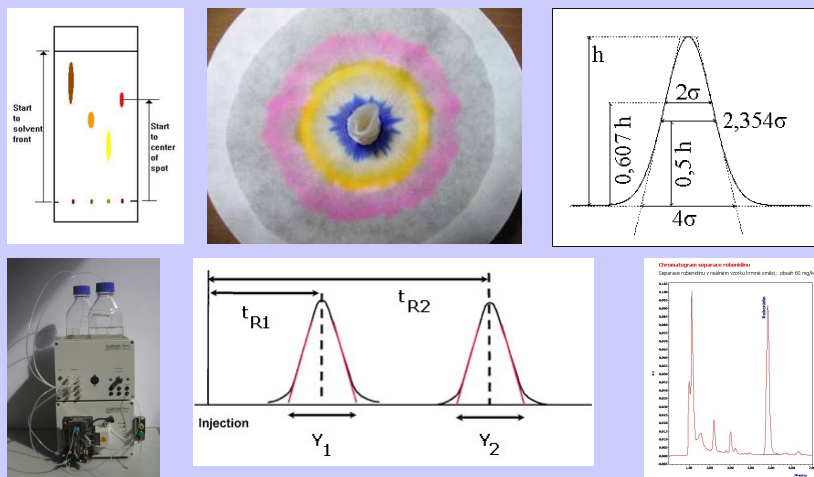


# Repetitorium chemie VIII (2020)



(teorie a praxe chromatografie)

## Chromatografie

Podstatou je rozdělování složek směsi dávkovaného vzorku mezi dvěma fázemi

**Stacionární fáze je nepohyblivá (silikagel, celulóza, polymerní částice)**

**Mobilní fáze je pohyblivá (voda, pufrů či směs organických rozpouštědel)**

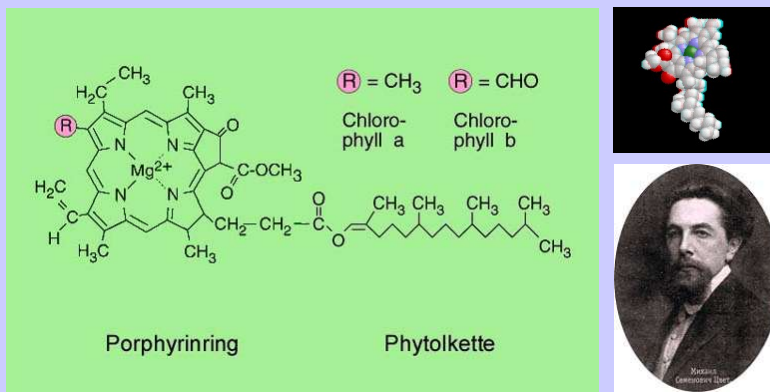
Různé složky vzorku se více či méně ochotně poutají ke stacionární fázi

Složky, které se poutají více, se pohybují pomaleji, složky, které se poutají méně, se pohybují rychleji

Historická metoda, avšak v současné době je dovedena téměř k dokonalosti

## Chromatografie

**Michail Sergejevič Cvět** (1872-1912) rozdělil v roce 1906 na sloupci jemně práškováného uhlíčitanu vápenatého listovou zeleň na několik složek. Poprvé od sebe oddělil a popsal **chlorofyl a** a **chlorofyl b**



## Chromatografie

Podle technického uspořádání se dělí chromatografie na dvě hlavní techniky:

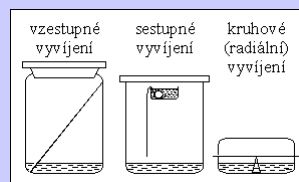
Metodicky jednodušší **planární**

(vyžaduje jednoduché laboratorní zařízení, lze ji provést improvizovaně i doma)

Složitější **sloupcovou**

(vyžaduje složité přístrojové zajištění)

## Planární chromatografie



(tenkovrstvá /TLC/, papírová /PC/)

### Potřeby:

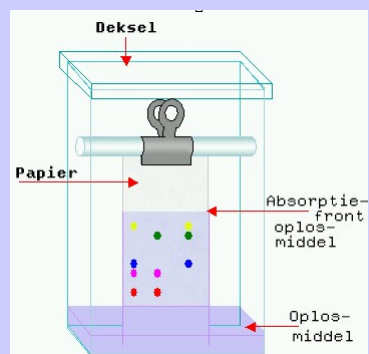
Vyvíjecí tank (nádobka)

Stacionární fáze (chromatografické desky, chromatografické papíry)

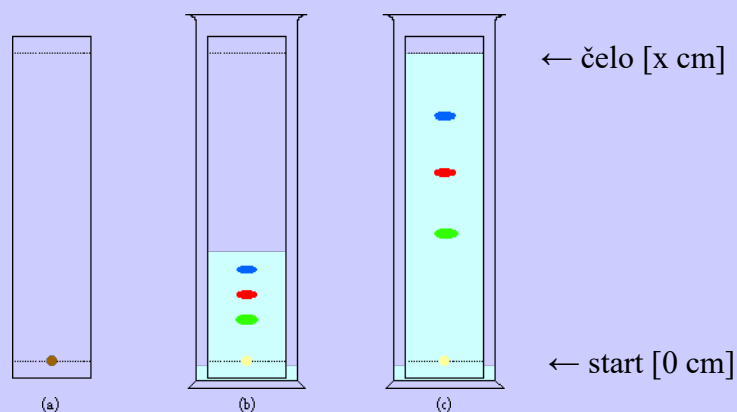
Mobilní fáze (voda, organická rozpouštědla)

Nanášecí zařízení (pipeta, kapilára)

Detekční činidlo / sušárna / UV lampa



## Postup dělení směsi při planární chromatografii



## Vyhodnocování chromatogramu:

### Kvalita: retenční faktor $R_F$ :

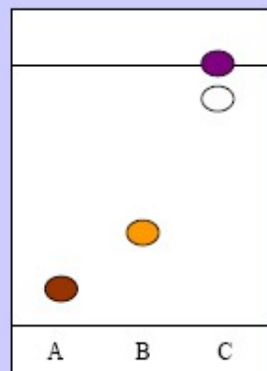
$$R_F = \frac{\text{vzdálenost od startu ke středu zóny látky}}{\text{vzdálenost od startu k čelu mobilní fáze}} = \frac{a}{b}$$

$R_F$  je vždy menší než 1. Ideální  $0.1 < R_F < 0.9$

### Kvantita: rozsah skvrny (plocha):

okometricky, densitometricky nebo analýzou obrazu

## Planární chromatografie – vyhodnocení dat



### Retenční faktor:

Vzdálenost od startu ke  
středu skvrny  
Vzdálenost start-cíl

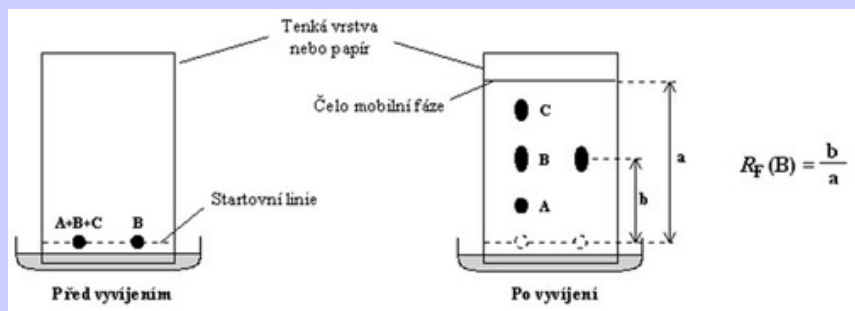
$$R_F(X) = R_x / R$$

$$R_F(A) = 0.14$$

$$R_F(B) = 0.33$$

$$R_F(C) = 0.84$$

$$R_F(C_2) = 1.00$$



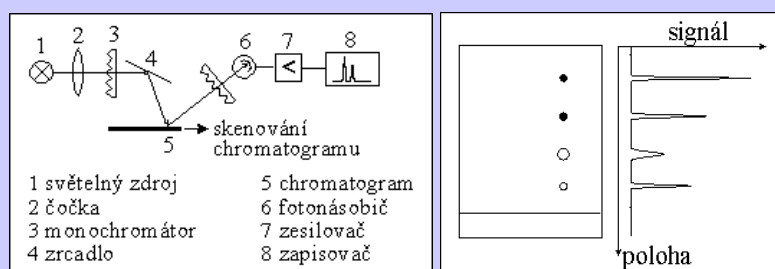
Nejběžnější stacionární fáze:

Papír  
 Celulóza  
 Silikagel  
 C-18 reverzní fáze  
 Polyamid

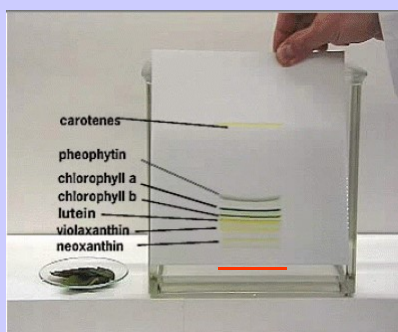
Nejběžnější mobilní fáze:

Směsi organických rozpouštědel  
 s vodou, často je nutné adjustované pH

### Planární chromatografie – vyhodnocení dat (kvantita)



## Planární chromatografie – příklad



Dělení směsi rostlinných pigmentů v soustavě petrolether – aceton (100:11) na tenké vrstvě silikagelu

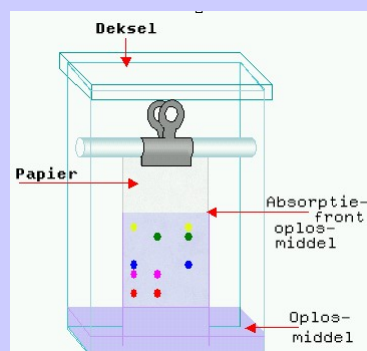
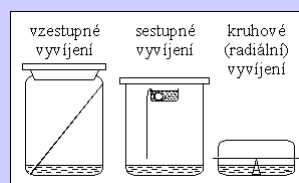
Dělení pigmentů probíhá pouze v jednom směru (zdola nahoru). Jde o „jednodimenzionální“ dělení, které je nejčastější. Start v dolní části desky.

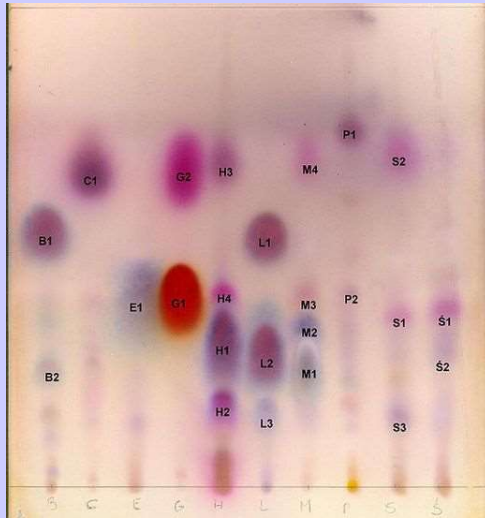
## Planární chromatografie

(tenkovrstvá /TLC/, papírová /PC/)

### Potřeby:

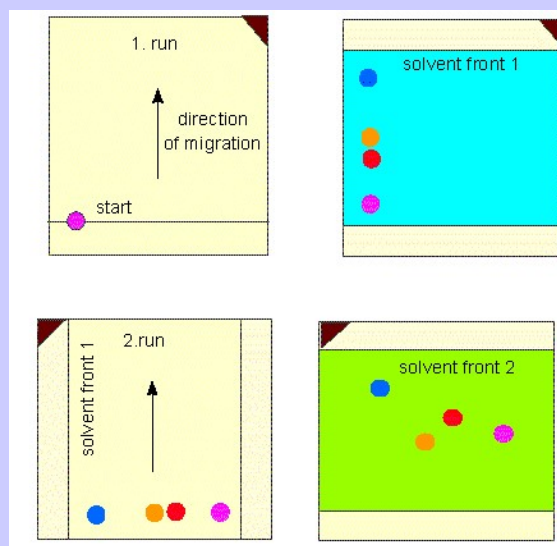
- Vývíjecí tank (nádobu)
- Stacionární fáze (chromatografické desky, chromatografické papíry)
- Mobilní fáze (voda, organická rozpouštědla)
- Nanášecí zařízení (pipeta, kapilára)
- Detekční činidlo / sušárna / UV lampa



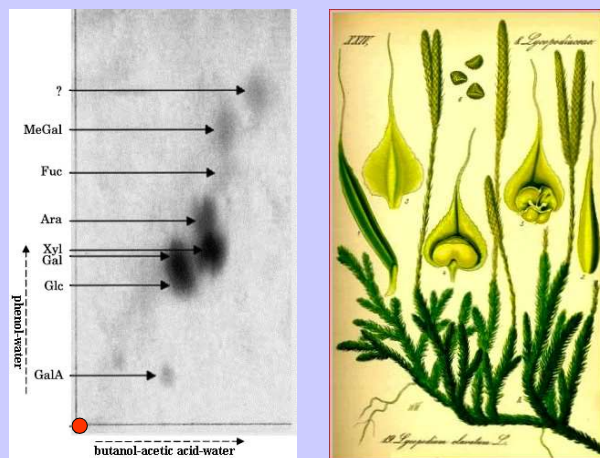


The scan of TLC plate (silica gel G) with 10 essential oils developed with mobile phase toluene - ethyl acetate (93:7 v/v), next sprayed with vanillin in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and heated. From left to right oils from: bergamot, cedar, eucalyptus, syzygium, lavandula, mint, orange, pine, spruce. Identified components: B1 and L1 - linalol, B2 and L2 - linalyl acetate, E1 - cinneol, G1 - eugenol, G2 - carryophyllene. Doubtfully identified components - C1 - cedrol, M3 - menthol, P1 - limonene.

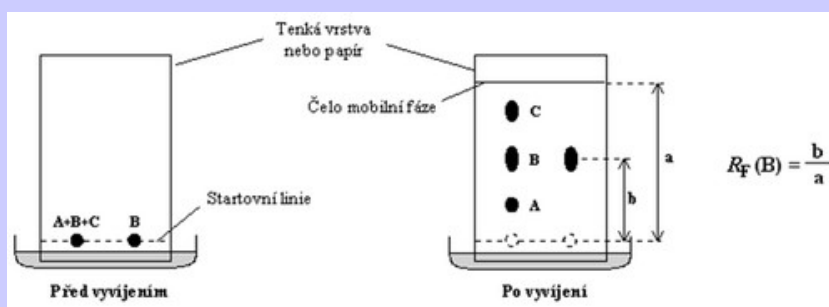
### Dvojdimenzionální chromatografie (2D-TLC; 2D-PC)



## Planární chromatografie – příklad



„Dvojdimenzionální“ technika dělení cukrů z plavuně (start vpravo dole)



Porovnání směsi látek se standardem při TLC/PC

## Kolonová chromatografie



Podle typu mobilní fáze se dělí na:  
plynovou (GC)  
kapalinovou (LC)

Podle typu interakce látek se dělí na:  
adsorpční (adsorpce)  
ionexovou (interakce s ionty)  
gelovou (velikost molekul)



Dělení neprobíhá v plošném uspořádání, ale na  
různě dlouhé **koloně**

## Kolonová chromatografie

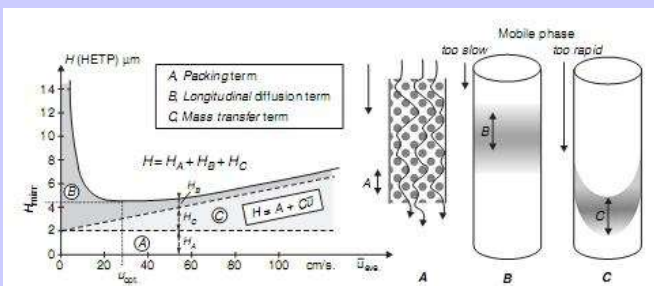


*Na čistou kolonu se do proudu mobilní fáze nadávkuje směs látek. Průtokem mobilní fáze dochází k separaci složek směsi podle jejich afinit ke stacionární fázi.*

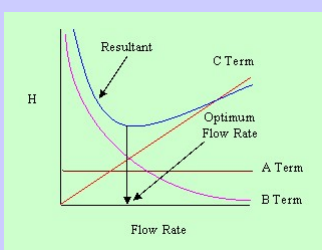
## Kolonová chromatografie



*Ta část původní směsi, která se na kolonu váže nejméně, ji opouští jako první. Ta část, která se váže nejvíce, jako poslední.*



**Figure 1.11** Van Deemter's curve in gas chromatography with the domains of parameters A, B and C indicated. There exists an equation similar to that of Van Deemter that considers temperature:  $H = A + B/T + C\bar{u}$ .



**Van Deemterova rovnice: hledání optimální průtokové rychlosti v daném uspořádání**

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u}$$

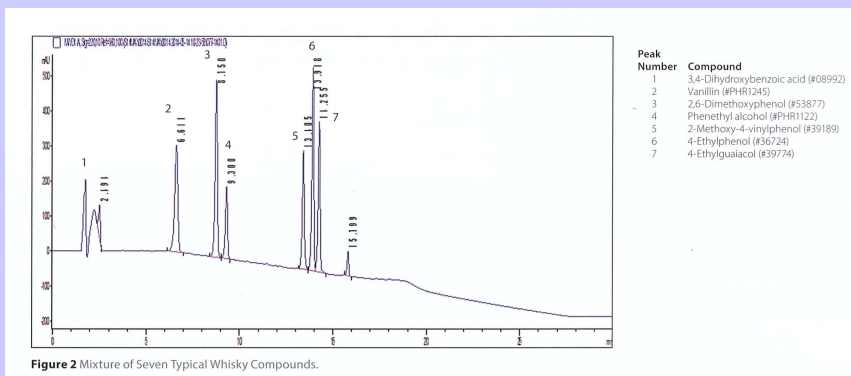


Figure 2 Mixture of Seven Typical Whisky Compounds.

### HPLC separace základních aromatických složek whisky

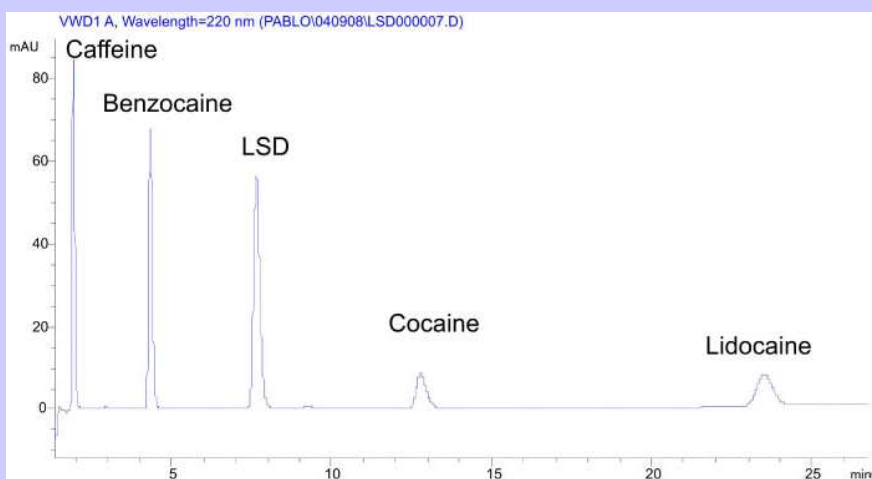
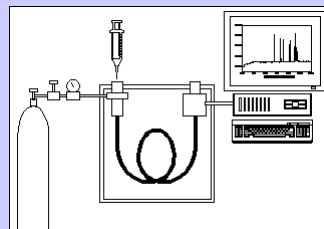


FIGURE 6 - Chromatogram obtained after injection of standards of caffeine ( $t_r = 1.92$  min), benzocaine ( $t_r = 4.33$  min), LSD ( $t_r = 7.64$  min), cocaine ( $t_r = 12.77$  min) and lidocaine ( $t_r = 23.51$  min).

## Plynová chromatografie (GC)

Potřeby: plynový chromatograf



### Základní součásti

Zdroj plynu a regulace průtoku

Dávkovací zařízení

Kolona a termostat

Detekční zařízení



## Plynová chromatografie (GC)

Použití pro látky, které lze snadno převést do plynného stavu  
(derivatizace: cukry, mastné kyseliny – TMS)

Mobilní fáze: vodík, dusík, argon, oxid uhličitý

Stacionární fáze: kapilární, náplňové kolony

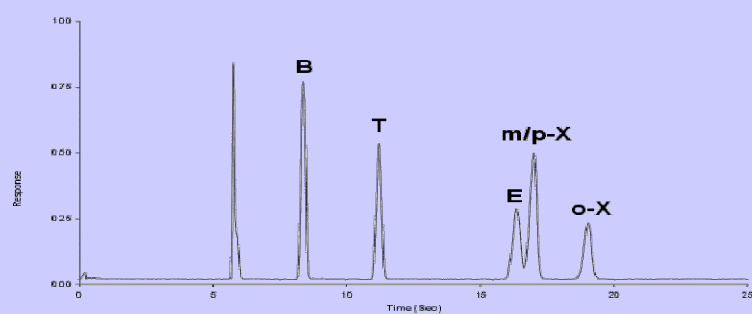
Běžná detekční zařízení:

TCD (tepelně vodivostní detektor, spalování látky na žhavém vlákně – změna teploty = změna vodivosti)

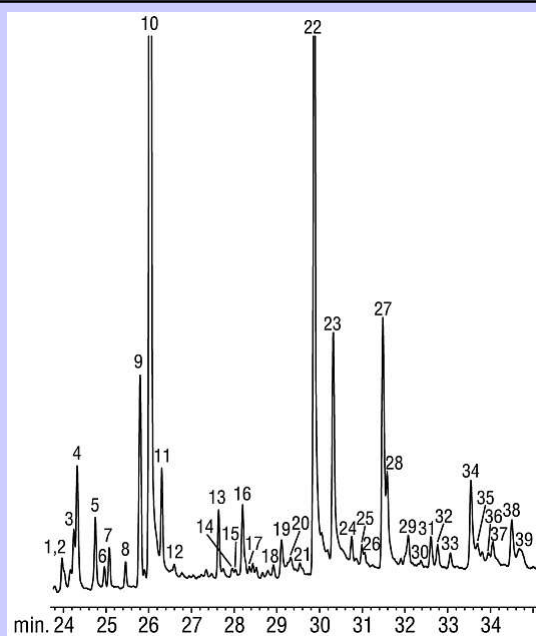
FID (plameno ionizační detektor, ionizace plamene)

MS (hmotnostní detektor, na principu hmotnostního spektrometru)

## Plynová chromatografie (GC)



*Příklad: GC chromatogram směsi benzen, toluen, ethylbenzen a xylenu*



**Flavor Compounds in Malt Whiskey on Stabilwax®-DA**

## Kapalinová chromatografie (LC, HPLC)

HPLC = high pressure (performance) liquid chromatography

Potřeby: kapalinový chromatograf



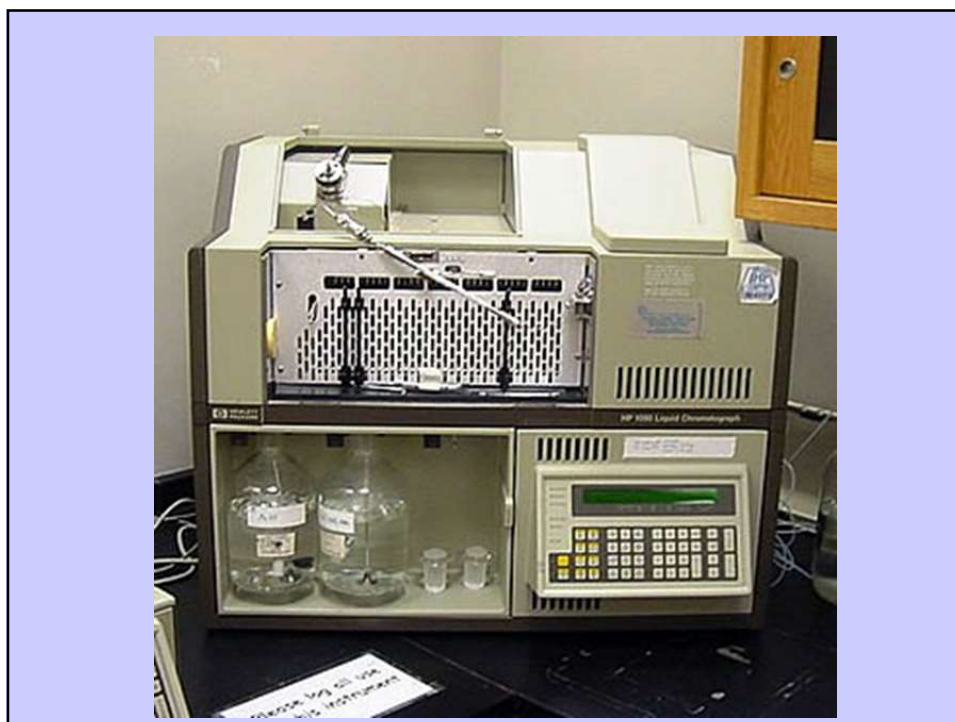
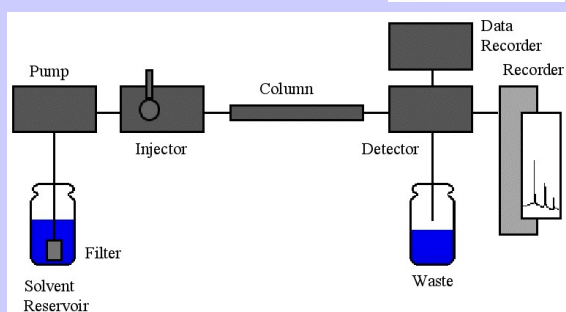
### Základní součásti

Rezervoár mobilní fáze  
a vysokotlaká pumpa s mixérem

Dávkovací zařízení

Kolona a termostat

Detekční zařízení



## Kapalinová chromatografie (HPLC)

### Použití pro netěkavé látky

Mobilní fáze: voda, organická rozpouštědla  
Stacionární fáze: kolona s náplní

### Běžná detekční zařízení:

- DAD (detektor diodového pole = UV/VIS detektor)
- FLD (fluorescenční detektor)
- MS (detektor na principu hmotnostního spektrometru)
- RI (refraktometrický detektor)
- CD (elektrochemický detektor)



## Kapalinová chromatografie (HPLC)

### Kolony užívané při HPLC:

Silikagelové (normální fáze)	(polární)
Modifikovaný silikagel, tzv. reverzní fáze C18	(nepolární)
Modifikovaný silikagel, tzv. aminofáze NH <sub>2</sub>	(speciální)
Modifikovaný silikagel, tzv. nitrilová CN	(speciální)
Gely pro gelovou filtraci	(speciální, dělení podle Mw)
Iontoměniče	(IMAC)

Další komerčně dostupné kolony, určené pro speciální aplikace

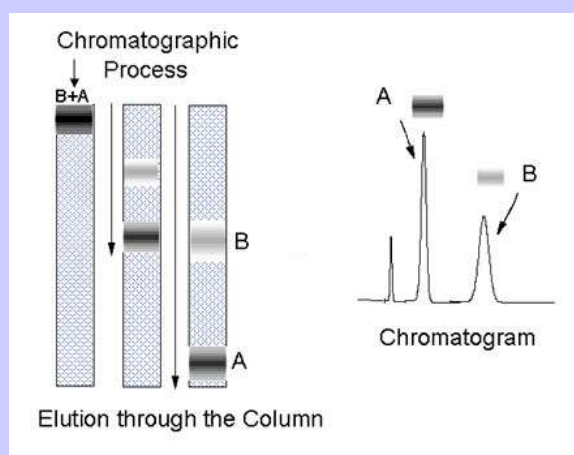
## Kapalinová chromatografie (HPLC)

Mobilní fáze: obecně voda, pufrů či směsí s organickými rozpouštědly

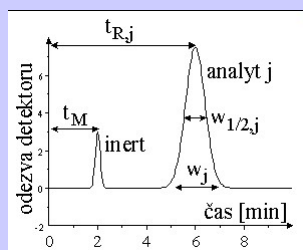
Metanol, acetonitril, voda	(reversní fáze)
Hexan, isopropanol, HAc	(normální fáze)
Pufry	(jiné kolony)

Isokratický režim	složení mobilní fáze je stále stejné
Gradientový režim	složení mobilní fáze se v průběhu analýzy mění
<i>například</i>	<i>0 min 100% vody 0% MeOH</i>
	<i>10 min 10% vody 90% MeOH</i>

## Kolonová chromatografie – získávání dat

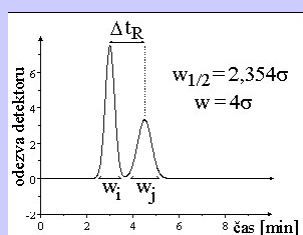


## Kolonová chromatografie – vyhodnocování dat

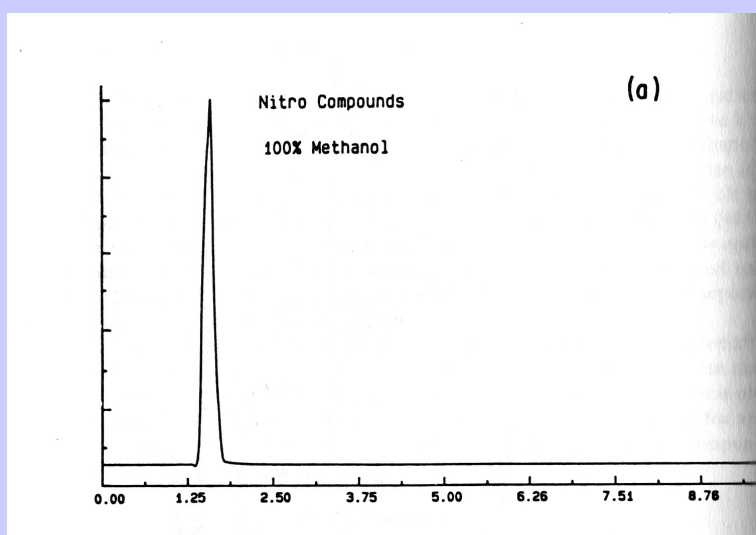


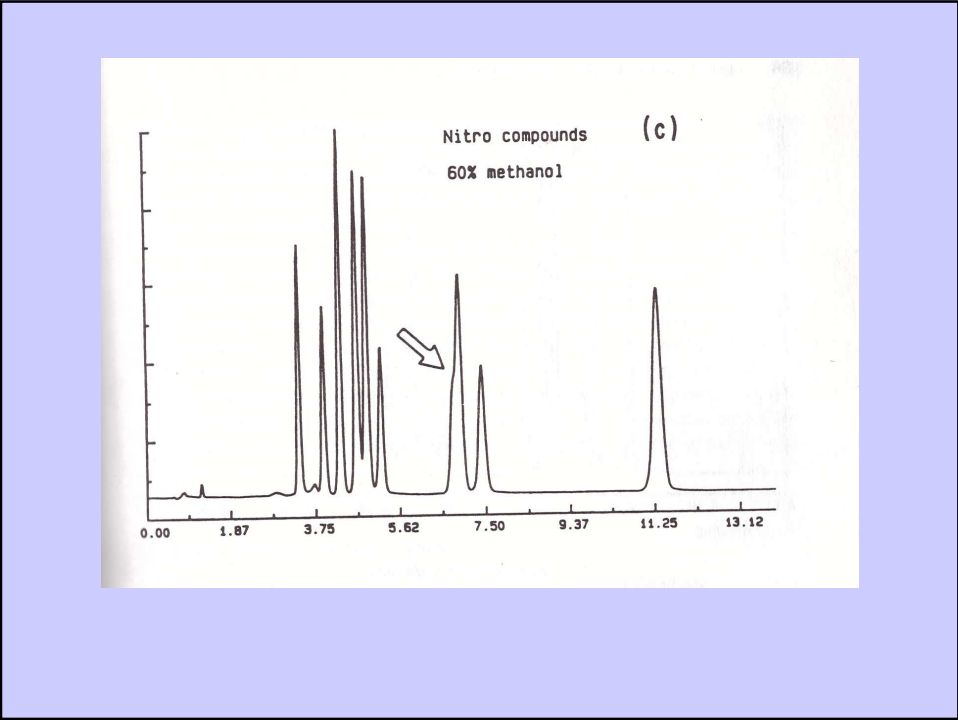
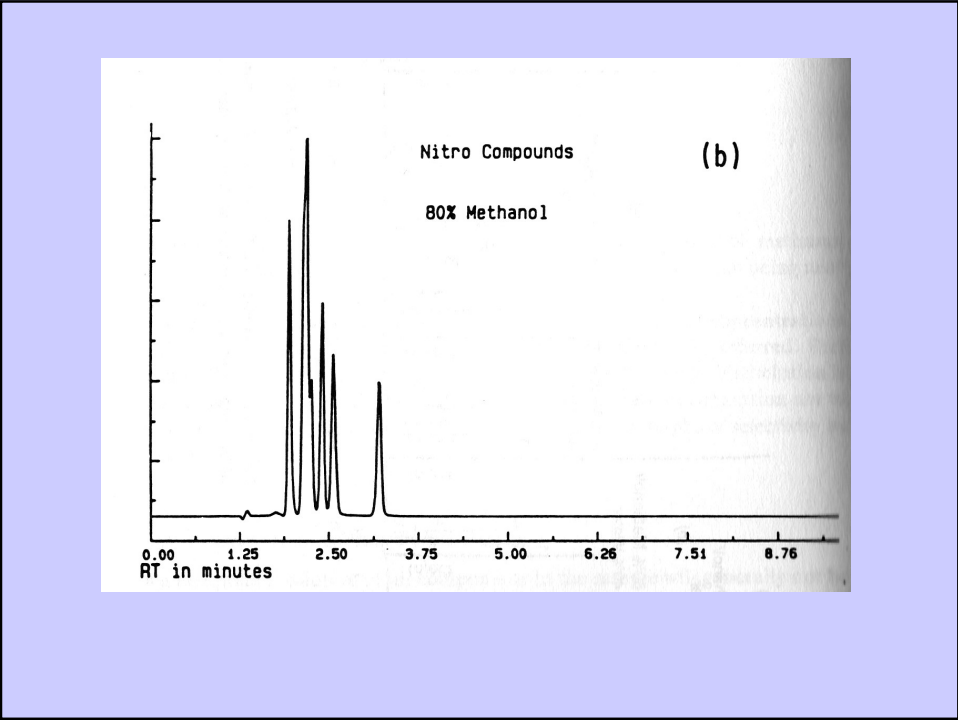
$t_M$  – „mrtvý čas“ – inertní látka  
 $t_R$  – retenční čas  
 $w$  – šířka píku u základny  
 $h$  – výška píku  
 $A$  – plocha píku získaná integrací  
**Rozlišení píků**

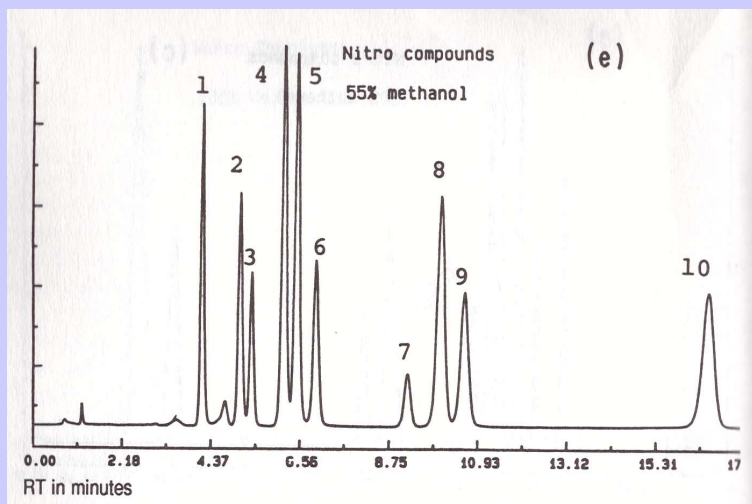
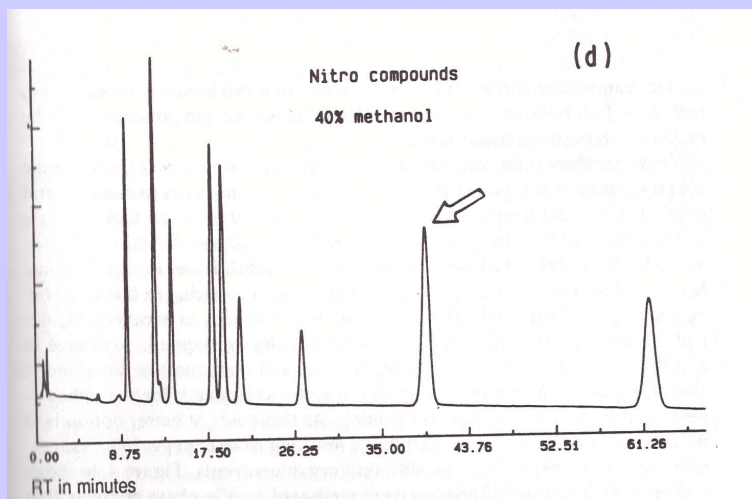
$$R_{i,j} = \frac{2 \cdot (t_{R,i} - t_{R,j})}{w_i + w_j} = \frac{2 \cdot \Delta t_R}{w_i + w_j}$$



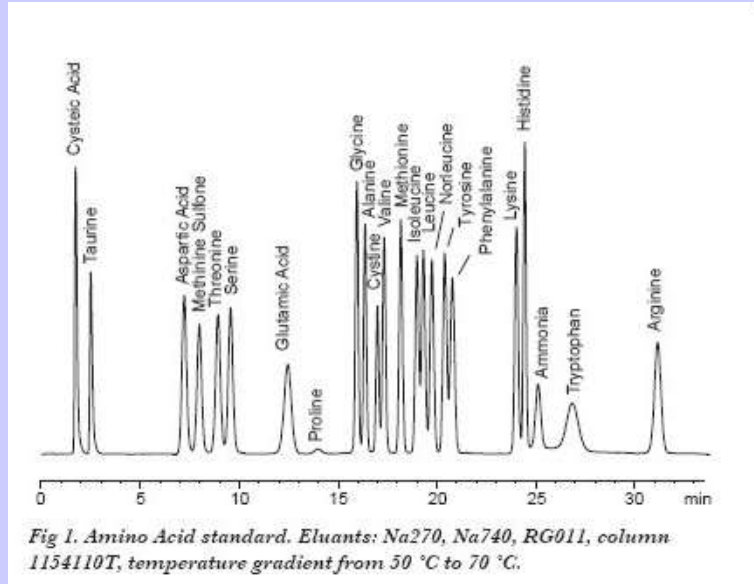
**Rozlišení lze ovlivnit:**  
 Volbou stacionární a mobilní fáze  
 Teplotou, průtokovou rychlostí  
 Isokratickým / gradientovým uspořádáním



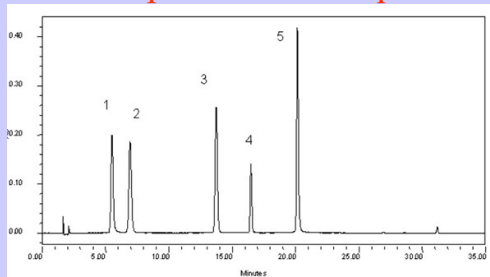




## Kolonová chromatografie – příklady separací

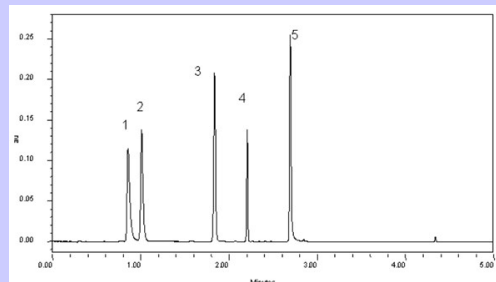


## Ultra performance liquid chromatography (UPLC)



Original HPLC separation of caffeic acid derivatives from Echinacea Purpurea, a natural product. ( ← )

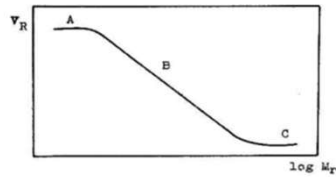
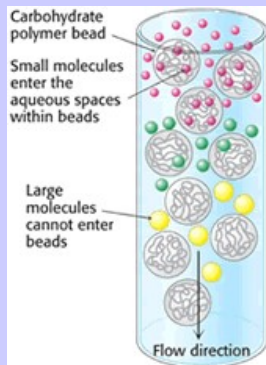
UPLC separation ( ↓ )



Méně vzorku, větší citlivost, rychlejší separace, menší spotřeba mobilní fáze

## Kolonová chromatografie – další druhy:

### GPC - Gelově permeační chromatografie vhodná pro dělení makromolekul



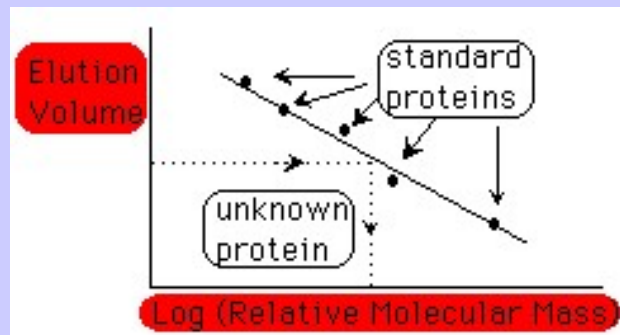
Závislost elučního objemu  $V_R$  na logaritmu relativní molekulové hmotnosti  $M_r$  při GPC

Stacionární fáze je tvořena polymerem s póry, do kterých mohou pronikat malé molekuly, ale velké ne

31/34

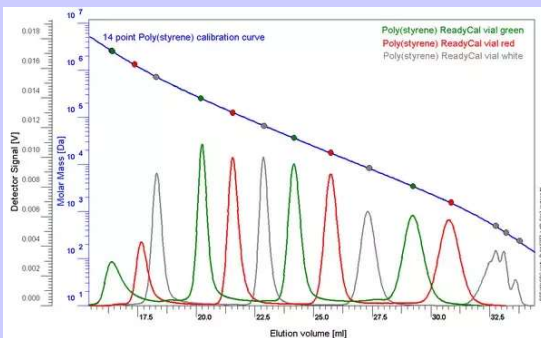
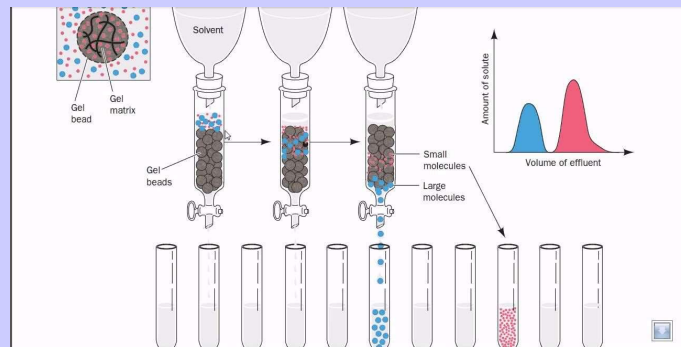
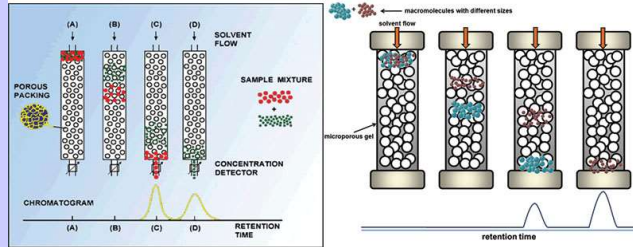
## Kolonová chromatografie – další druhy:

### GPC – určení molekulové hmotnosti



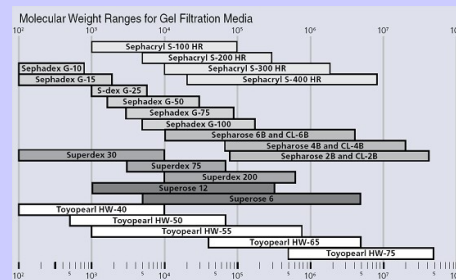
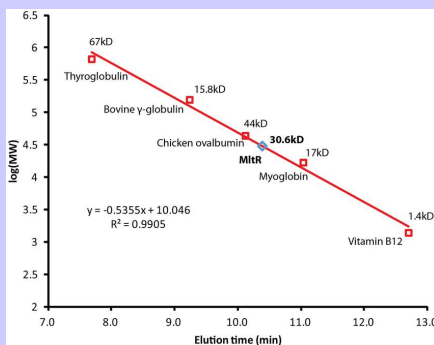
! Na ose x je logaritmus relativní molekulové hmotnosti

# Gel Permeation Chromatography



Standardy MW mohou být ovšem i syntetické, např. na bázi polystyrenu;

Dole příklad stacionárních fází pro gelovou filtrační chromatografii.



## Kolonová chromatografie – další druhy:

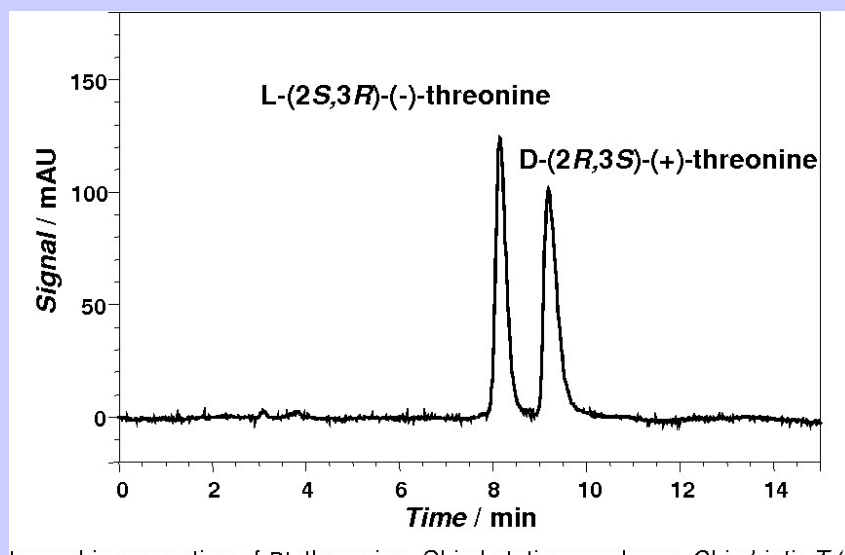
### Afinitní chromatografie na nosičích obsahujících navázaná barviva nebo protilátky:

Barviva jsou podobná některým kofaktorům

Použití při separacích proteinů

### Chirální separace: důležité zejména ve farmacii

Stacionární fáze např. cyklodextriny

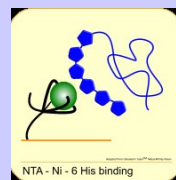


Příklad chirální separace (povšimněte si uvedených konfigurací)

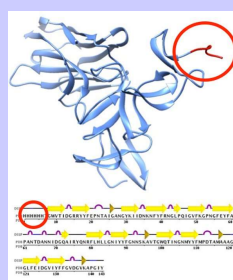
## Kolonová chromatografie – další druhy:

### IMAC – afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů vhodná pro dělení makromolekul

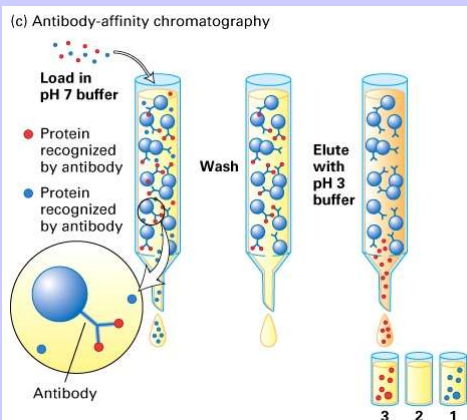
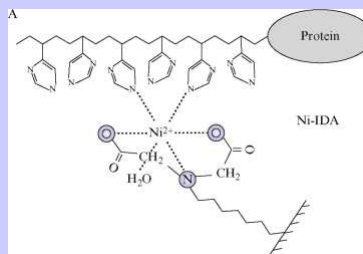
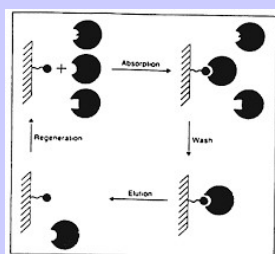
Chromatografie na iontech, obsahujících navázané dvojmocné ionty Co, Cu, Ni, Zn s kladným nábojem ( $2^+$ )



Makromolekuly (jejich části) s převažujícím negativním nábojem s kovy interagují



Nejběžnější využití: při purifikaci rekombinantních proteinů, obsahujících tzv. *histidinovou kotvu* (6x His)



Nahoře vlevo: obecný princip sorpce a vymývání látek z kolony; nahoře vpravo příklad záchytu rekombinantního proteinu s histidinovou kotvou; dole vlevo příklad afinitní chromatografie, založené na interakci proteinu (v roztoku) s pevnou fází s navázanými protilátkami.

Tento materiál je určen pouze pro výuku studentů.

This presentation has been scheduled for educational purposes only.

Pokud má někdo dojem, že použité obrázky (jiné než moje vlastní) jsou kryty copyrightem, necht' mi dá vědět.

If somebody believes, that pictures or figures in this presentation are covered by copyright, please let me know.

Jiří Gabriel ([gabriel@biomed.cas.cz](mailto:gabriel@biomed.cas.cz))