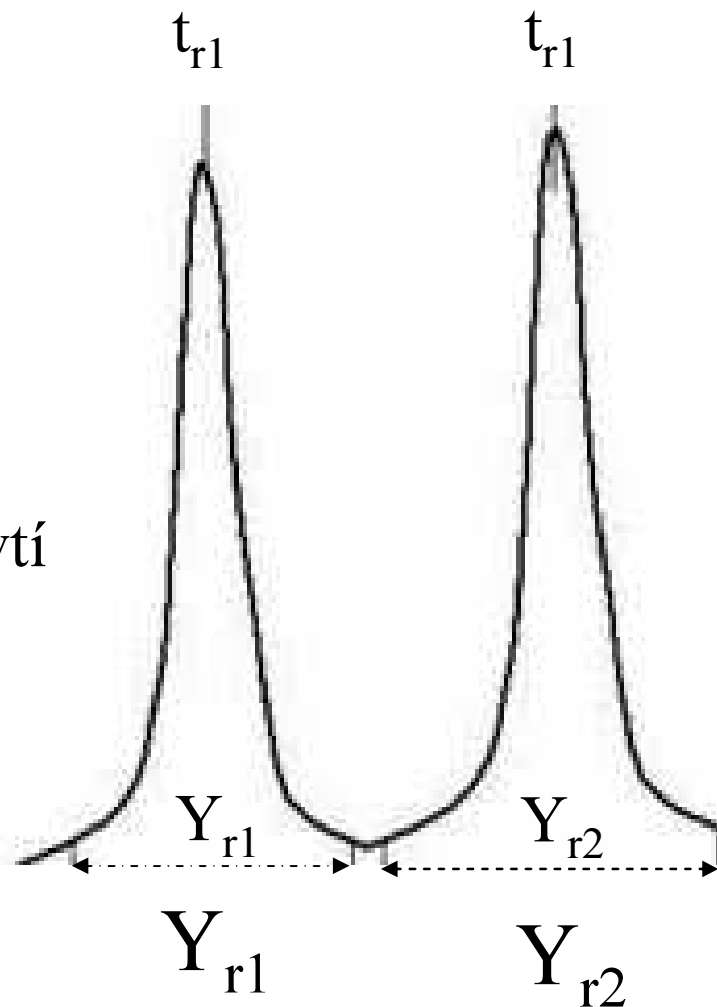


# Rozlišení

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

$R_{12}=1.5$  – nulové překrytí

$R_{12}=1.0$  – překrytí 2 %

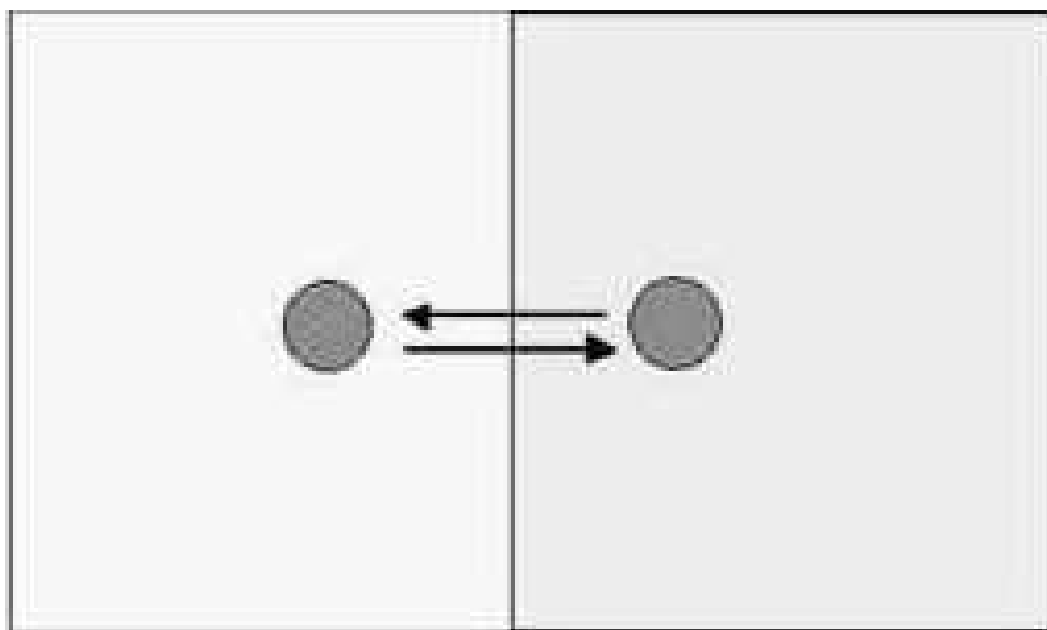


# Síly a efekty využívané při separaci

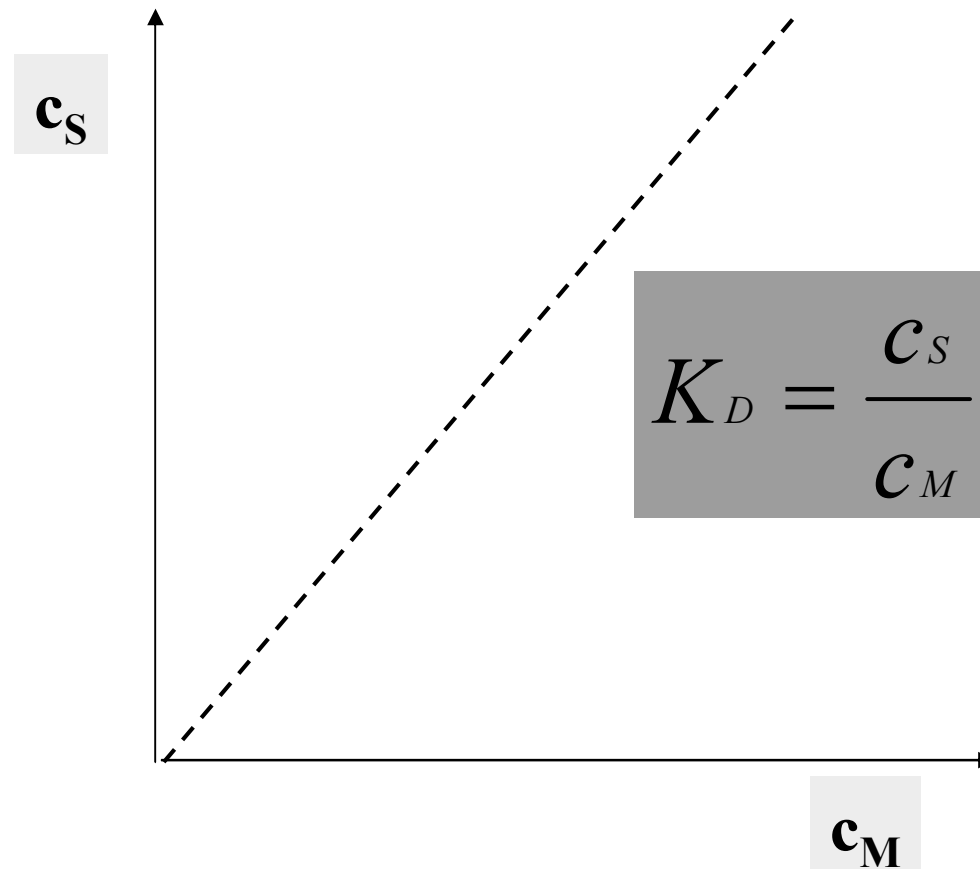
- Iontové síly
- Polární síly
- Nepochární síly
- Sterické interakce
- Efekt velikosti molekul



# Rozdělovací chromatografie

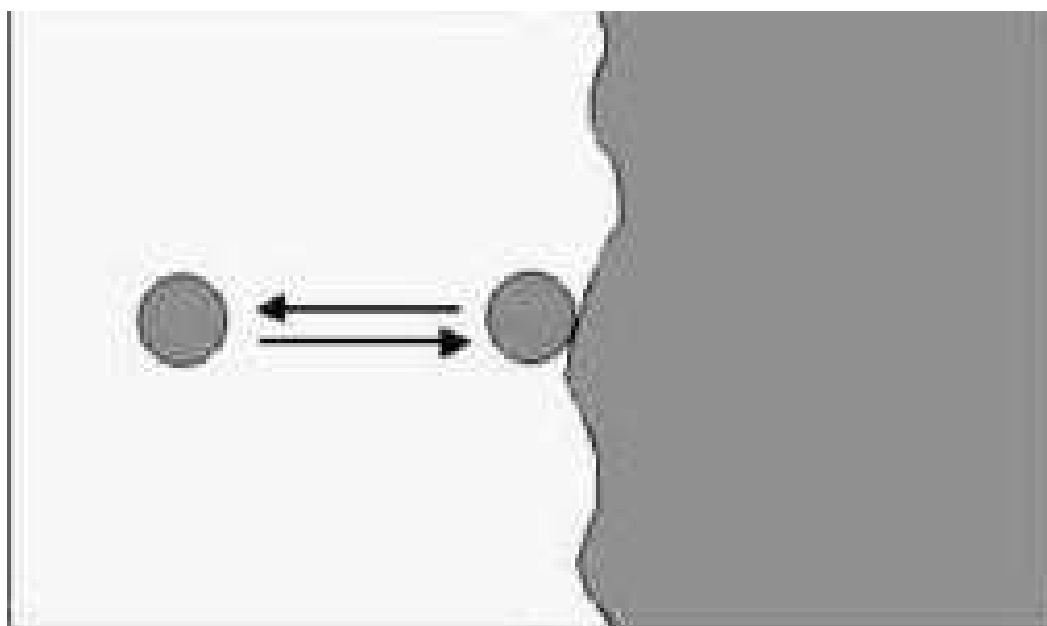


# Rozdělovací chromatografie

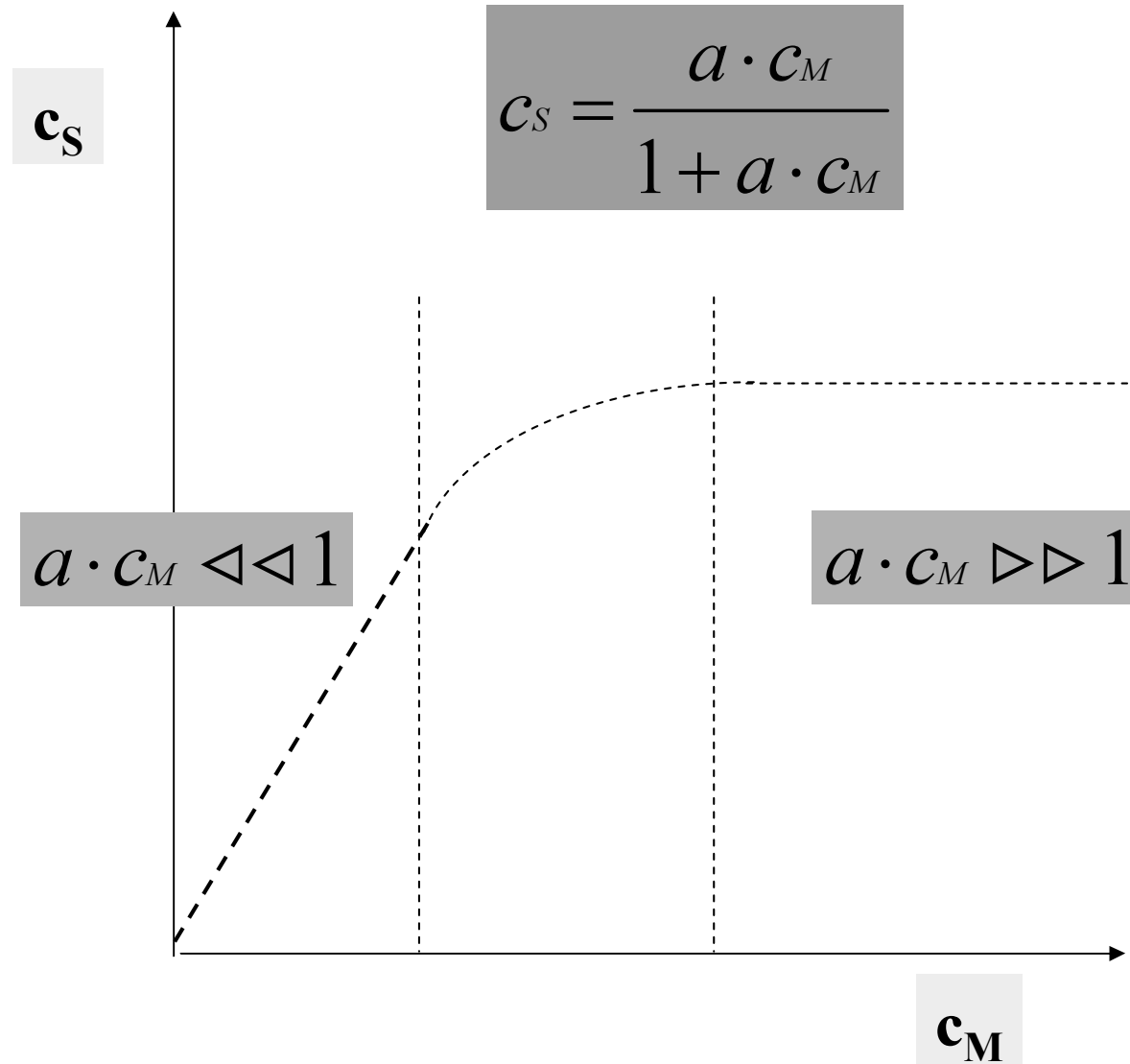


Použití – analytická PC, TLC

# Adsorpční chromatografie



# Adsorpční chromatografie



# Adsorpční chromatografie

- Stacionární fáze – polární

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

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

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

# Adsorpční chromatografie

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

Eluotropická řada:

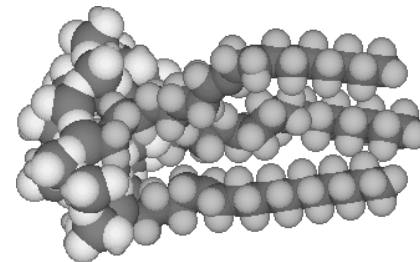
uhlovodíky < subst. uhlovodíky < ketony <

aldehydy < alkoholy < voda

# Reverzně fázová chromatografie

- Stacionární fáze – nepolární

$C_8, C_{18}$



- Mobilní fáze – polární – vodné roztoky

pH → potlačit disociaci

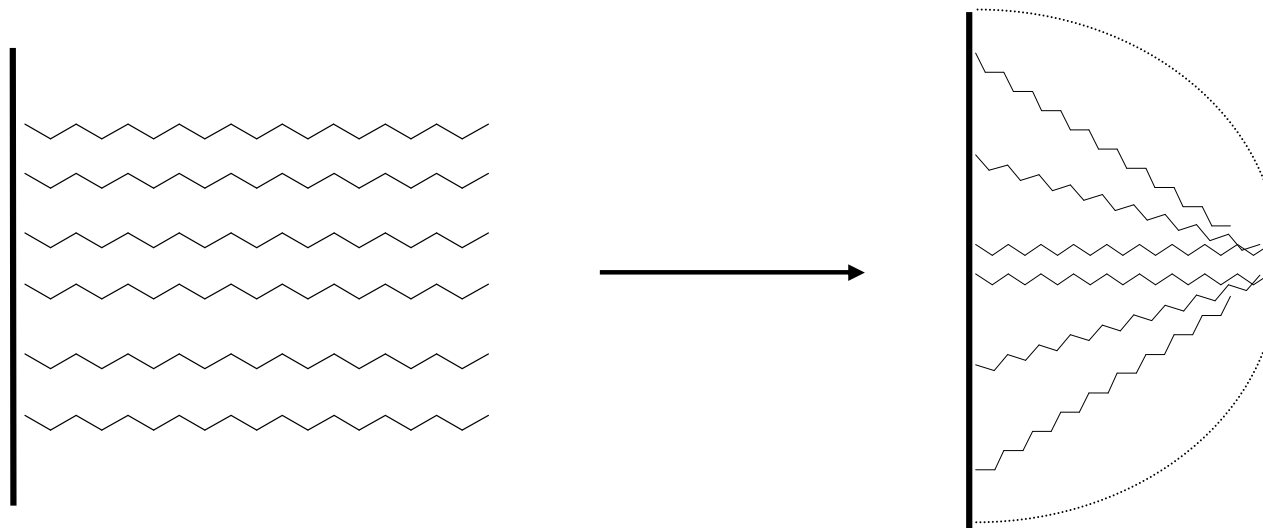
- Eluce – snižováním polarity mobilní fáze

ACN, MetOH,

# Reverzně fázová chromatografie

**Kartáčový typ stacionární fáze**

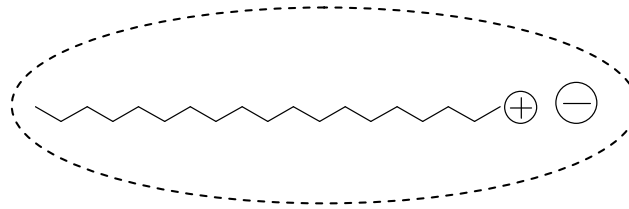
**H<sub>2</sub>O**



**Použití : analytické – až 90 % analýz**



# Iontově párová chromatografie



iontově párující činidlo

analyt

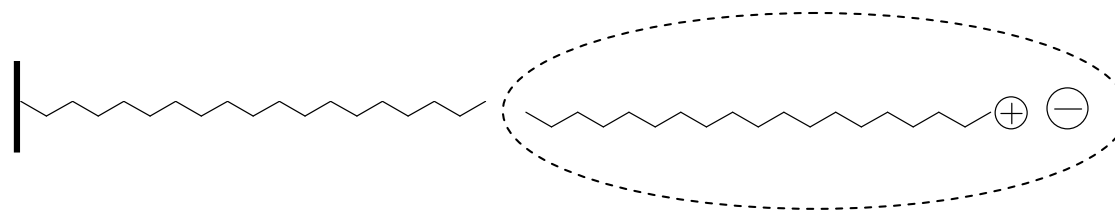
+ - SDS,  $\text{HClO}_4$

- - tetrabutylamonium

# Iontově párová chromatografie

sorbent C<sub>18</sub>

iontový pár



Stacionární, mobilní fáze, eluce – RPC

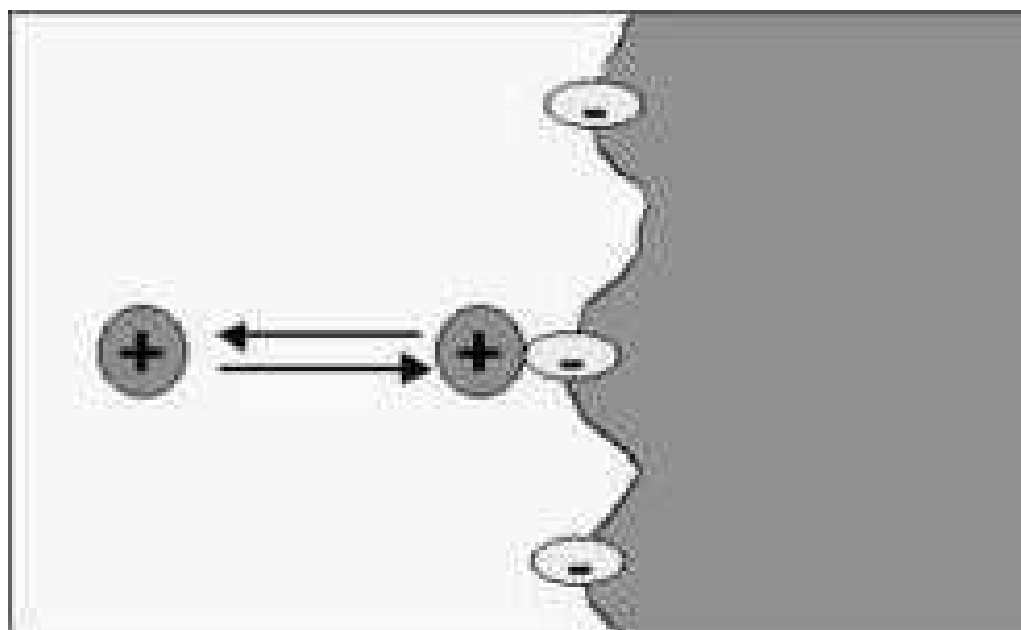
pH → plná ionizace analytu

# 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

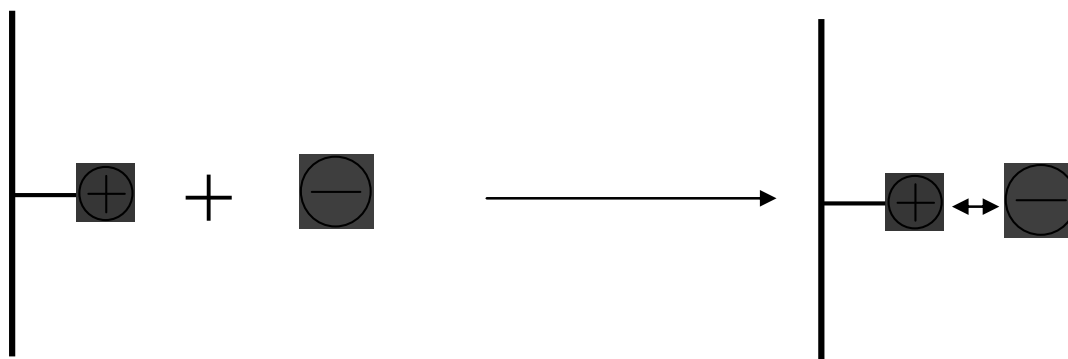
# Ionexová chromatografie



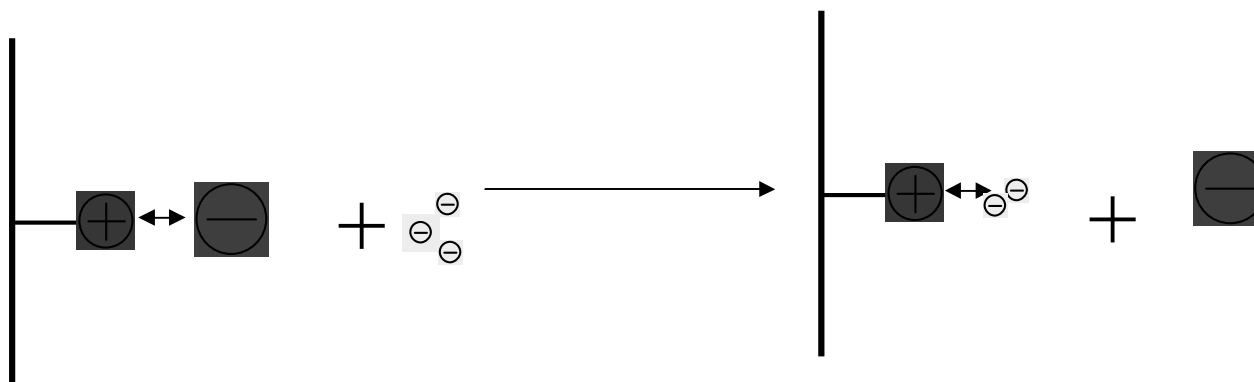
# Ionexová chromatografie

elektrostatická interakce

Vazba



Eluce



# Ionexy

- Katexy - - vazba kationtů

silné - sulfo(S), sulfopropyl(SP)  $\text{OSO}_3^-$

slabé - karboxy(C), karboxymetyl(CM)  $\text{COO}^-$

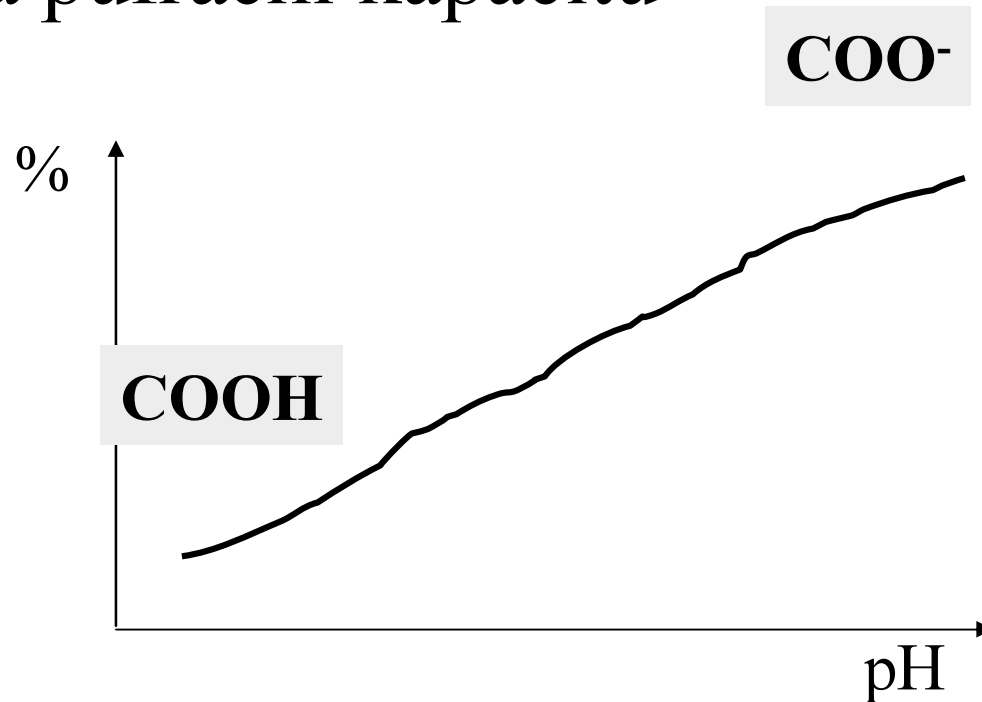
- Anexy - + vazba aniontů

silné - dietylaminoetyl(DEAE)

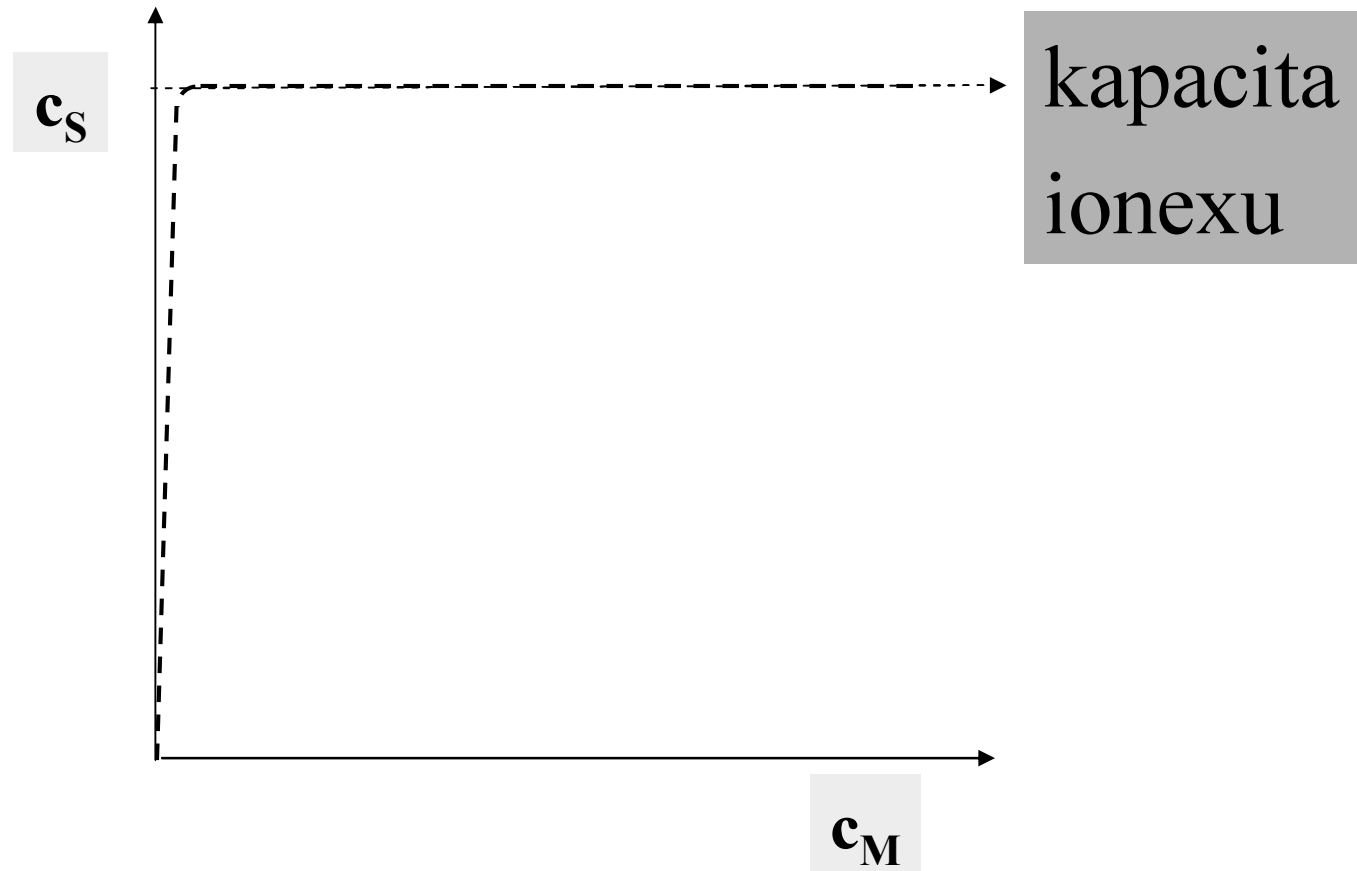
slabé – trietylaminoetyl(TEAE)

# Slabý ionex

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

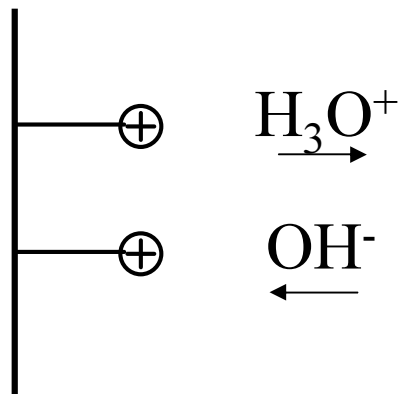


# Ionexová chromatografie

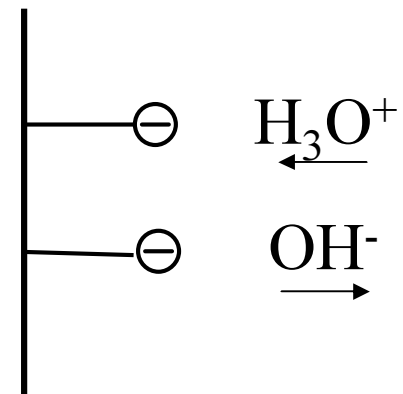




# Donanův efekt



zvyšování pH



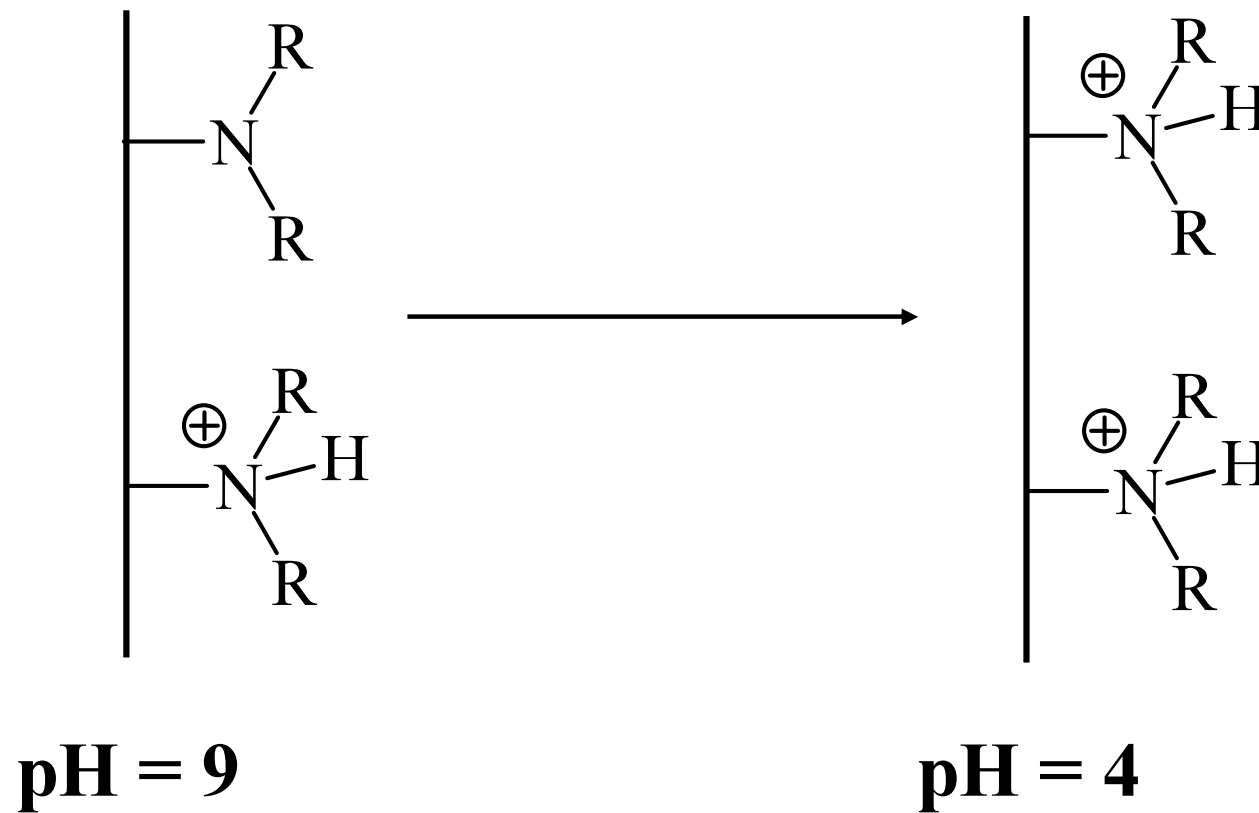
snižování pH

# Ionexová chromatografie

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

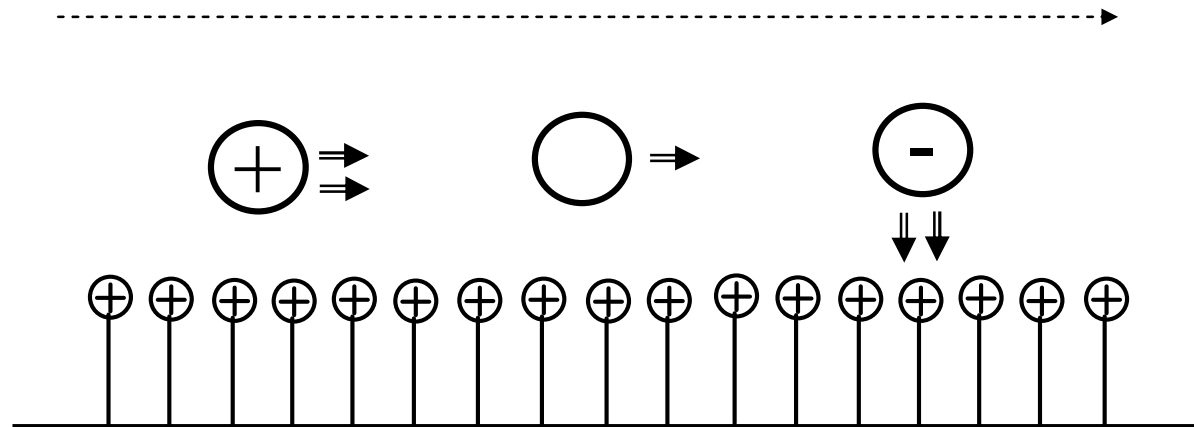
Použití – purifikace, zakoncentrování, výměna pufu

# Chromatofokusace děj na koloně

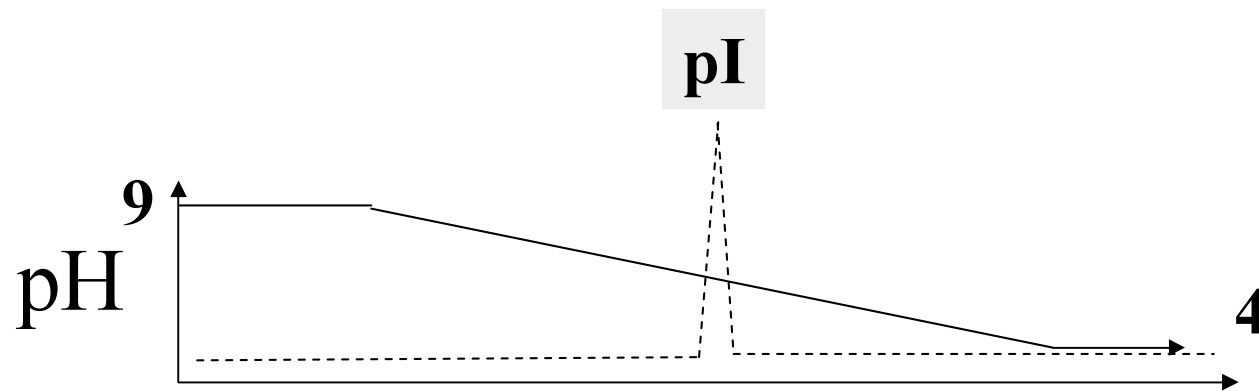


# Chromatofokusace chování vzorku

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



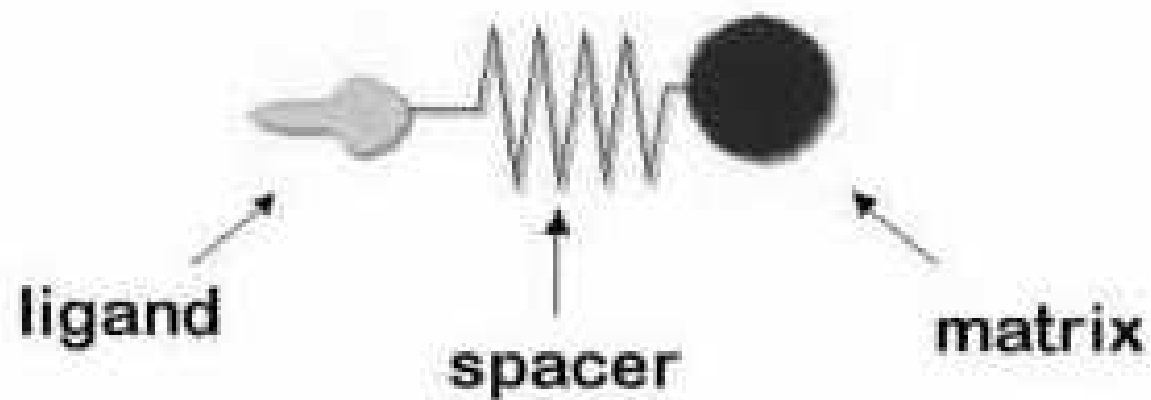
# Chromatofokusace chování vzorku



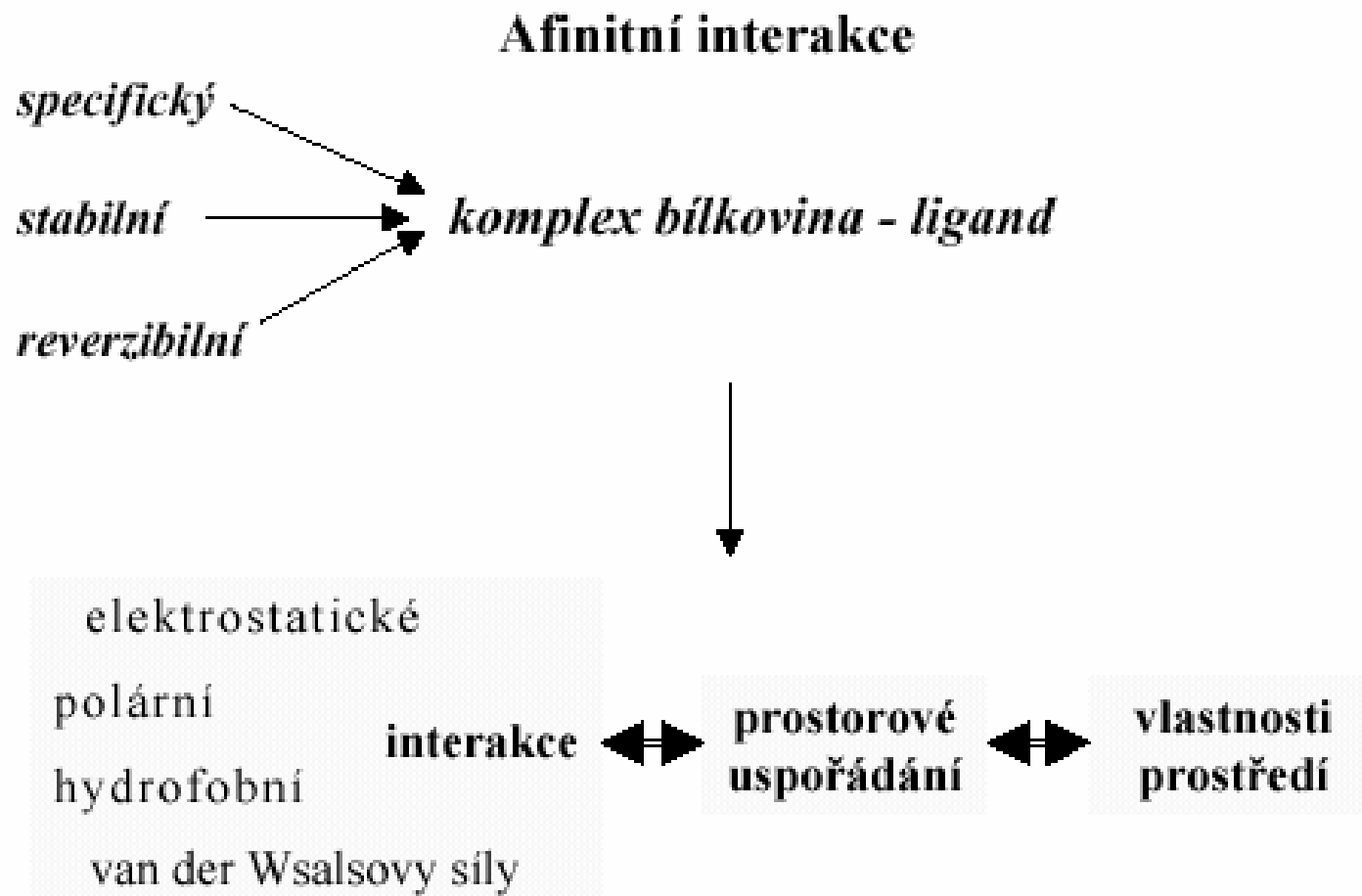
Použití : analytické – stanovení pI

preparativní – purifikace bílkovin

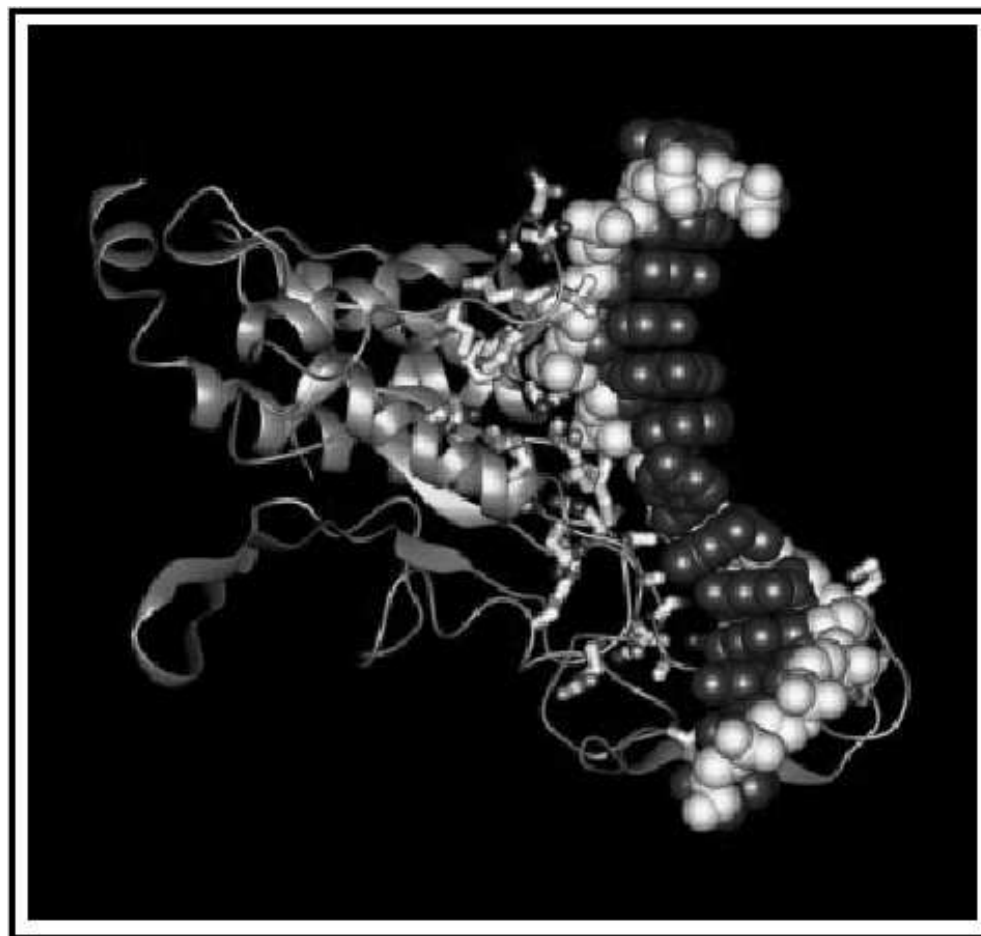
# Afinní chromatografie



# Afinitní interakce



# Interakce mezi DNA a endonukleasou



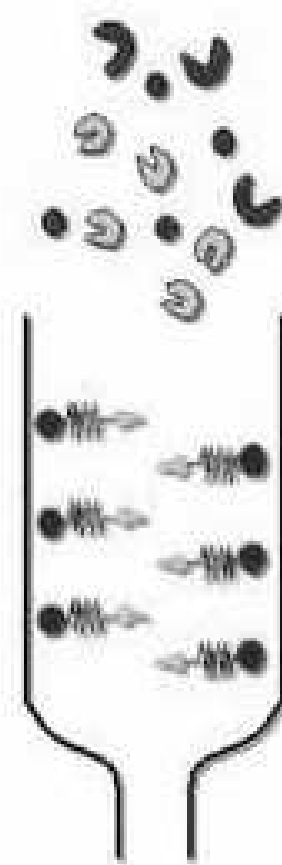


# Afinitní páry

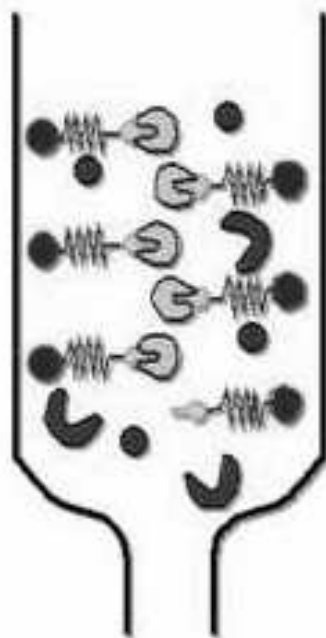
| Ligand        | Bílkovina               | $K_D$ (M)            |
|---------------|-------------------------|----------------------|
| antigen       | polyklonální protilátka | $10^{-8} - 10^{-6}$  |
| antigen       | monoklonální protilátka | $10^{-12} - 10^{-8}$ |
| biotin        | avidin        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

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

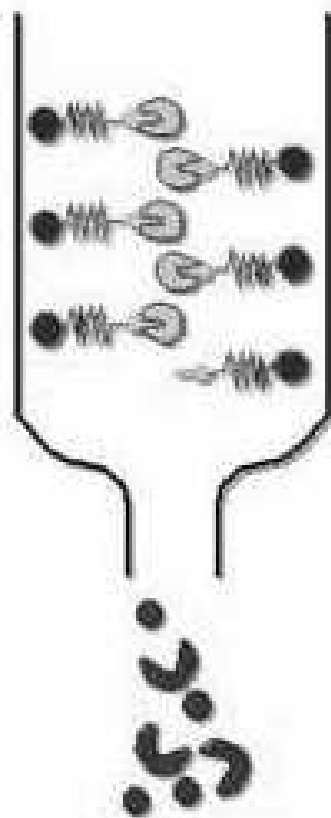
# Afinní chromatografie nanesení vzorku



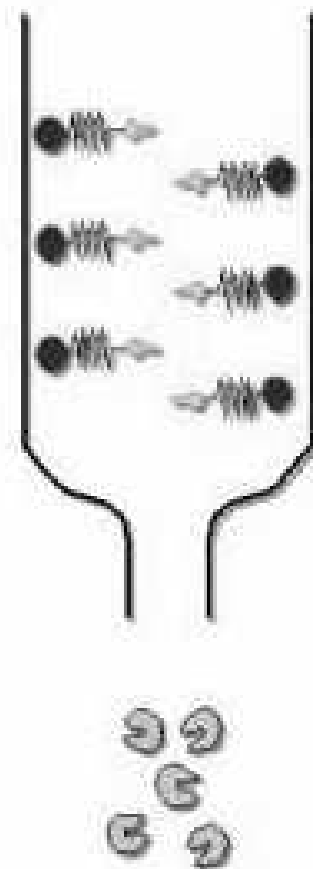
# Afinní chromatografie vznik interakce



# Afinní chromatografie vymytí balastů

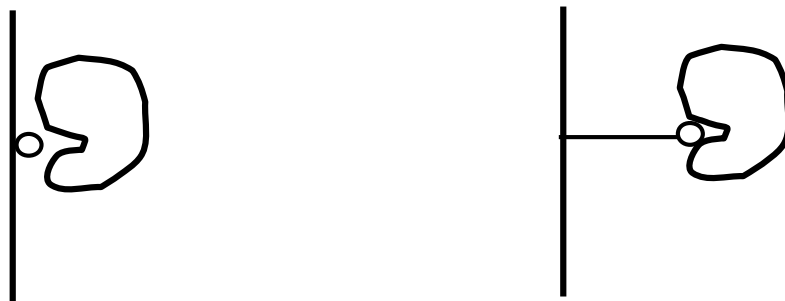


# Afinní chromatografie eluce



# Předpoklady pro vznik komplexu

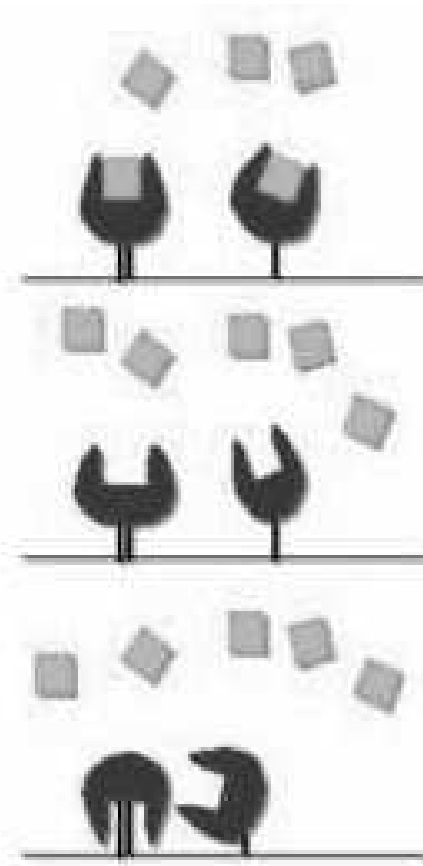
- Sterické – použití raménka (spacer)



- Optimální pH, iontová síla

# Předpoklady pro vznik komplexu

- Vazebné
- Konformační



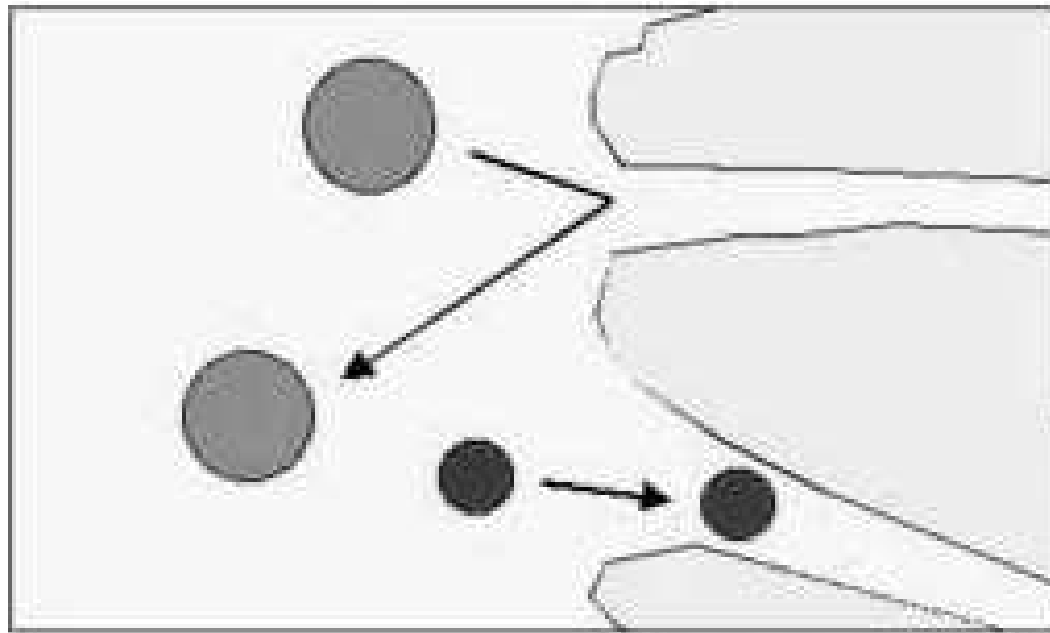
# Provedení

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

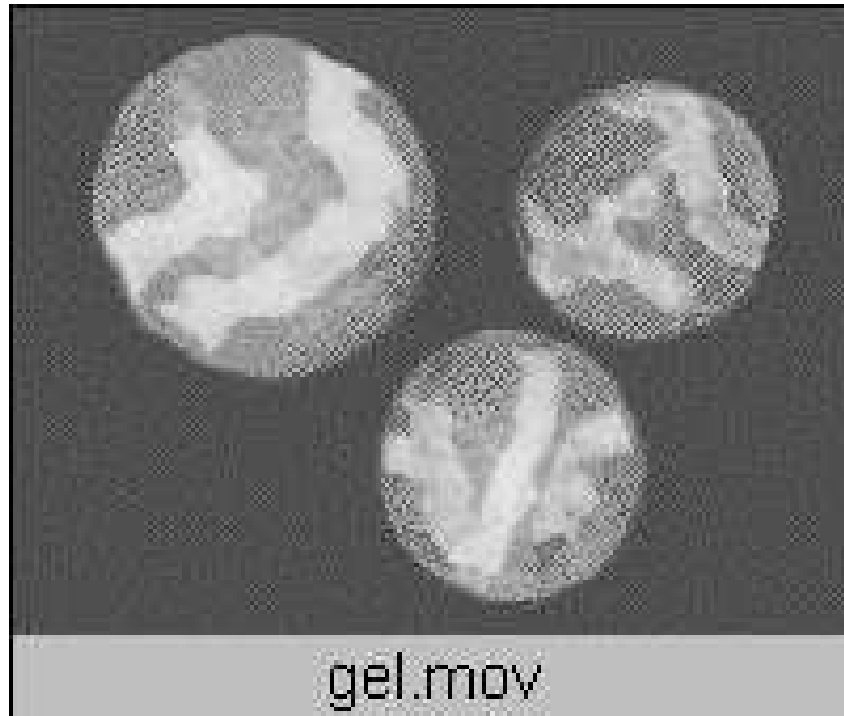
Použití : analytické (stanovení K), purifikace



# Gelová permeační chromatografie

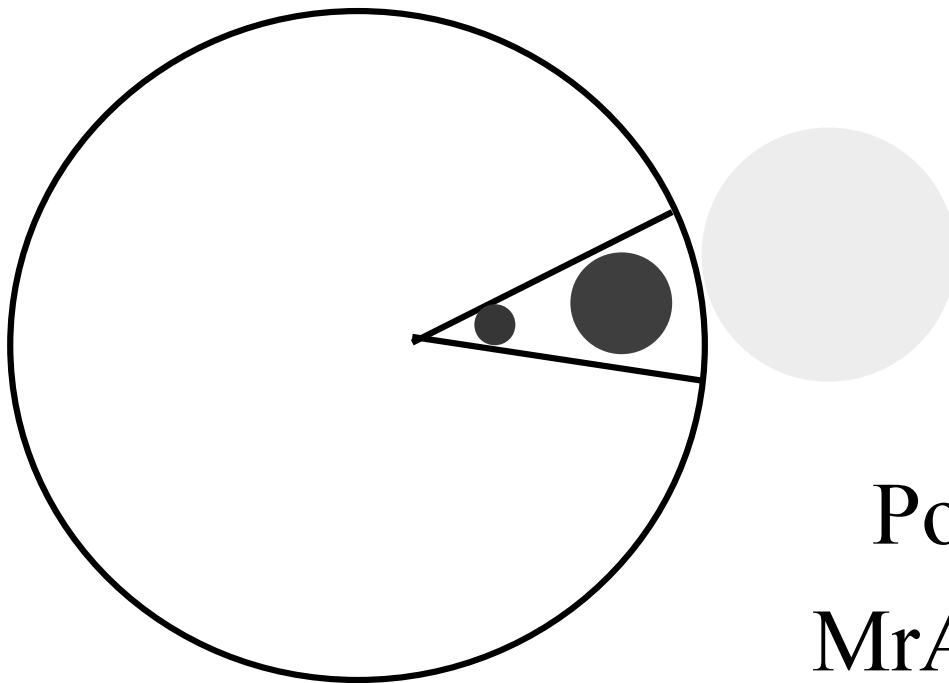


# Gelová permeační chromatografie



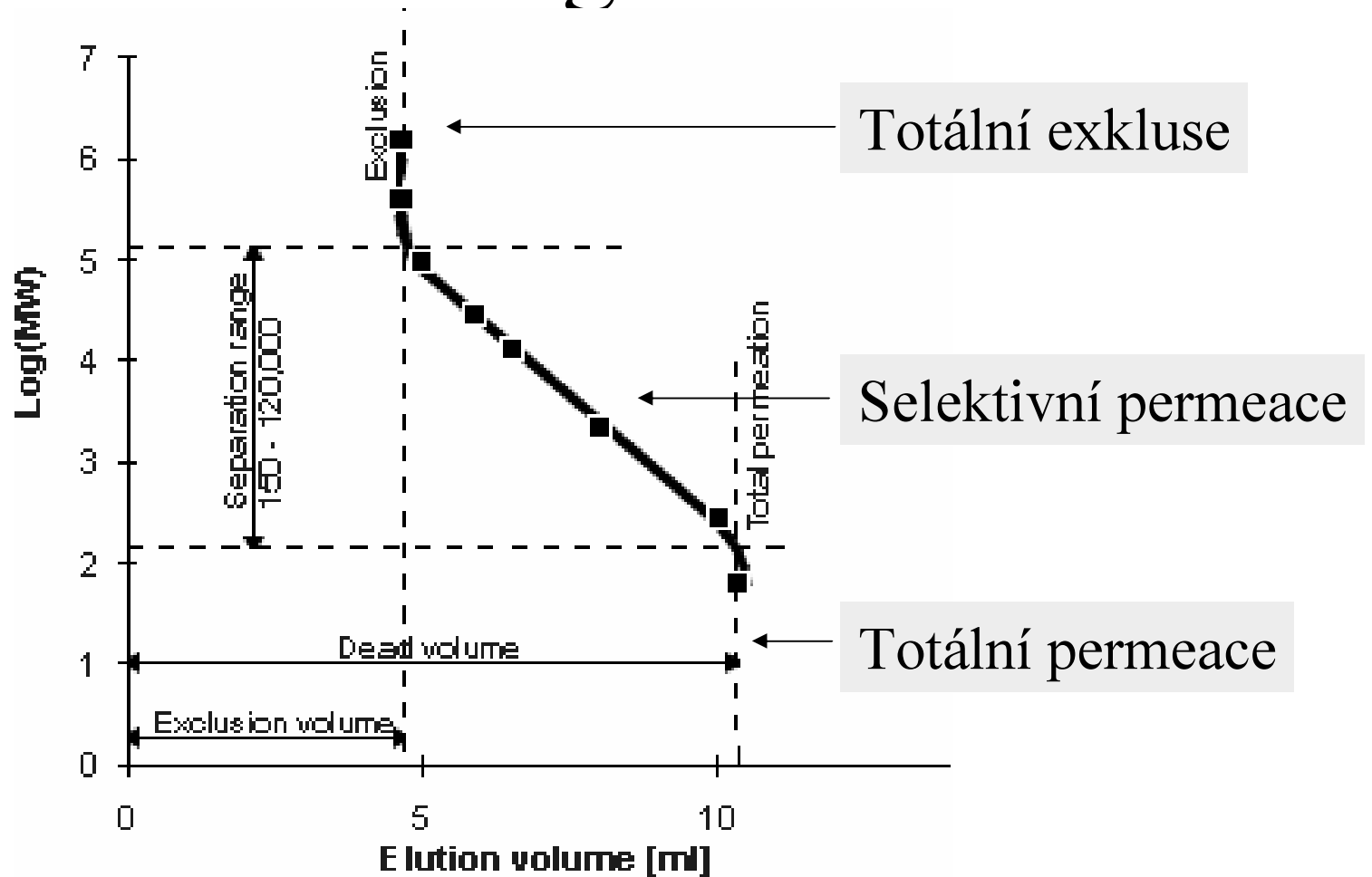
# Gelová permeační chromatografie

Princip - stérická exkluze  
- omezená difuze



Pořadí eluce :  
 $MrA > MrB > MrC$

# Gelová permeační chromatografie

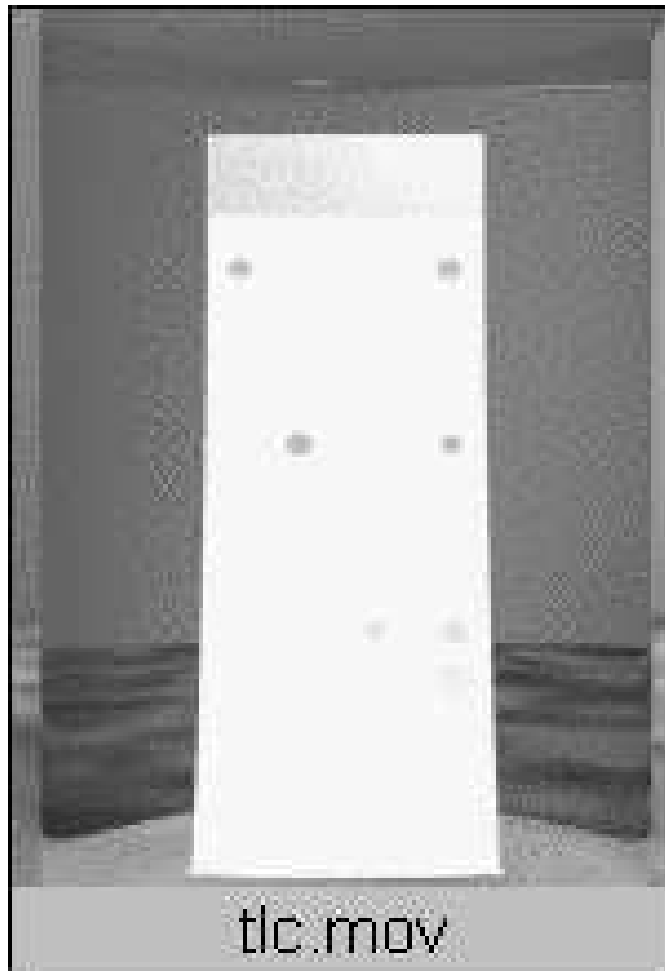


# Gelová permeační chromatografie

- 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 - Siluful (Cz)  
Watman

# PC a TLC - mody

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

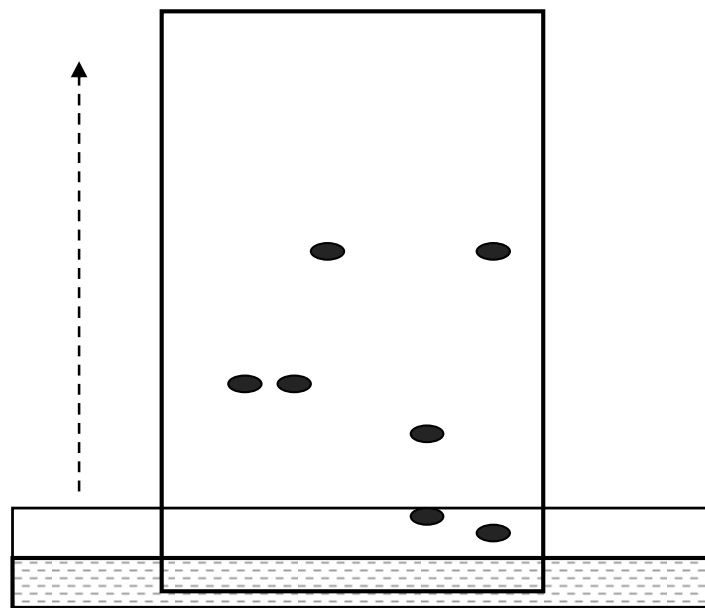
# Nanášení vzorku

- Pipety
- Kapiláry

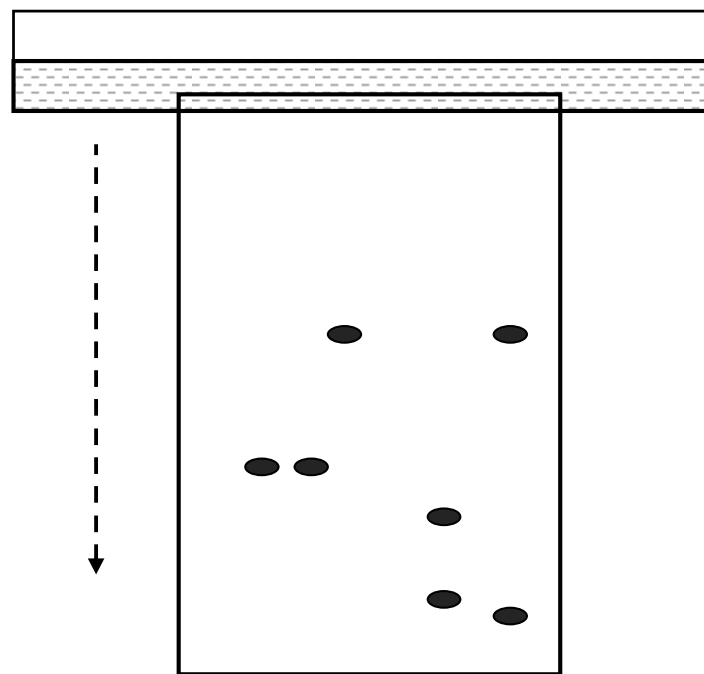
# Provedení

- Vzestupné
- Sestupné
- Kruhové
- Dvojrozměrné

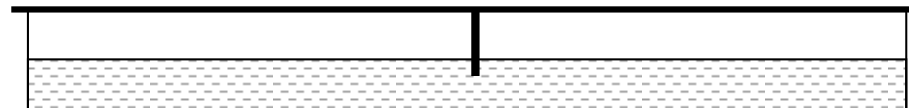
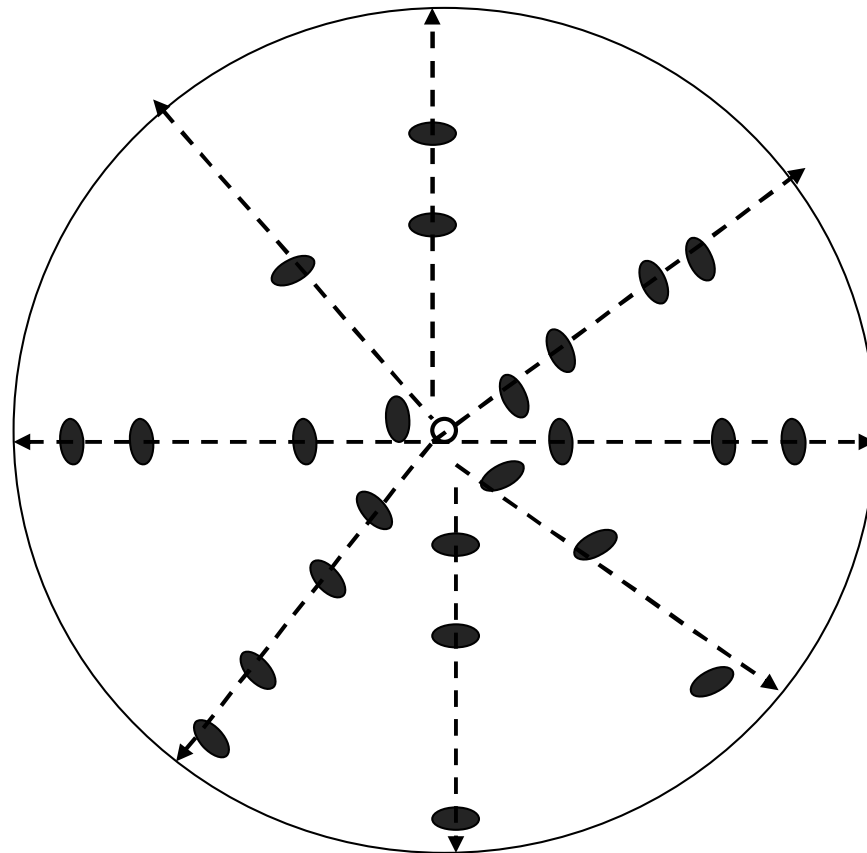
# Vzestupné



# Sestupné

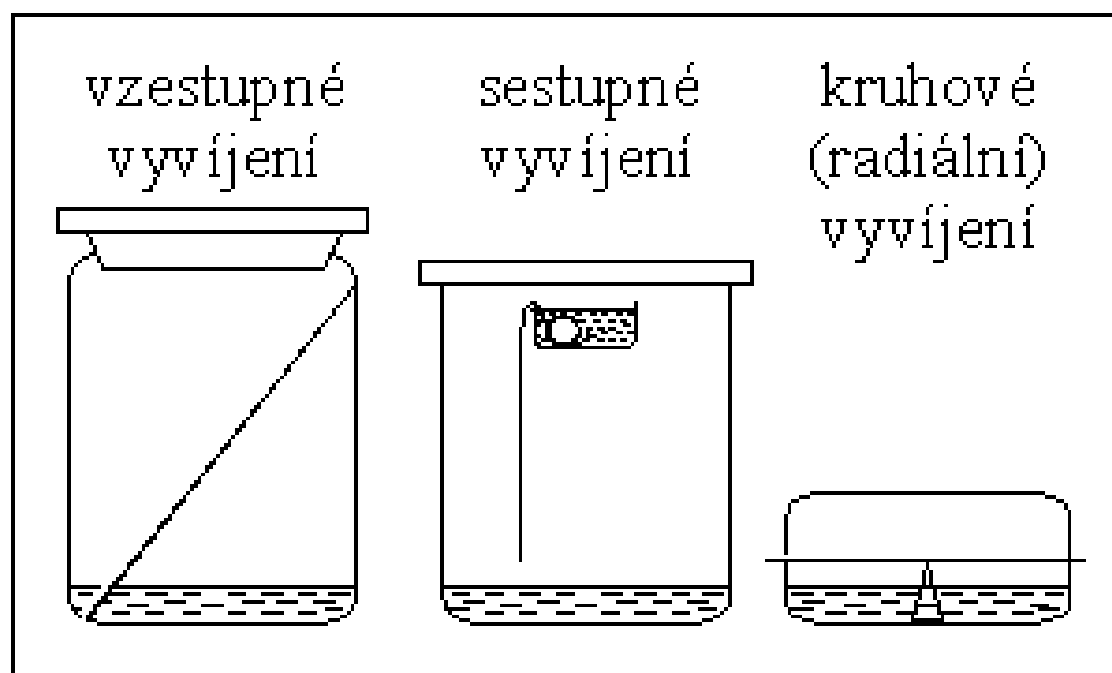


# Kruhové

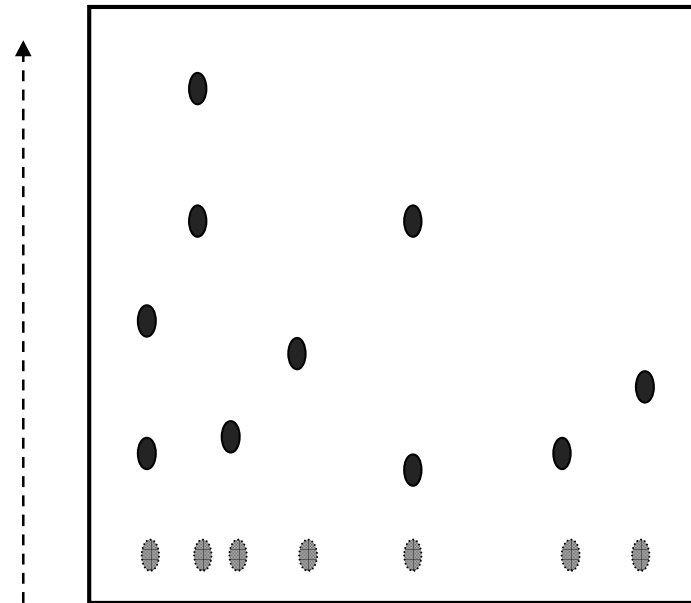
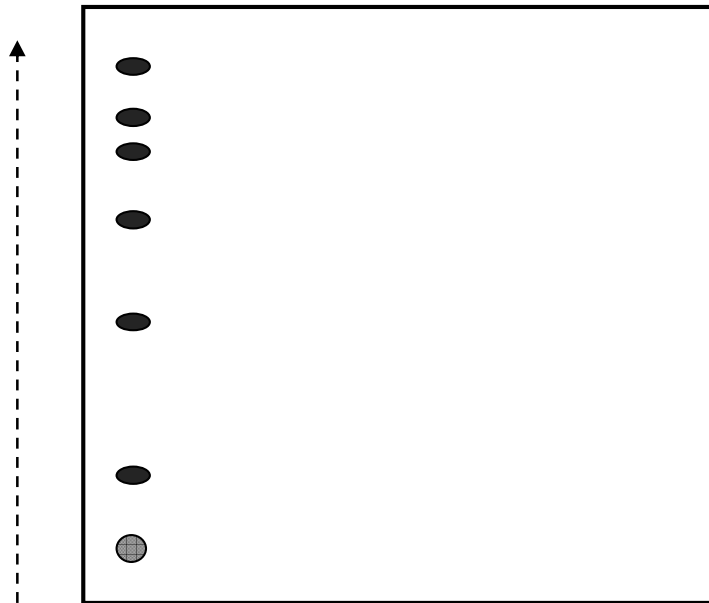




# Vyvíjení



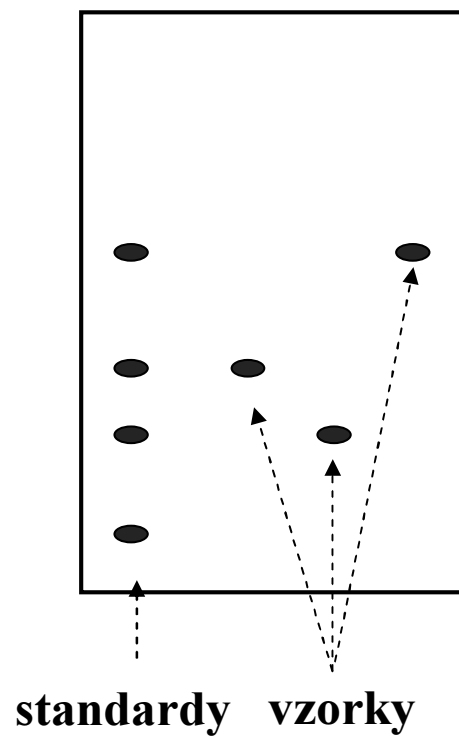
# Dvojrozměrné



# Provedení

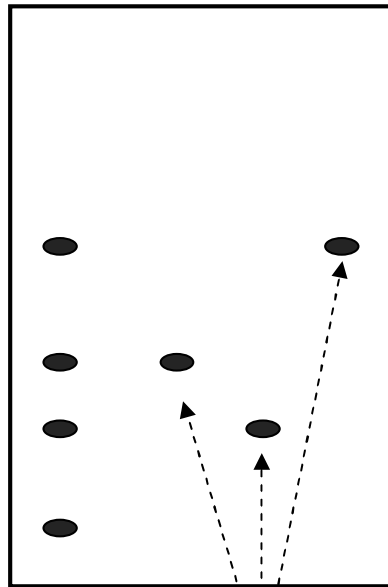
- Analytické
- Preparativní

# Analýza kvalitativní



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

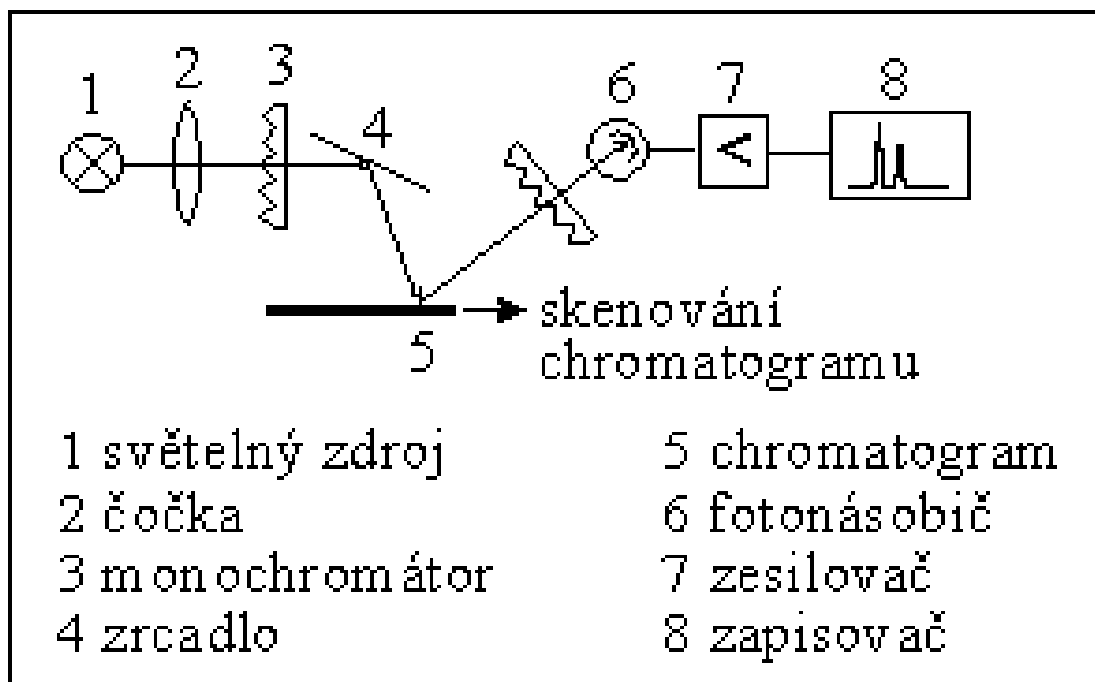
# Analýza kvantitativní



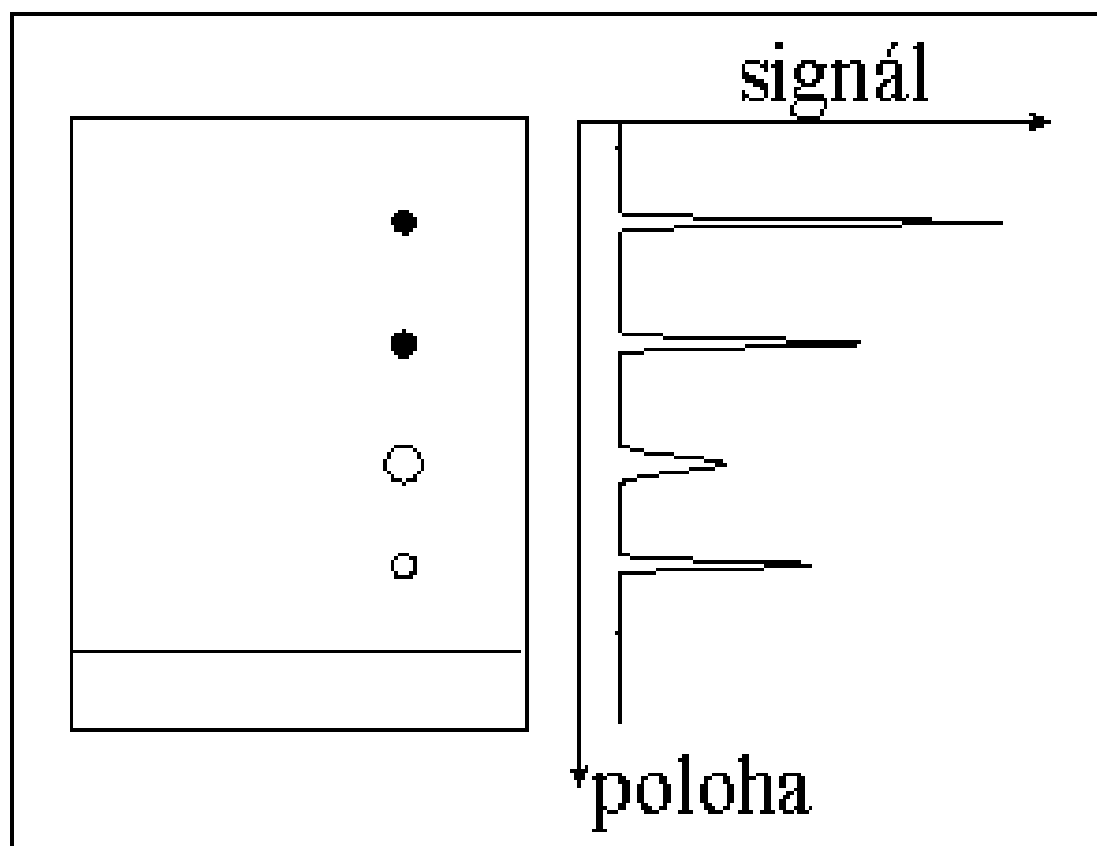
**Plocha  
skvrn**

- Planimetrie
- Densitometrie

# Denzitometrie



# Denzitometrie

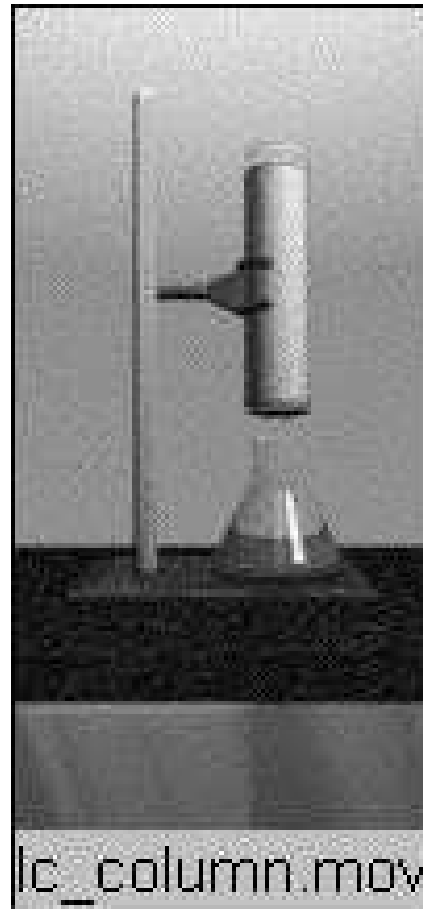


# Preparace

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



# Chromatografie



# Chromatografie

- Cvet – separace chlorofylů na  $\text{CaCO}_3$  1906

# Kapalinová chromatografie rozdělení

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

# Kapalinová chromatografie využití

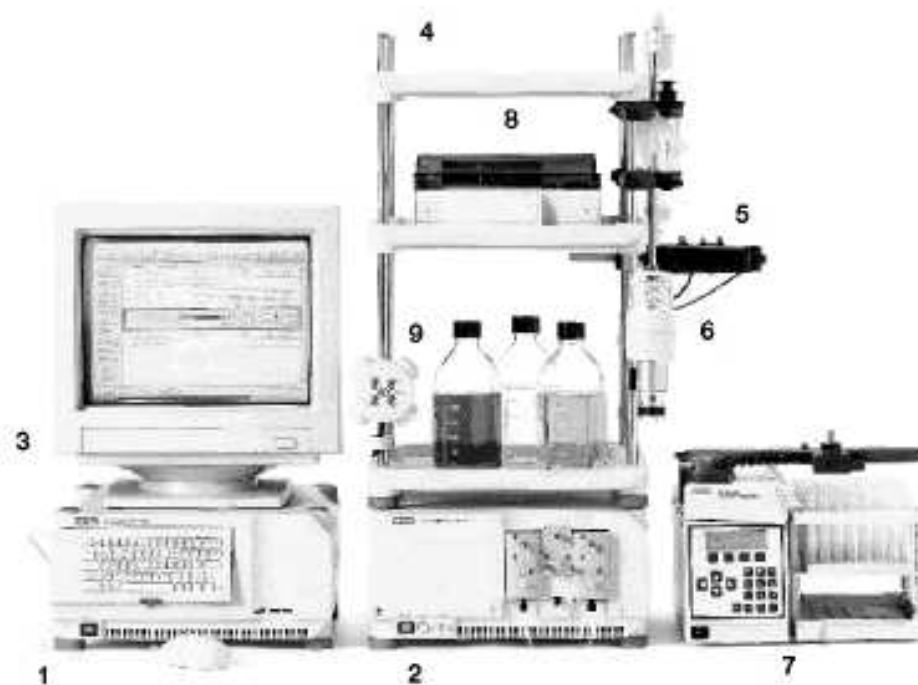
- LPC – semipreparativní
- FPLC – semipreparativní a analytická
- HPLC – analytická

# Kapalinová chromatografie

## doba trvání

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

# Zařízení pro LPC



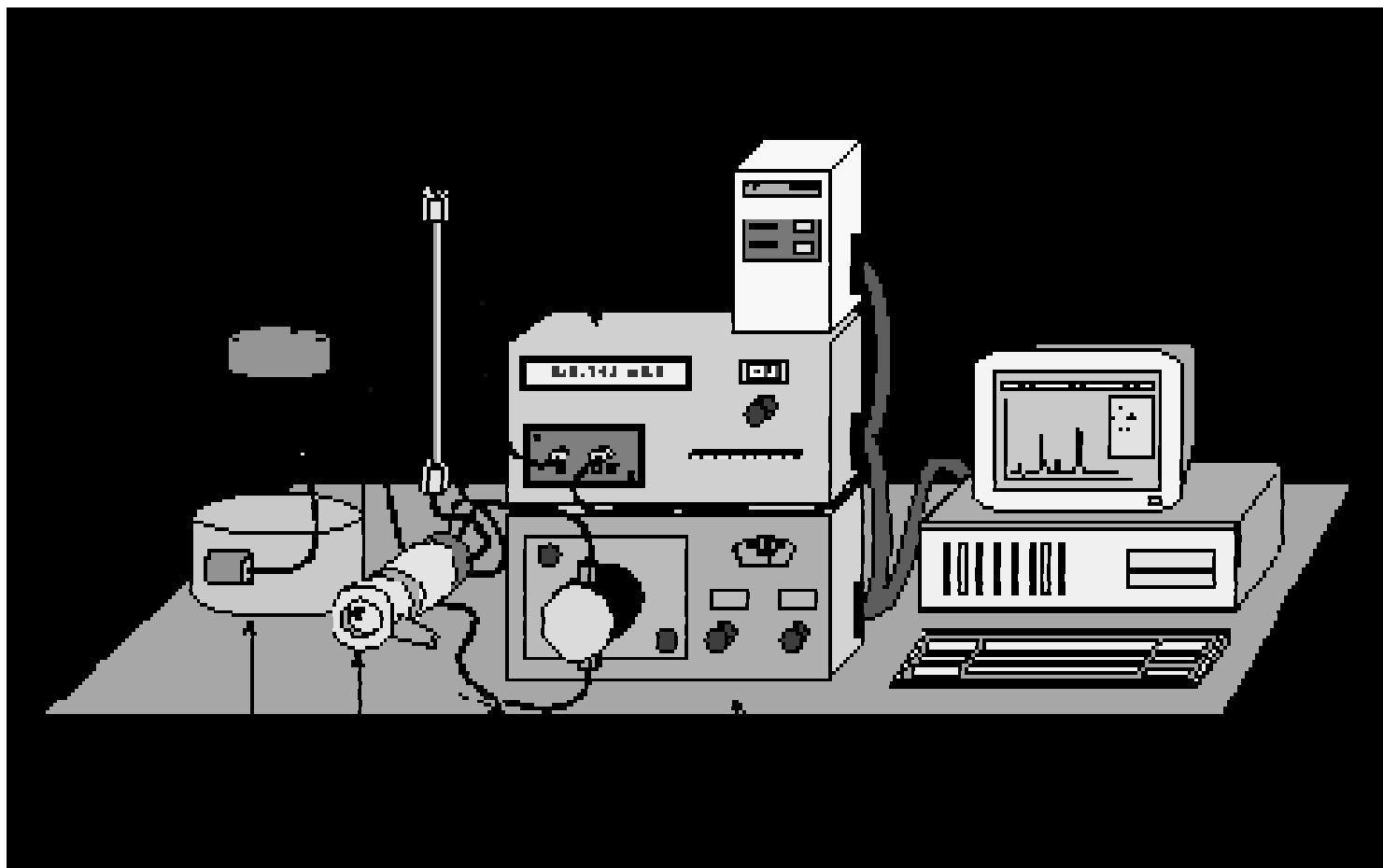
# Instrumentace pro LPC

- 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

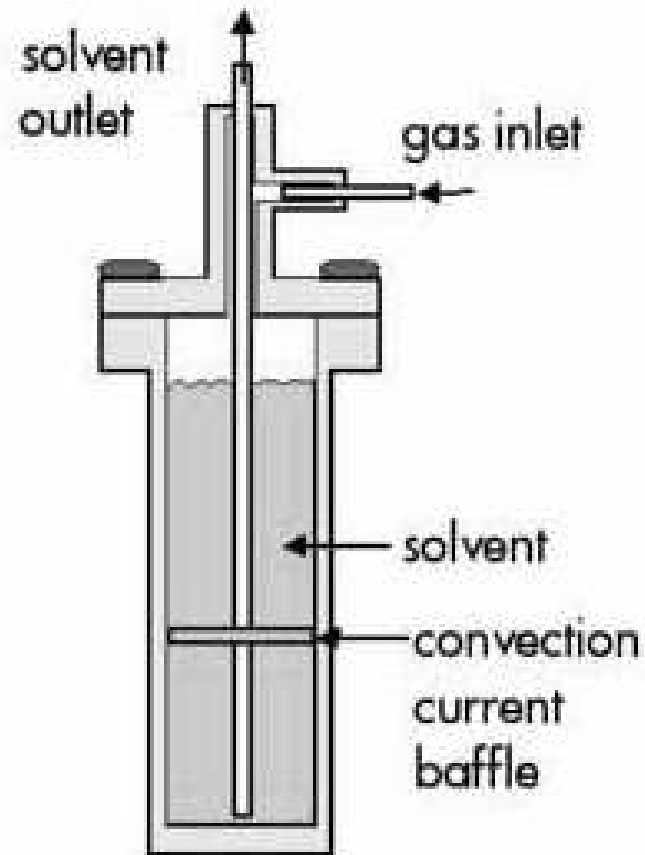


# Zařízení pro HPLC

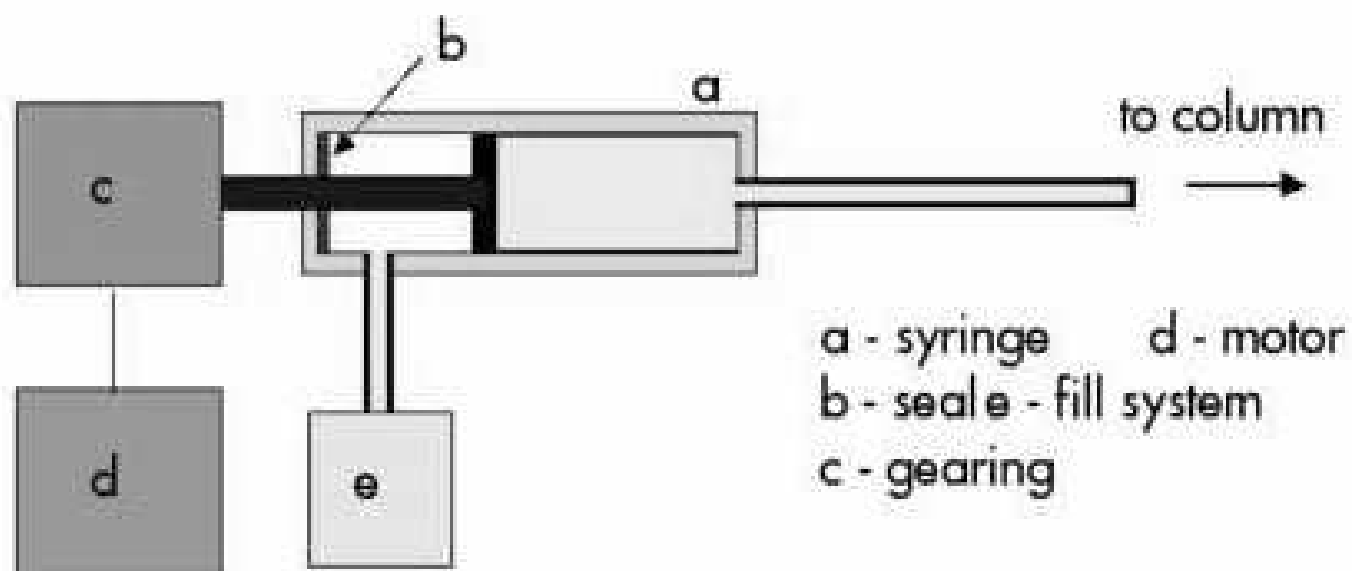


Pumpy

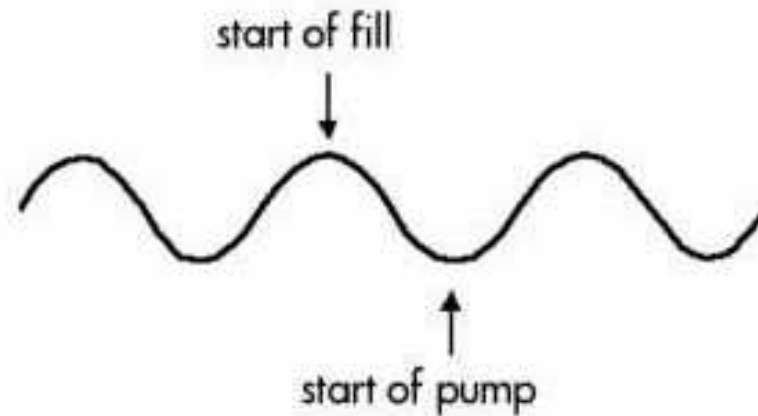
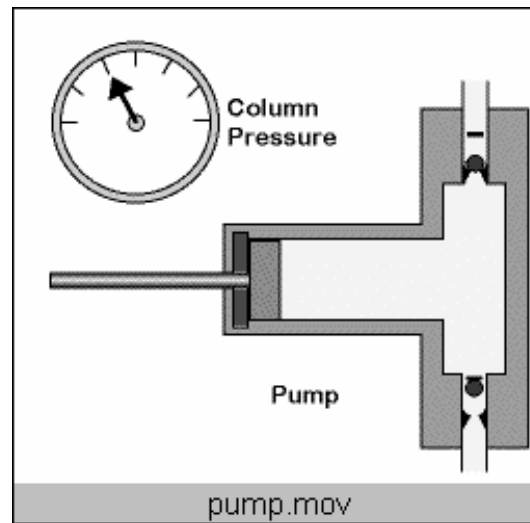
# Tlaková pumpa



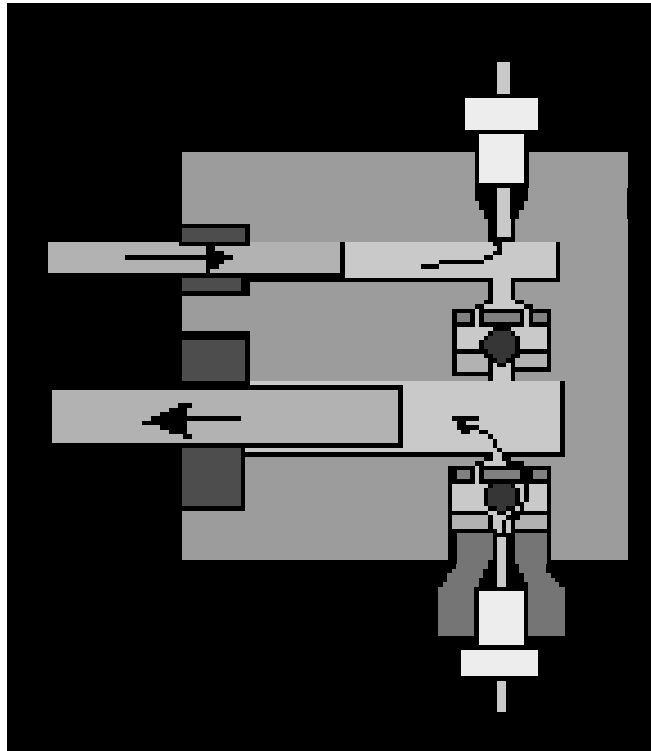
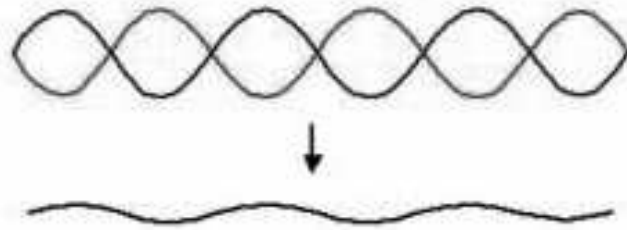
# Lineární dávkovače



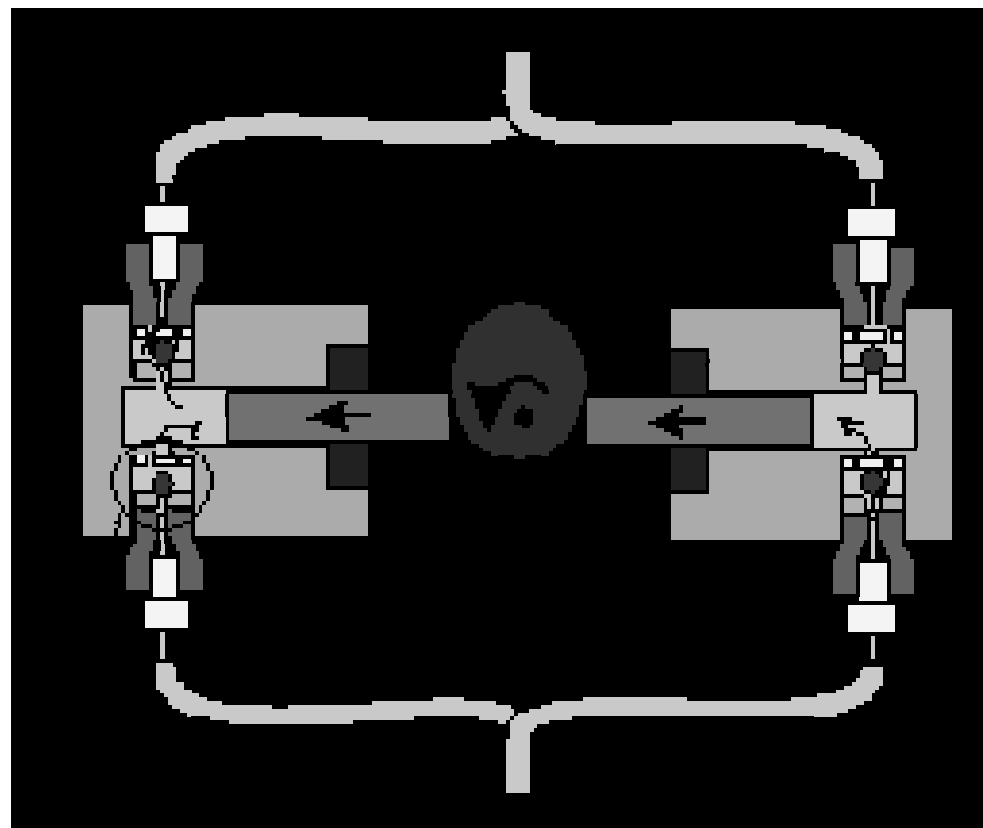
# Pumpa jednopístová



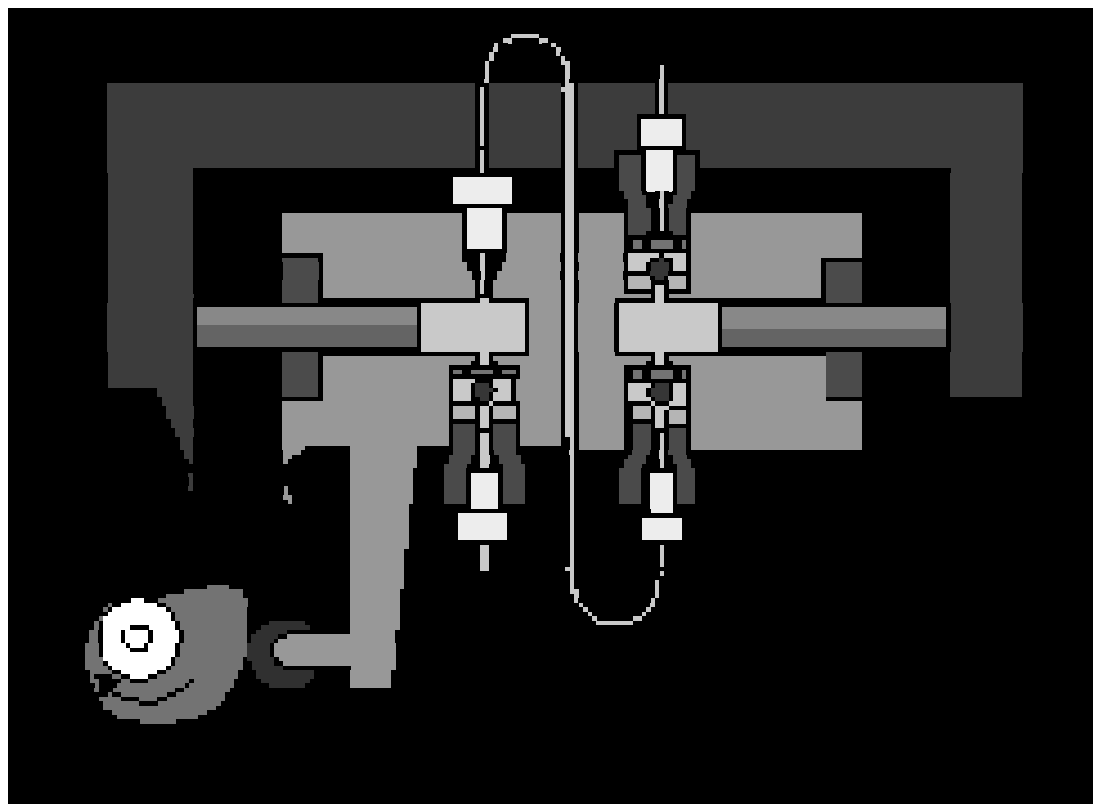
# Pumpa dvoupístová



# Pumpa dvoupístová

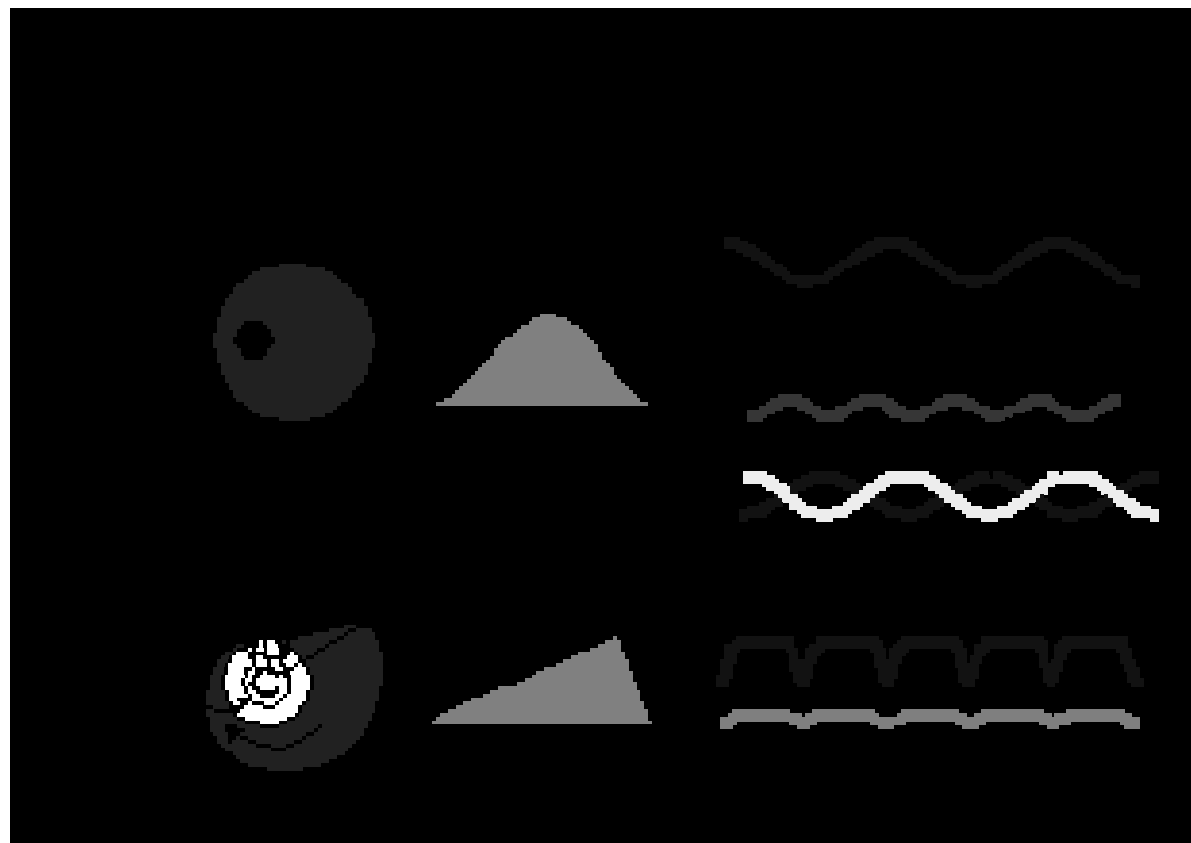


# Pumpa dvoupístová

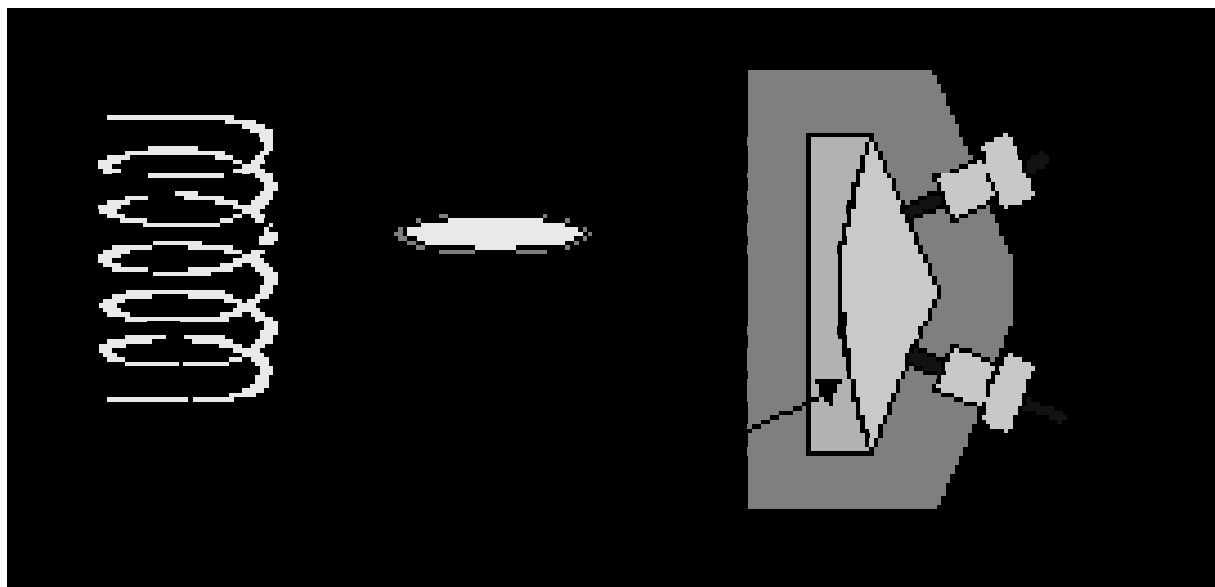




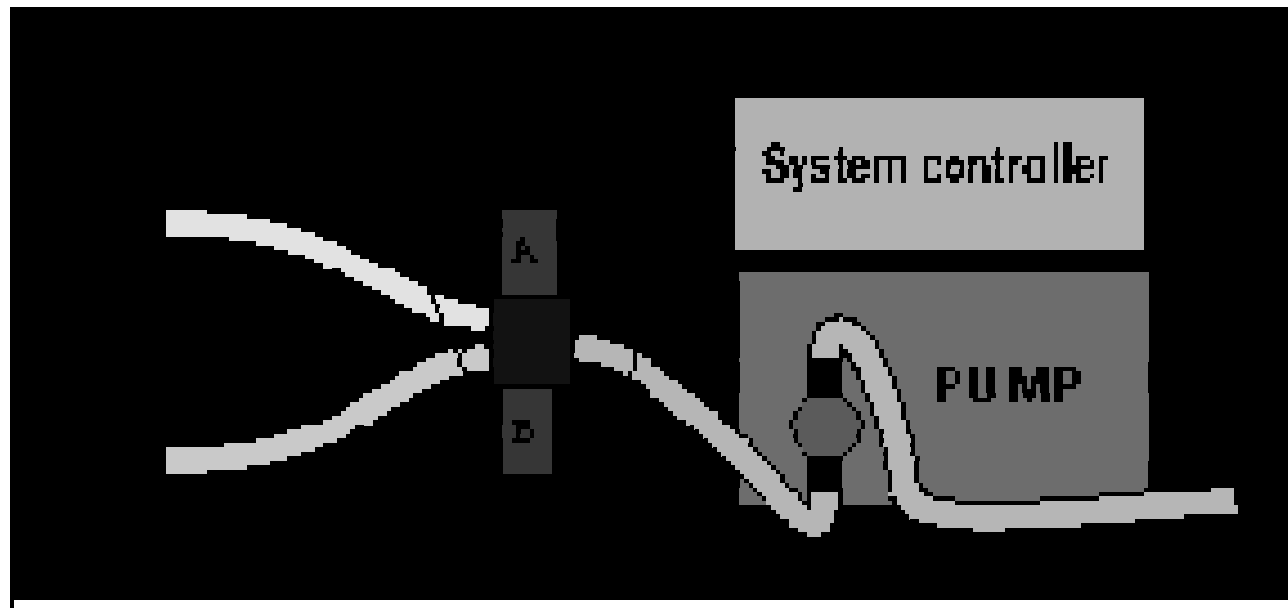
# Tlumení pulsů



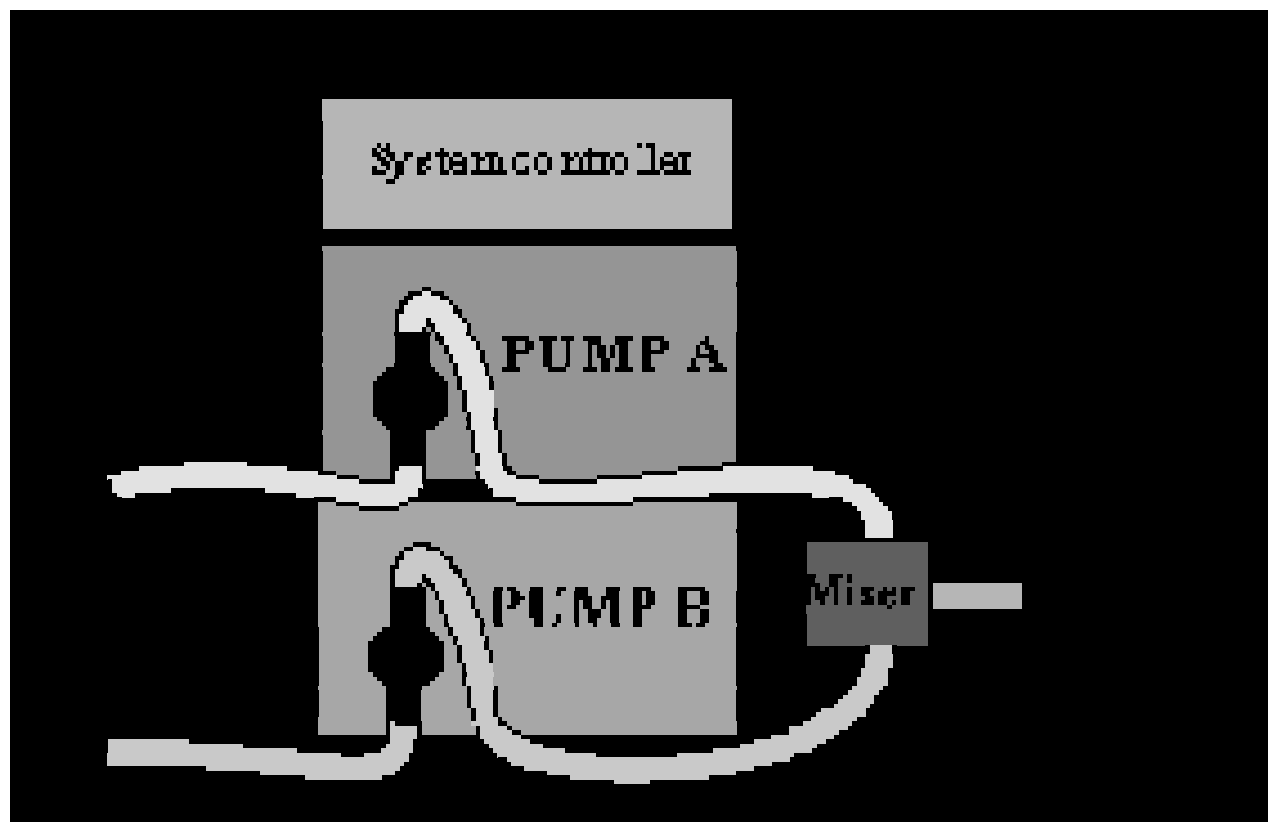
# Tlumení pulsů



# Gradient nízkotlaký



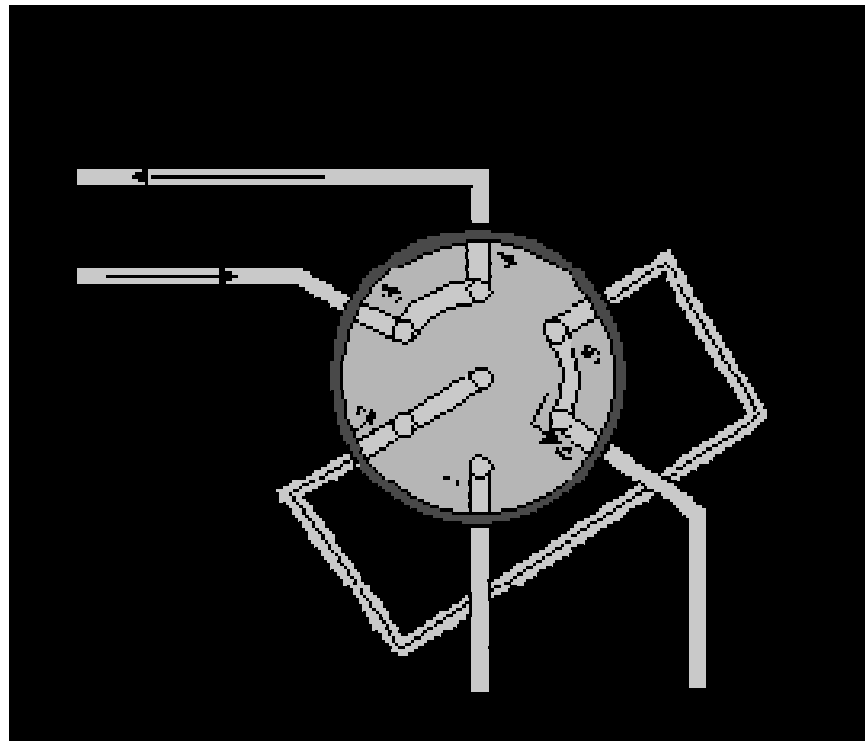
# Gradient vysokotlaký



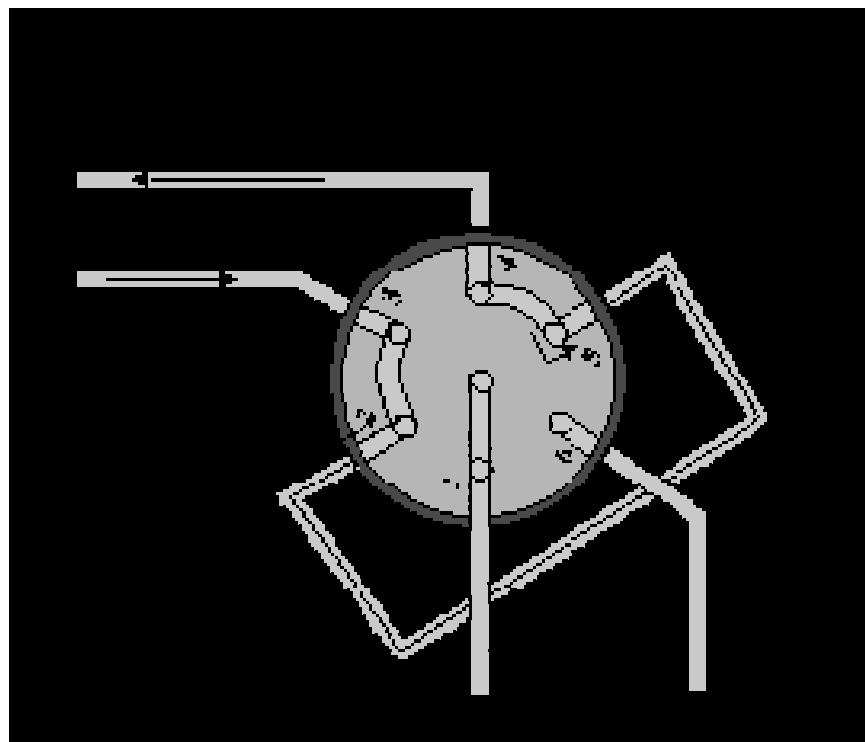
# Dávkování – dávkovací ventil



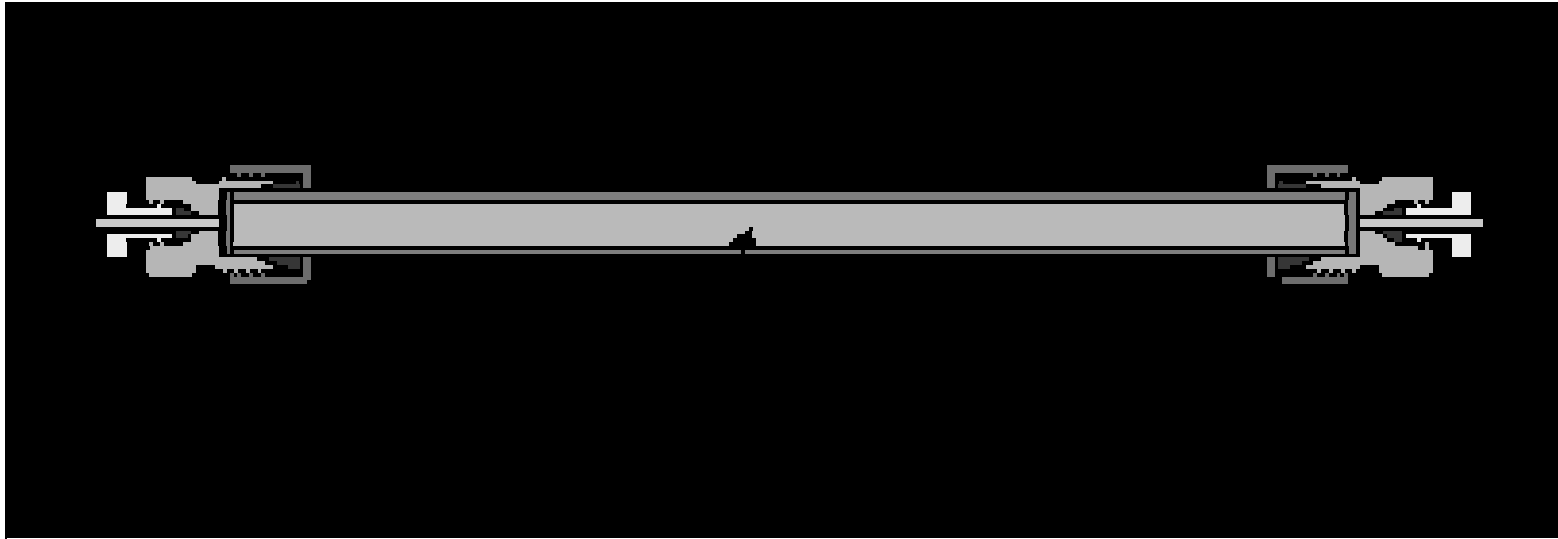
# Dávkovací ventil – „Load“



# Dávkovací ventil – „Inject“

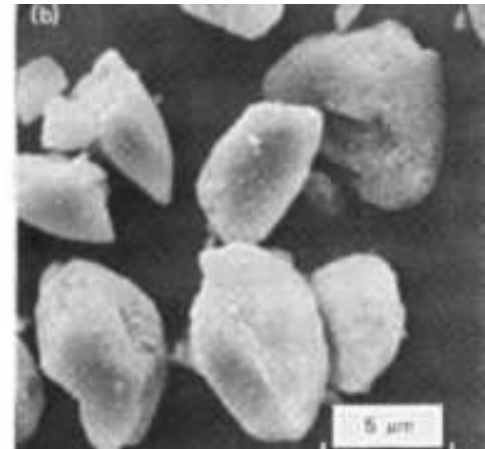
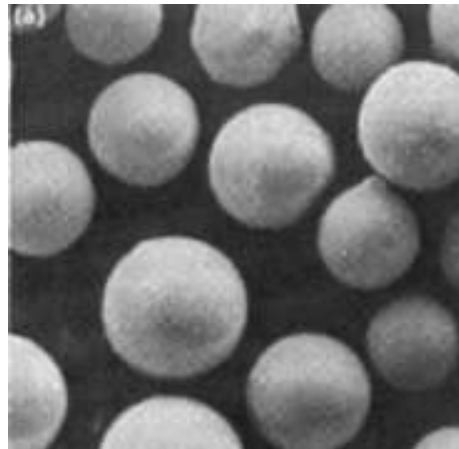
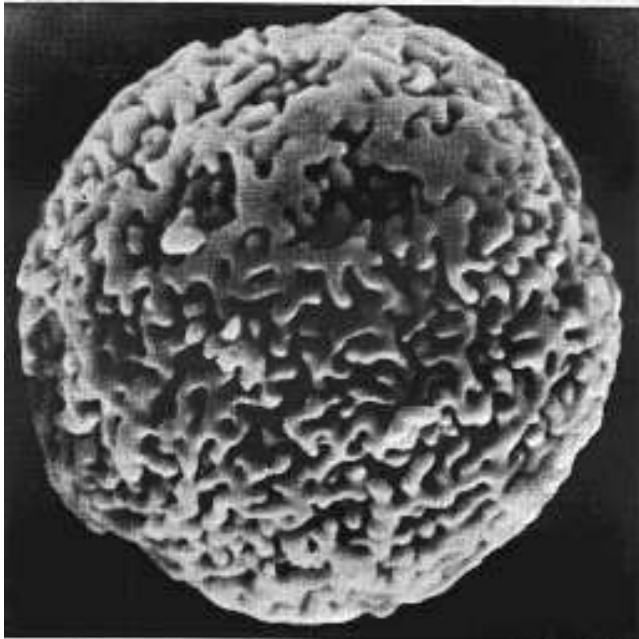


# Kolona



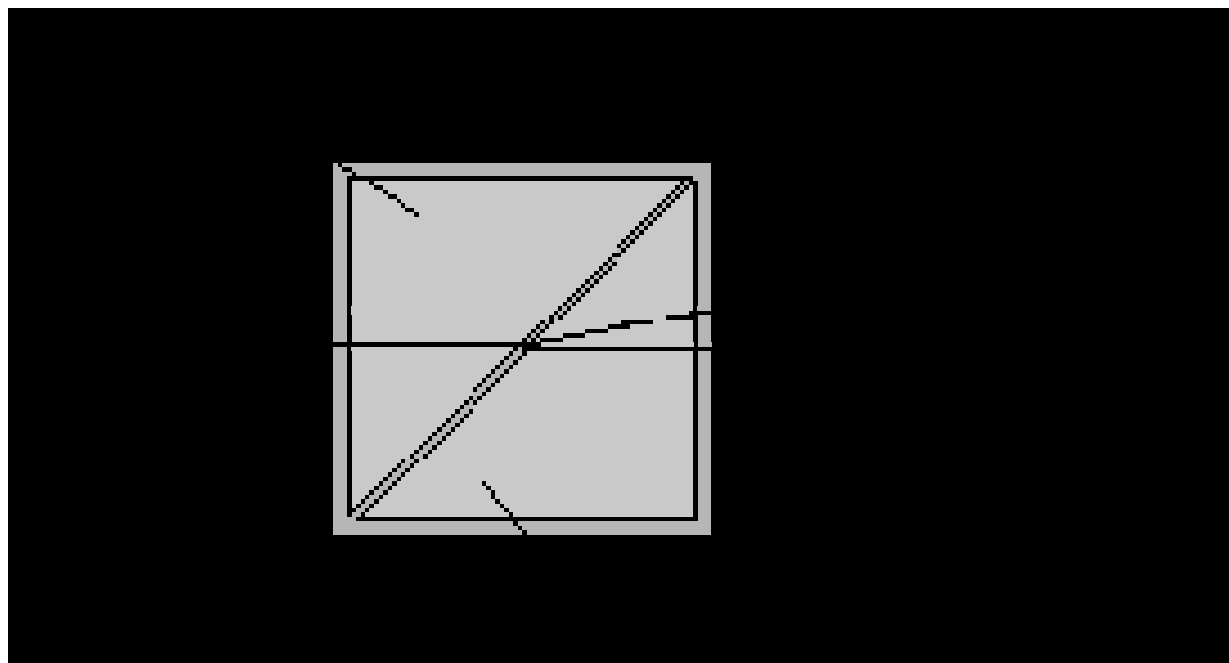


# Částice sorbentu



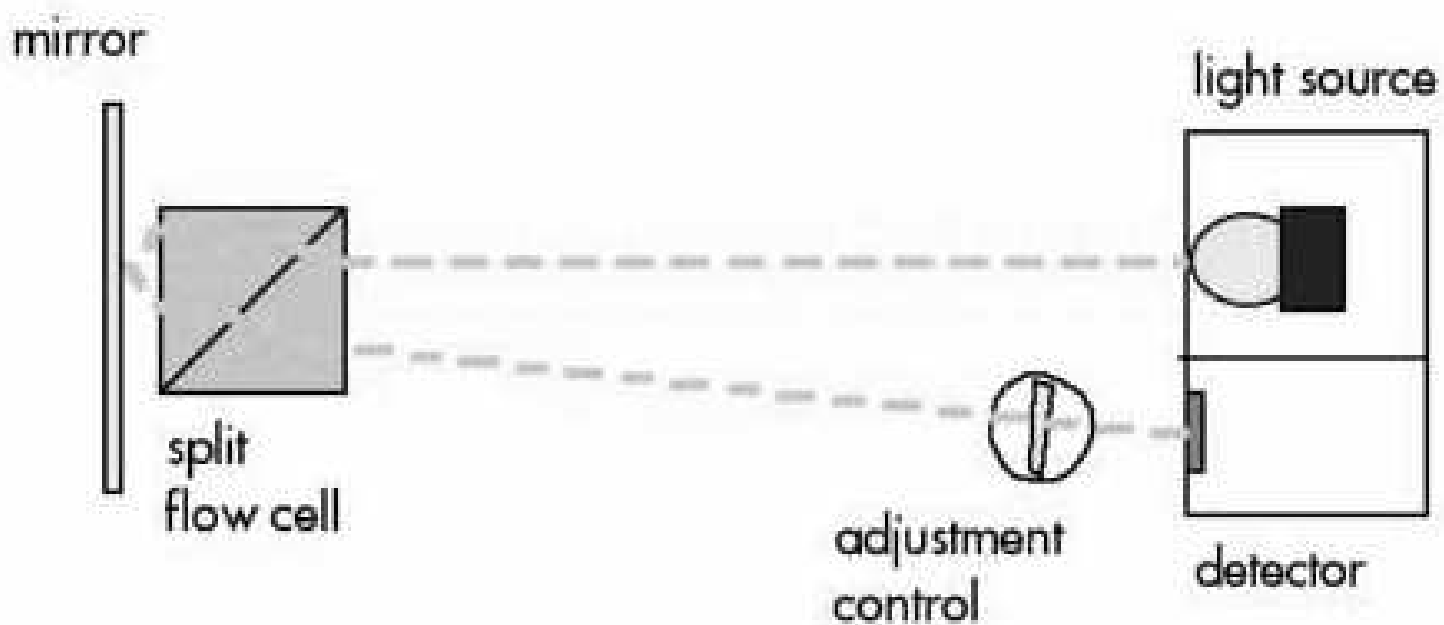
Detektory

# Refraktometrický detektor



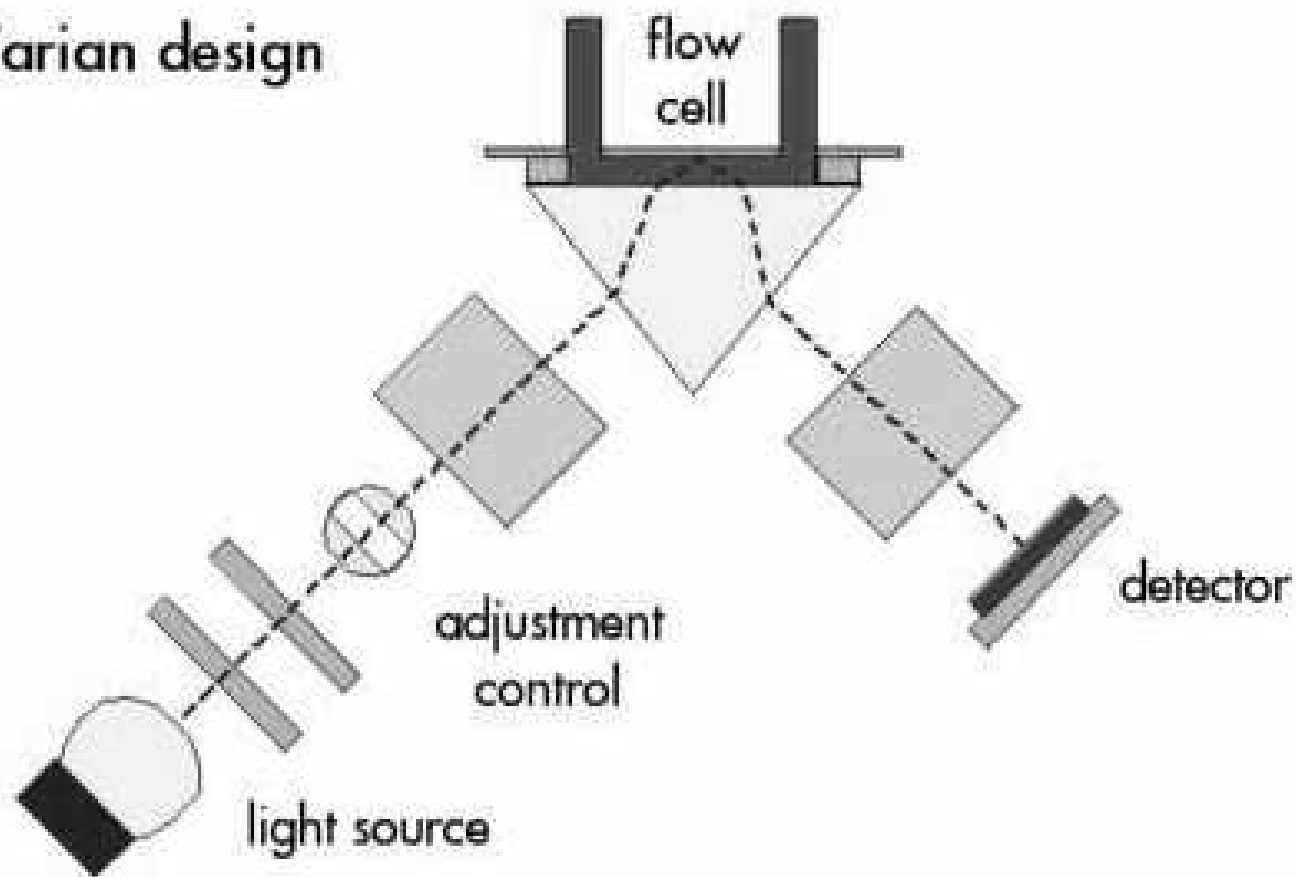
# Refraktometrický detektor

Waters design



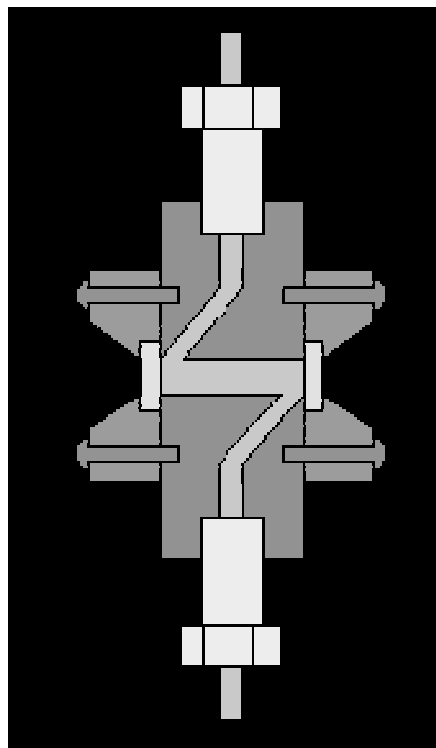
# Refraktometrický detektor

Varian design

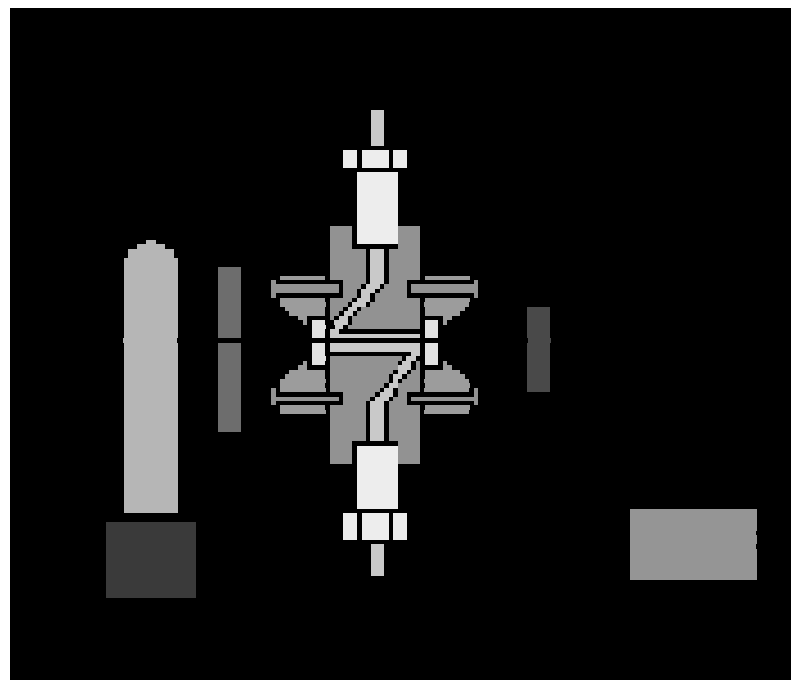


# UV – VIS detektor

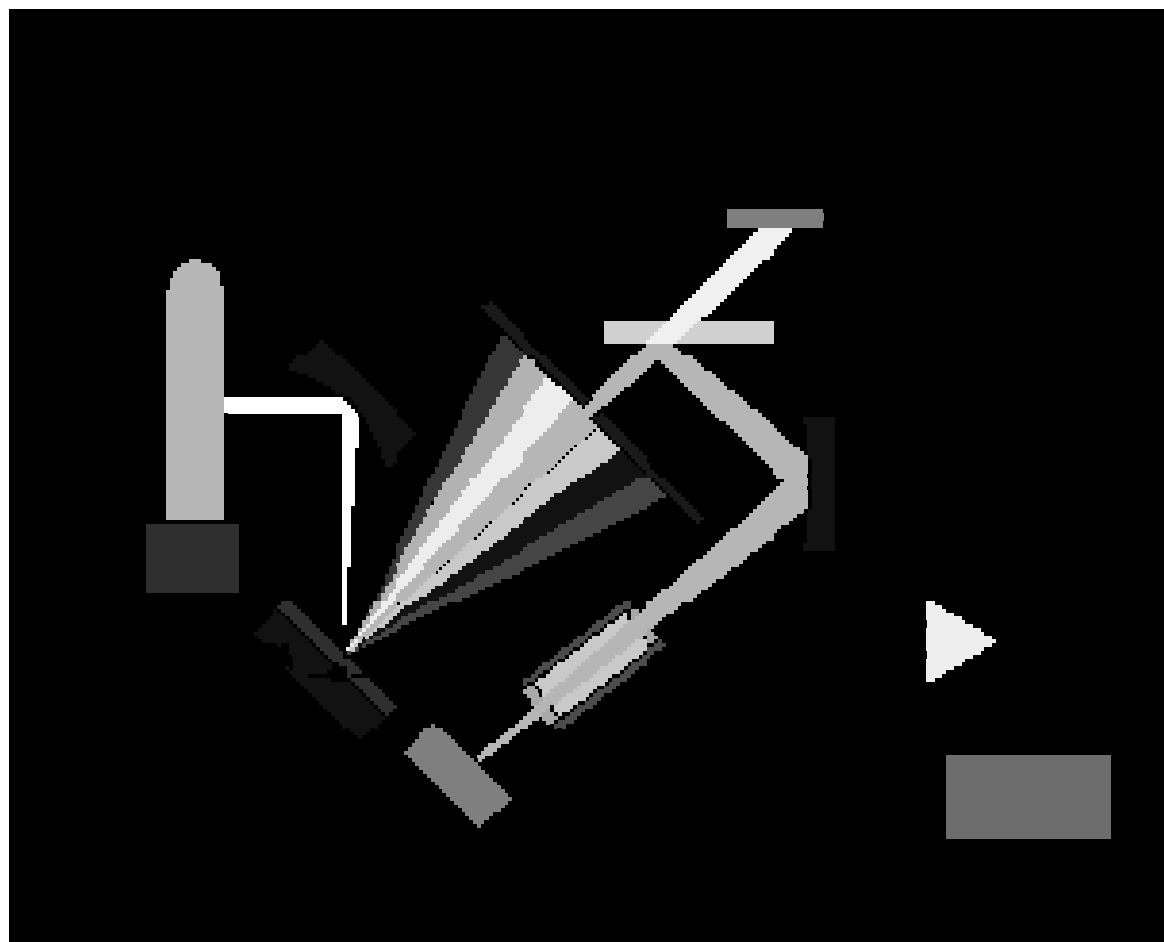
## detekční cely



# UV – VIS detektor s fixní vlnovou délkou

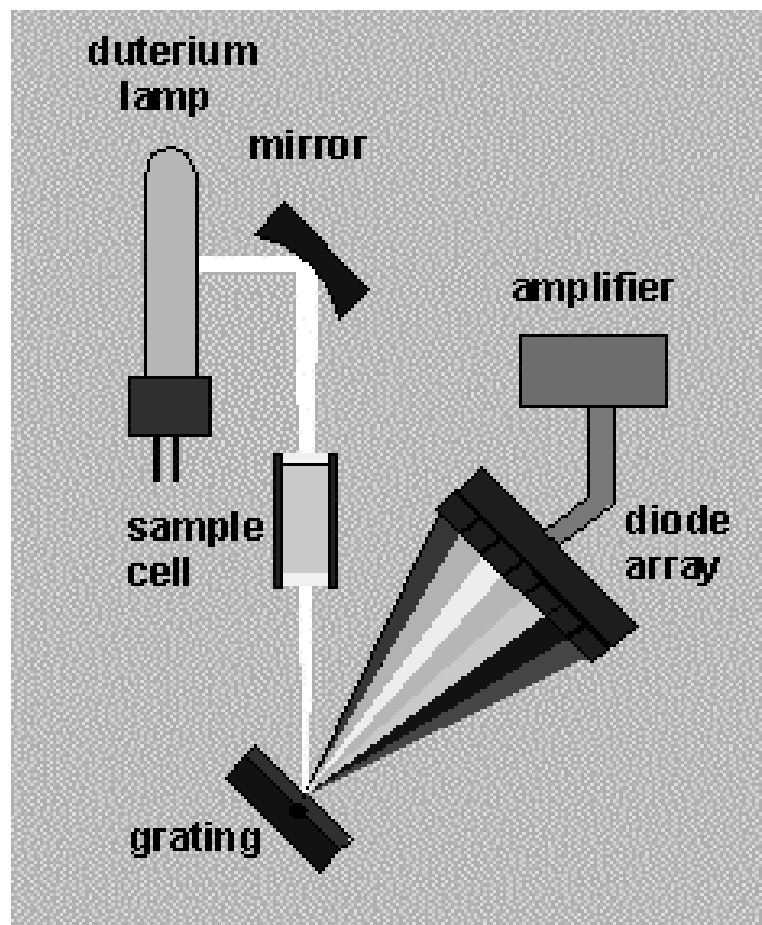


# UV – VIS detektor s proměnlivou vlnovou délkou

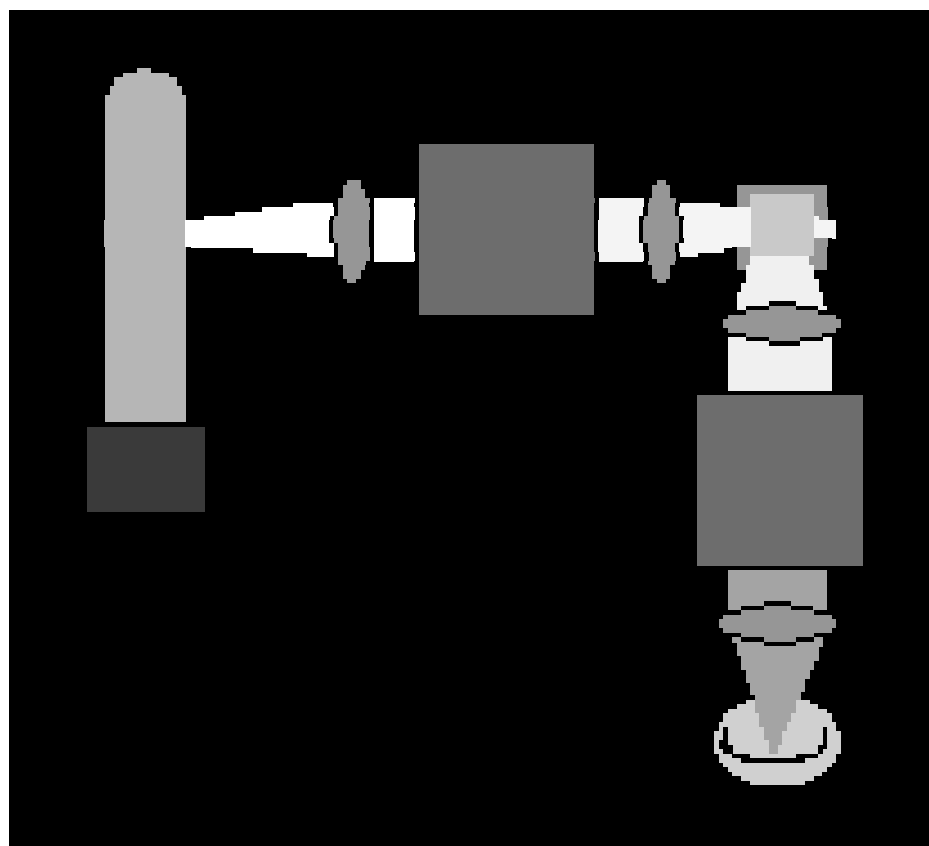




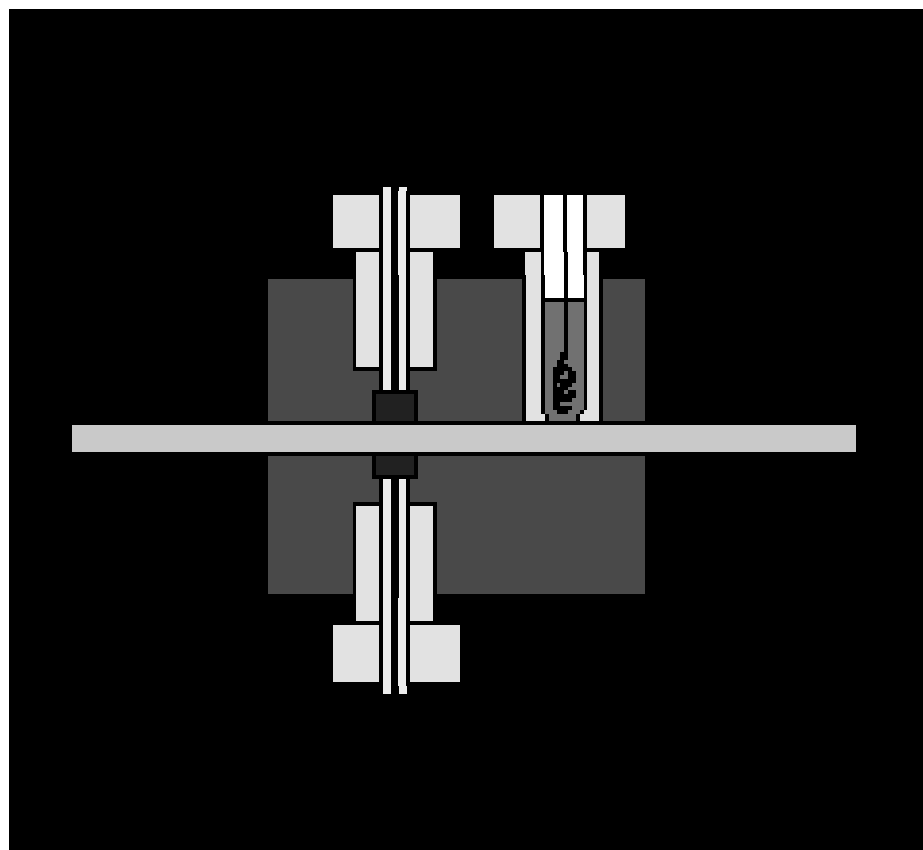
# UV – VIS detektor s diodovým polem



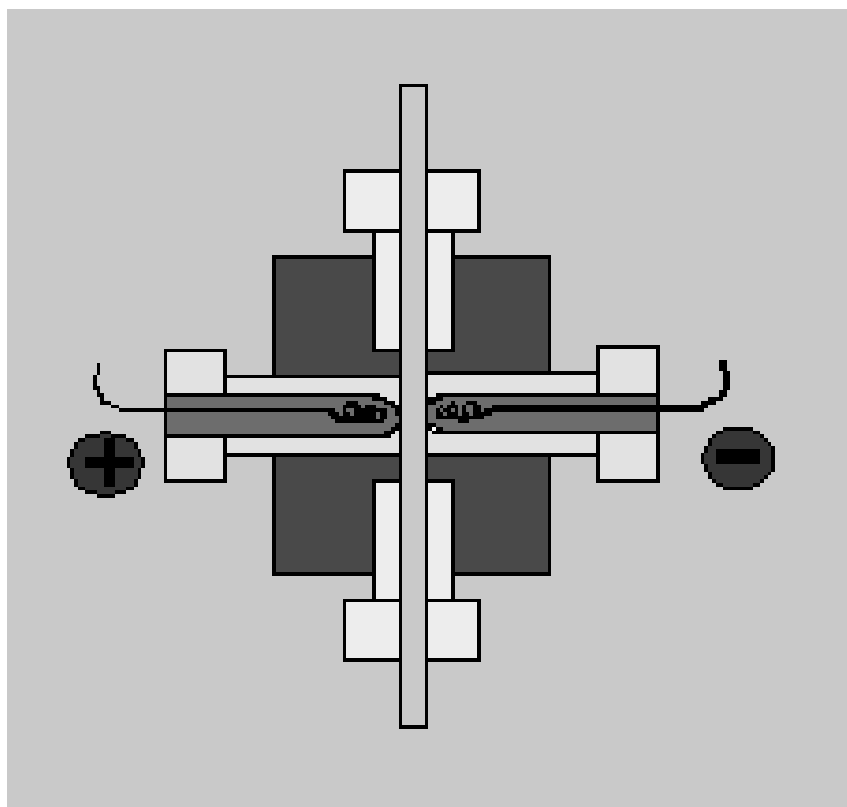
# Fluorescenční detektor



# Elektrochemický detektor

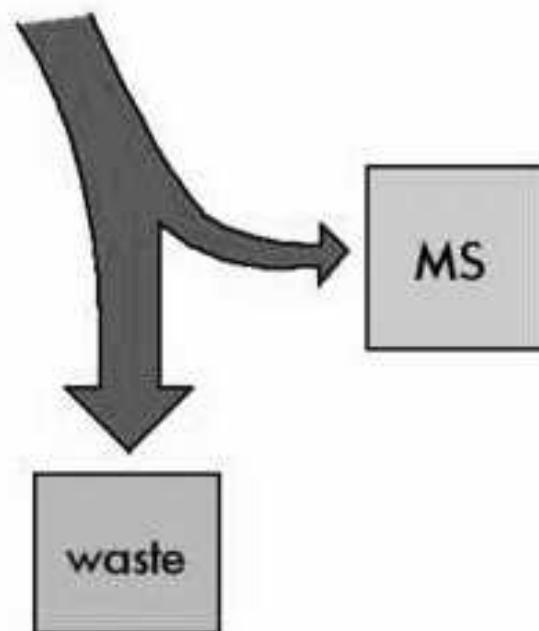


# Konduktometrický detektor

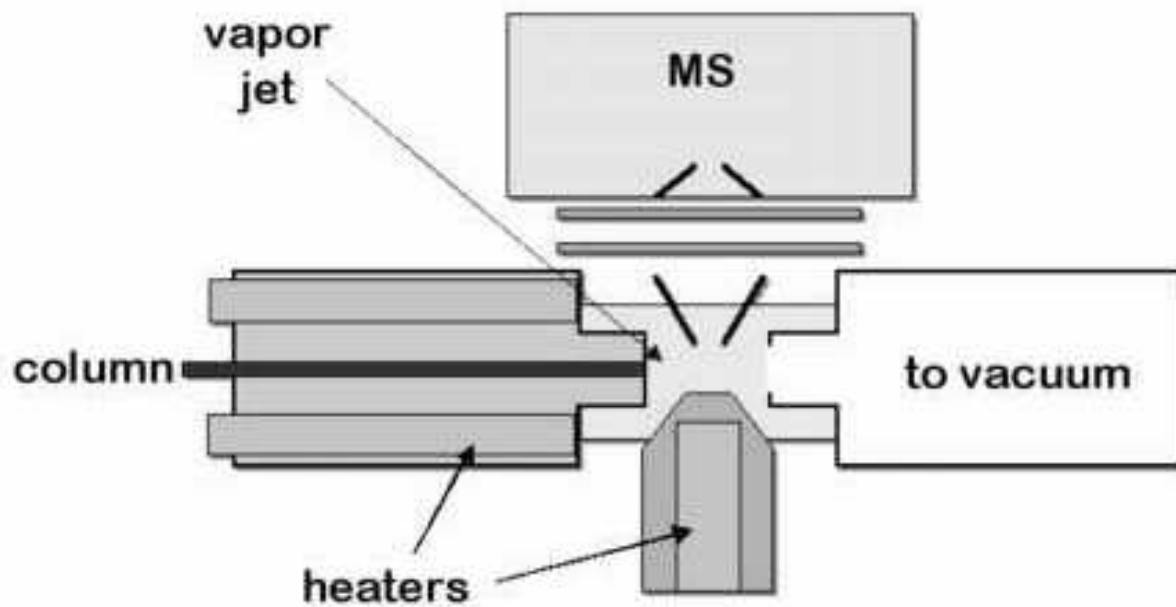


# LC-MS

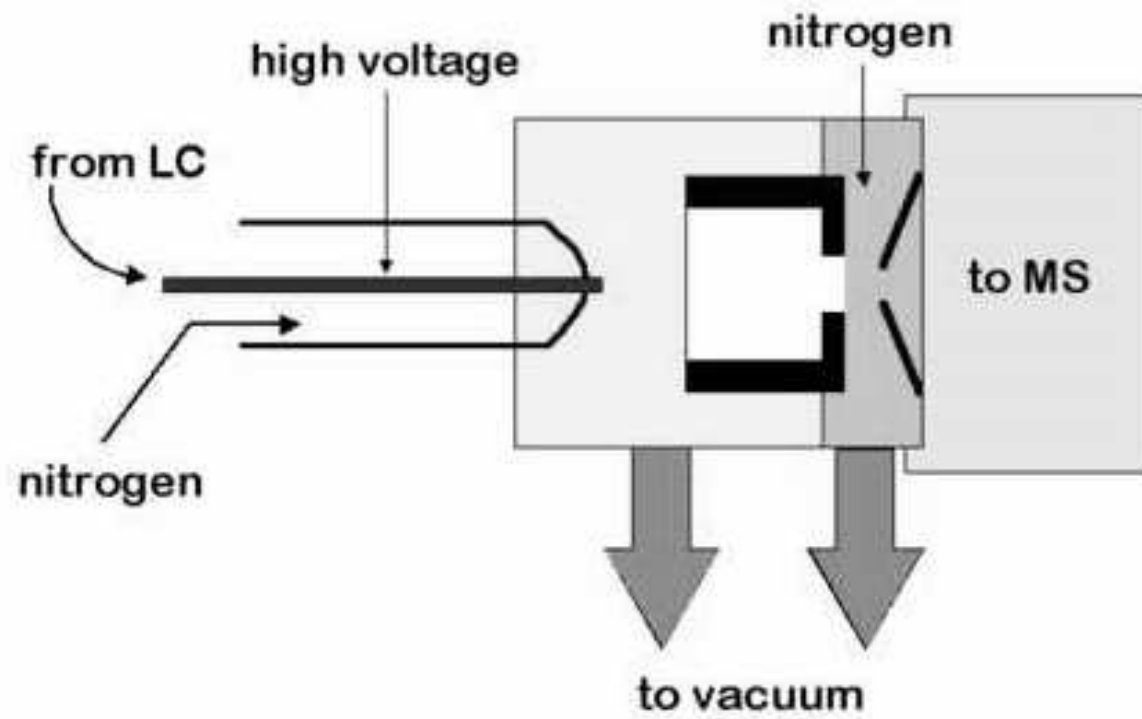
HPLC



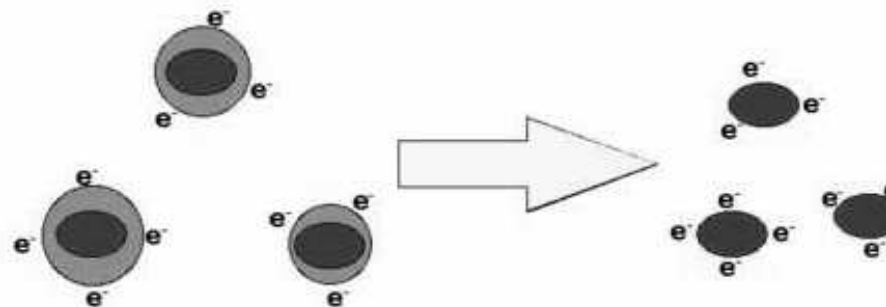
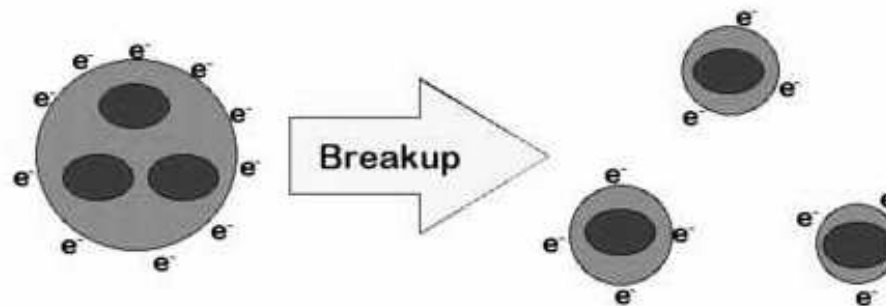
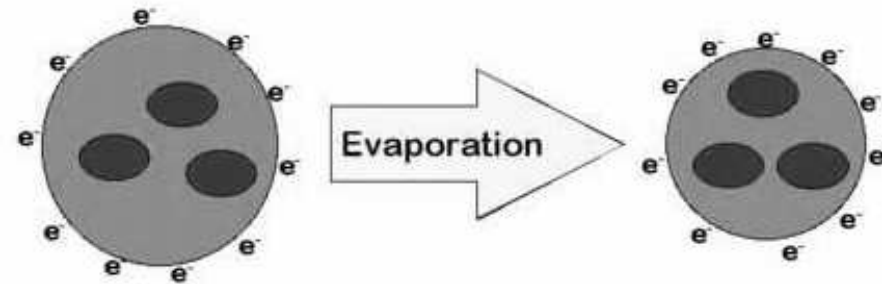
# „Termospray“



# „Electrospray“



# Ionizace

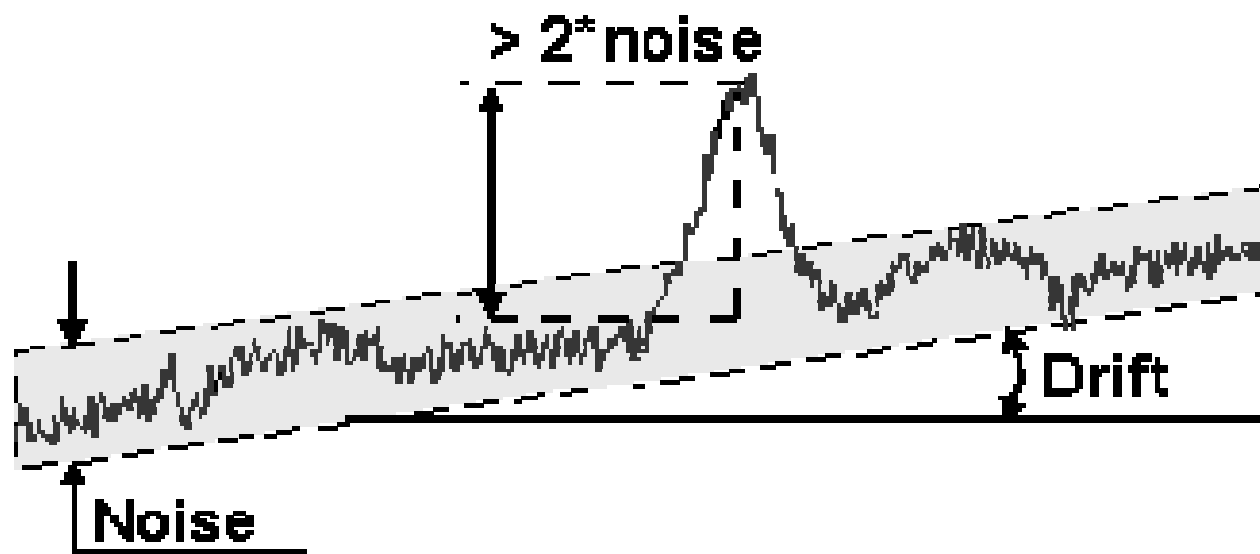




# Derivatizace

- „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

