

# Chromatografické metody

Zdeněk Glatz

# 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

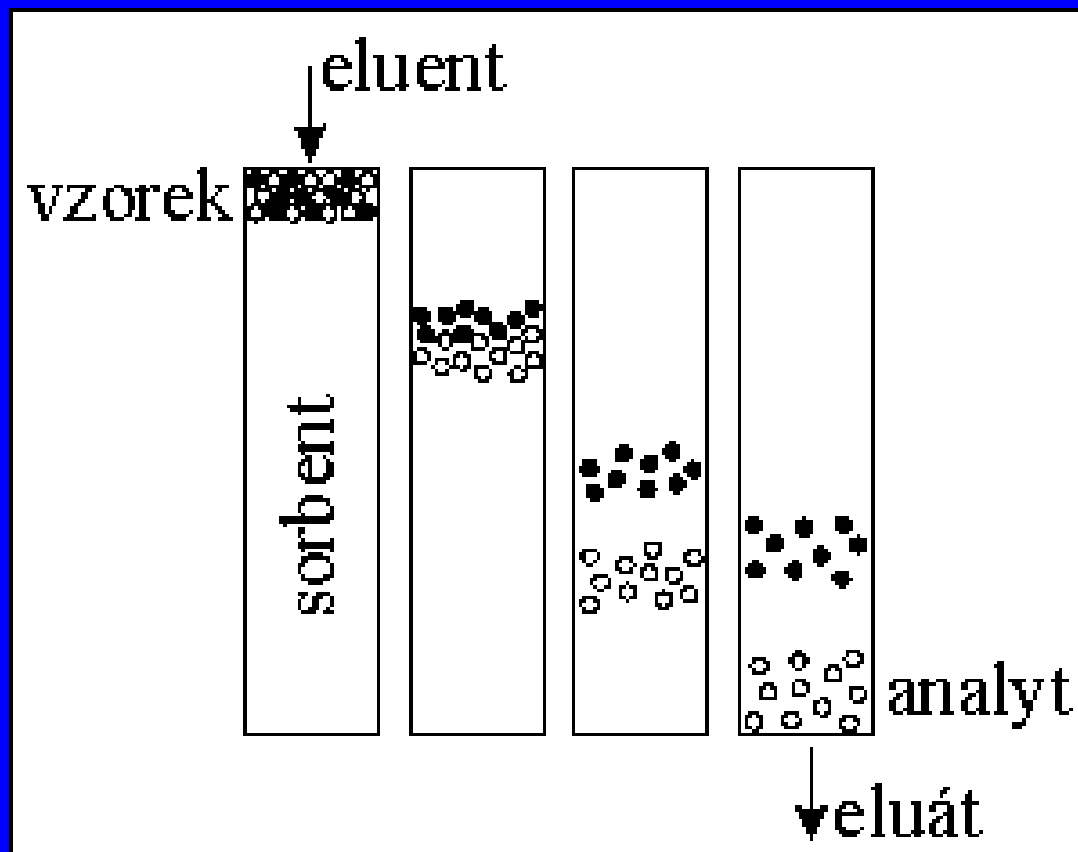
- Papírová PC
- Tenkovrstvá TLC
- Kolonová CC

# Teorie

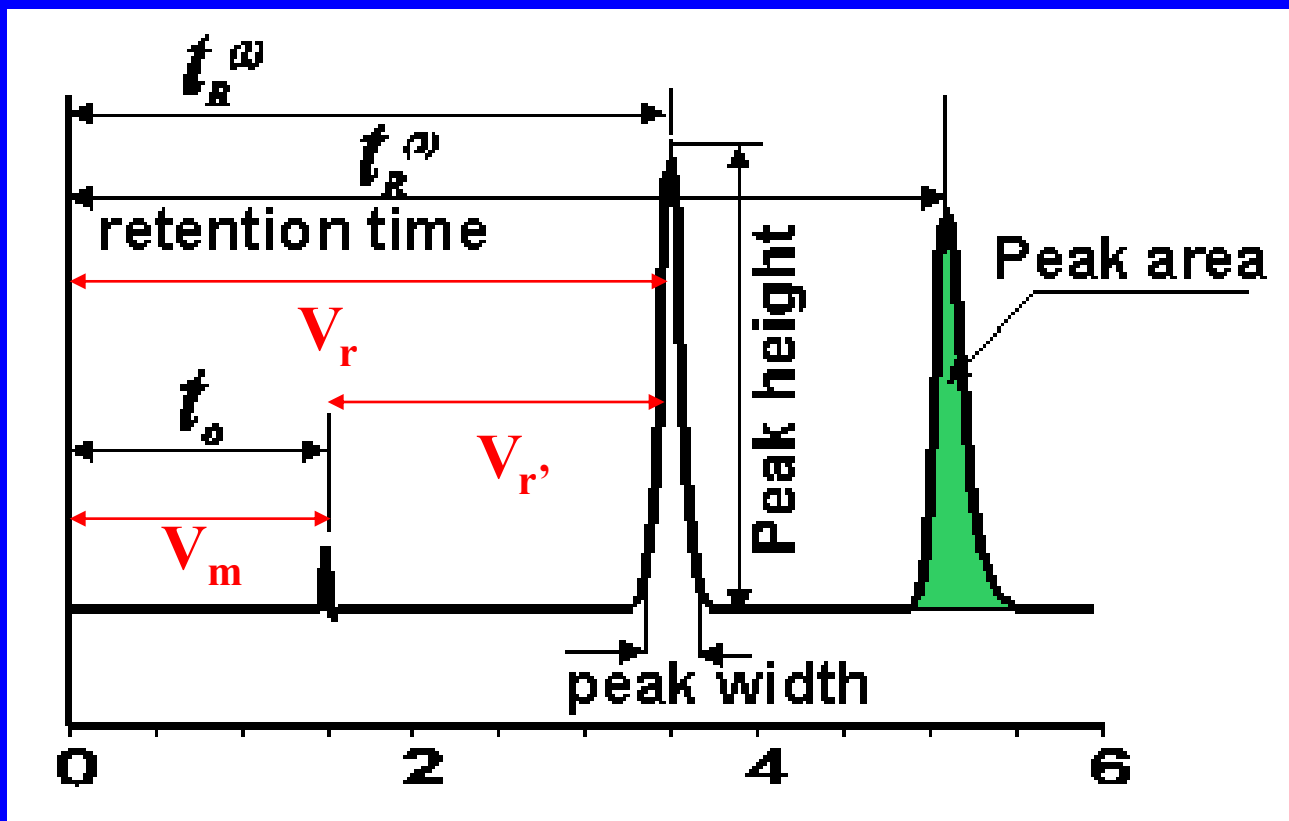
## „Ideální lineární chromatografie“

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

# Sloupcová chromatografie



# Charakteristiky chromatogramu





## 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  
+ mimočasticový 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

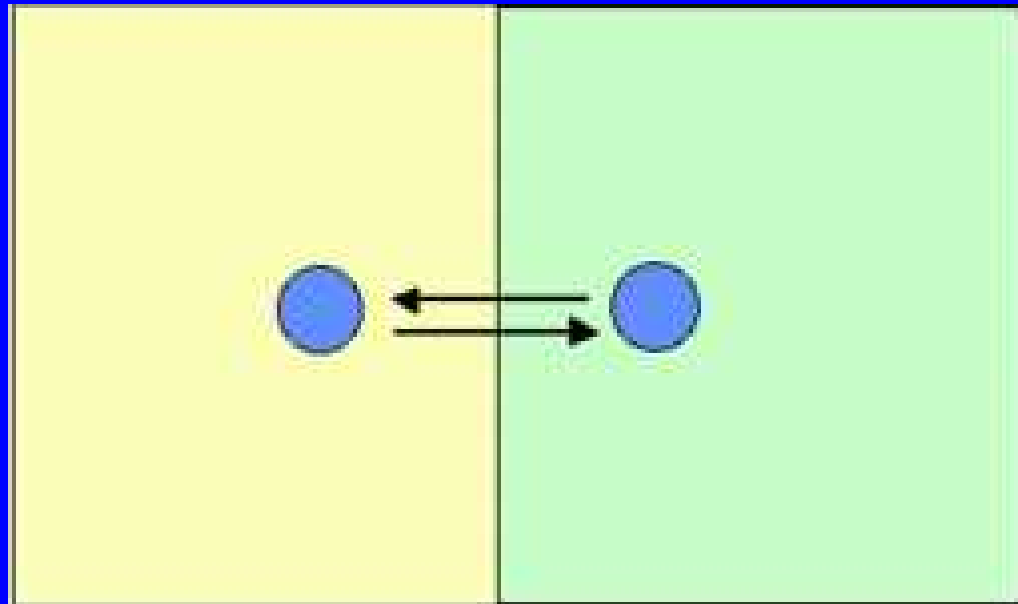
## Retenční faktor $\alpha$

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

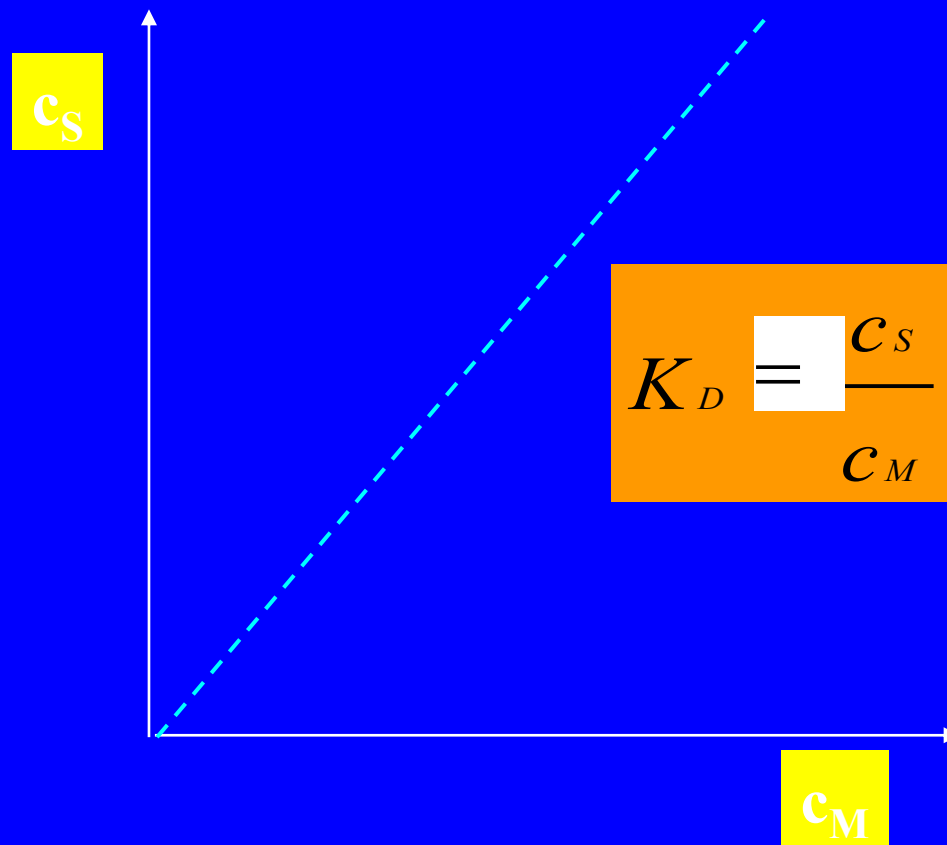
# Síly a efekty využívané při separaci

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

# Rozdělovací chromatografie

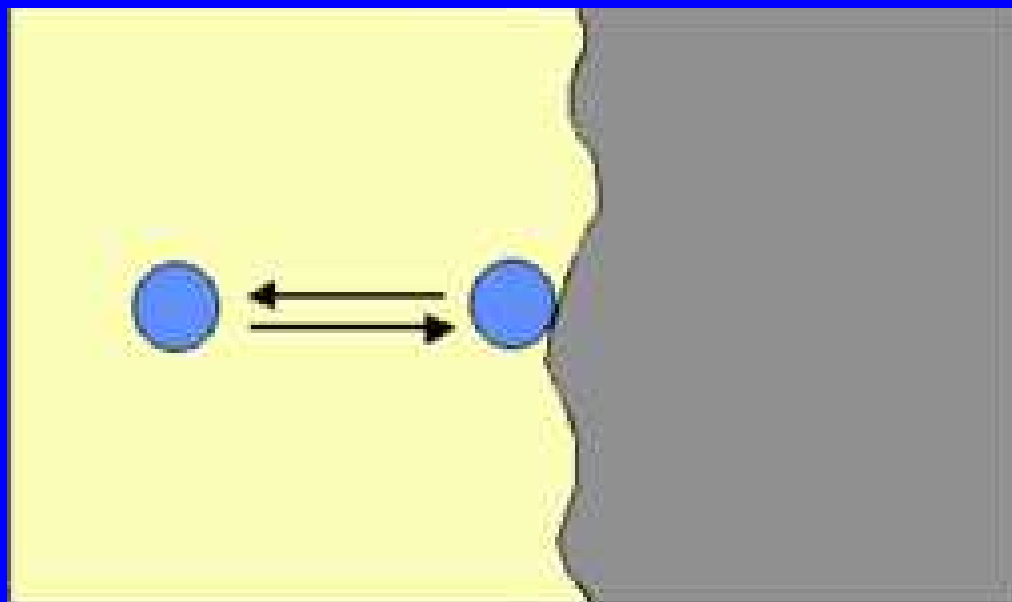


# Rozdělovací chromatografie



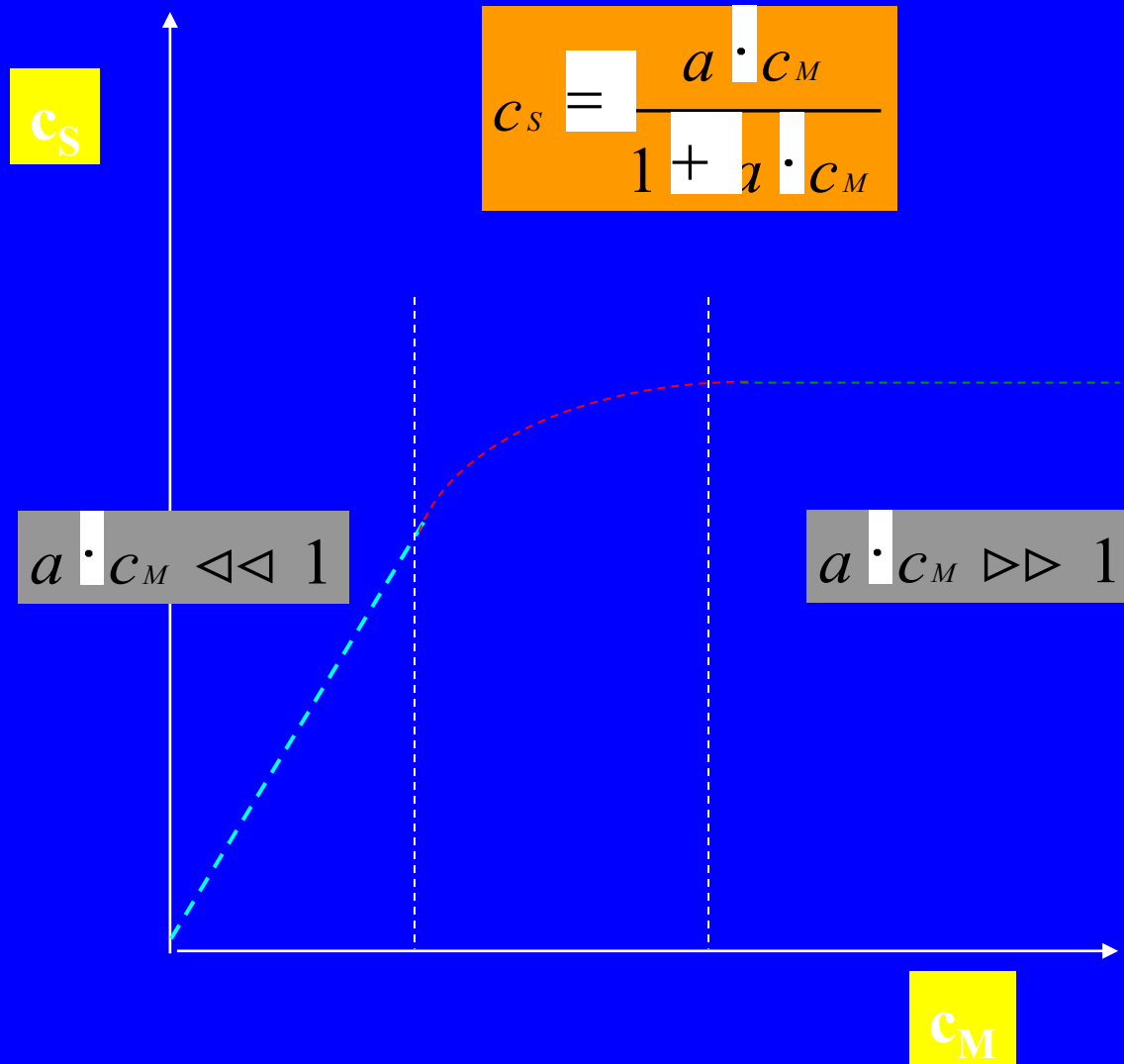
Použití – analytická PC, TLC

# 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 polarity mobilní fáze

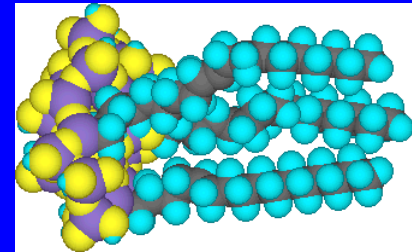
Eluotropická řada:

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

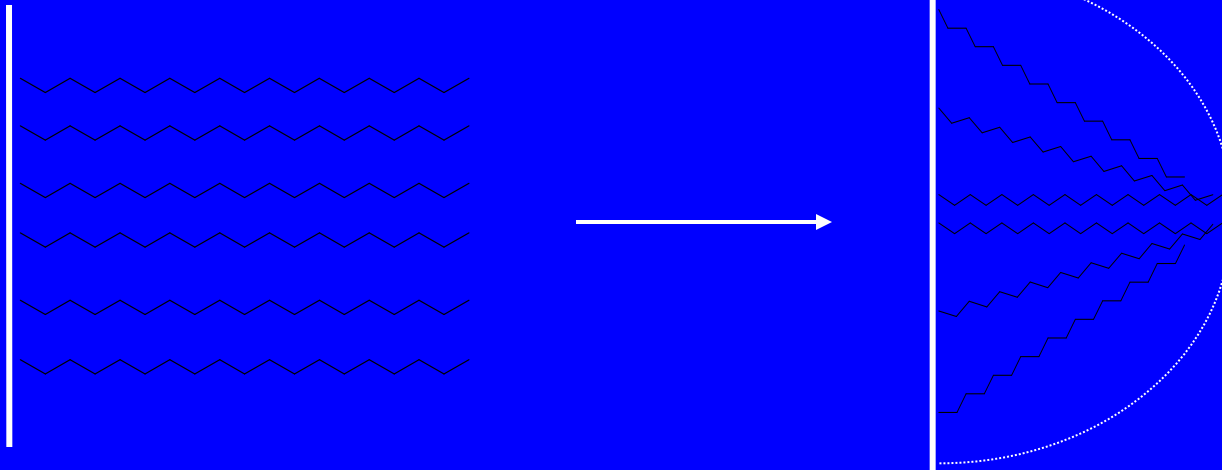
- Eluce – snižováním polarity mobilní fáze

ACN, MetOH,

# Reverzně fázová chromatografie

Kartáčový typ stacionární fáze

H<sub>2</sub>O



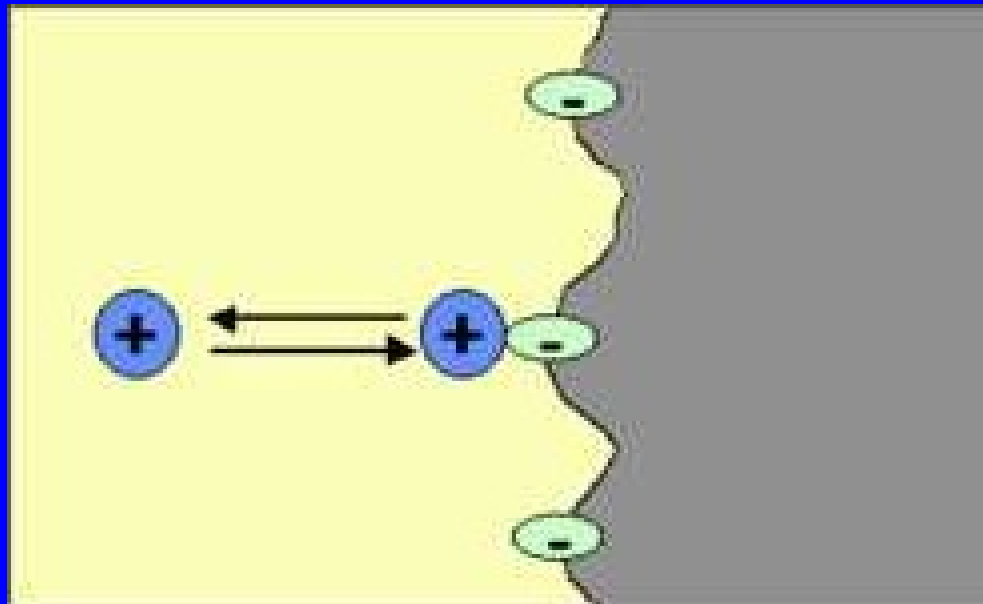
Použití : analytické – až 90 % analýz

# 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

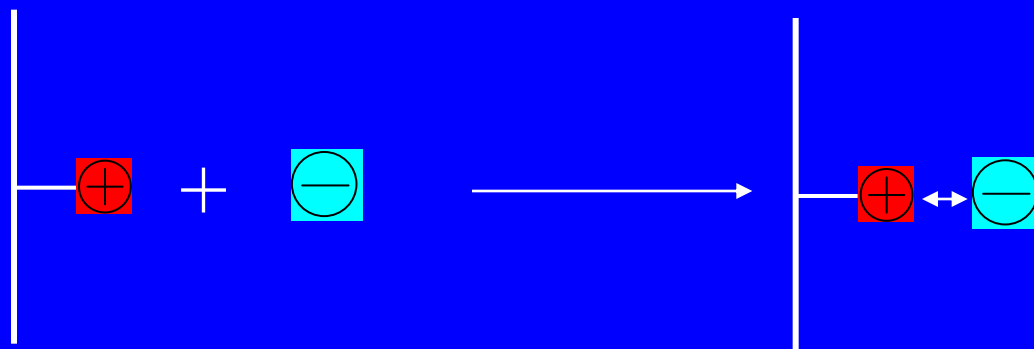
# Ionexová chromatografie



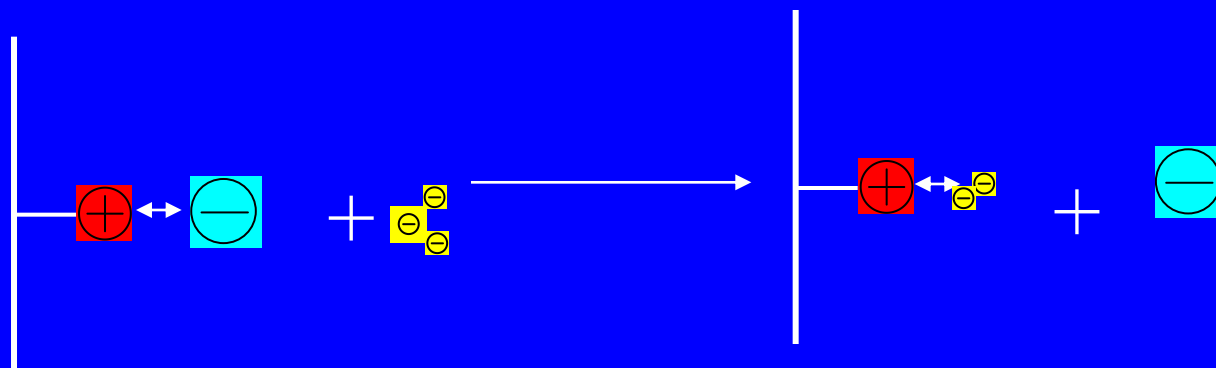
# Ionexová chromatografie

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)

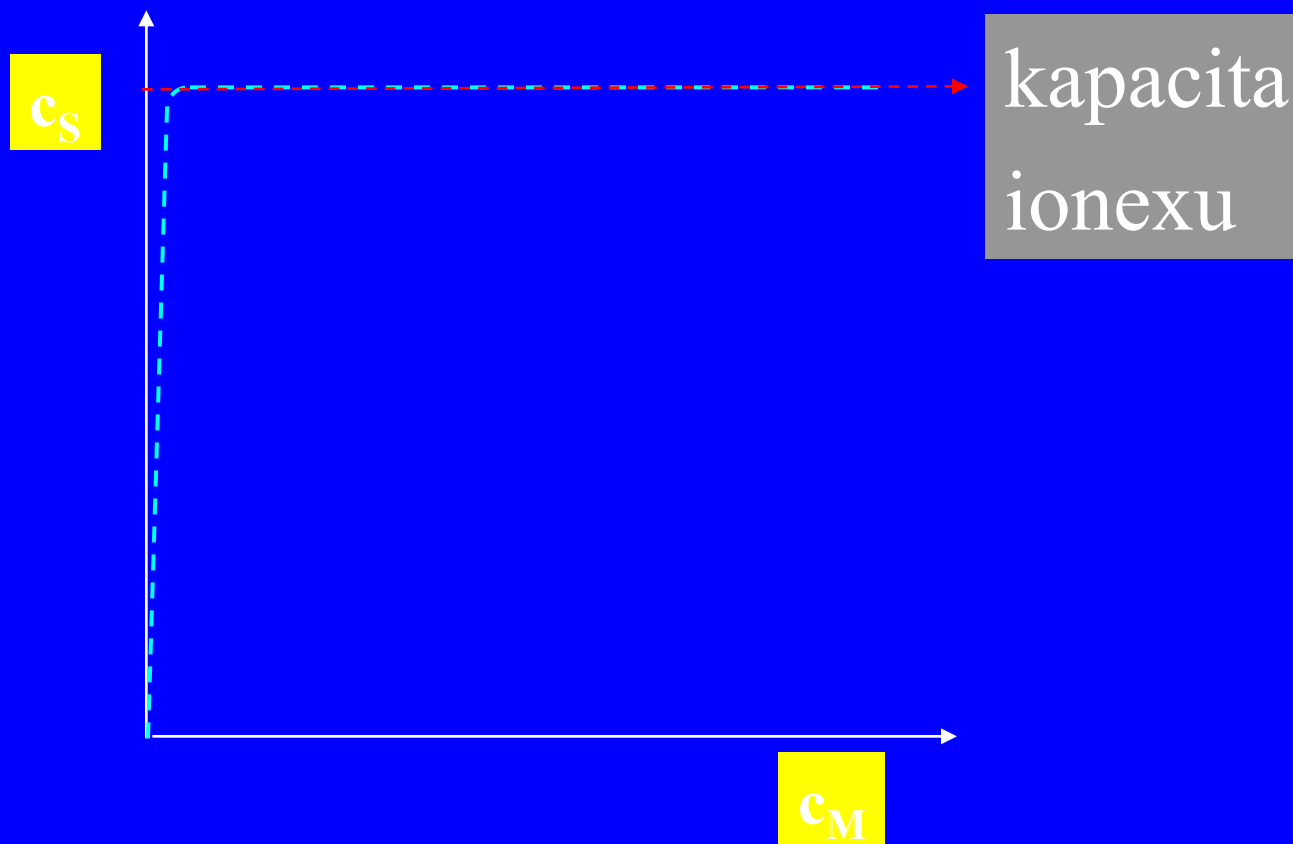
slabé – trietylaminoetyl(TEAE)

# Slabý ionex

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



# Ionexová chromatografie

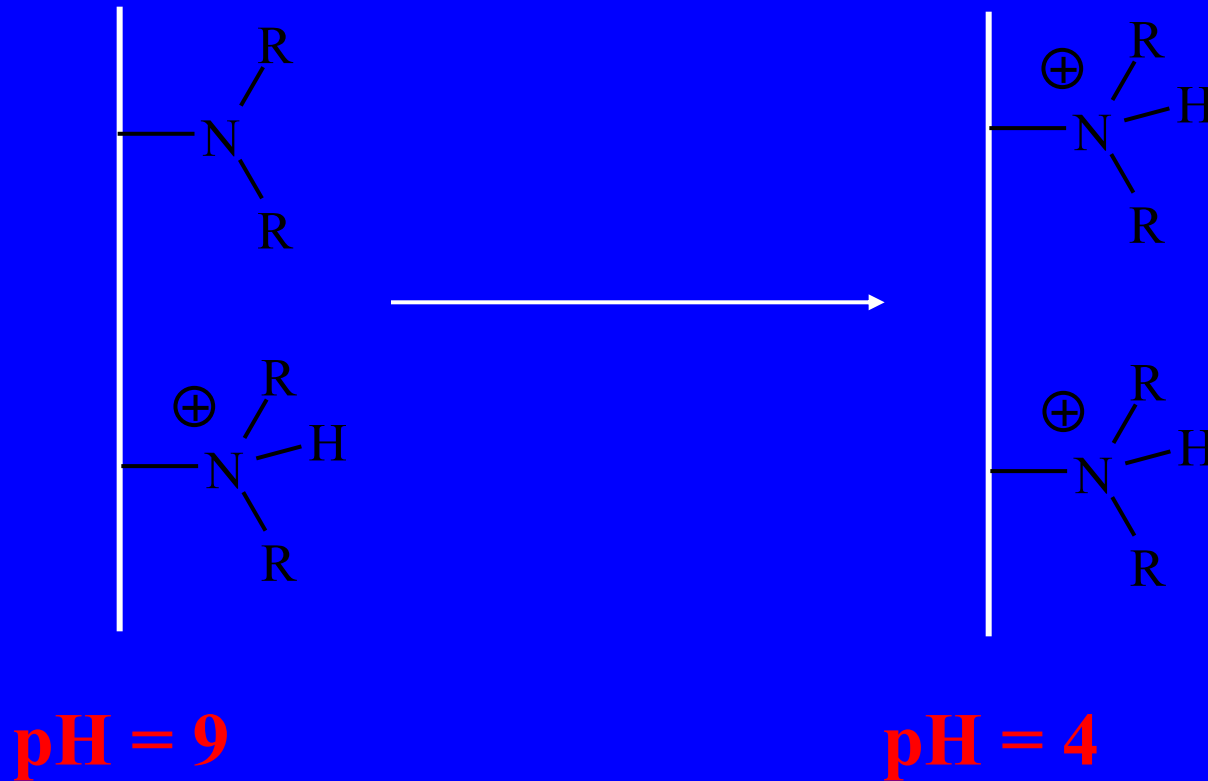


# Ionexová chromatografie

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

Použití – purifikace, zakoncentrování, výměna pufu

# Chromatofokusace děj na koloně

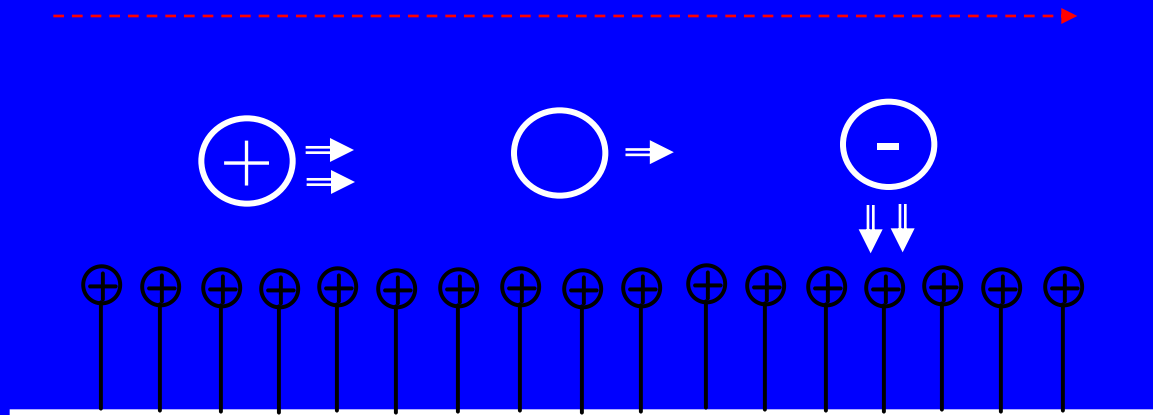


# Chromatofokusace chování vzorku

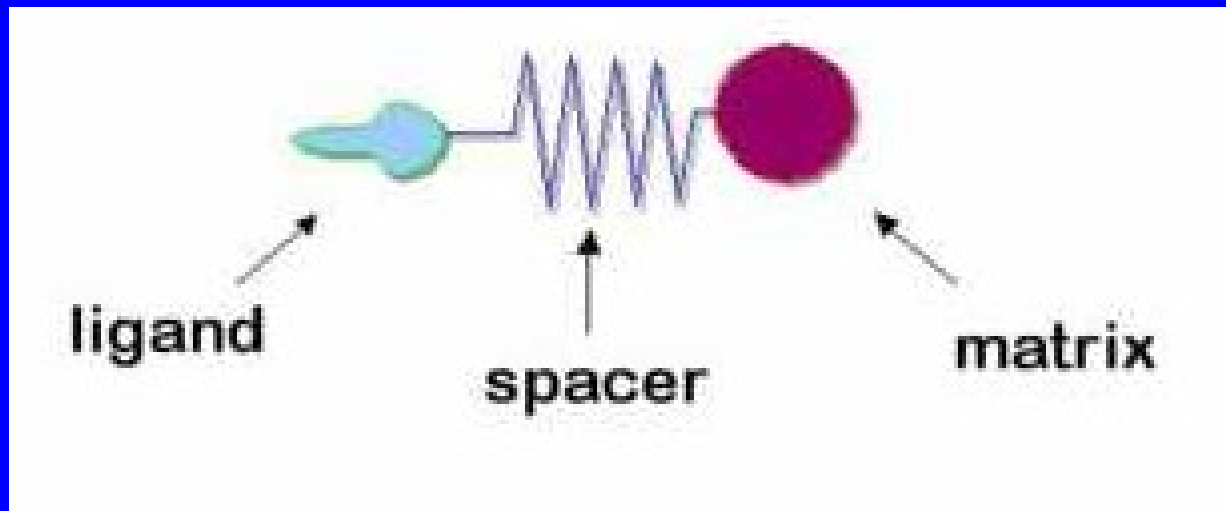
$pH < pI$

$pH = pI$

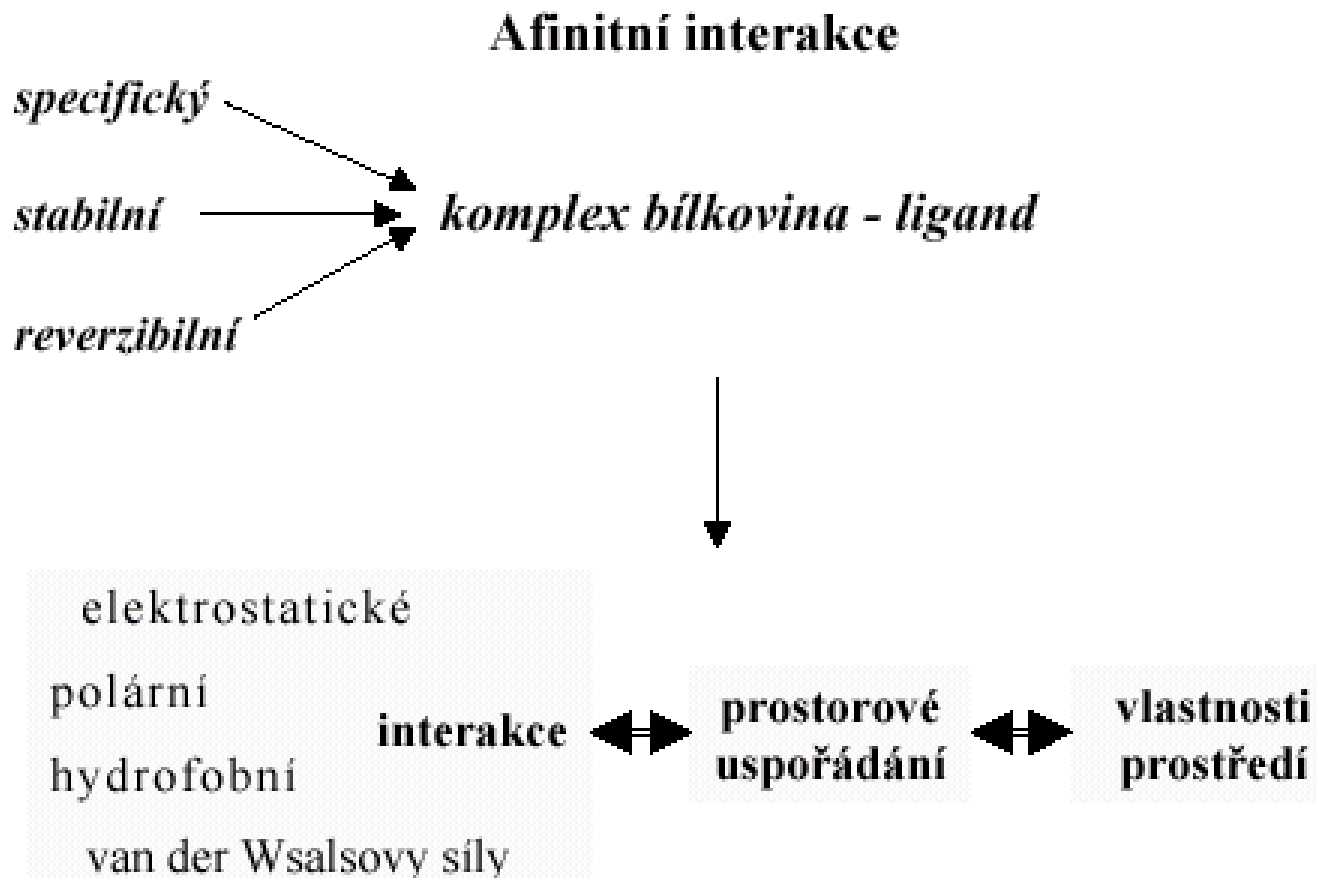
$pH > pI$



# Afinní chromatografie

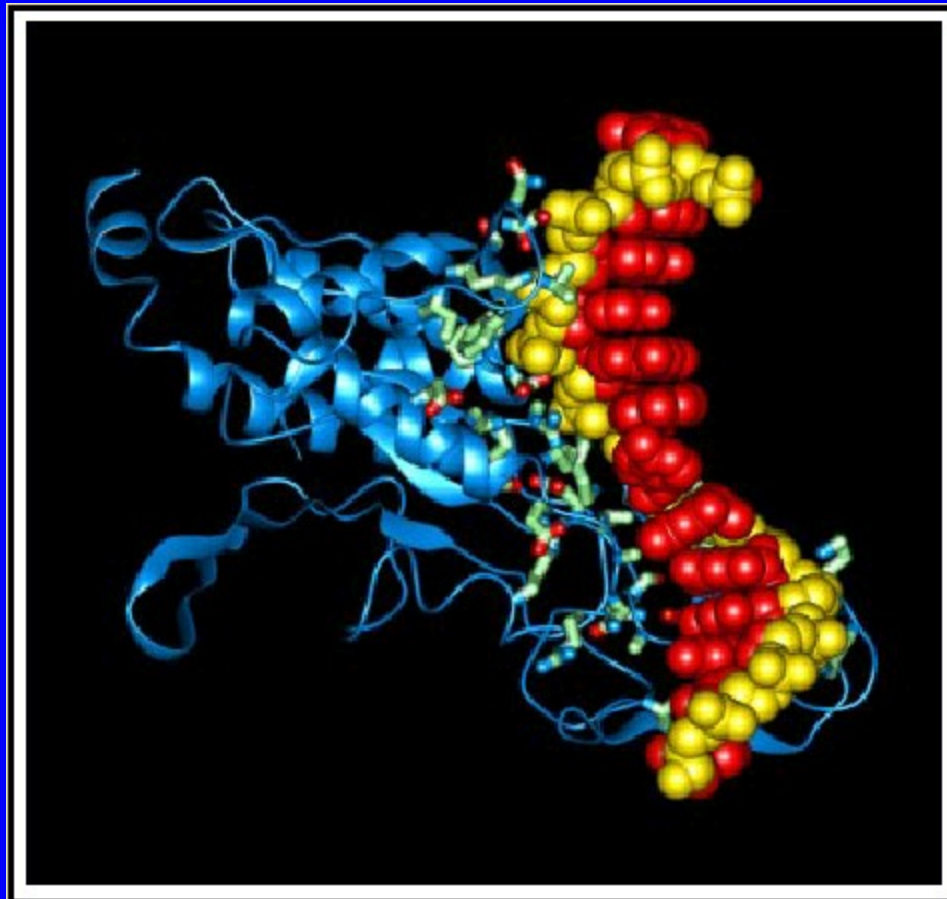


# Afinitní interakce





# Interakce mezi DNA a endonukleasou

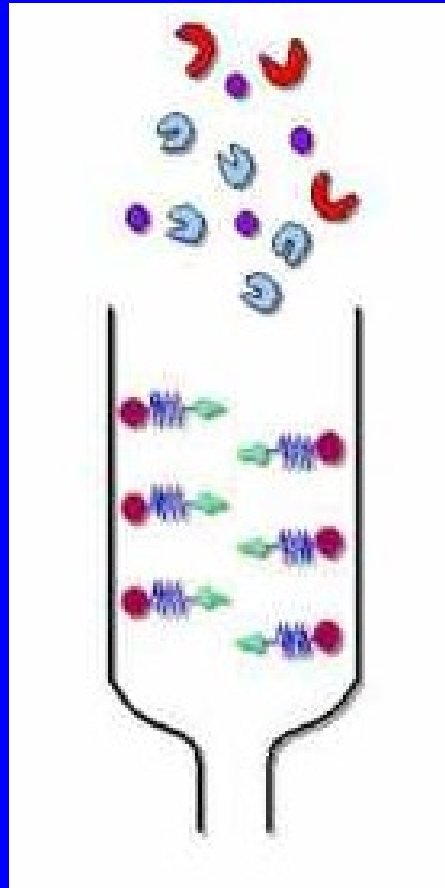


# Afinitní páry

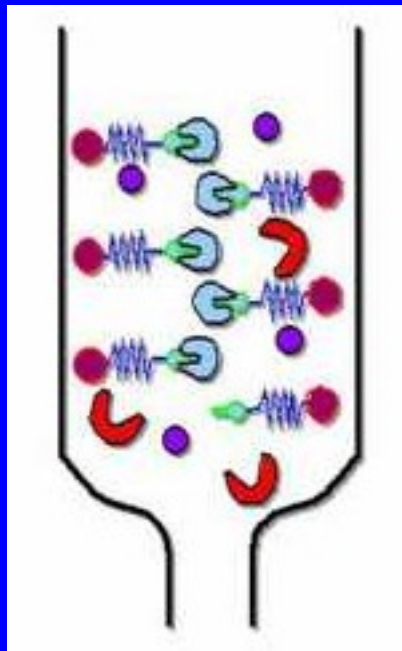
Ligand	Bílkovina	$K_D$ (M)
antigen	polyklonální protilátka	$10^{-8} - 10^{-6}$
antigen	monoklonální protilátka	$10^{-12} - 10^{-8}$
biotin	avidin	$10^{-15}$
sacharid	lektin	$10^{-6} - 10^{-3}$
hormon, toxin	vazebný protein	$10^{-9} - 10^{-12}$
substrát	enzym	$10^{-7} - 10^{-3}$
inhibitor	enzym	$10^{-14}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

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

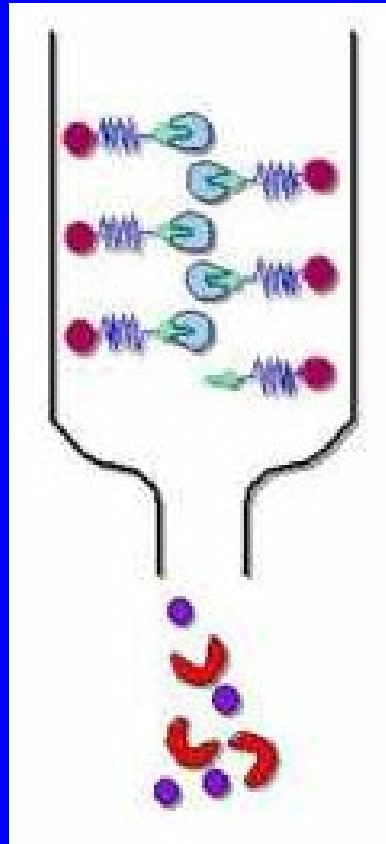
# Afinní chromatografie nanesení vzorku



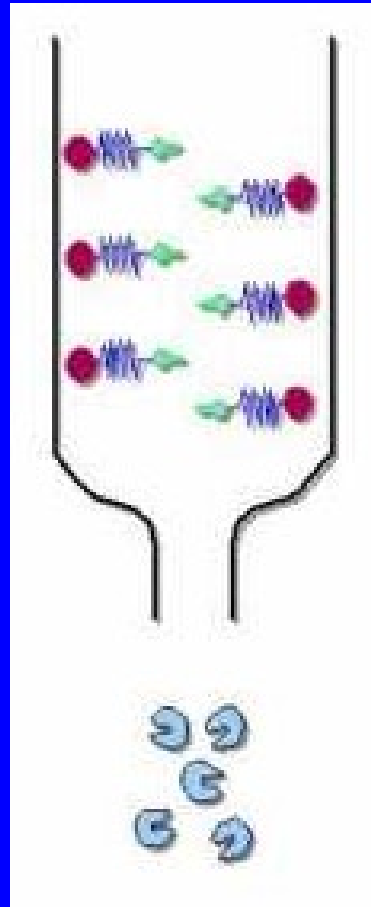
# Afinní chromatografie vznik interakce



# Afinní chromatografie vymytí balastů



# Afinní chromatografie eluce



# Předpoklady pro vznik komplexu

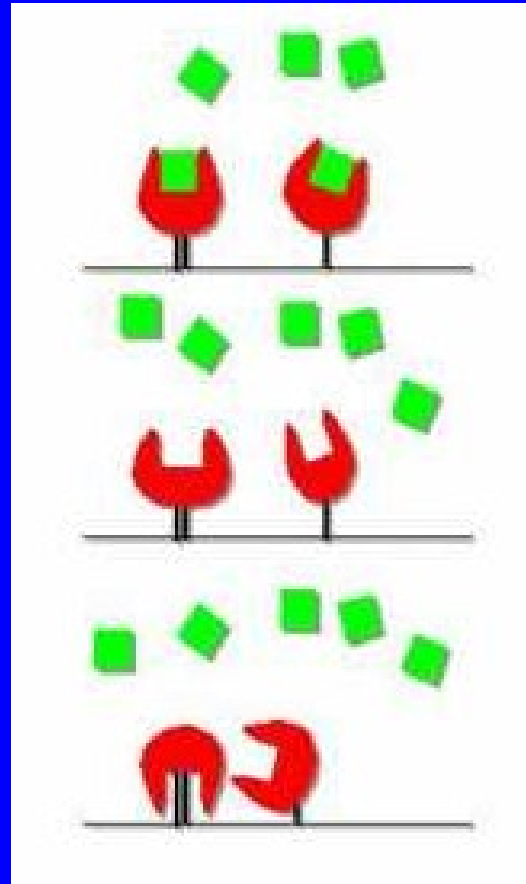
- Sterické – použití raménka (spacer)



- Optimální pH, iontová síla

# Předpoklady pro vznik komplexu

- Vazebné
- Konformační



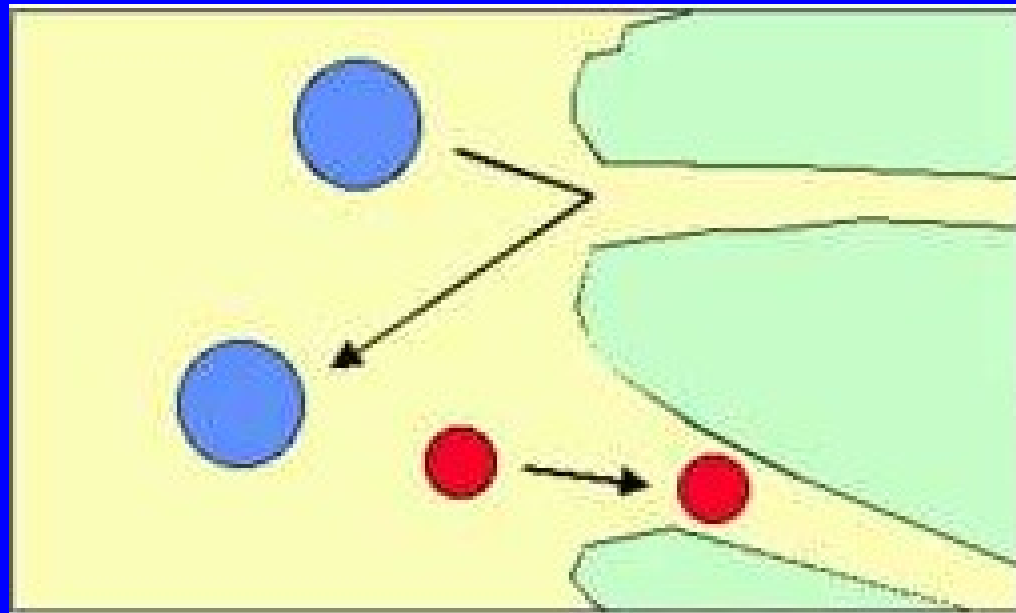


# Provedení

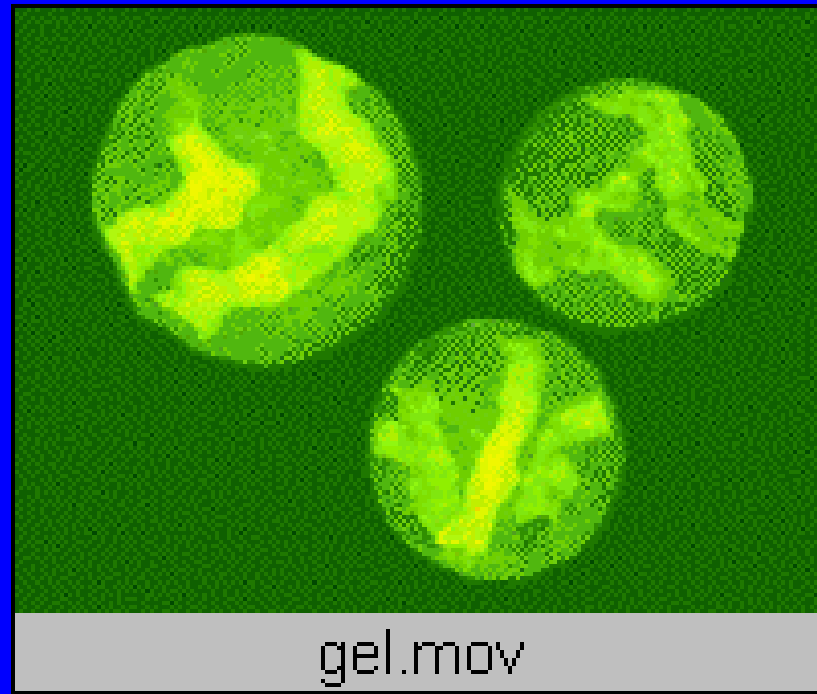
- Nanesení vzorku – nízká iontová síla
- Eluce – selektivní - volným ligandem  
– neselektivní - změna pH, iontové síly, polarity

Použití : analytické (stanovení K), purifikace

# Gelová permeační chromatografie

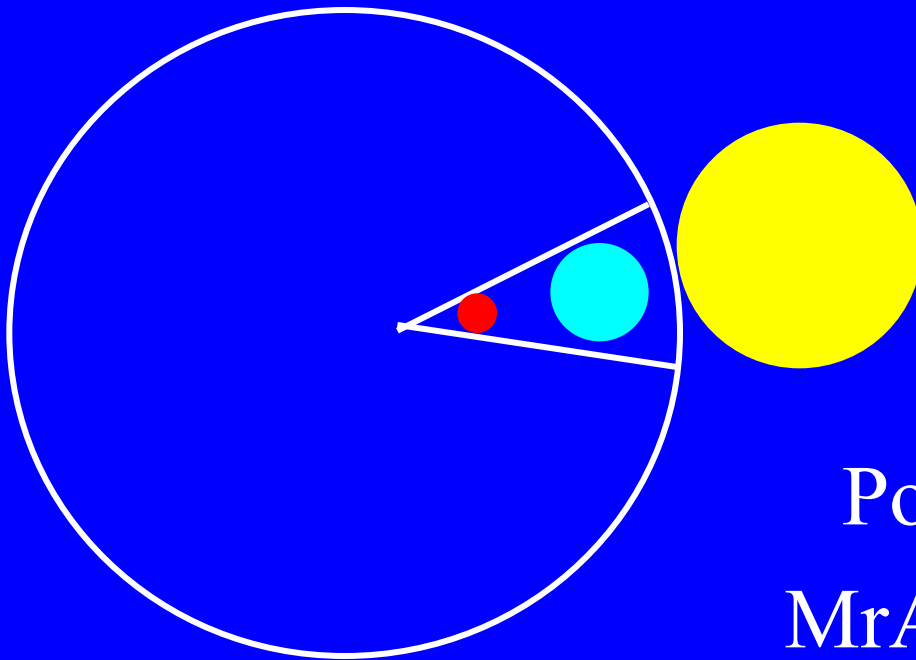


# Gelová permeační chromatografie



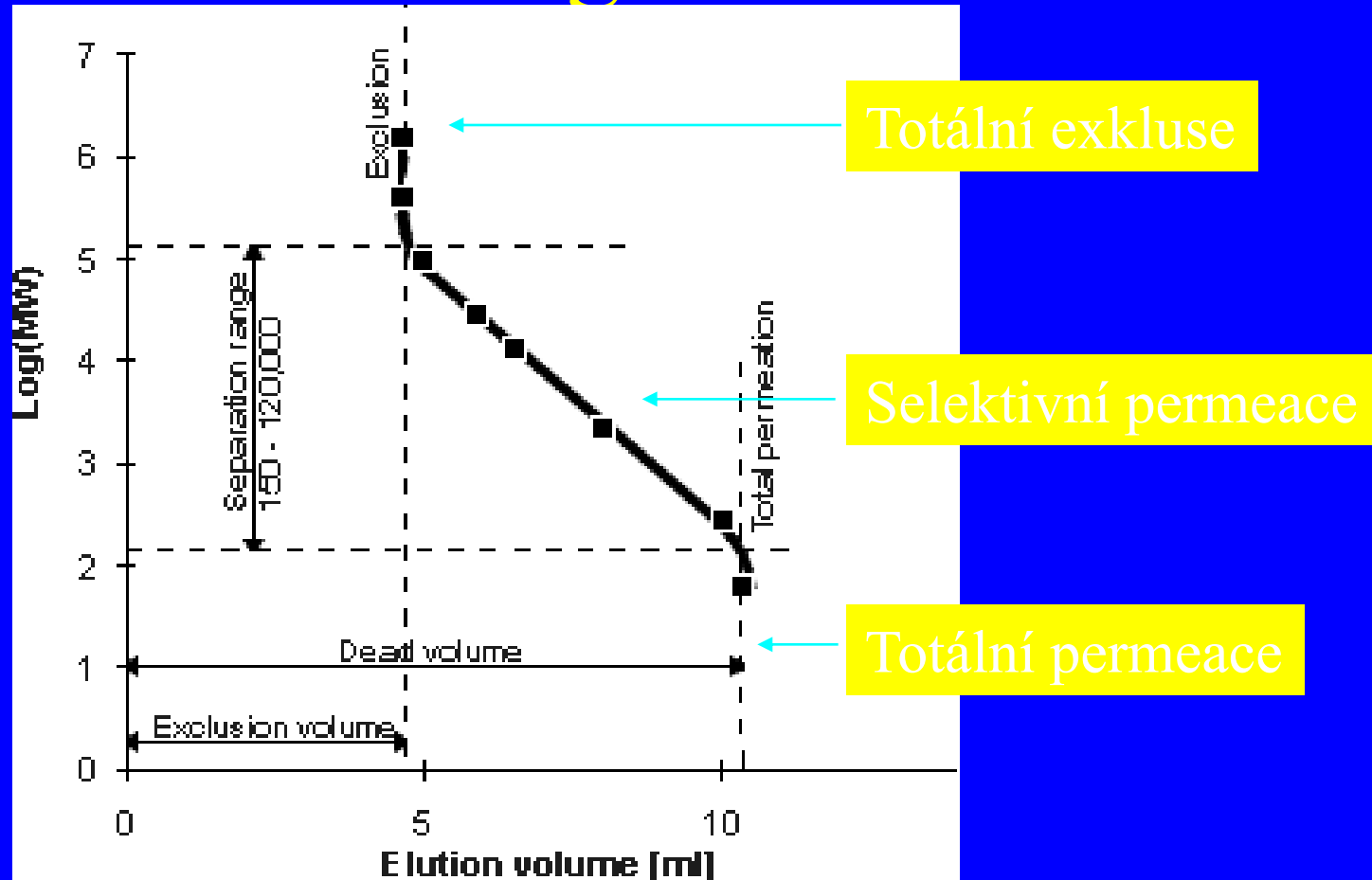
# Gelová permeační chromatografie

Princip - stérická exkluze  
- omezená difuze



Pořadí eluce :  
 $MrA > MrB > MrC$

# Gelová permeační chromatografie

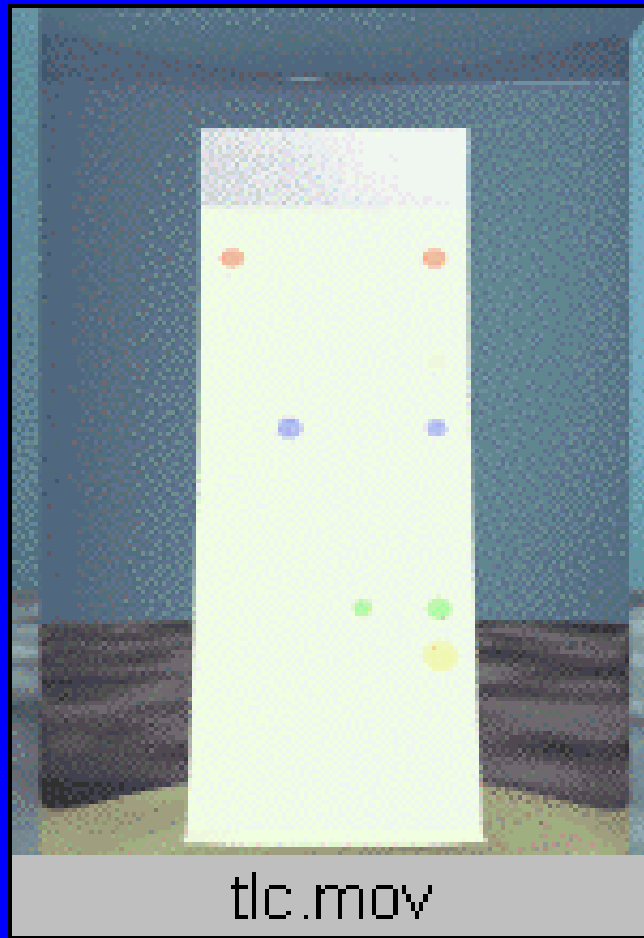


# Gelová permeační chromatografie

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

Použití : stanovení Mr, odsolování, purifikace

# PC a TLC



tlc.mov

# 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

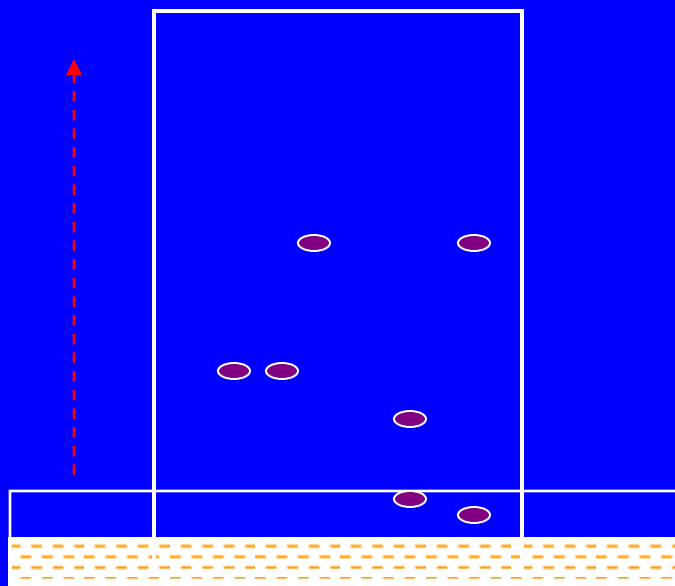
# Nanášení vzorku

- Pipety
- Kapiláry

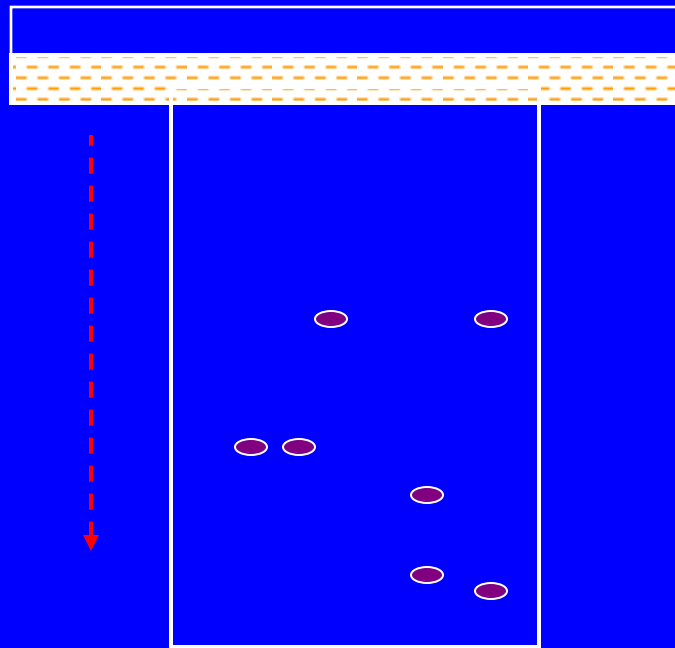
# Provedení

- Vzestupné
- Sestupné
- Kruhové
- Dvojrozměrné

# Vzestupné

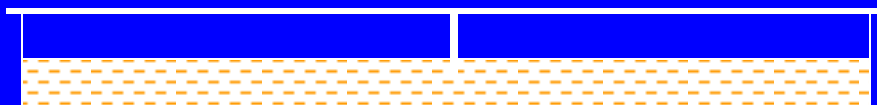
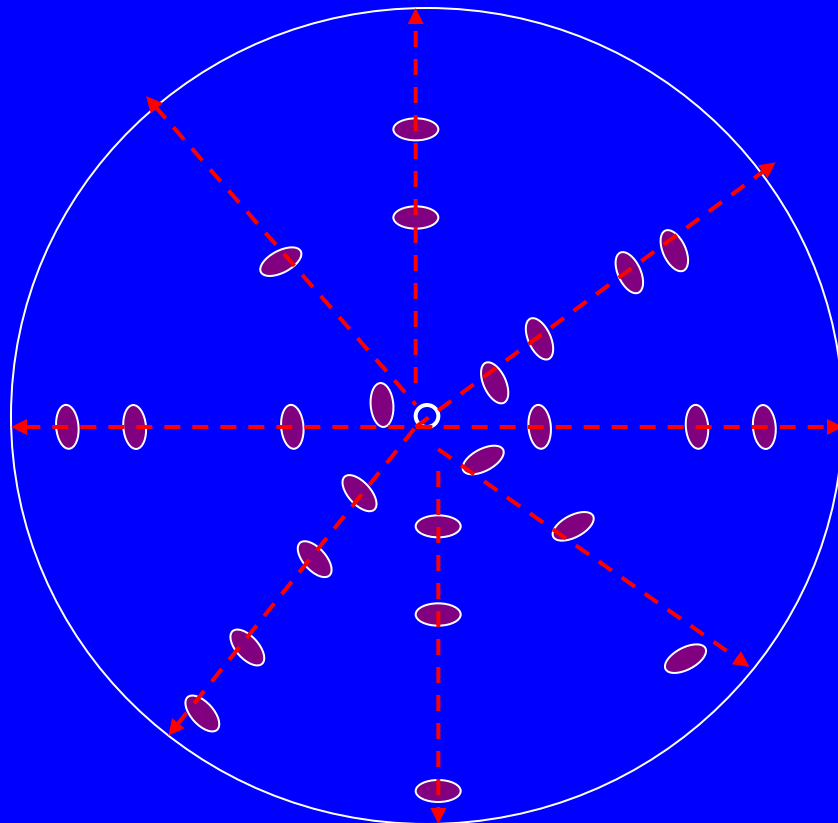


# Sestupné

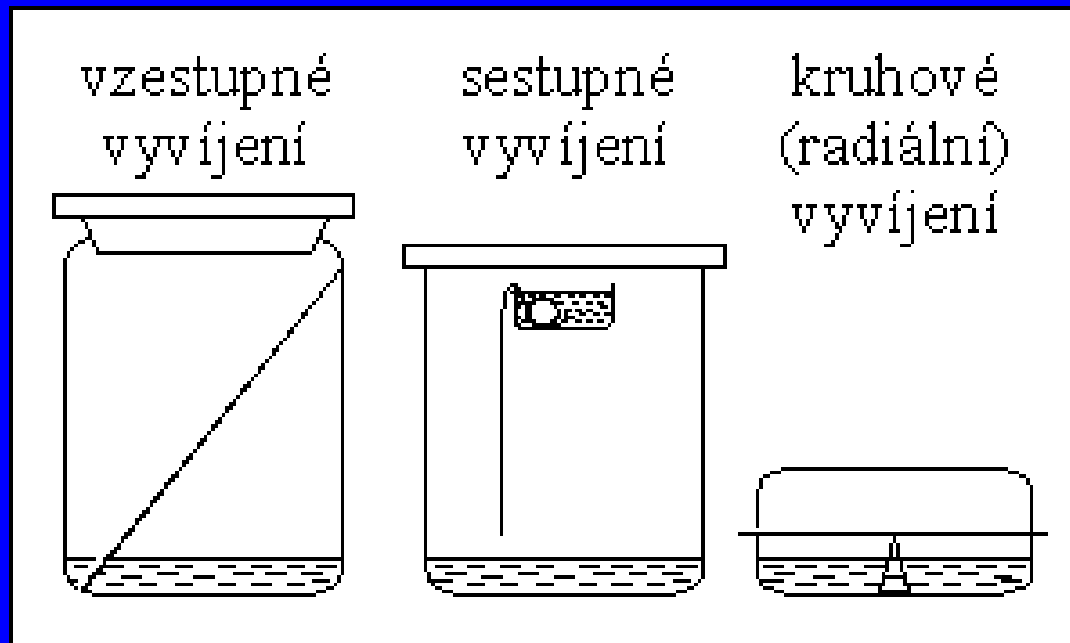




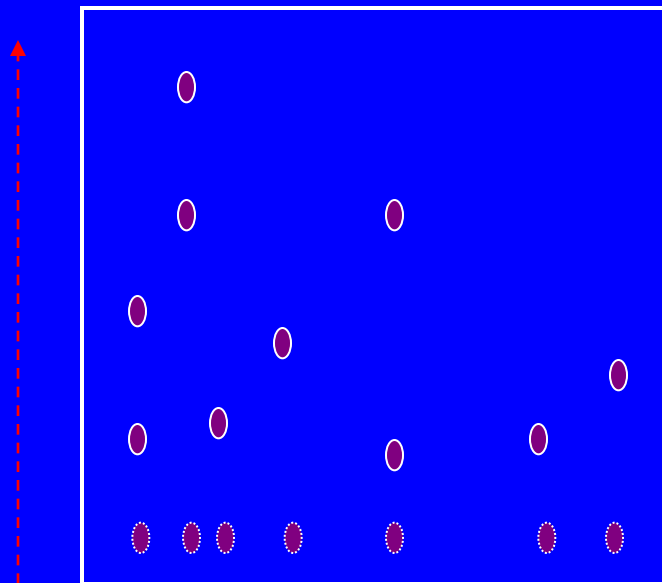
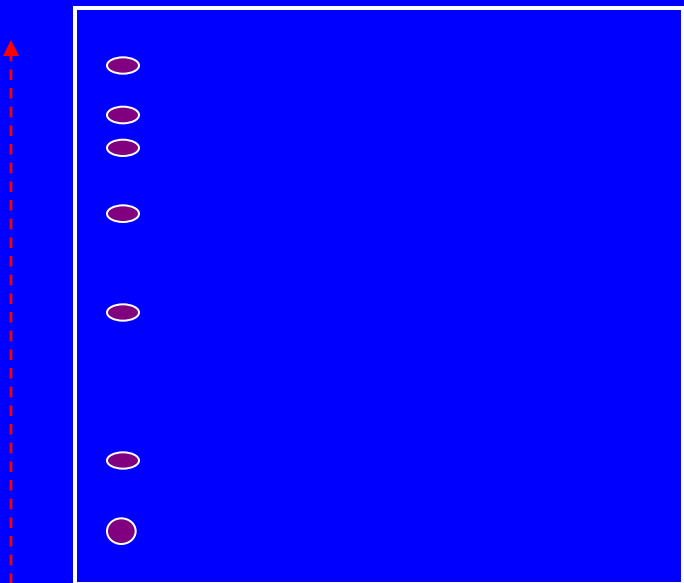
# Kruhové



# Vyvíjení



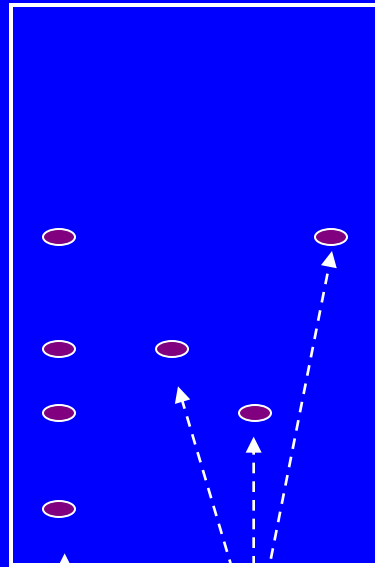
# Dvojrozměrné



# Provedení

- Analytické
- Preparativní

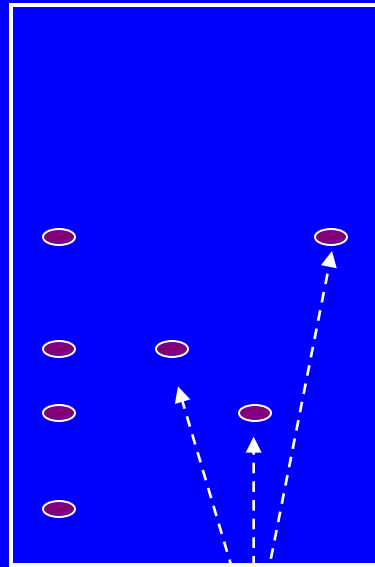
# Analýza kvalitativní



standardy vzorky

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

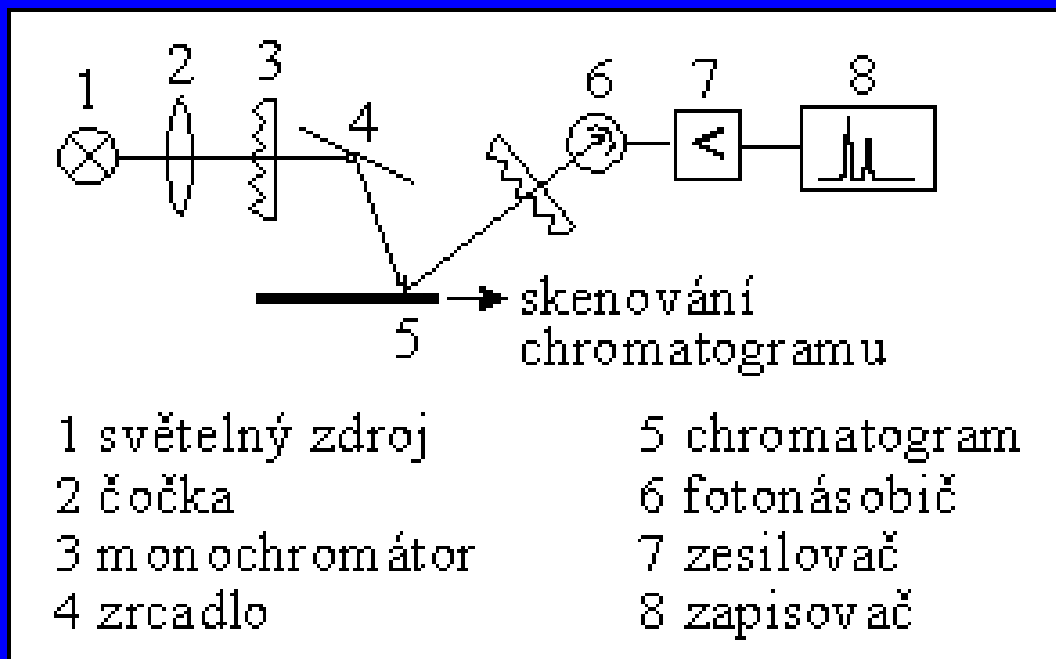
# Analýza kvantitativní



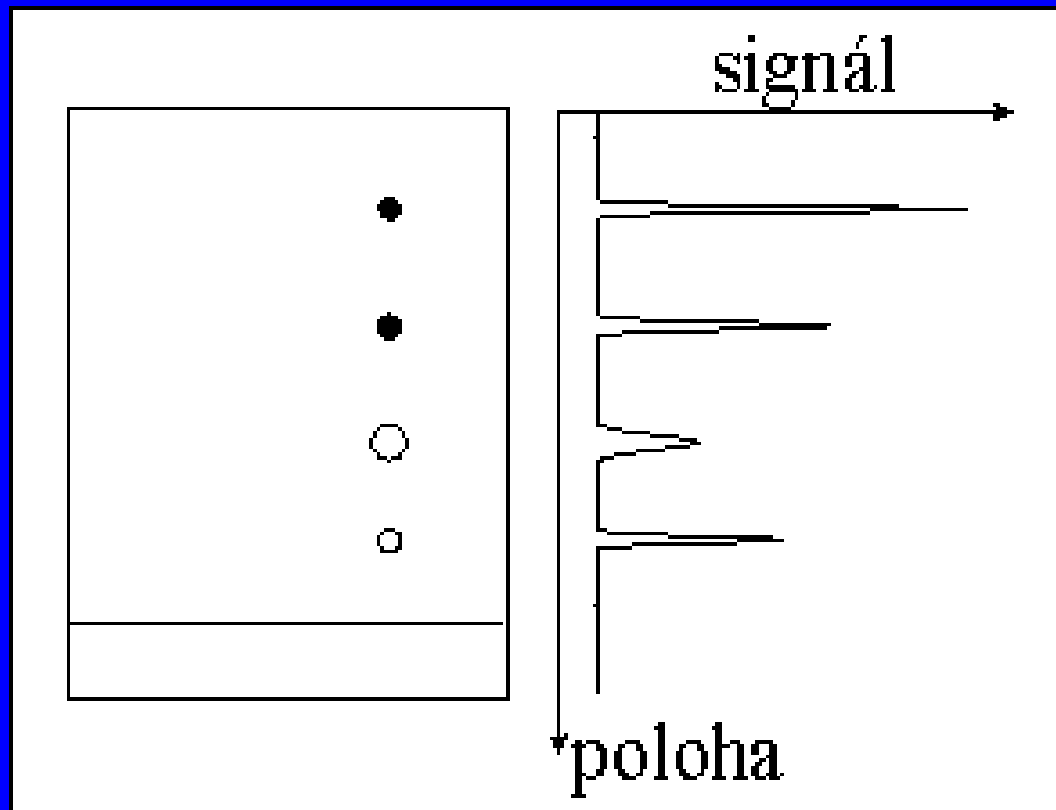
**Plocha  
skvrn**

- Planimetrie
- Denzitometrie

# Denzitometrie



# Denzitometrie





# Preparace

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

# 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

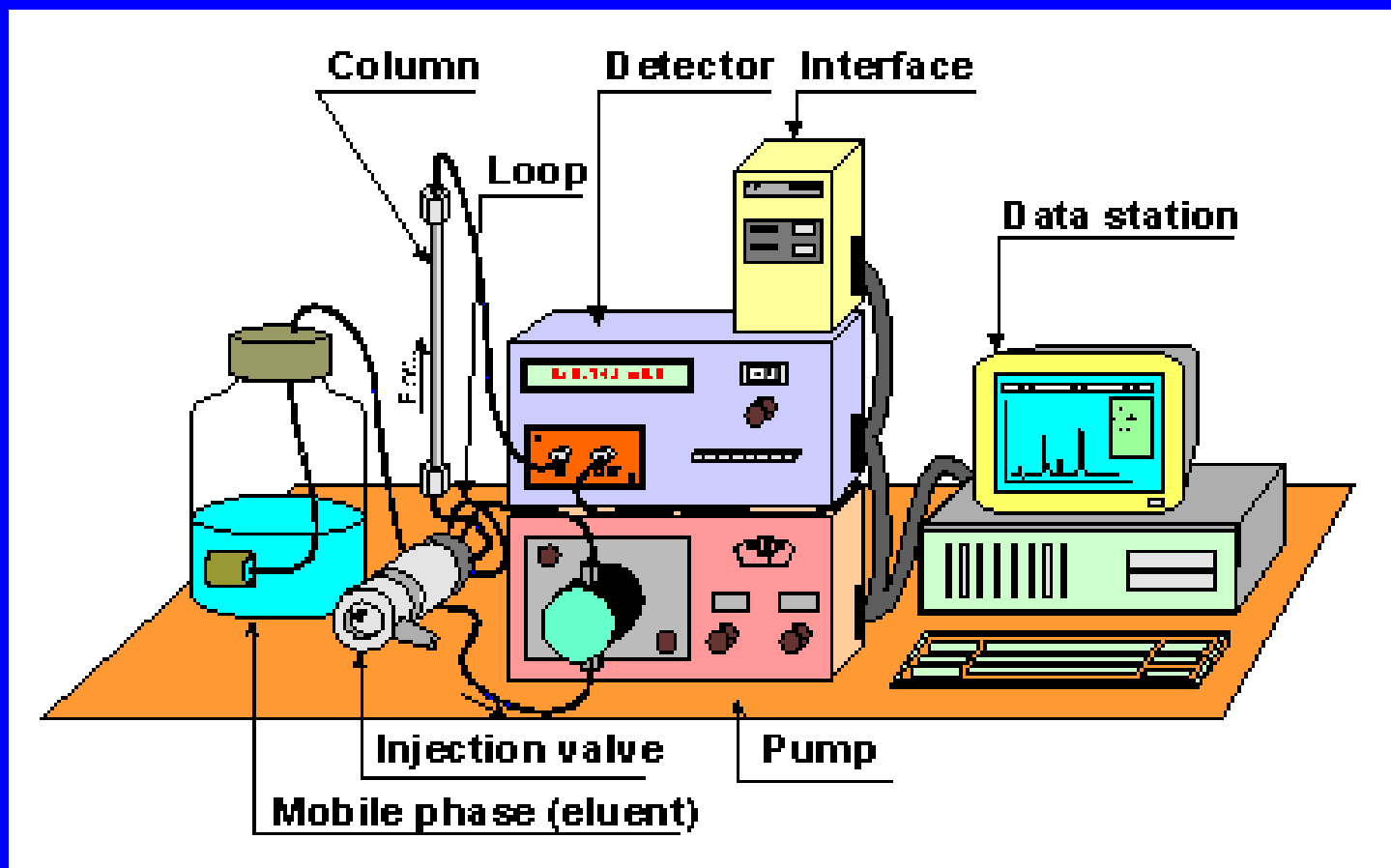


# Instrumentace pro LPC

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

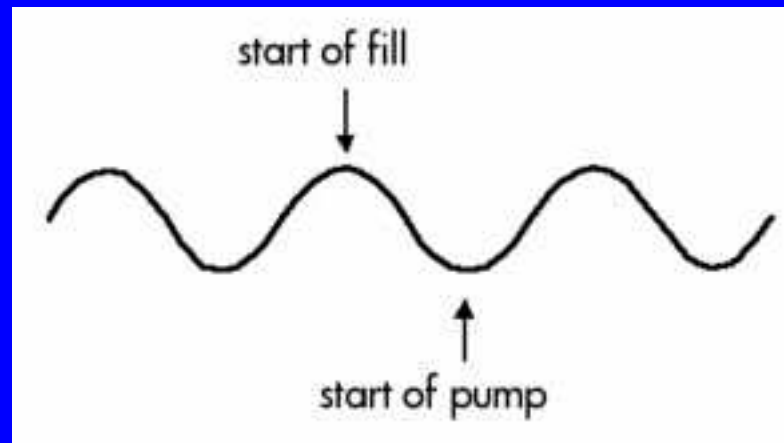
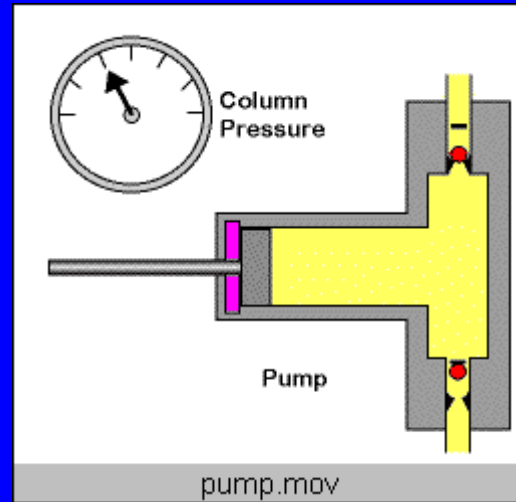
# Instrumentace pro FPLC a HPLC

# Zařízení pro HPLC

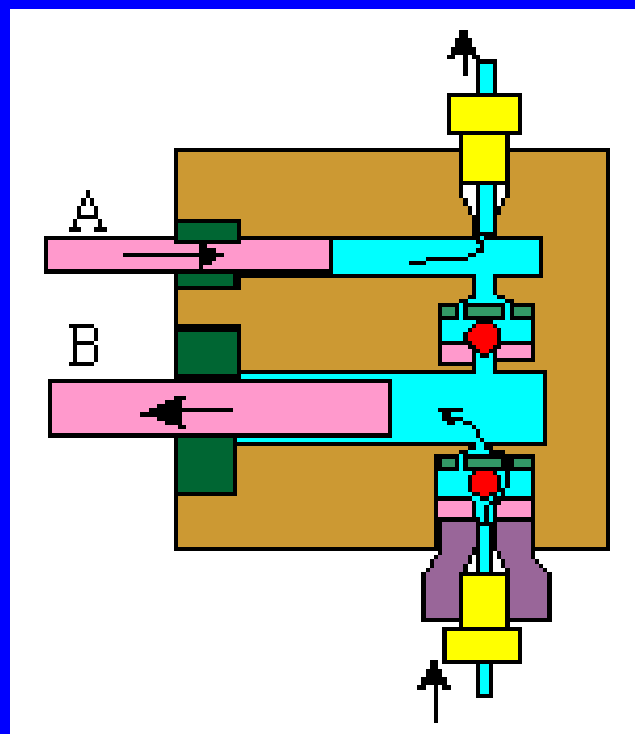
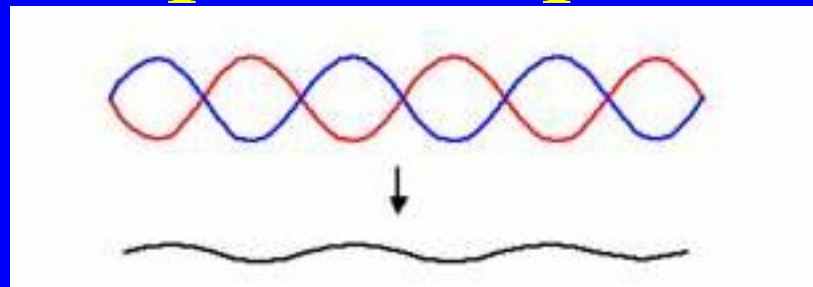




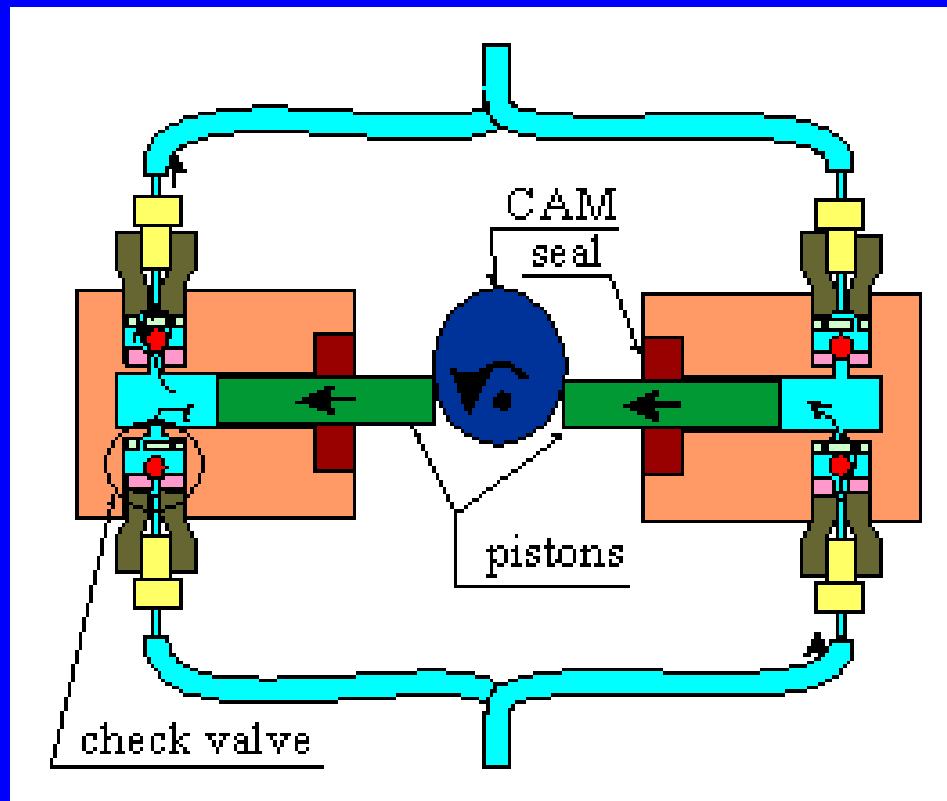
# Pumpa jednopístová



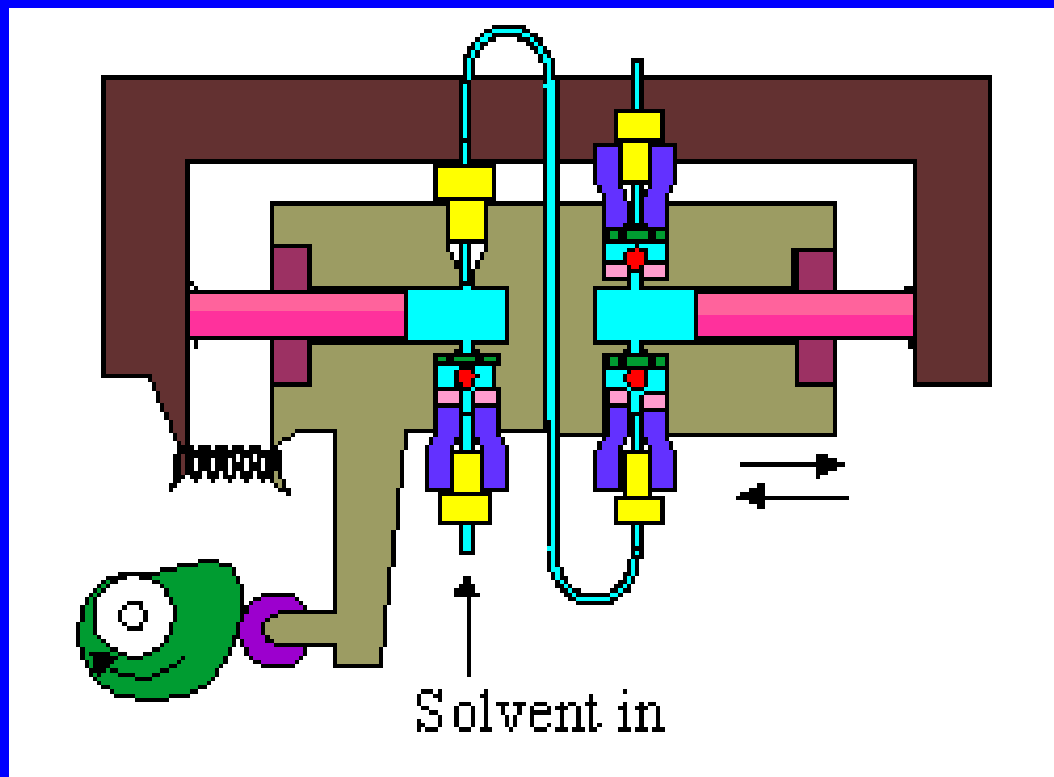
# Pumpa dvoupístová



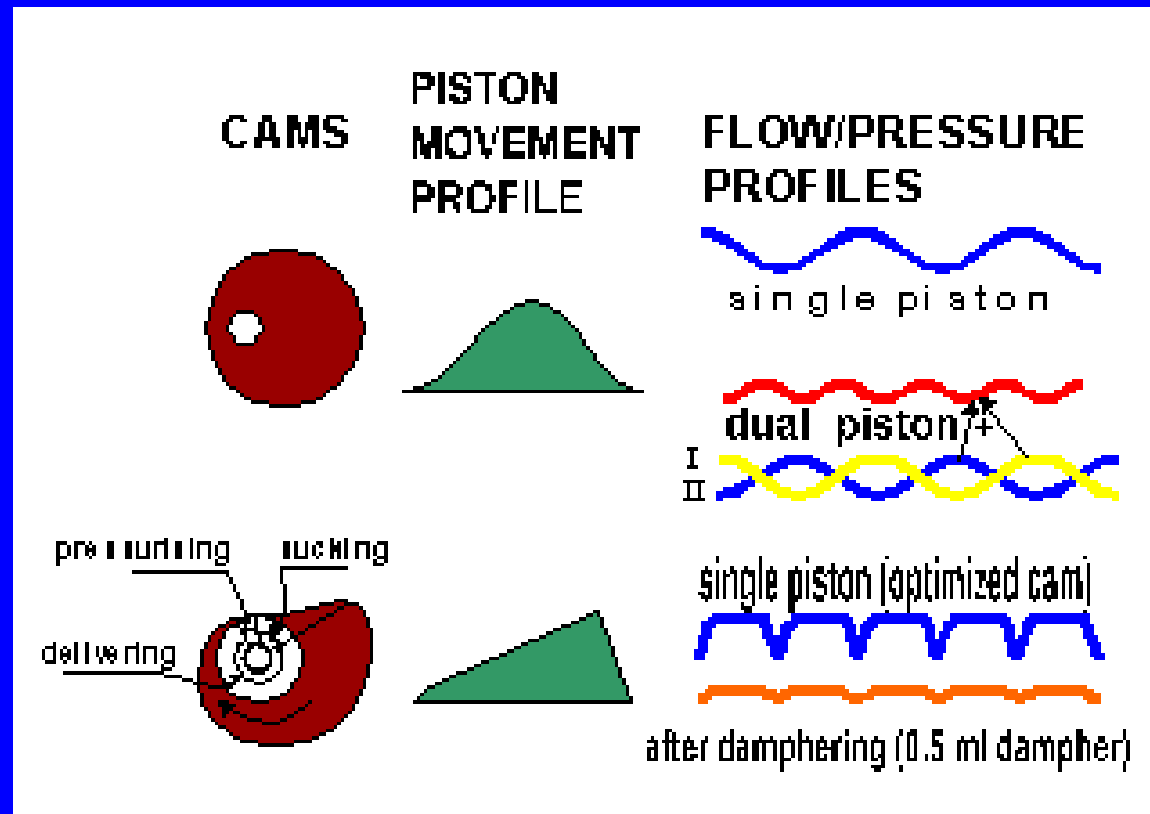
# Pumpa dvoupístová



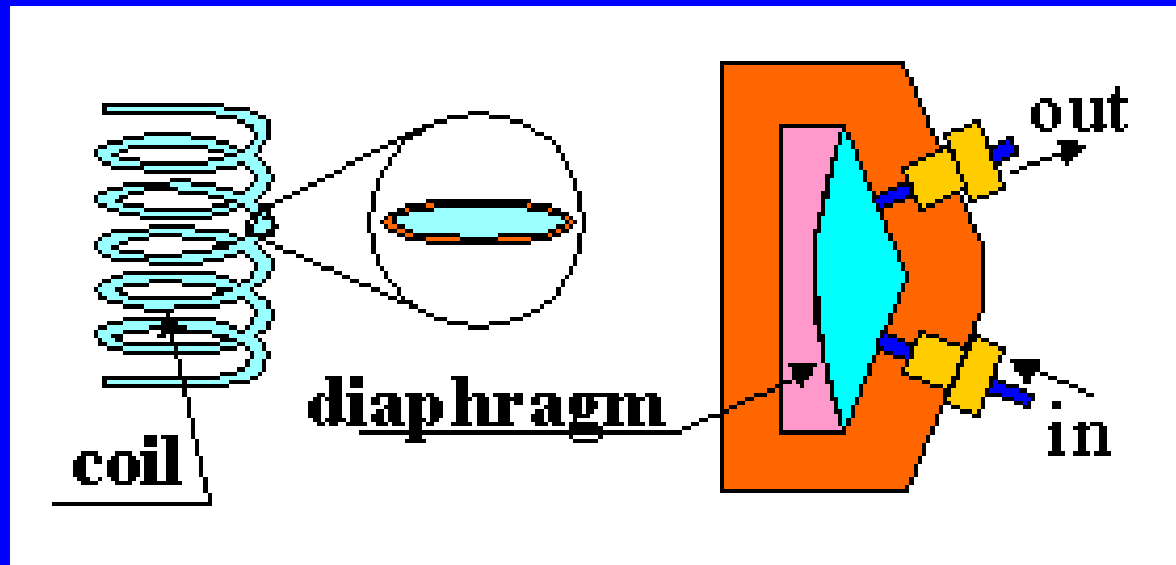
# Pumpa dvoupístová



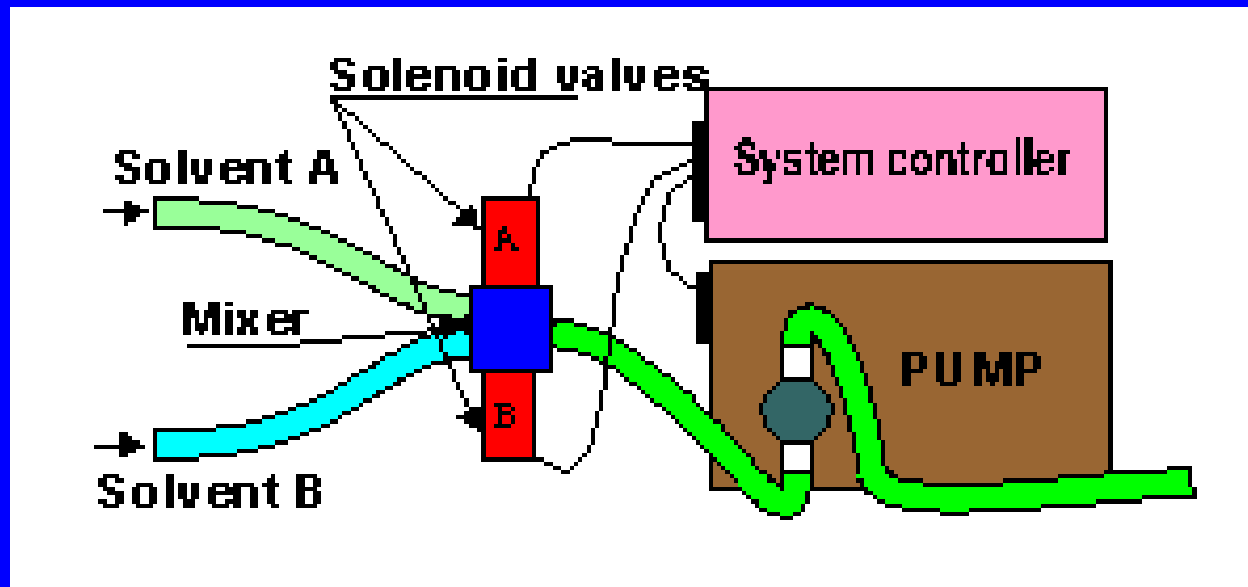
# Tlumení pulsů



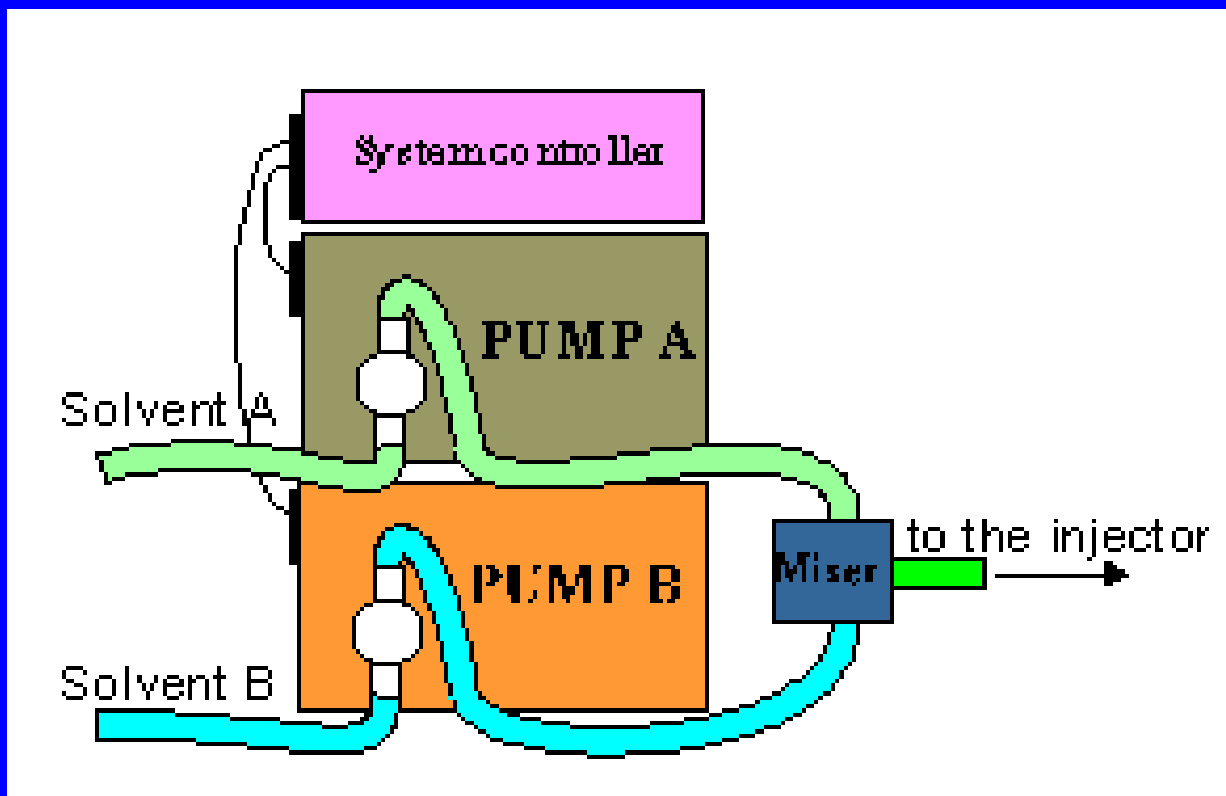
# Tlumení pulsů



# Gradient nízkotlaký

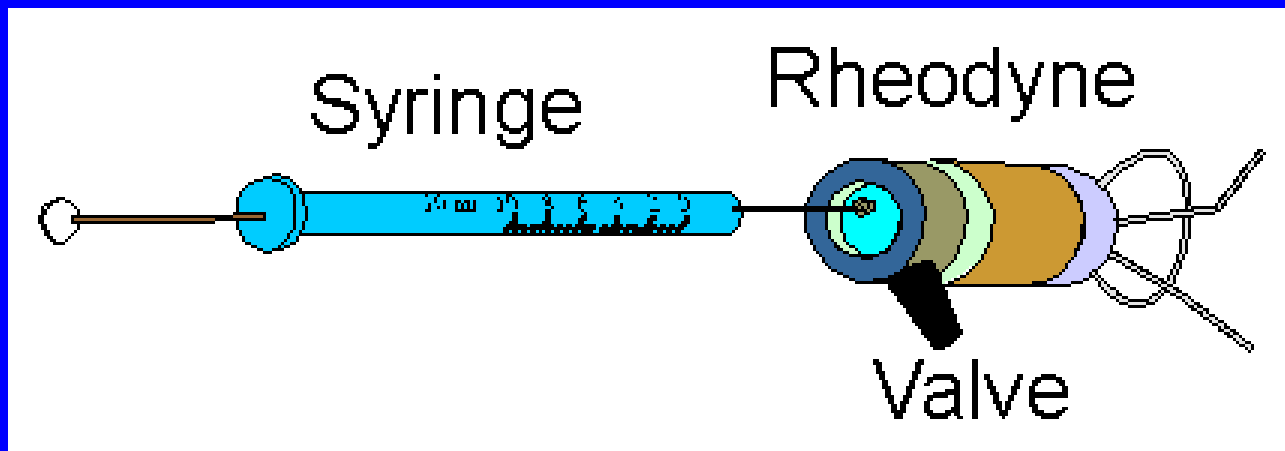


# Gradient vysokotlaký

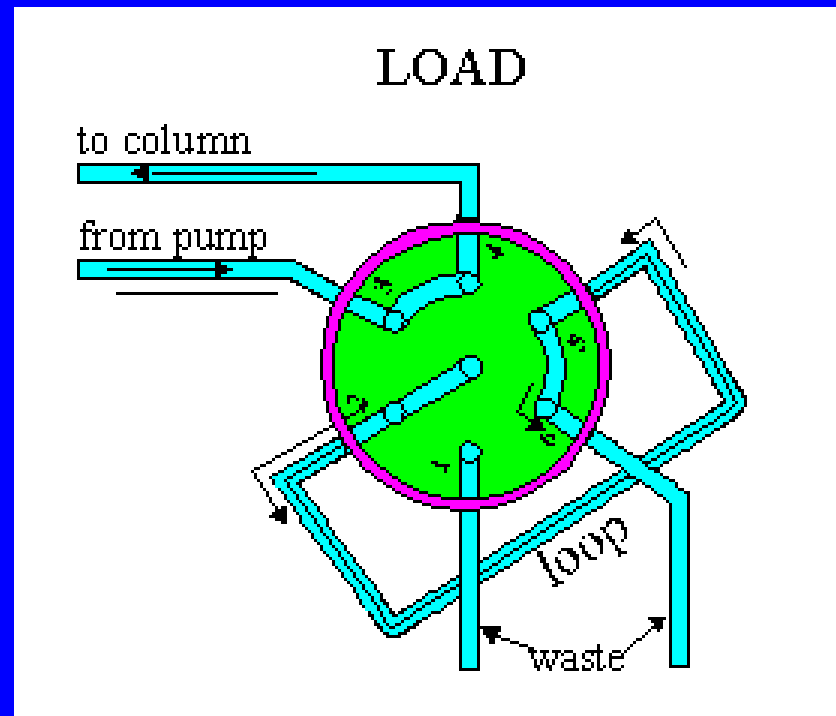




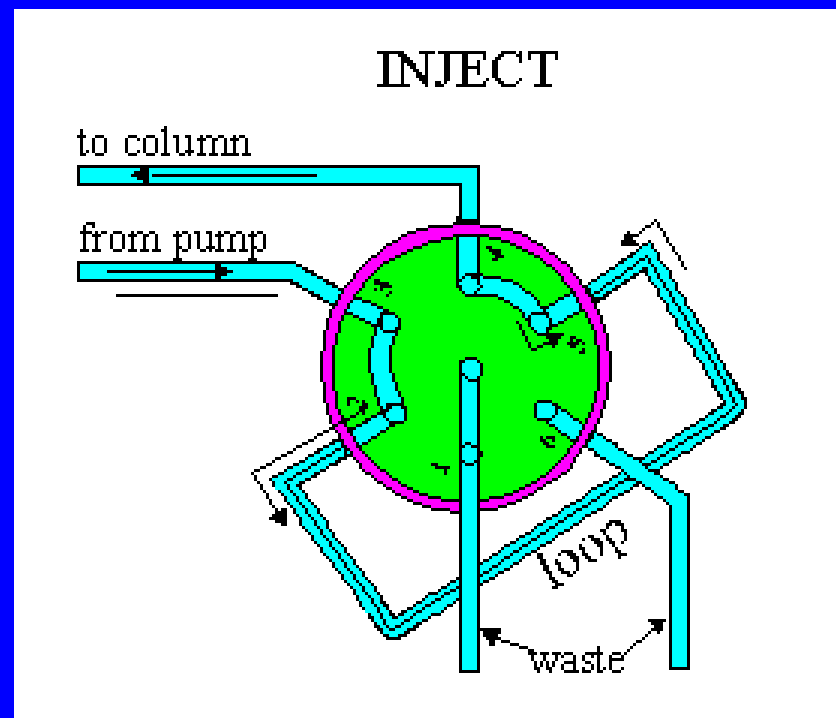
# Dávkování – dávkovací ventil



# Dávkovací ventil – „Load“

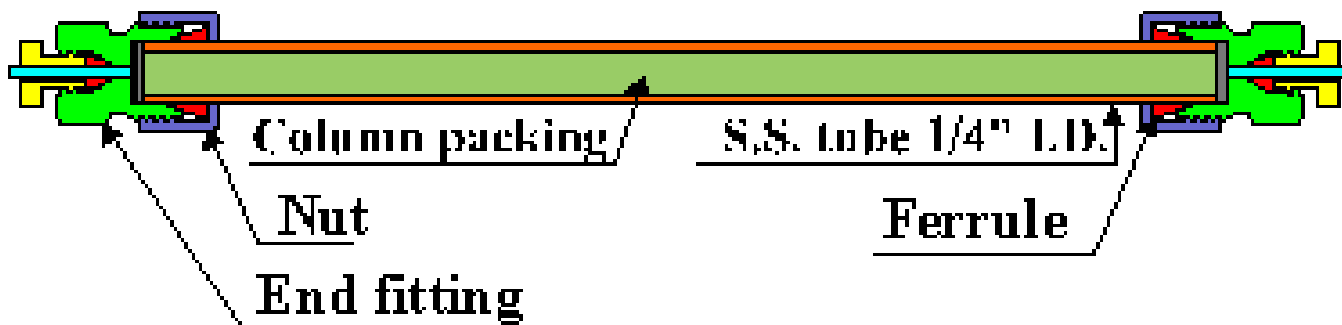


# Dávkovací ventil – „Inject“

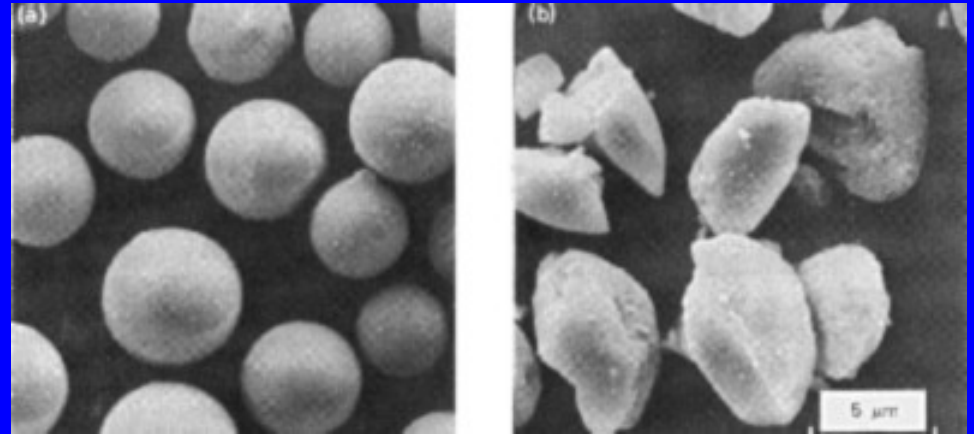
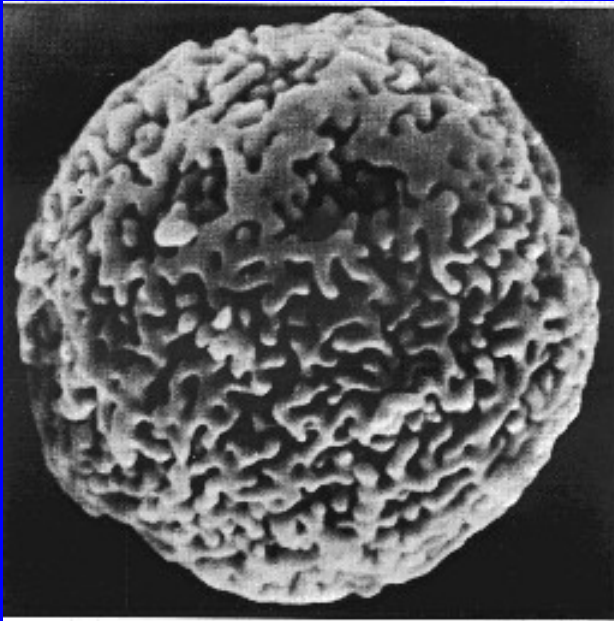


# Kolona

## Standart column hardware

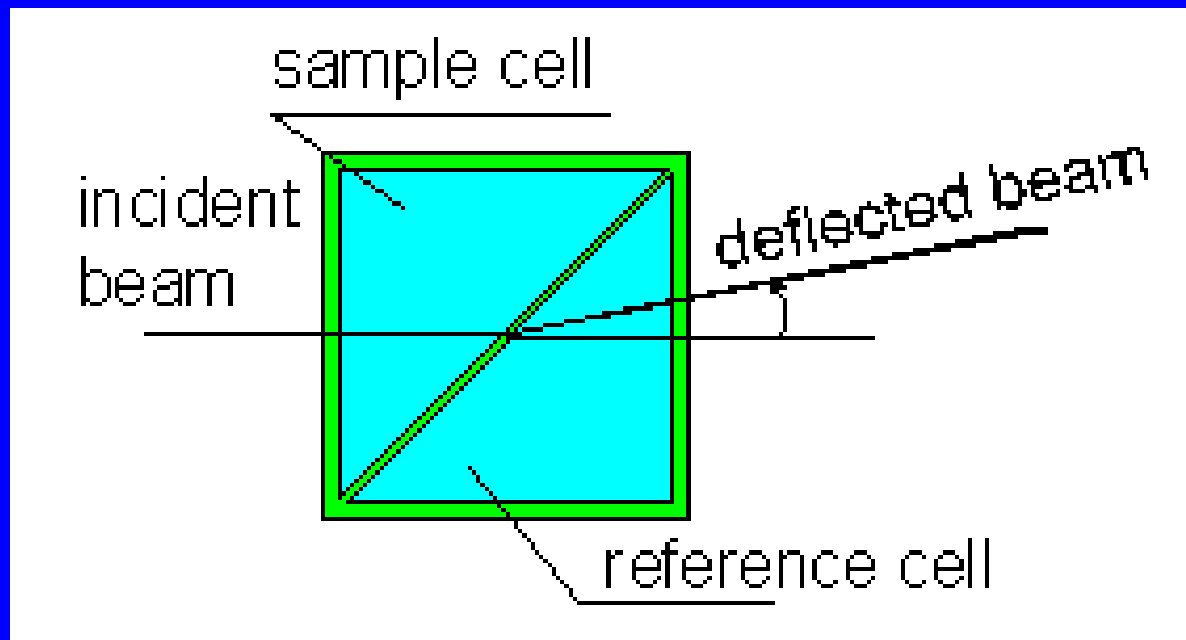


# Částice sorbentu

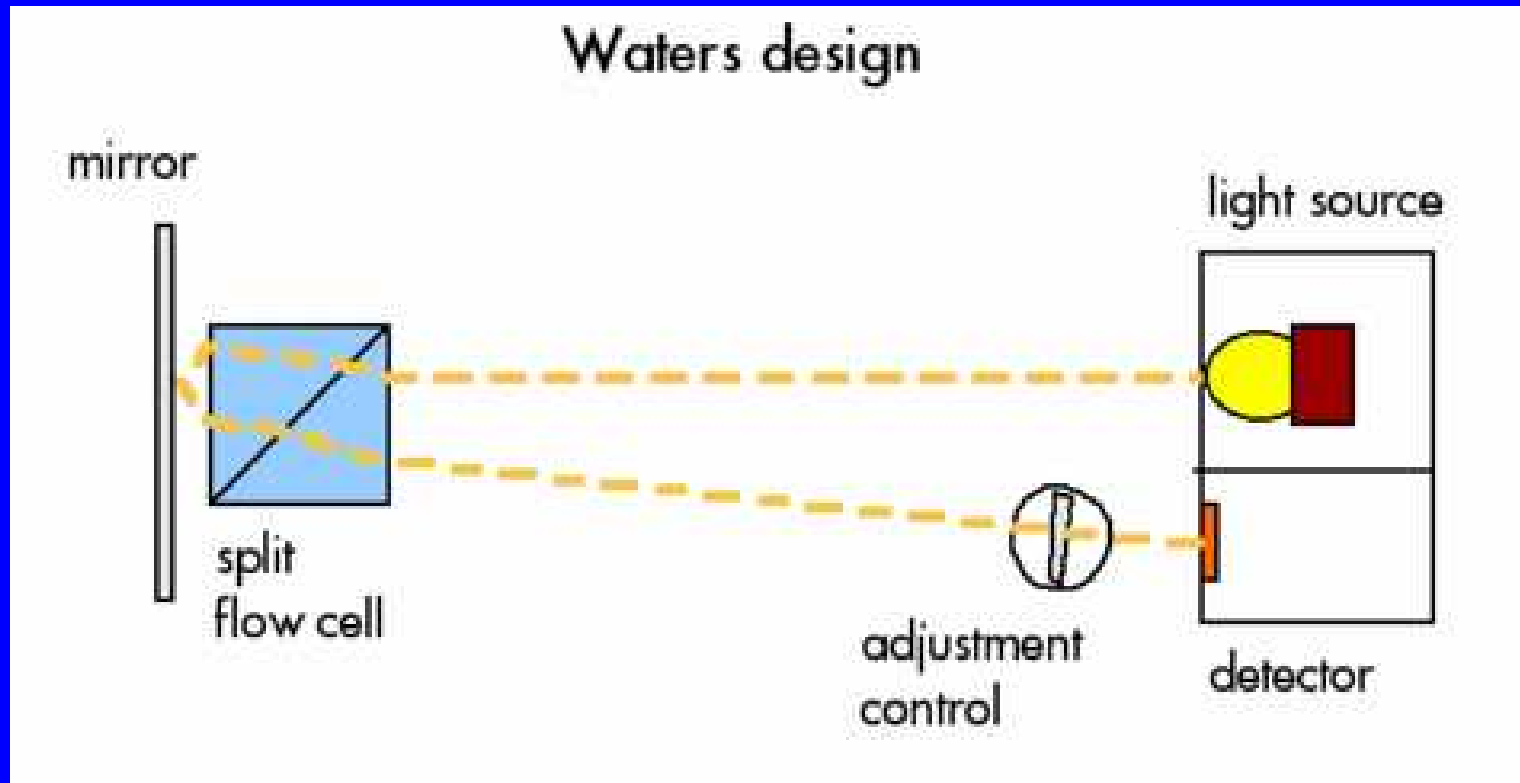


Detektory

# Refraktometrický detektor



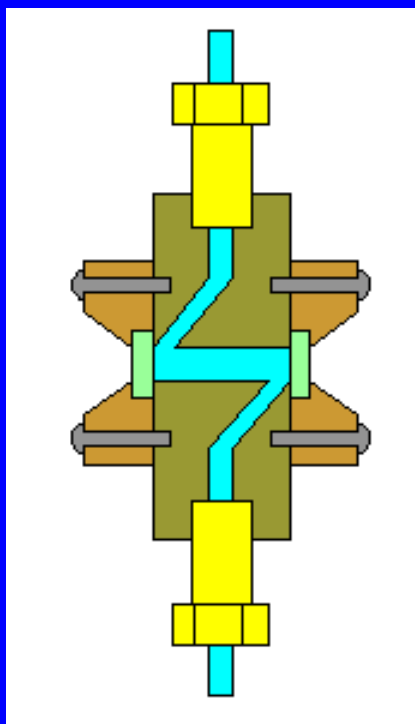
# Refraktometrický detektor



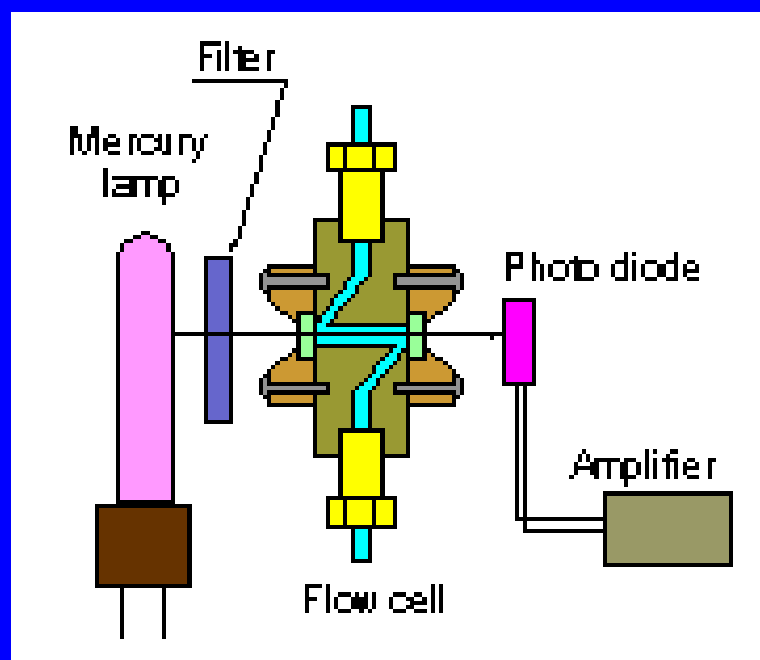


# UV – VIS detektor

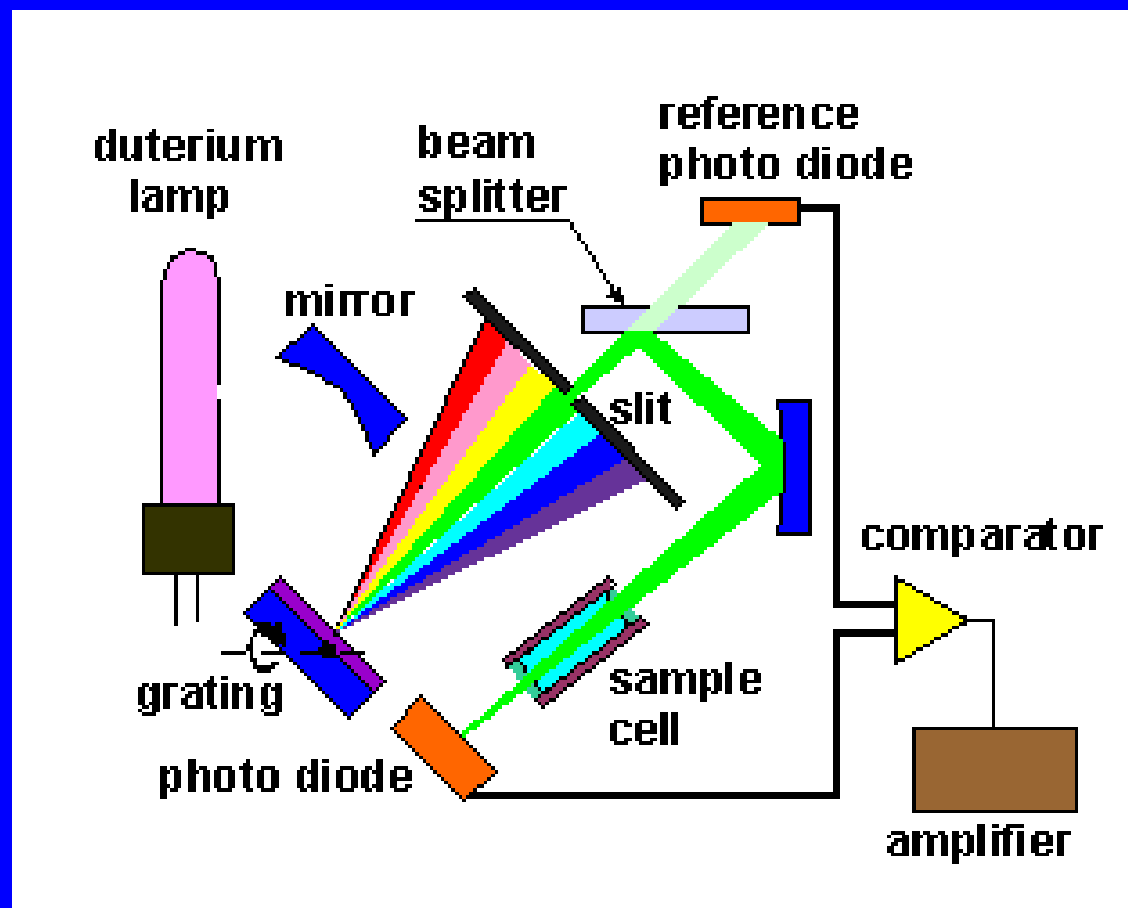
## detekční cela



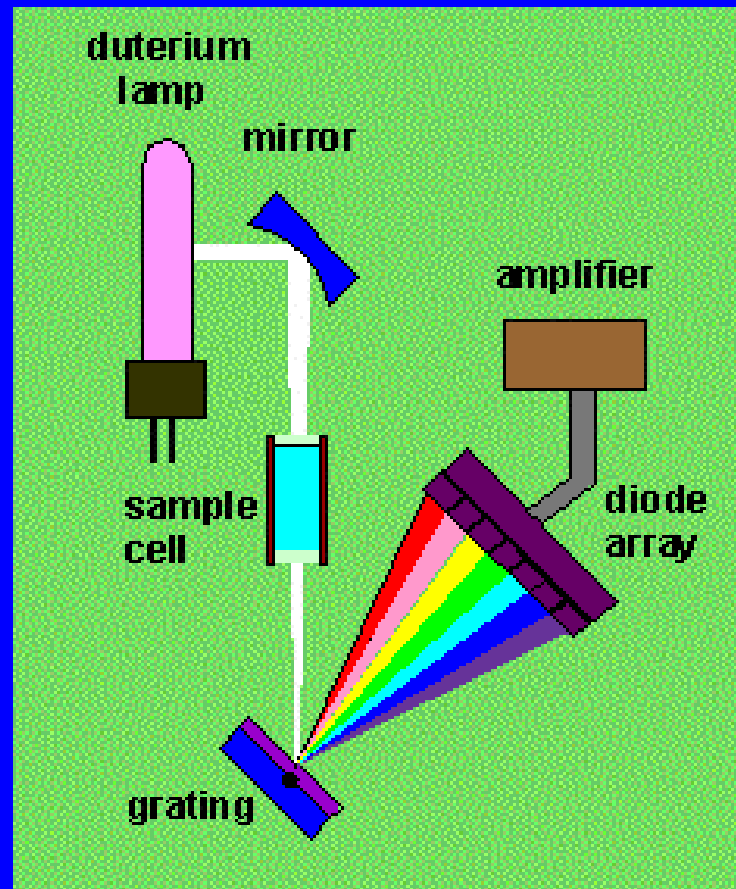
# UV – VIS detektor s fixní vlnovou délkou



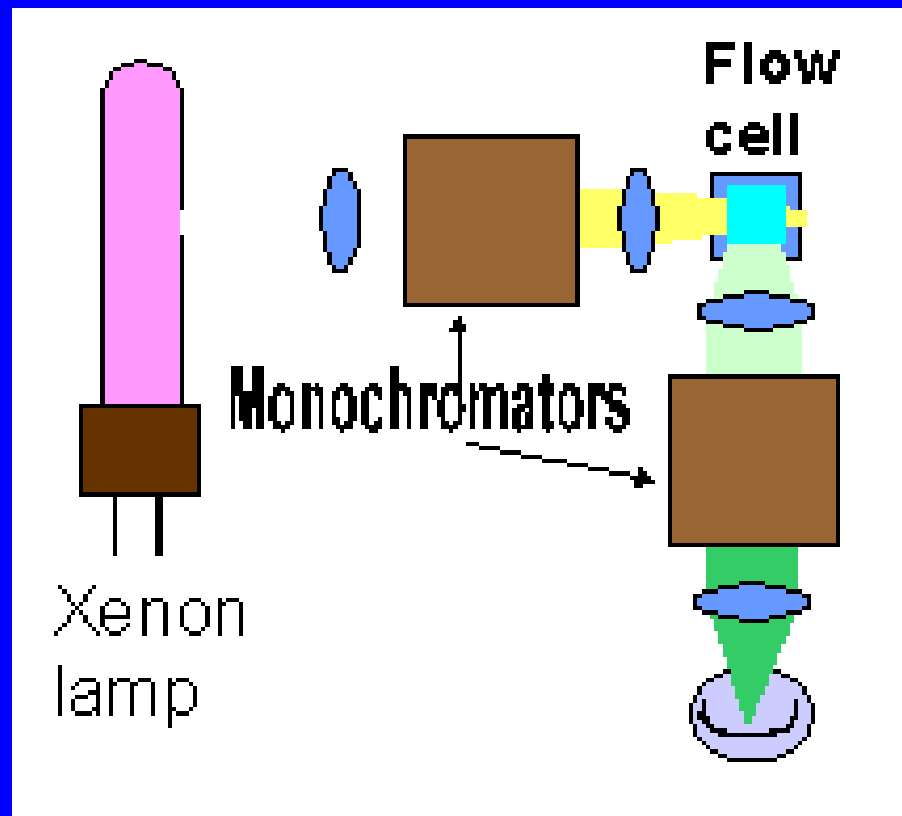
# UV – VIS detektor s proměnlivou vlnovou délkou



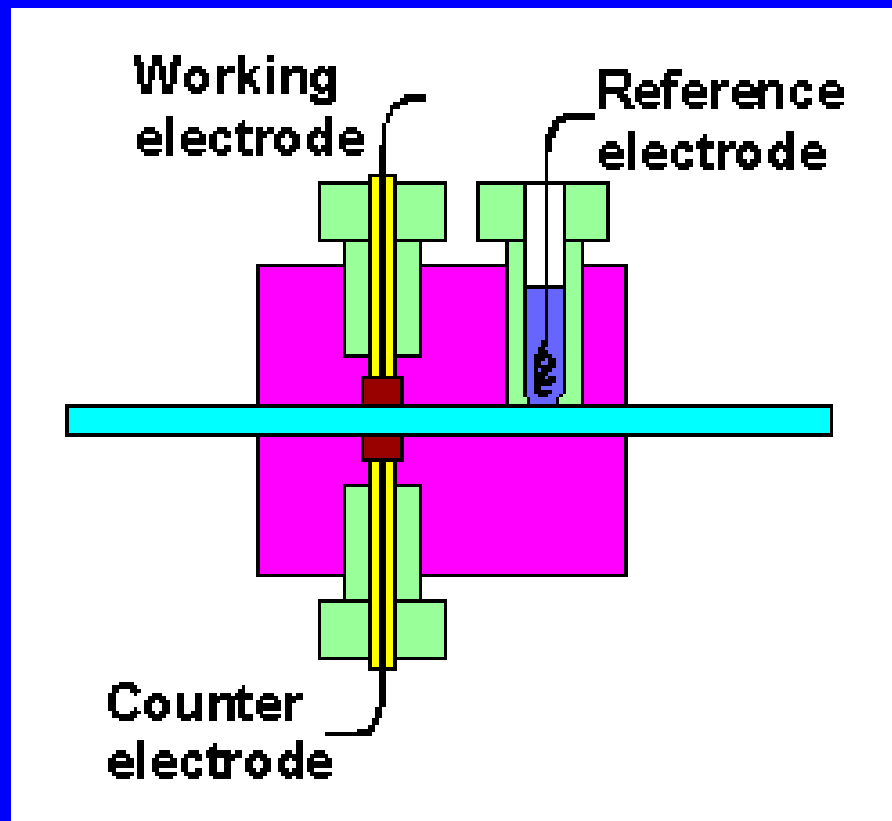
# UV – VIS detektor s diodovým polem



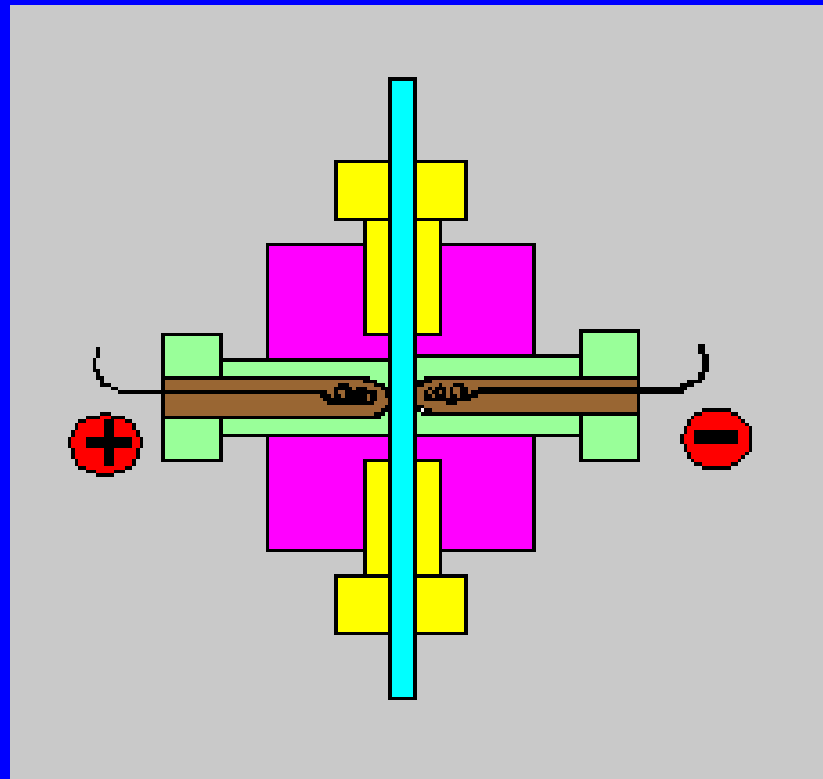
# Fluorescenční detektor



# Elektrochemický detektor



# Konduktometrický detektor



# Vyhodnocení


- Zapisovače
- Integratory
- Integrační software + PC



# 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

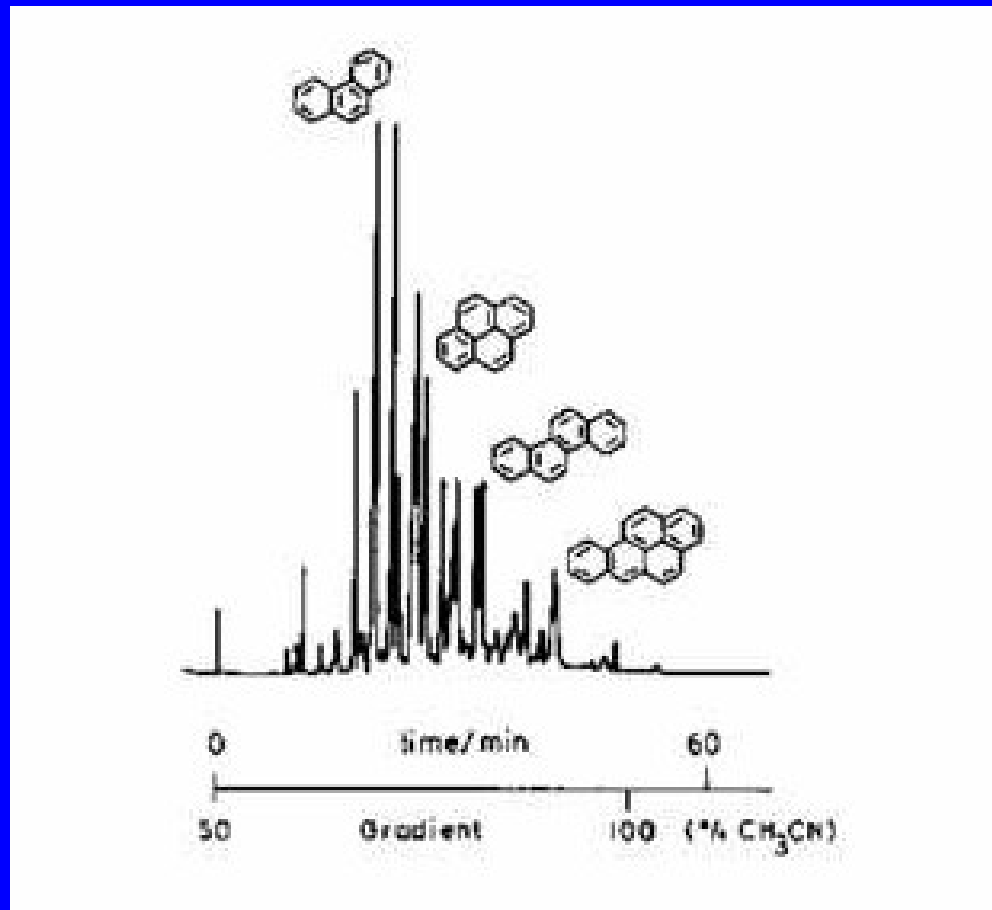
# Analýza kvantitativní



Plocha (výška) píku

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

# LC analýza



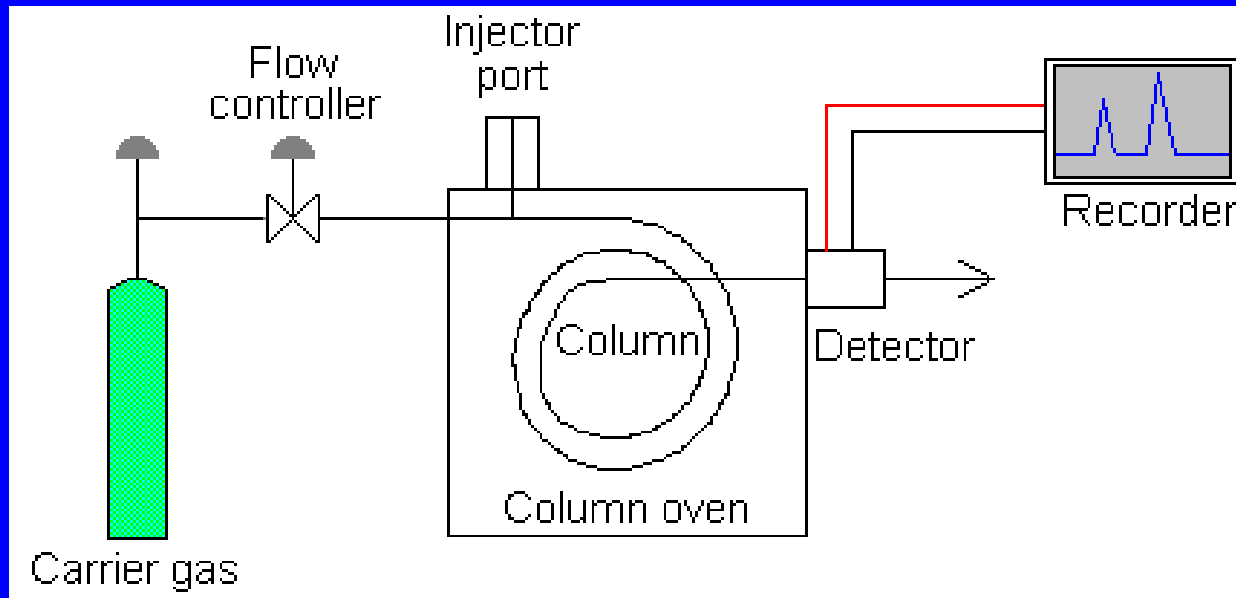
# Plynová chromatografie

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

# Výhody

- Nižší viskozita mobilní fáze
- Rychlejší difuze

# Schéma plynového chromatografu

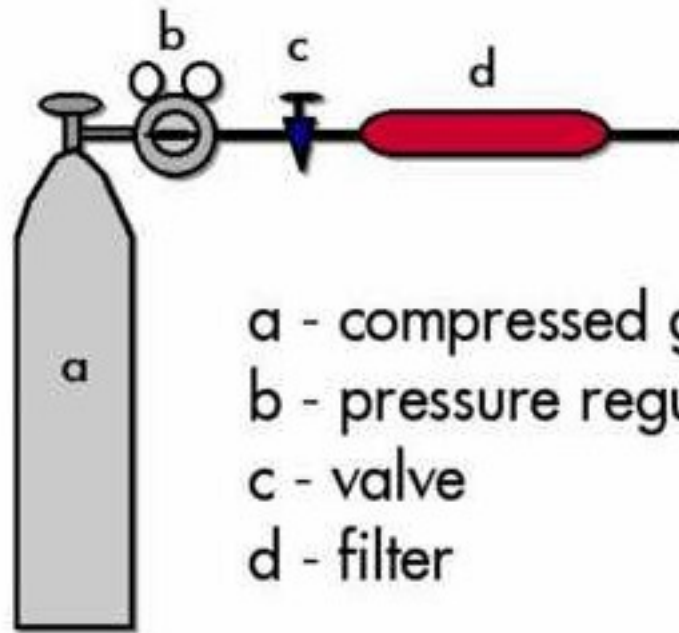


# Plynový chromatograf



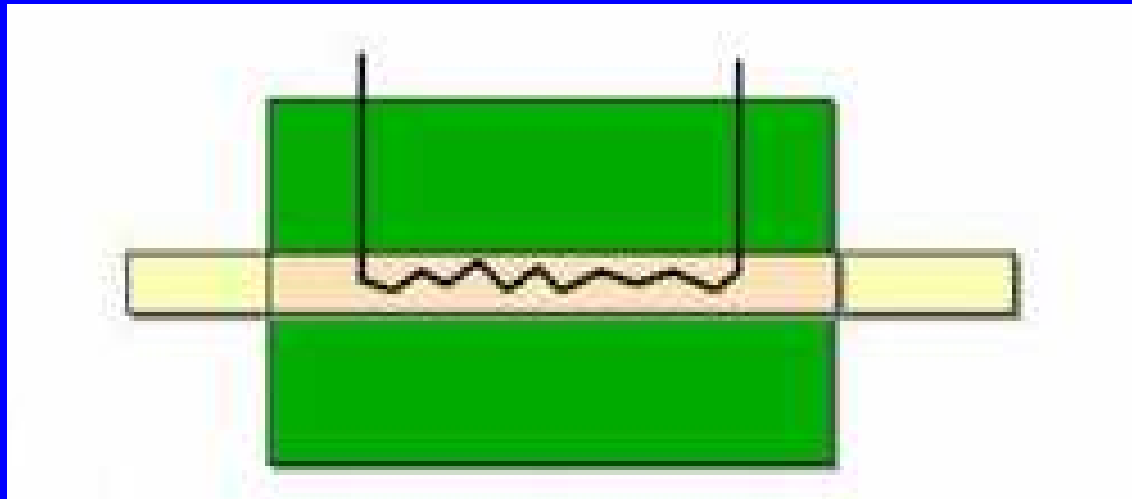


# Zdroj nosného plynu



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

# Elektrické měření průtoku



# Nosné plyny

<b>Plyn</b>	<b>Výhody</b>	<b>Nevýhody</b>
<b>N<sub>2</sub></b>	levný, bezpečná práce	nízká tepelná vodivost
<b>H<sub>2</sub></b>	vysoká tepelná vodivost	explosivní
<b>He</b>	inertní	drahý
<b>Ar</b>	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

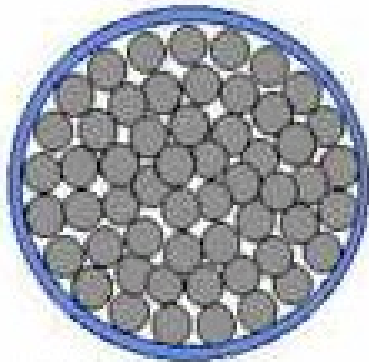
- Přes septum
- Ventilem
- Termální desorpcí

# Kolony

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

# Kolony

Packed

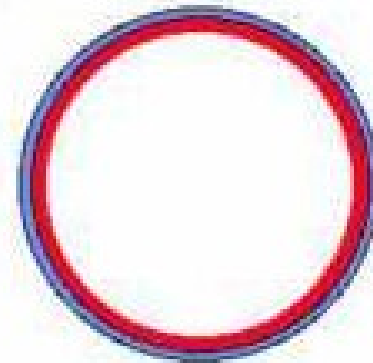


-  bead column
-  porous layer
-  conventional

open (capillary)



Porous  
Layer  
Open  
Tube



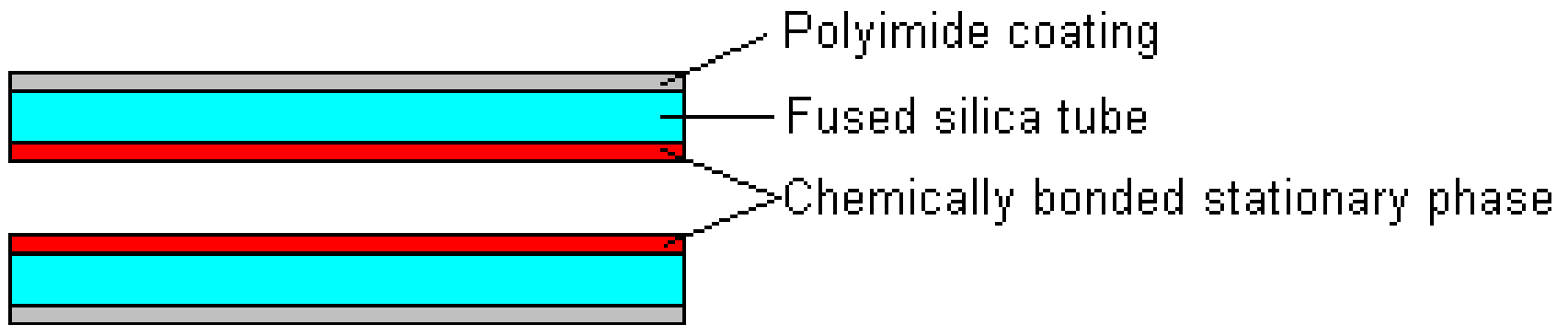
Wall  
Coated  
Open  
Tube



# Náplňová kolona



# Kapilární kolona



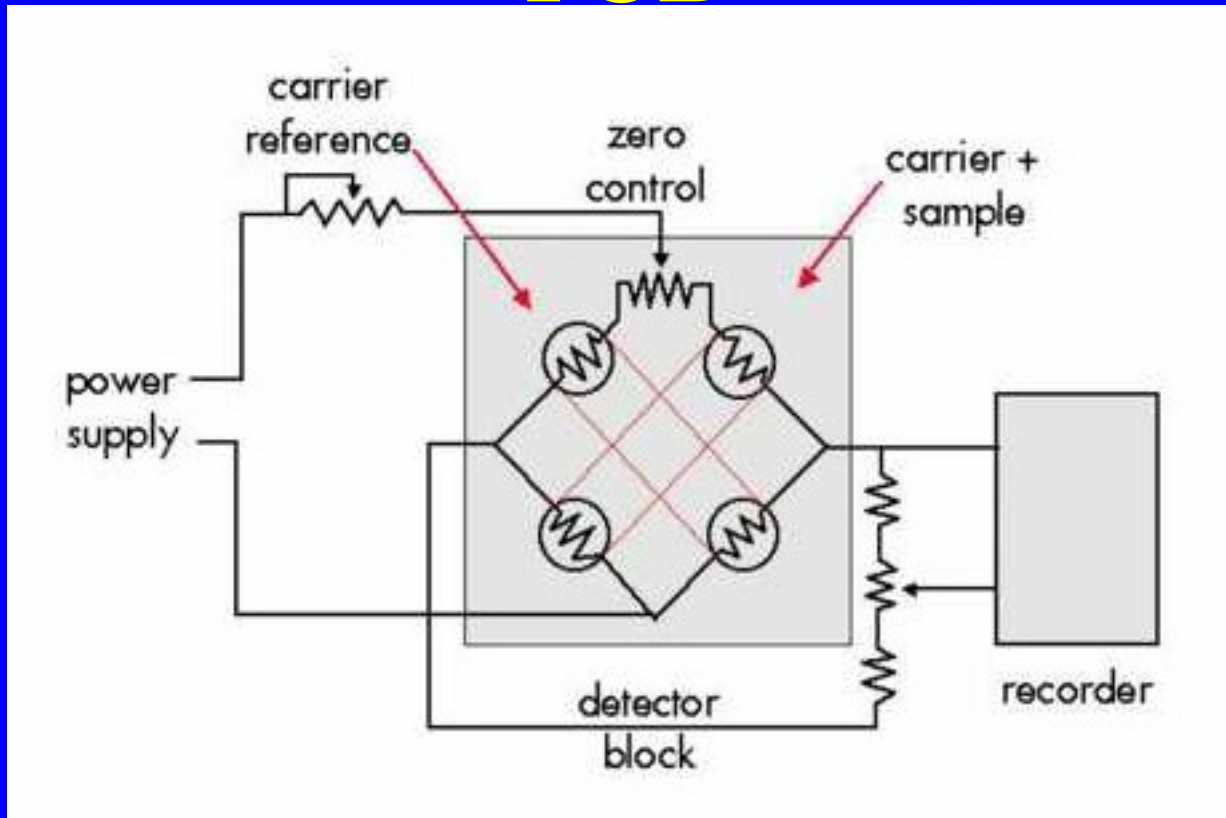
# Kapilární kolona



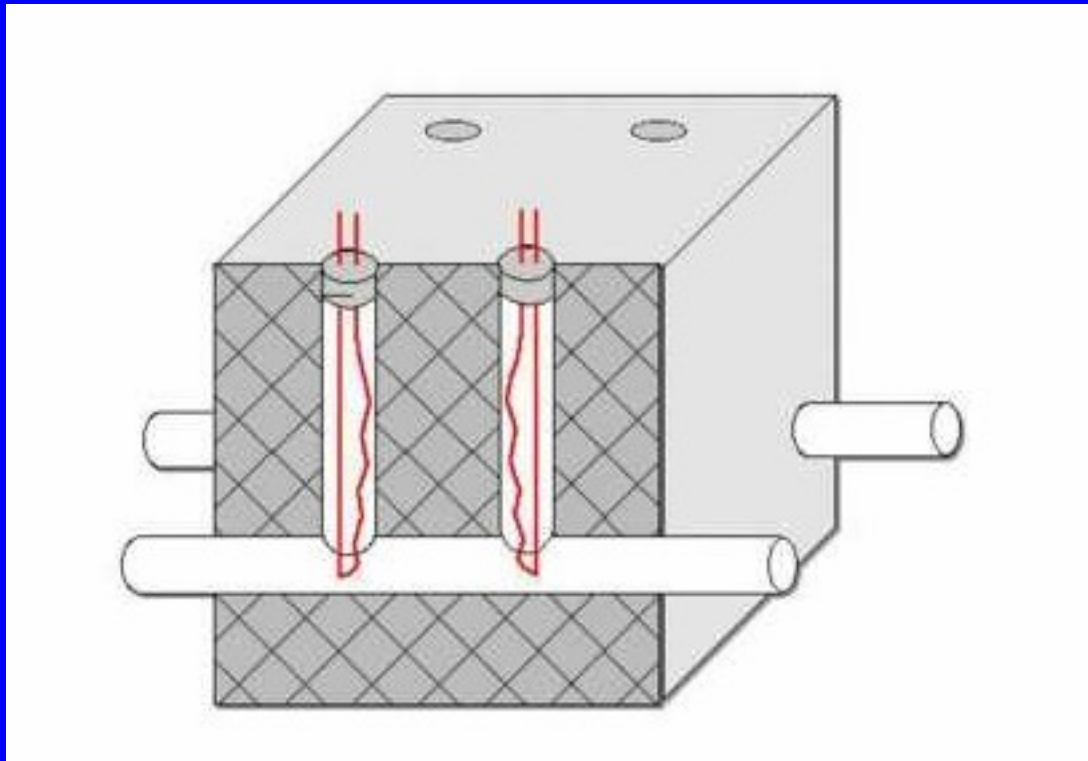
# Teplotně vodivostní detektor TCD

- 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

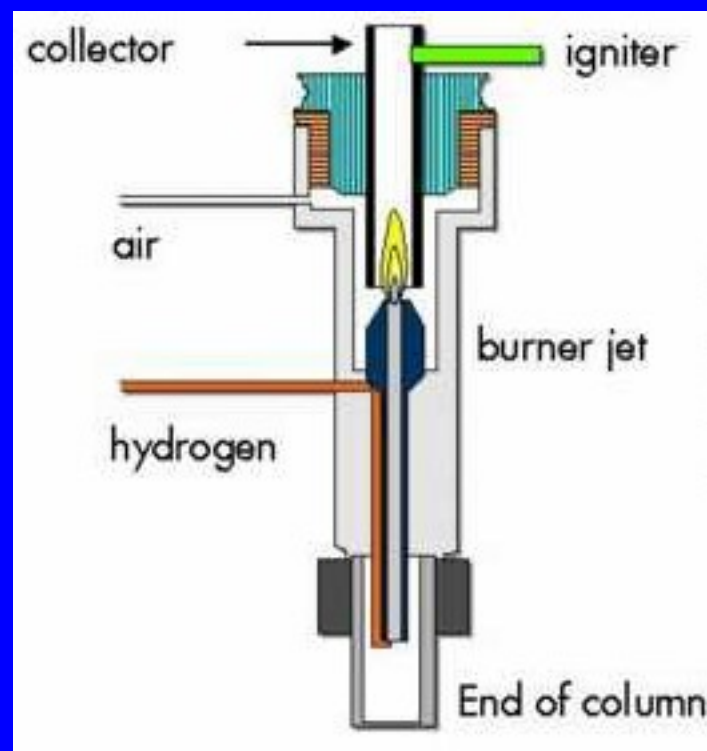
- Specifický
- Destruktivní
- Lineární rozsah –  $10^7$
- Princip – ionty vznikající spalováním vzorku vyvolávají nárůst proudu

# Plamenově ionizační detektor FID





# Plamenově ionizační detektor FID

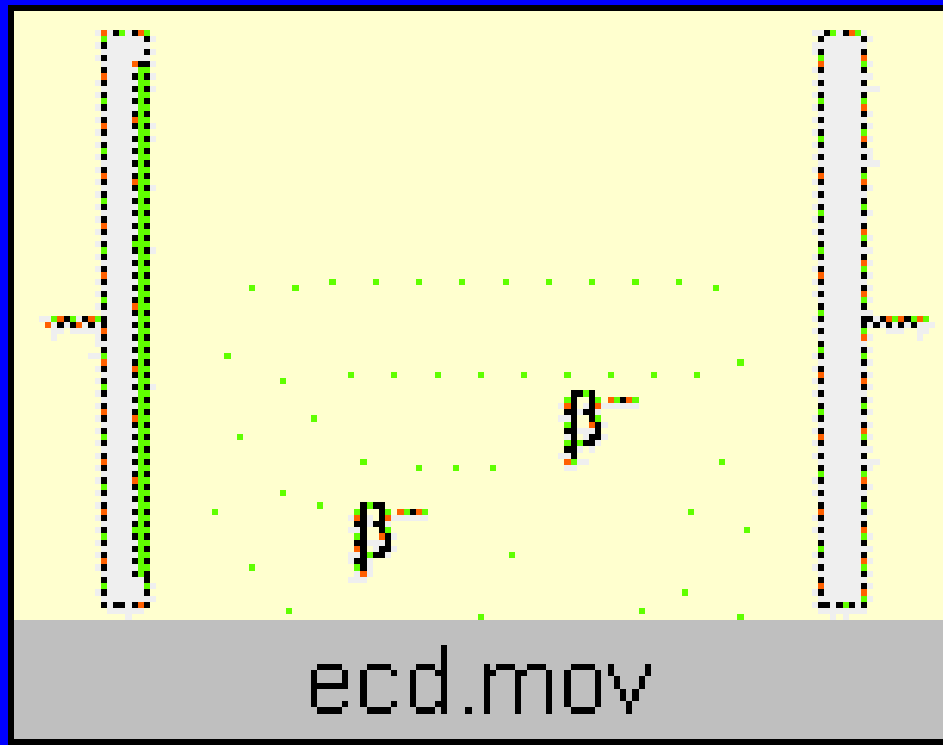


# Detektor elektronového záchytu ECD

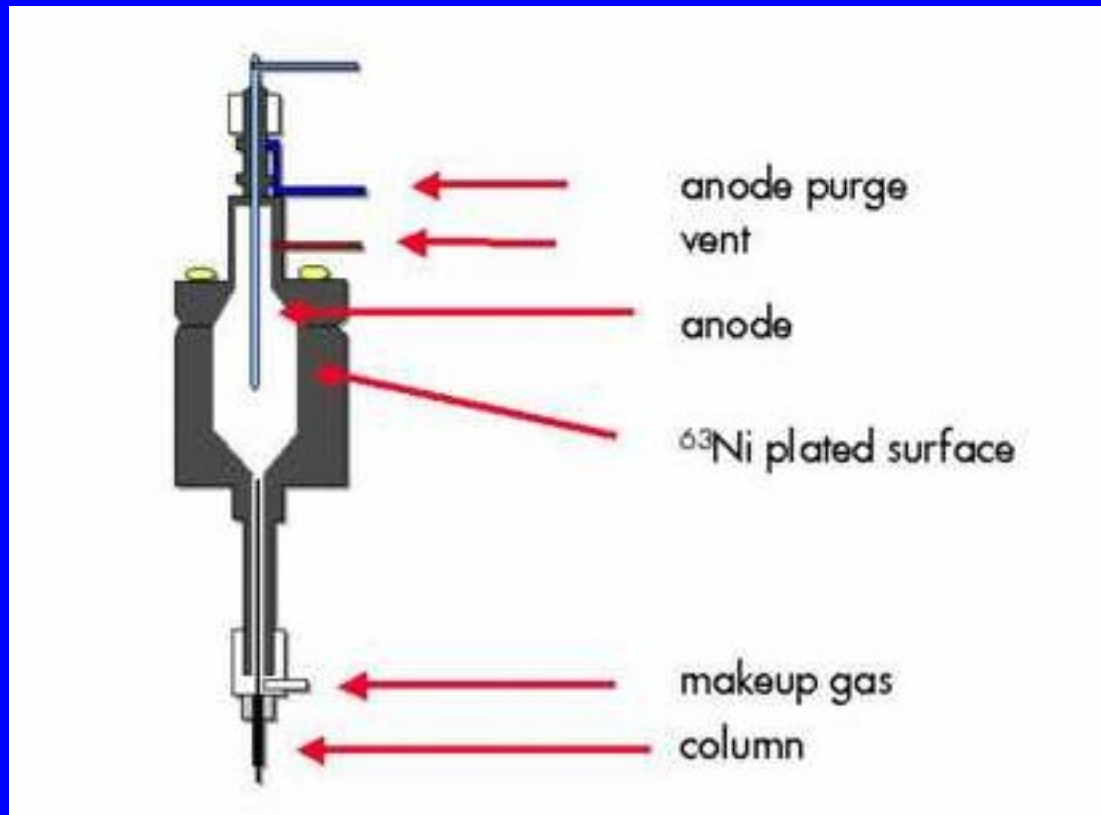
- Specifický
- Nedestruktivní
- Lineární rozsah -  $10^4$
- Princip – interakce ■ částic se vzorkem  
vyvolává pokles proudu

# Detektor elektronového záchytu ECD

  $^{63}\text{Ni}$

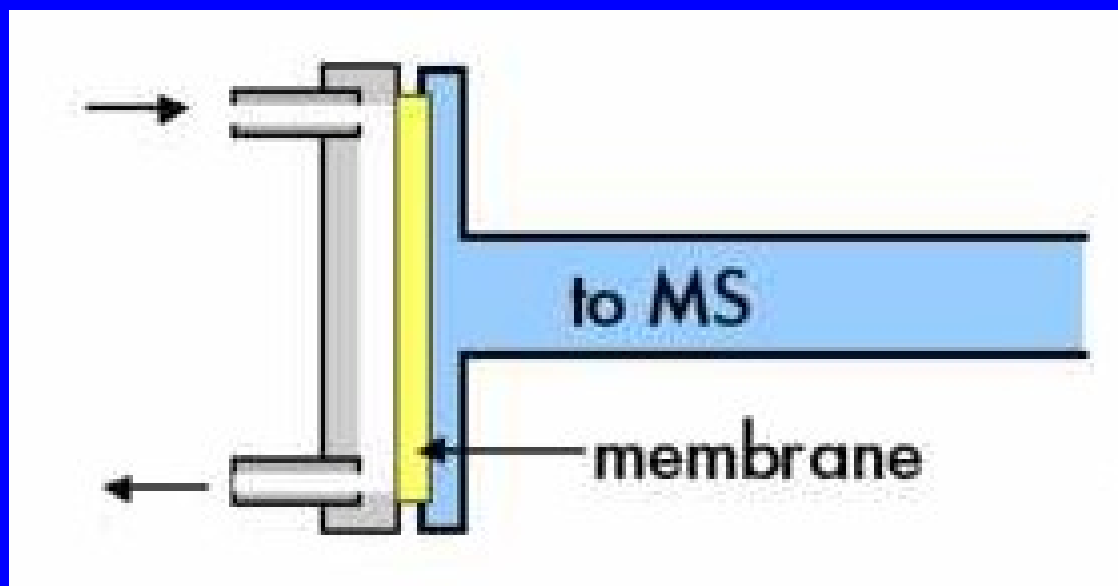


# Detektor elektronového záchytu ECD



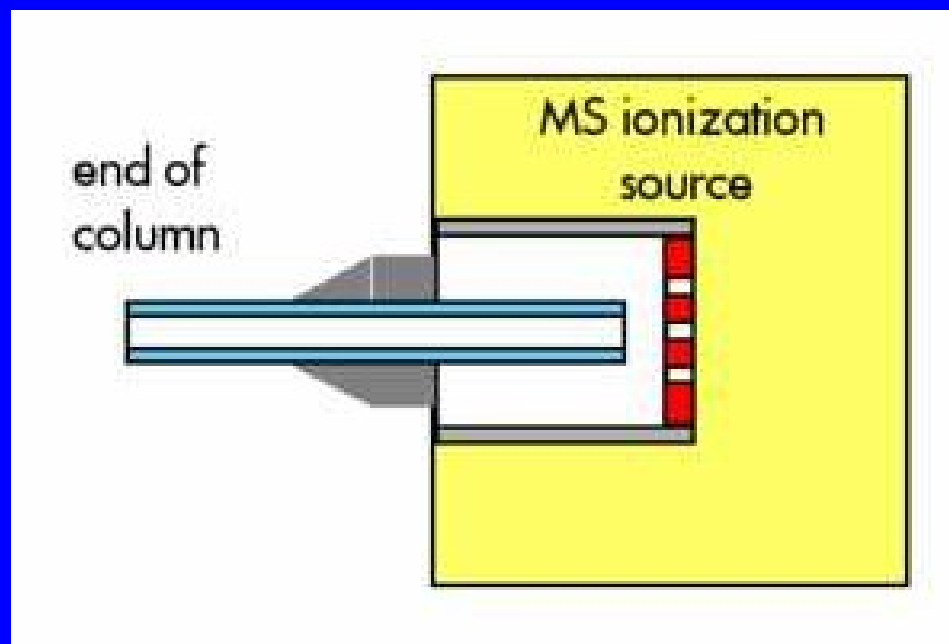
# GC MS

## permeační interface



# GC MS

## přímé spojení



# GC analysa

