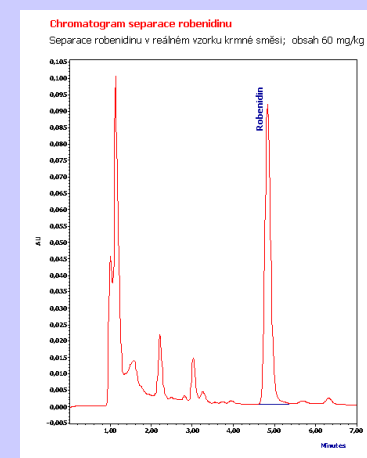
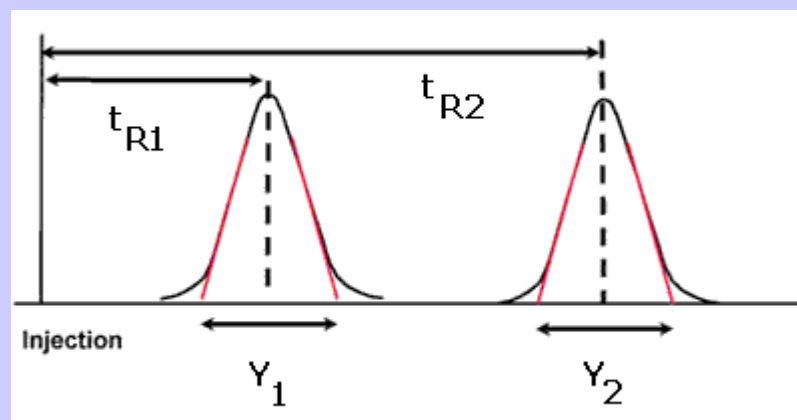
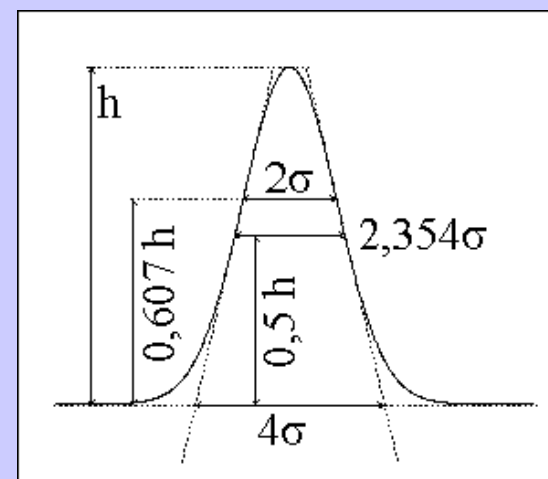
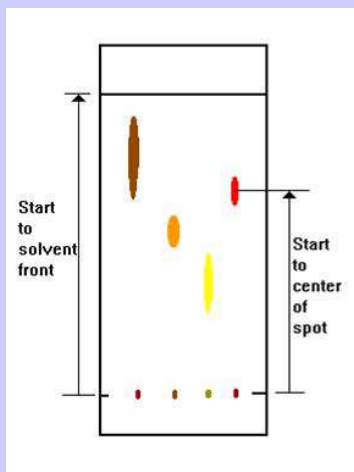


Repetitorium chemie IX

(2015)



(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, pufry či směs organických rozpouštědel)

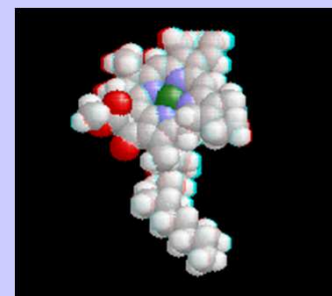
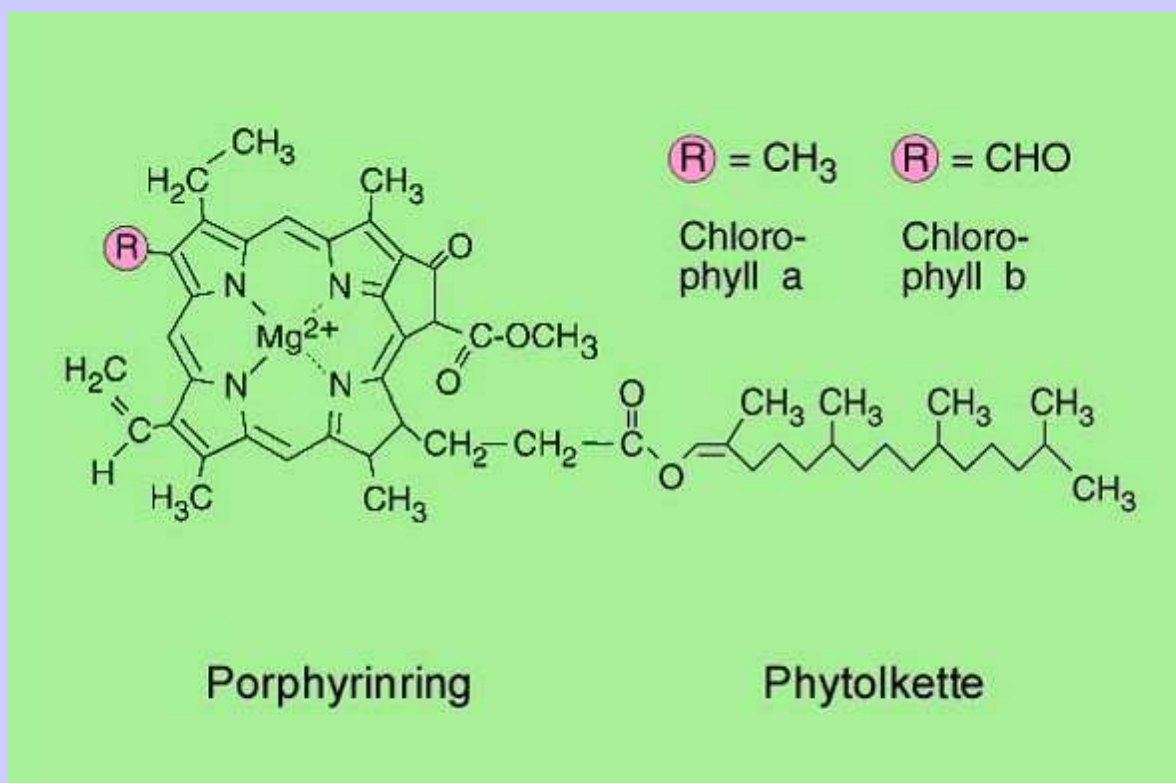
Různé složky vzorku se více či méně ochotně poutají ke stacionární fázi

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 práškovaného uhličitanu 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:

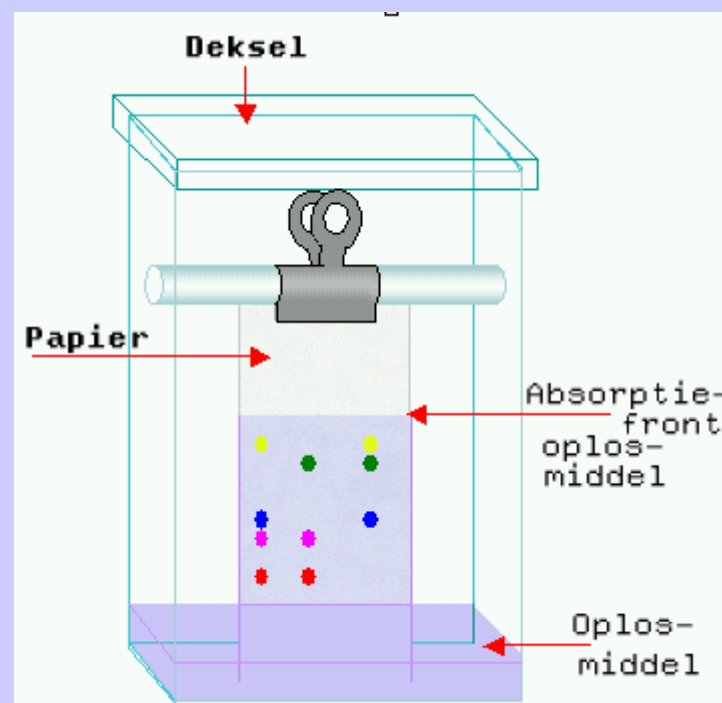
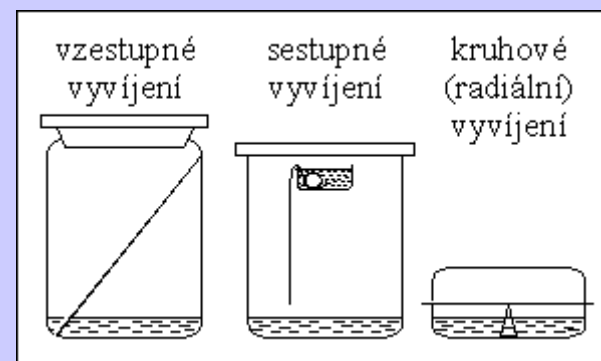
Vyvíjecí tank (nádobu)

Stacionární fáze (chromatografické desky,
chromatografické papíry)

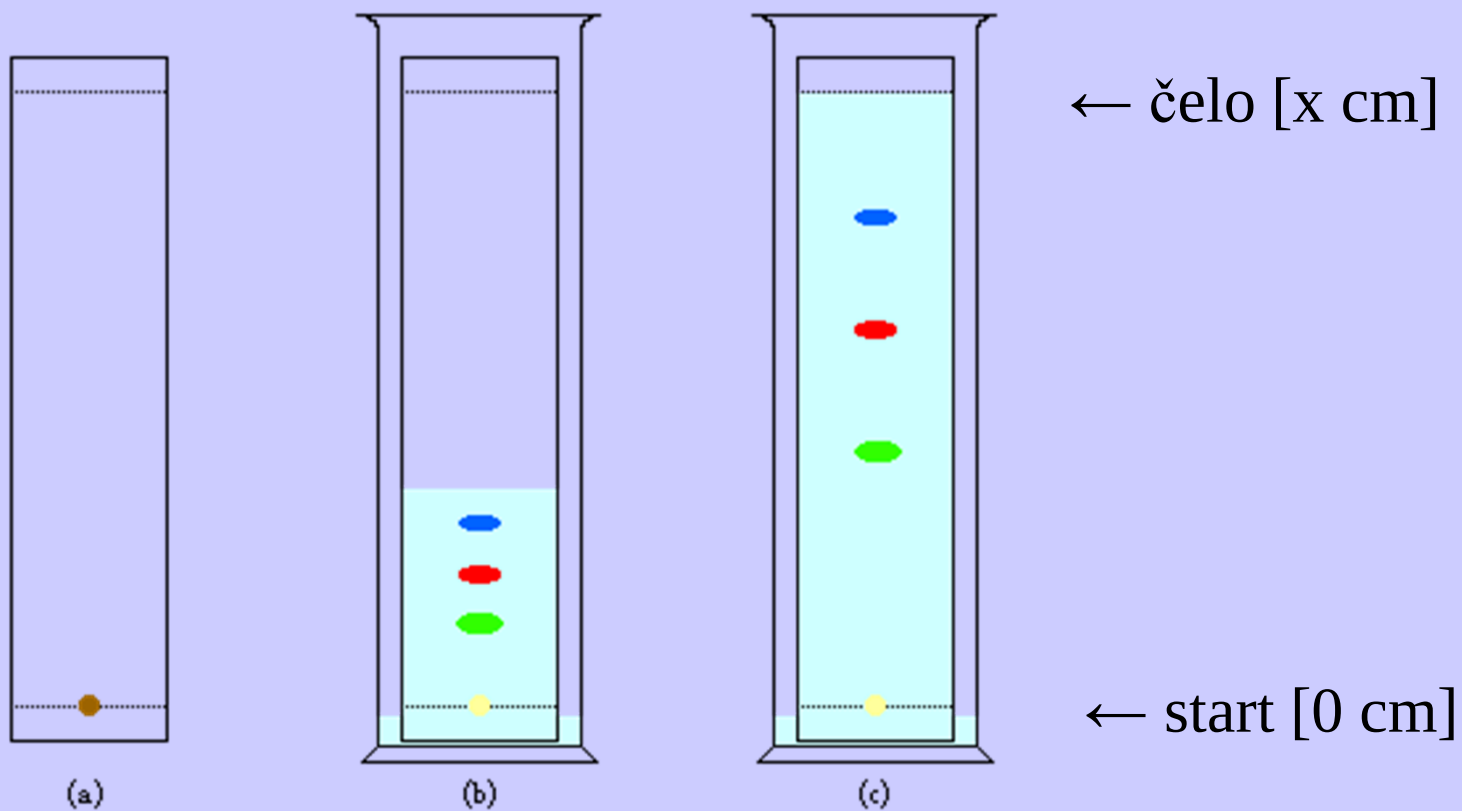
Mobilní fáze (voda, organická rozpouštědla)

Nanášecí zařízení (pipeta, kapilára)

Detekční činidlo / sušárna / UV lampa



Postup dělení směsi při planární chromatografii



Vyhodnocování chromatogramu:

Kvalita: retenční faktor R_F :

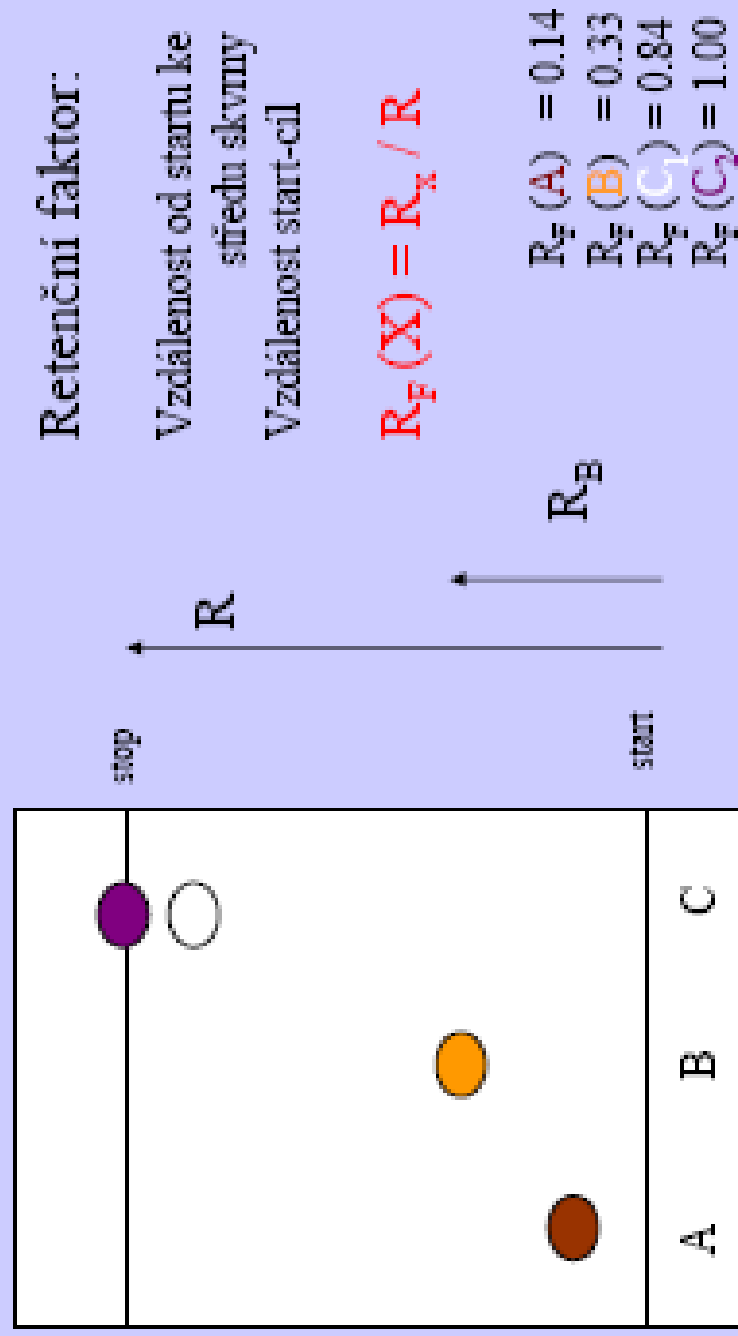
$$R_F = \frac{\text{vzdálenost od startu ke středu zóny látky}}{\text{vzdálenost od startu k čelu mobilní fáze}} = \frac{a}{b}$$

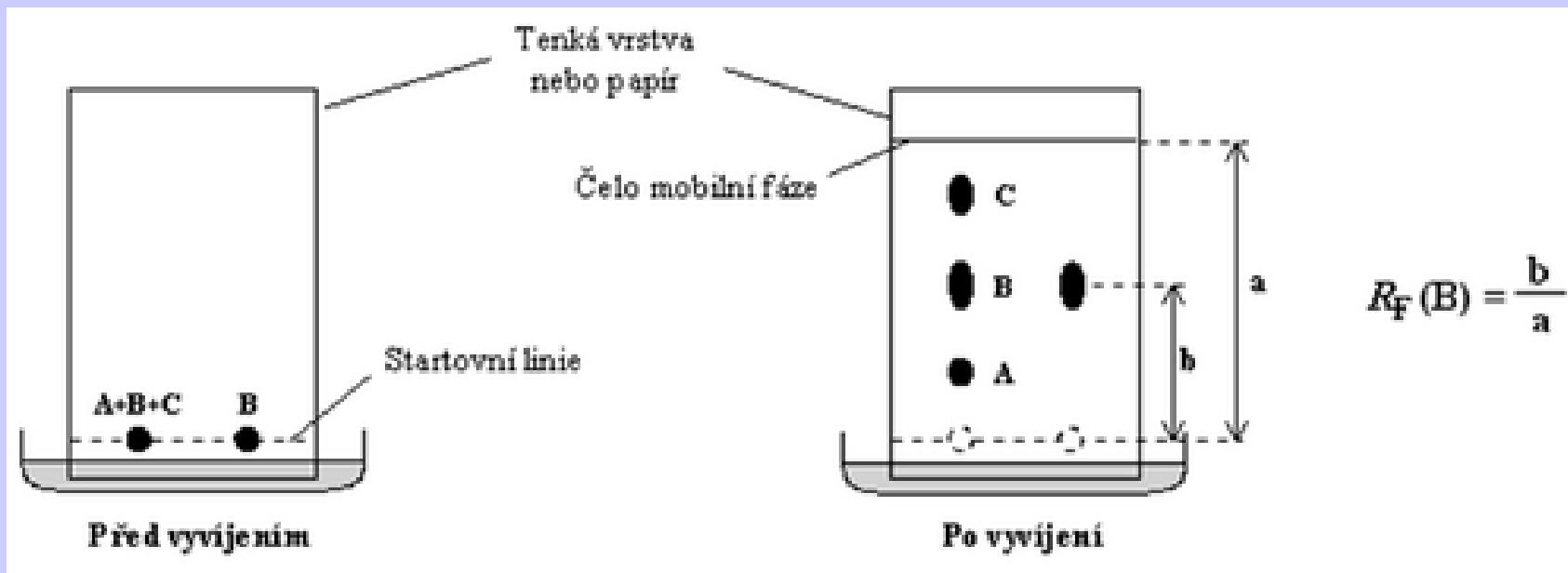
R_F je vždy menší než 1. Ideální $0.1 < R_F < 0.9$

Kvantita: rozsah skvrny (plocha):

okometricky, densitometricky nebo analýzou obrazu

Planární chromatografie – vyhodnocení dat





Nejběžnější stacionární fáze:

Papír

Celulóza

Silikagel

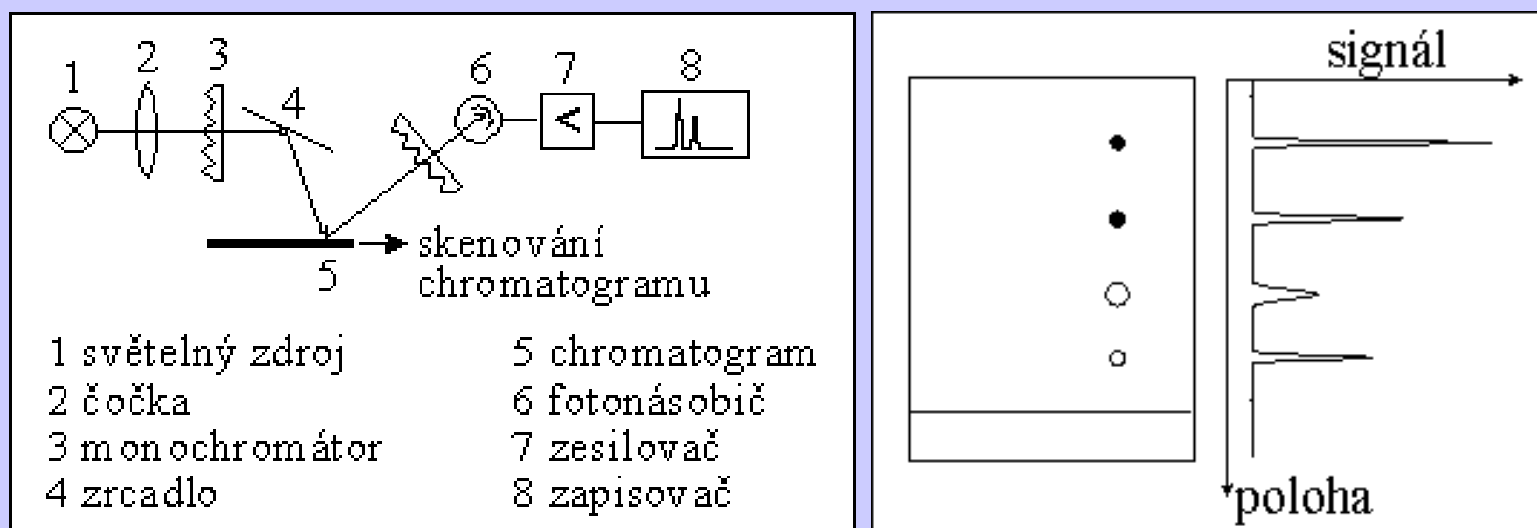
C-18 reverzní fáze

Polyamid

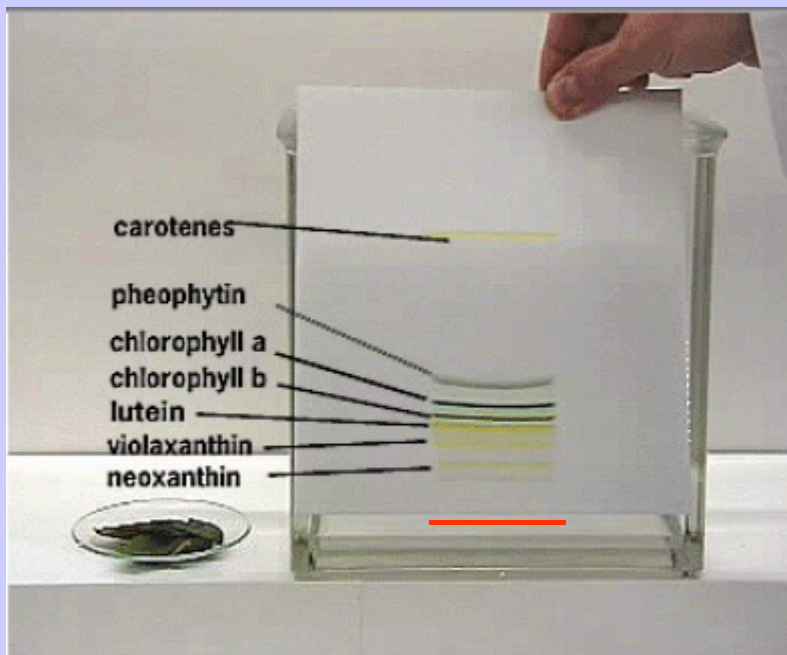
Nejběžnější mobilní fáze:

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
„jedinodimenzionální“ dělení, které je
nejčastější. *Start v dolní části desky.*

Planární chromatografie

(tenkovrstvá /TLC/, papírová /PC/)

Potřeby:

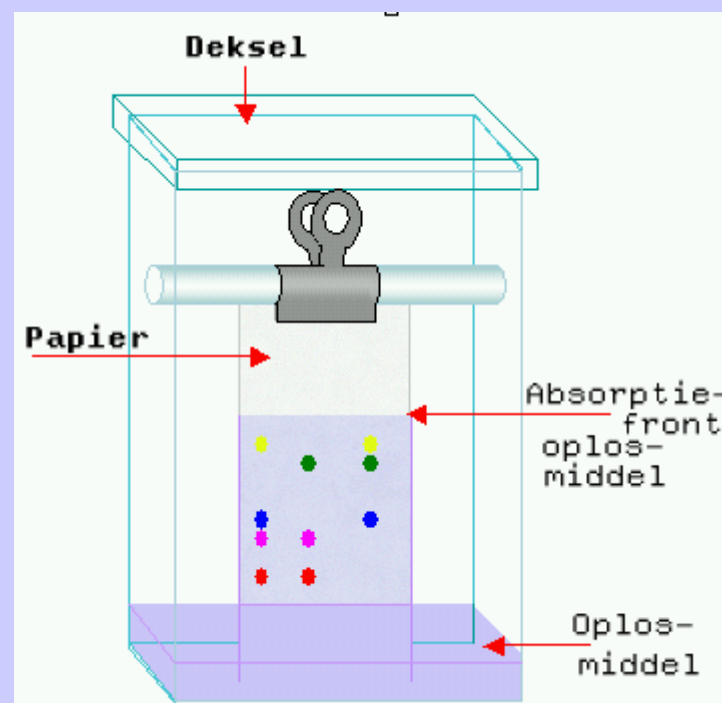
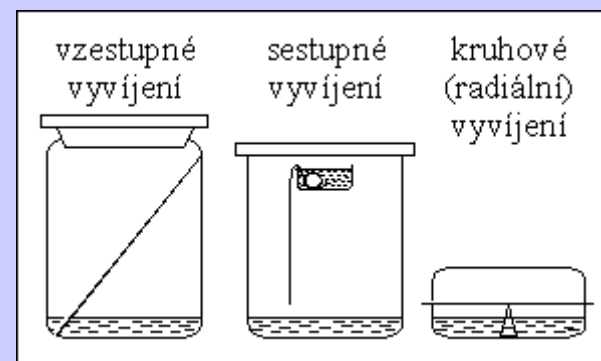
Vyvíjecí tank (nádobu)

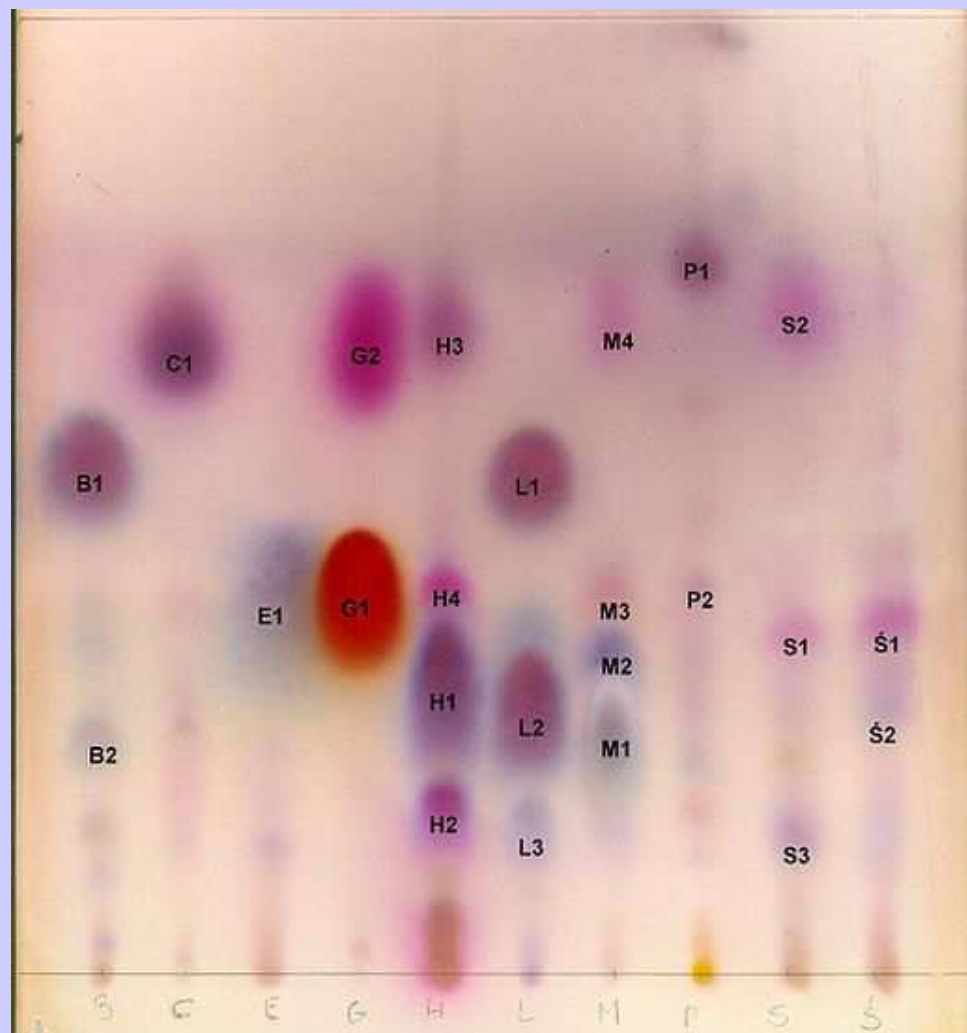
Stacionární fáze (chromatografické desky,
chromatografické papíry)

Mobilní fáze (voda, organická rozpouštědla)

Nanášecí zařízení (pipeta, kapilára)

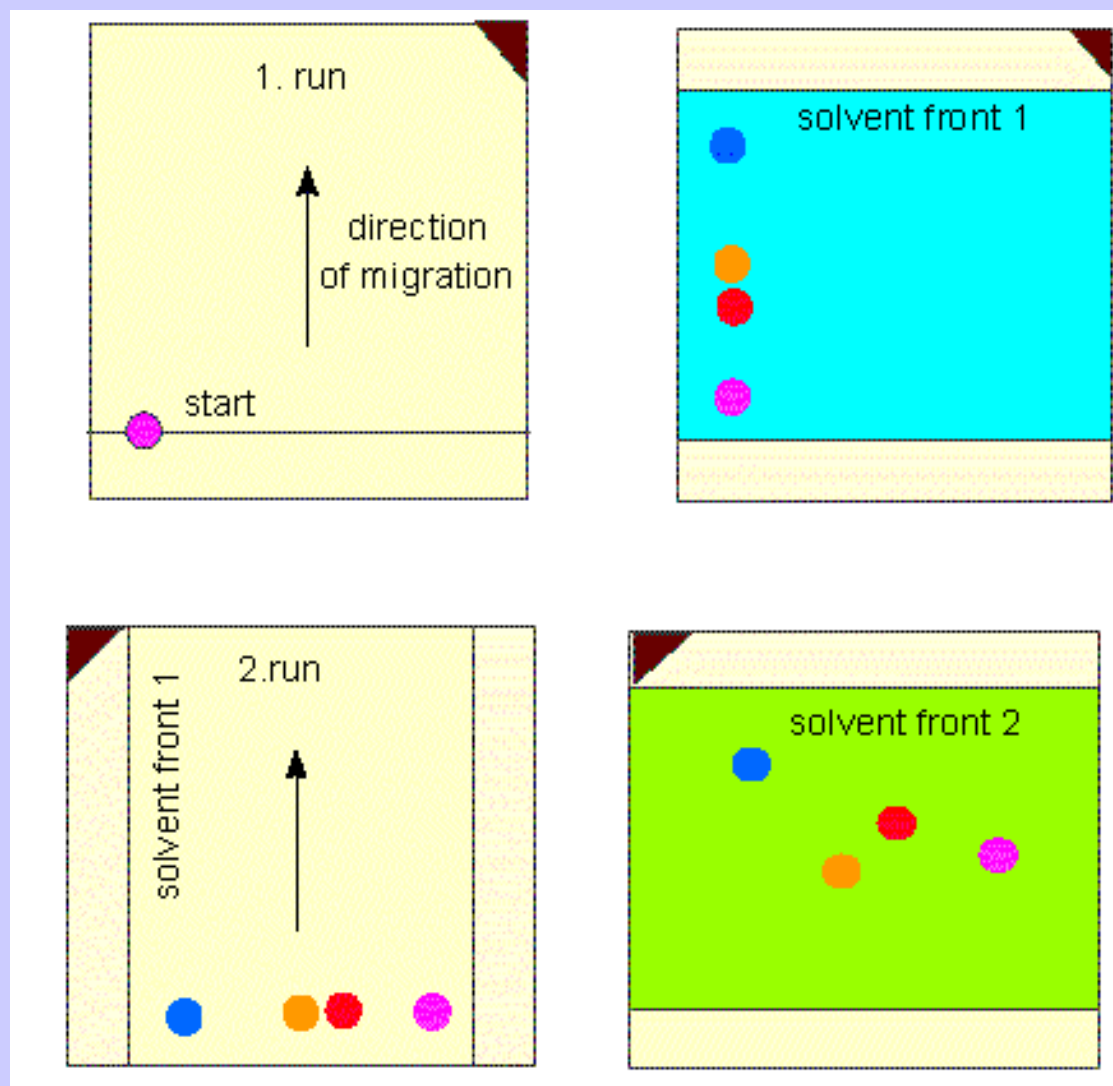
Detekční činidlo / sušárna / UV lampa



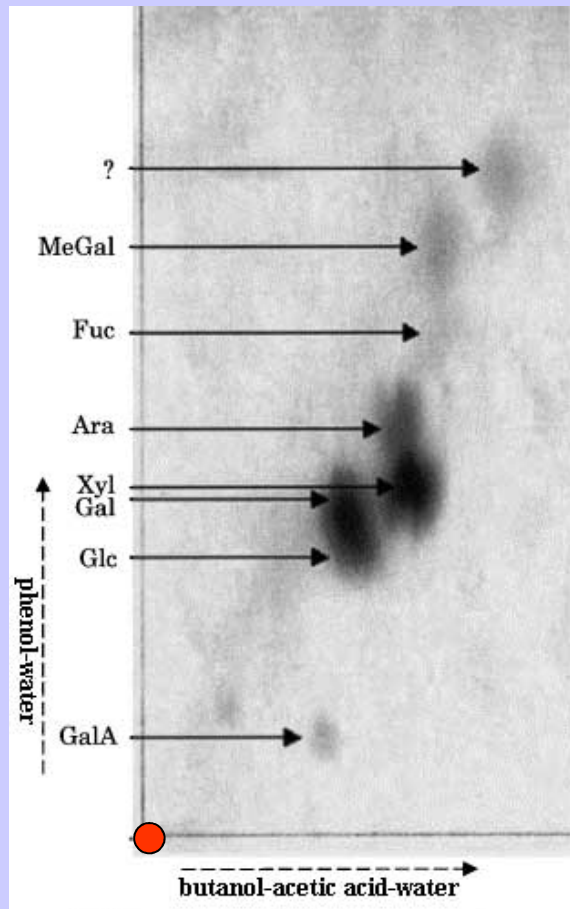


The scan of TLC plate (silica gel G) with 10 essential oils developed with mobile phase toluene - ethyl acetate (93:7 v/v), next sprayed with vanillin in H₂SO₄ and heated. From left to right oils from: bergamot, cedar, eucalyptus, syzygium, lavandula, mint, orange, pine, spruce. Identified components: B1 and L1 - linalol, B2 and L2 - linalyl acetate, E1 - cinneol, G1 - eugenol, G2 - carryophyllene. Doubtfully identified components - C1 - cedrol, M3 - menthol, P1 - limonene.

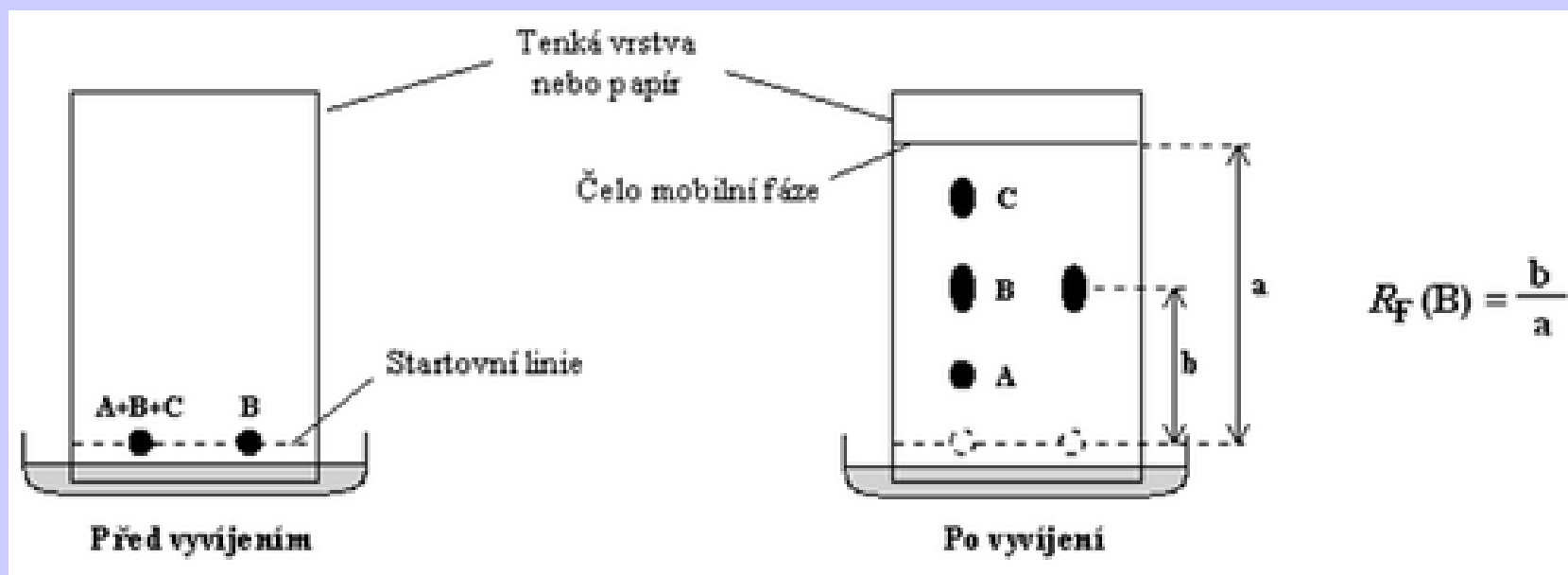
Dvojdimenzionální chromatografie (2D-TLC; 2D-PC)



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.



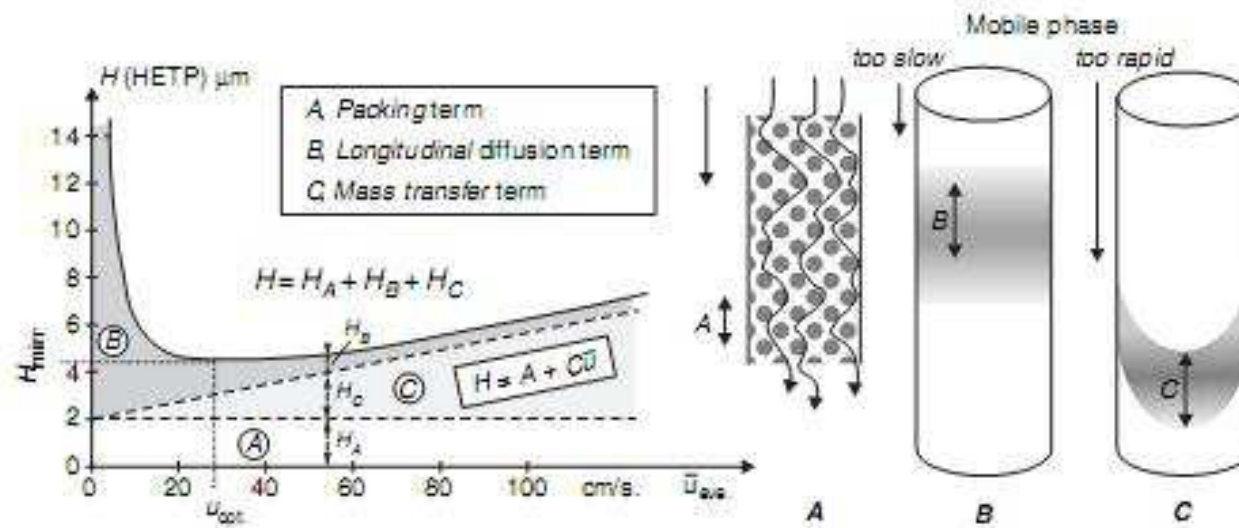
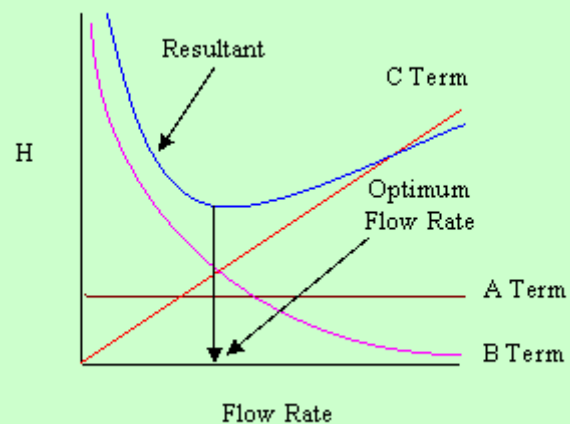
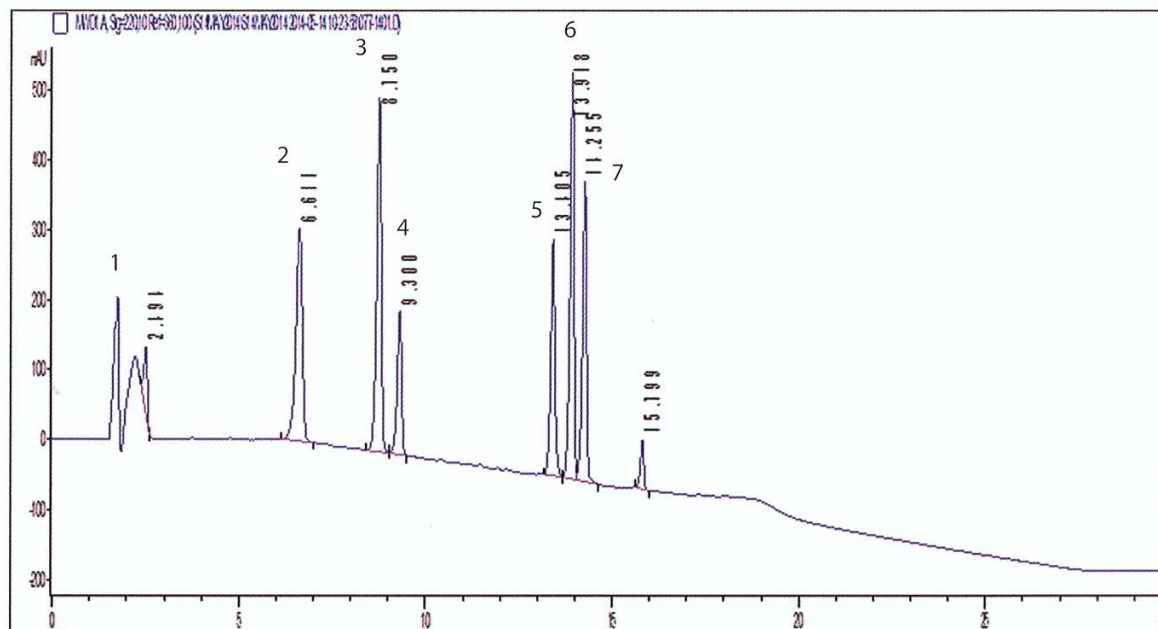


Figure 1.11 Van Deemter's curve in gas chromatography with the domains of parameters A, B and C indicated. There exists an equation similar to that of Van Deemter that considers temperature: $H = A + B/T + CT$.



Van Deemterova rovnice: hledání optimální průtokové rychlosti v daném uspořádání

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



Peak Number	Compound
1	3,4-Dihydroxybenzoic acid (#08992)
2	Vanillin (#PHR1245)
3	2,6-Dimethoxyphenol (#53877)
4	Phenethyl alcohol (#PHR1122)
5	2-Methoxy-4-vinylphenol (#39189)
6	4-Ethylphenol (#36724)
7	4-Ethylguaicol (#39774)

Figure 2 Mixture of Seven Typical Whisky Compounds.

HPLC separace základních aromatických složek whisky

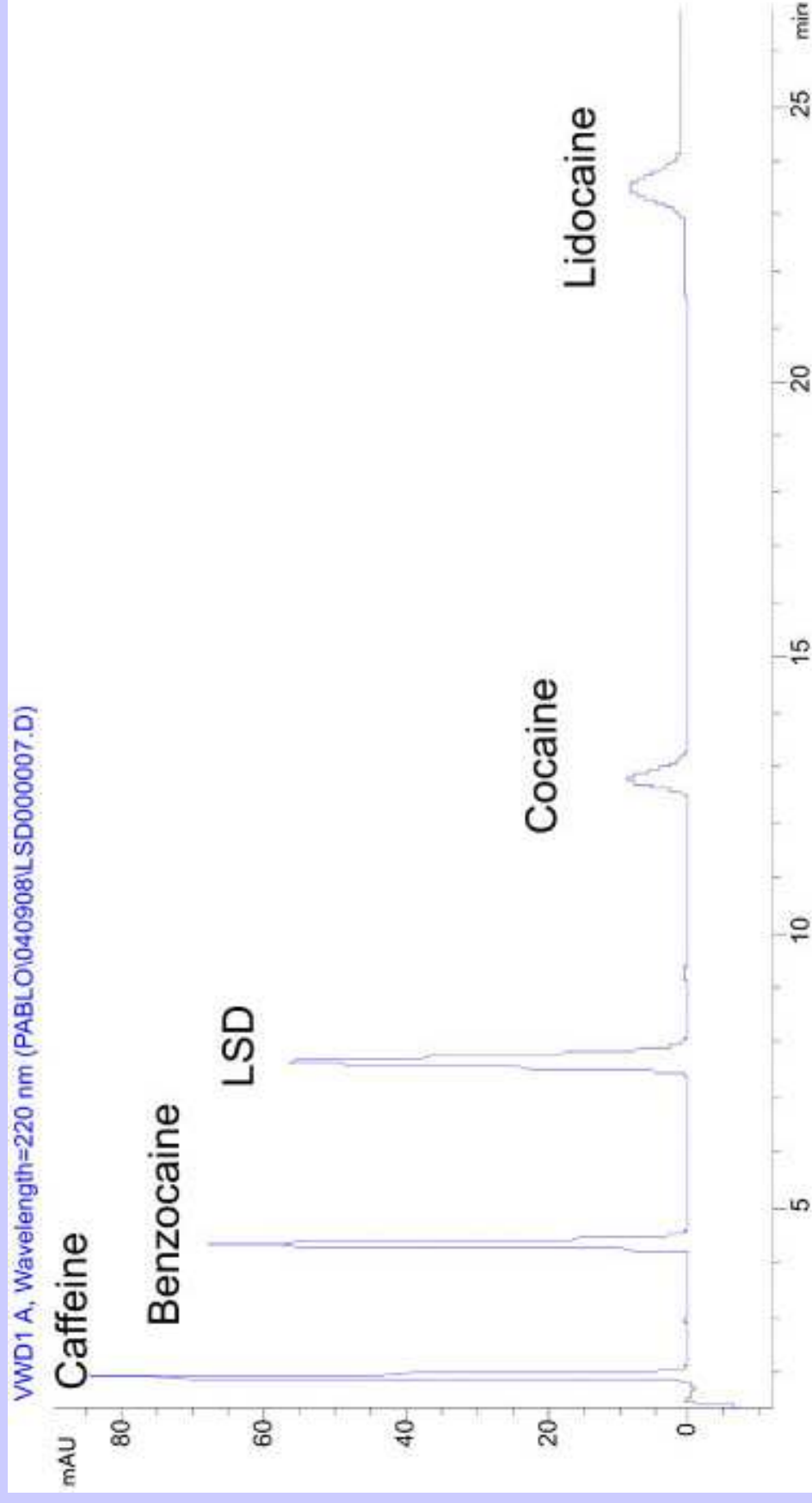


FIGURE 6 - Chromatogram obtained after injection of standards of caffeine ($t_r = 1.92$ min), benzocaine ($t_r = 4.33$ min), LSD ($t_r = 7.64$ min), cocaine ($t_r = 12.77$ min) and lidocaine ($t_r = 23.51$ min).

Plynová chromatografie (GC)

Potřeby: plynový chromatograf

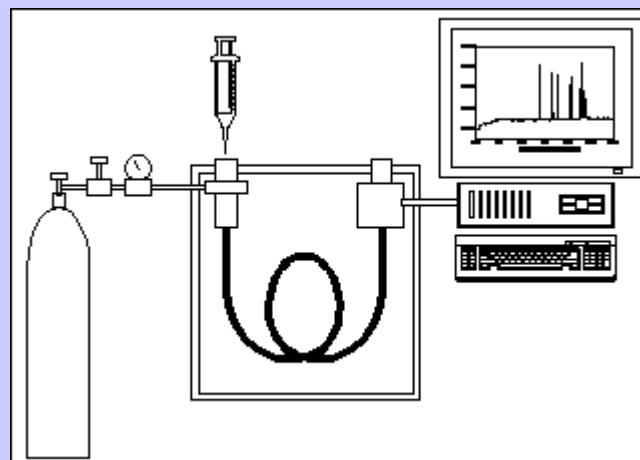
Základní součásti

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

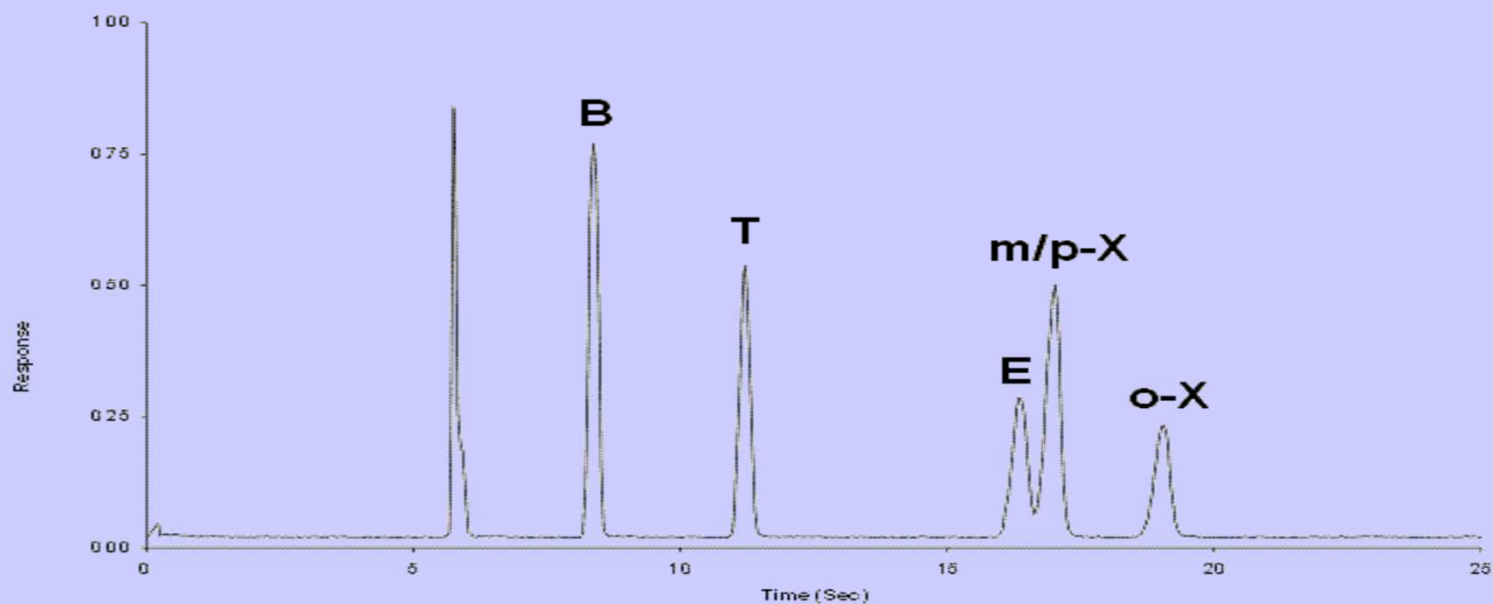
Běžná detekční zařízení:

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

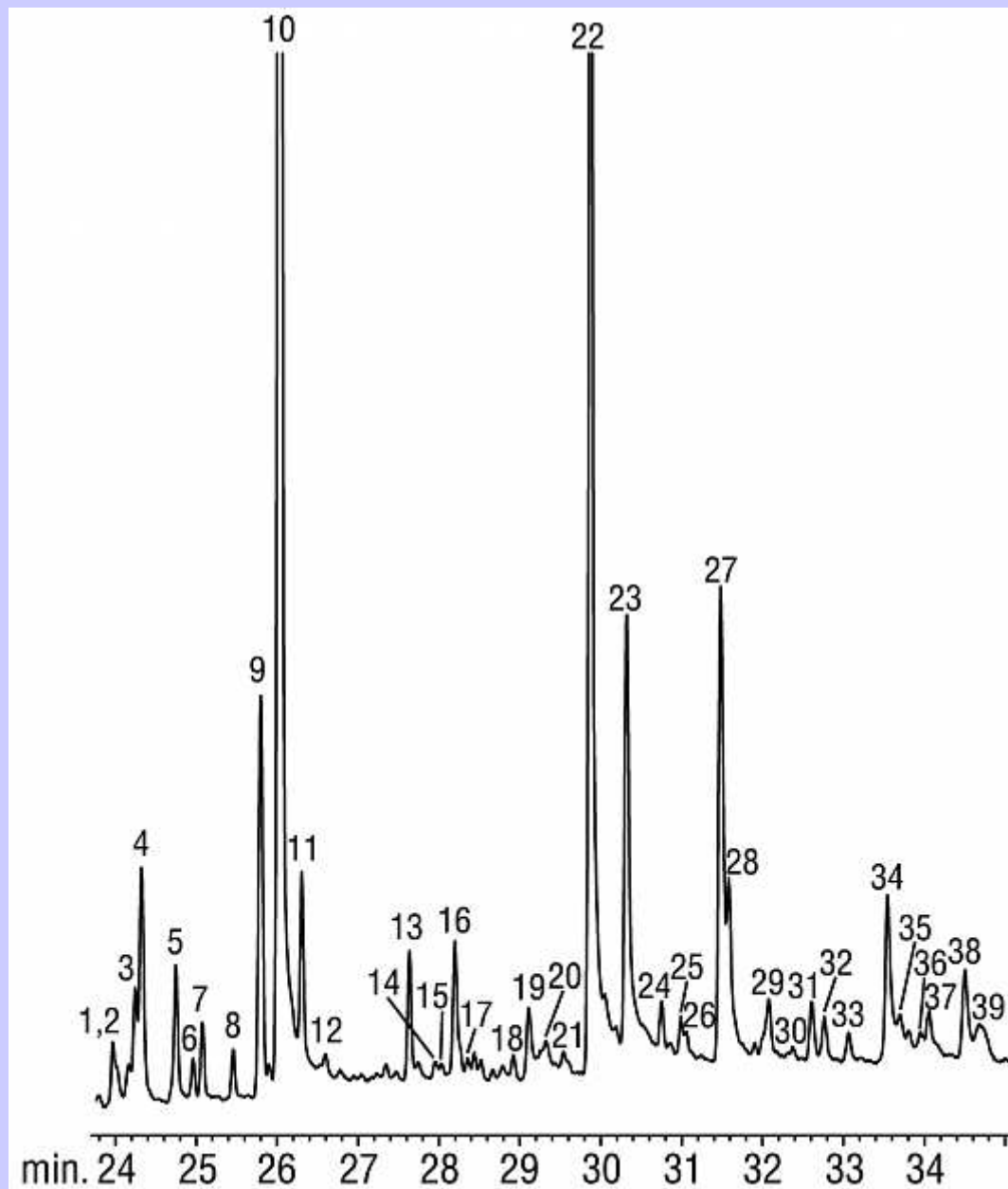
FID (plameno ionizační detektor, ionizace plamene)

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

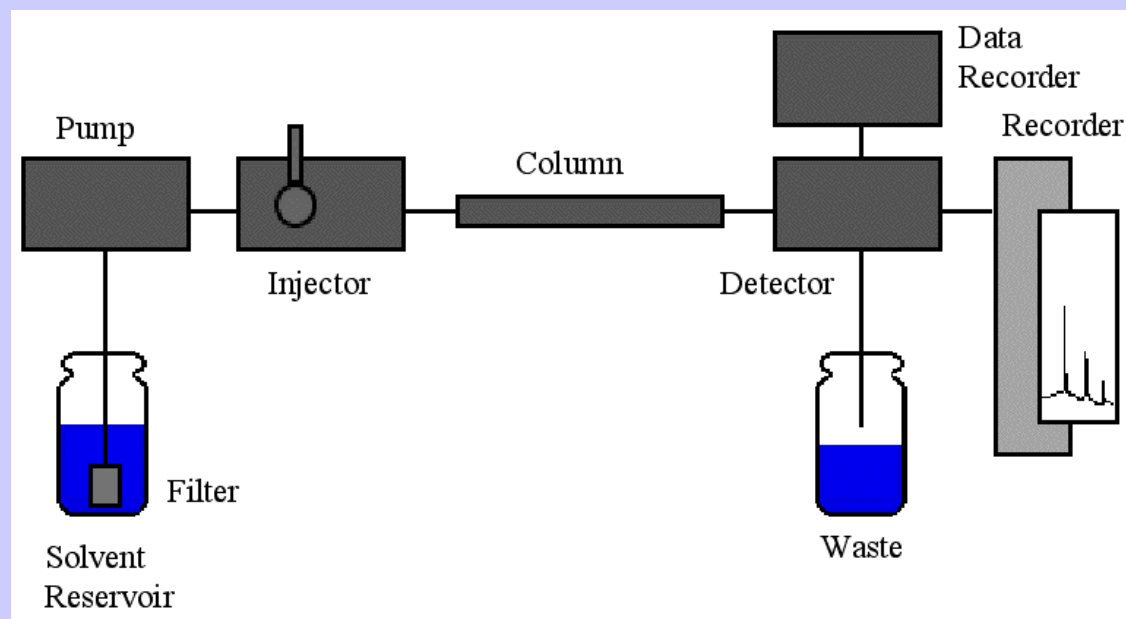
Rezervoár mobilní fáze

a vysokotlaká pumpa s mixérem

Dávkovací zařízení

Kolona a termostát

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_2	(speciální)
Modifikovaný silikagel, tzv. nitrilová CN	(speciální)
Gely pro gelovou filtraci	(speciální, dělení podle M_w)
Iontoměniče	(IMAC)

Další komerčně dostupné kolony, určené pro speciální aplikace

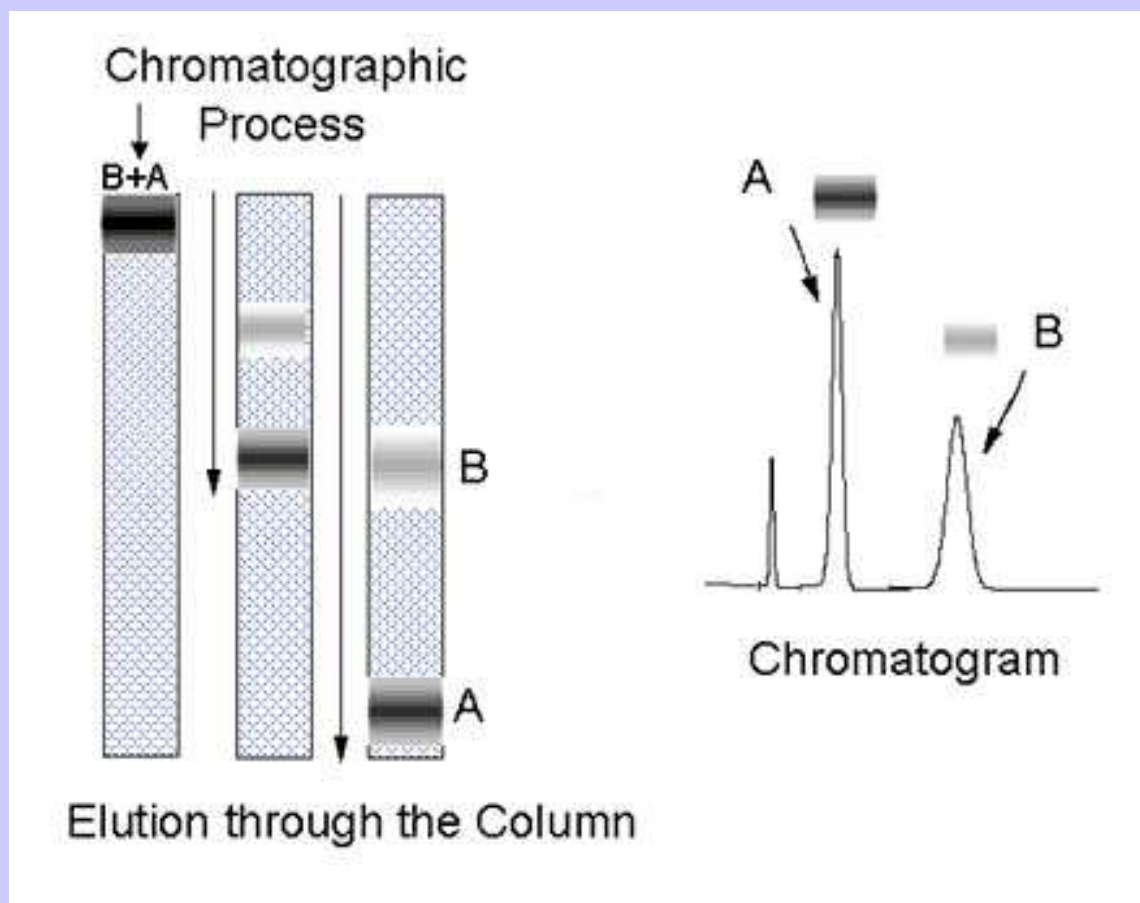
Kapalinová chromatografie (HPLC)

Mobilní fáze: obecně voda, pufrý či směsi s organickými rozpouštědly

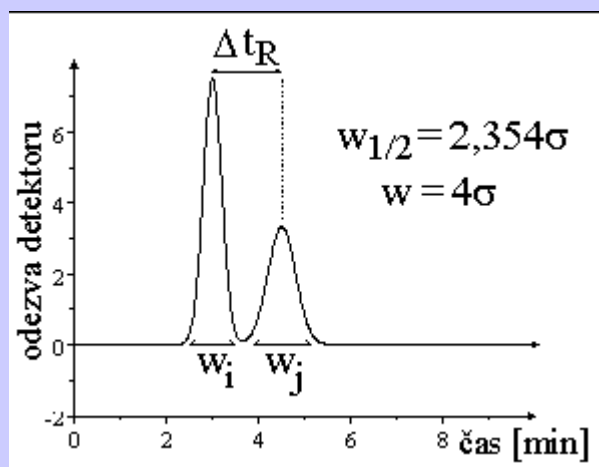
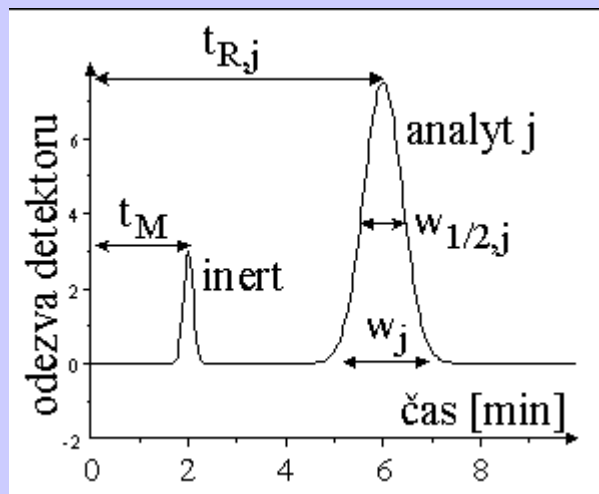
Metanol, acetonitril, voda	(reversní fáze)
Hexan, isopropanol, HAc	(normální fáze)
Pufry	(jiné kolony)

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

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

Rozlišení lze ovlivnit:

Volbou stacionární a mobilní fáze

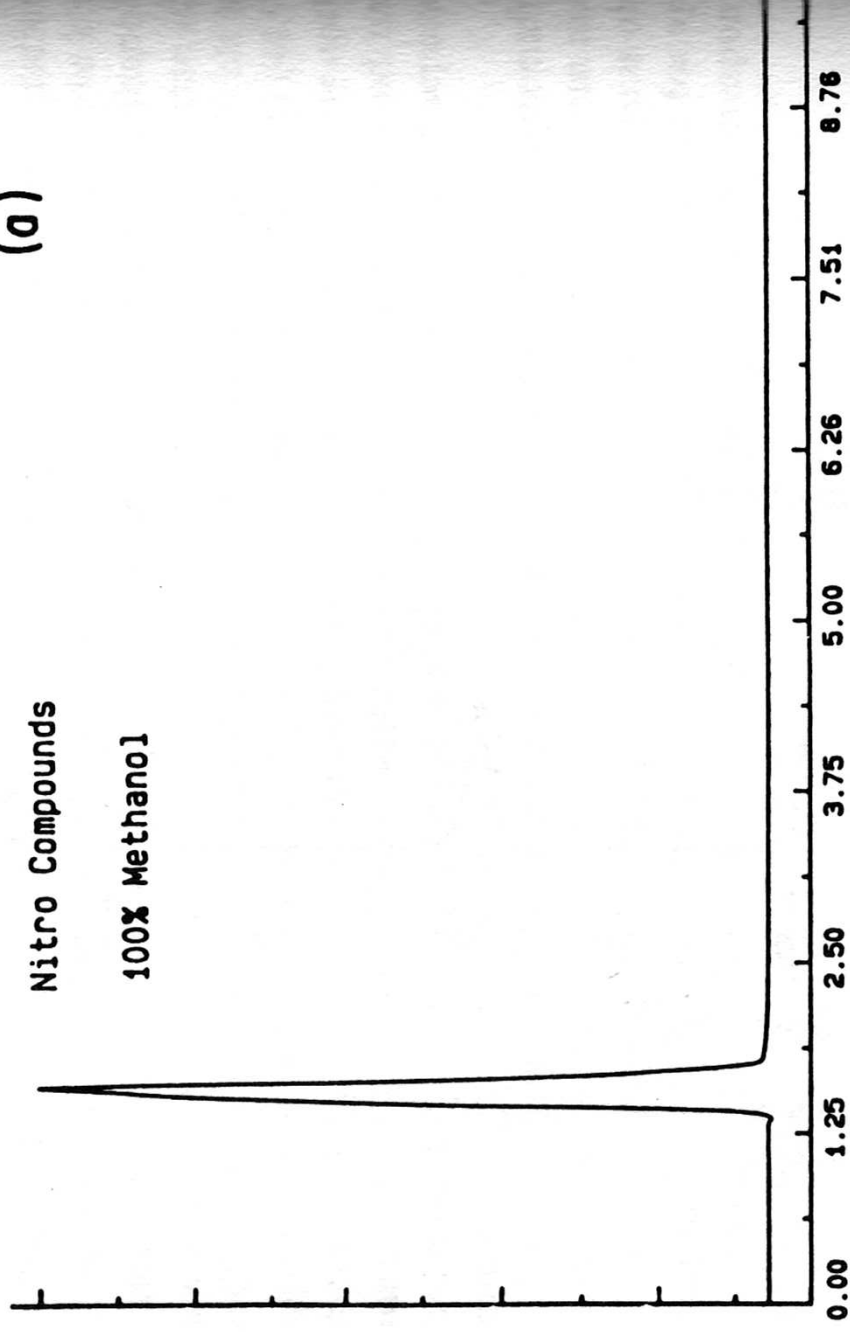
Teplotou, průtokovou rychlostí

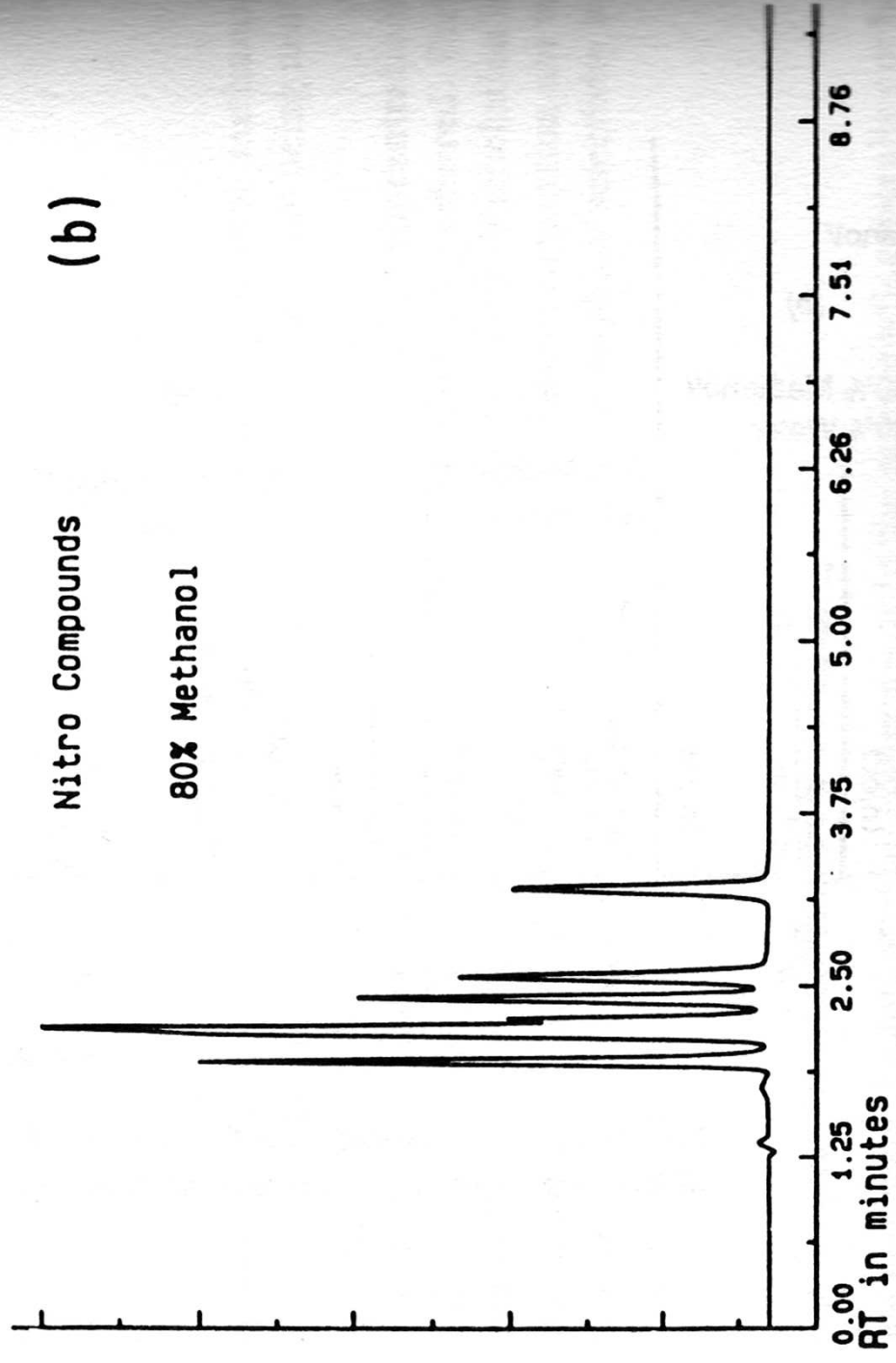
Isokratickým / gradientovým uspořádáním

(a)

Nitro Compounds

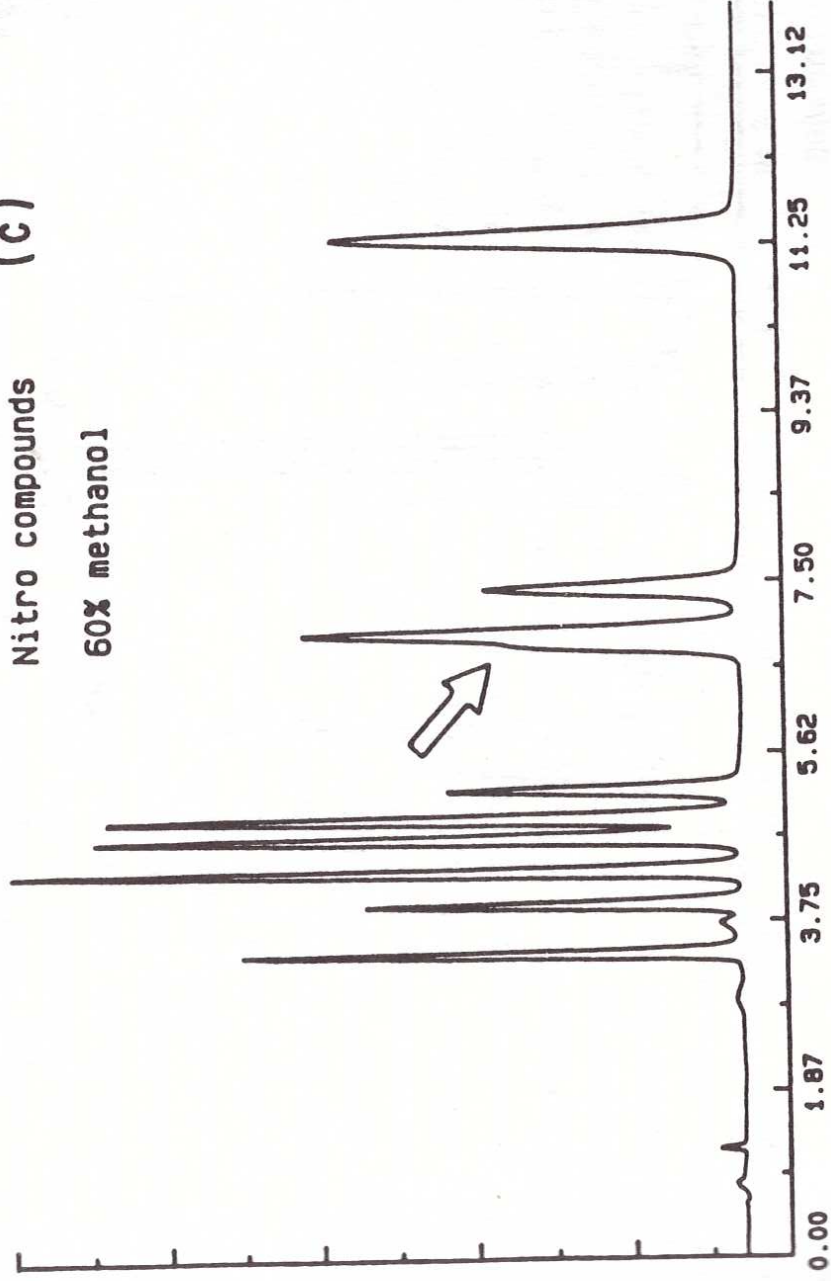
100% Methanol





(c)

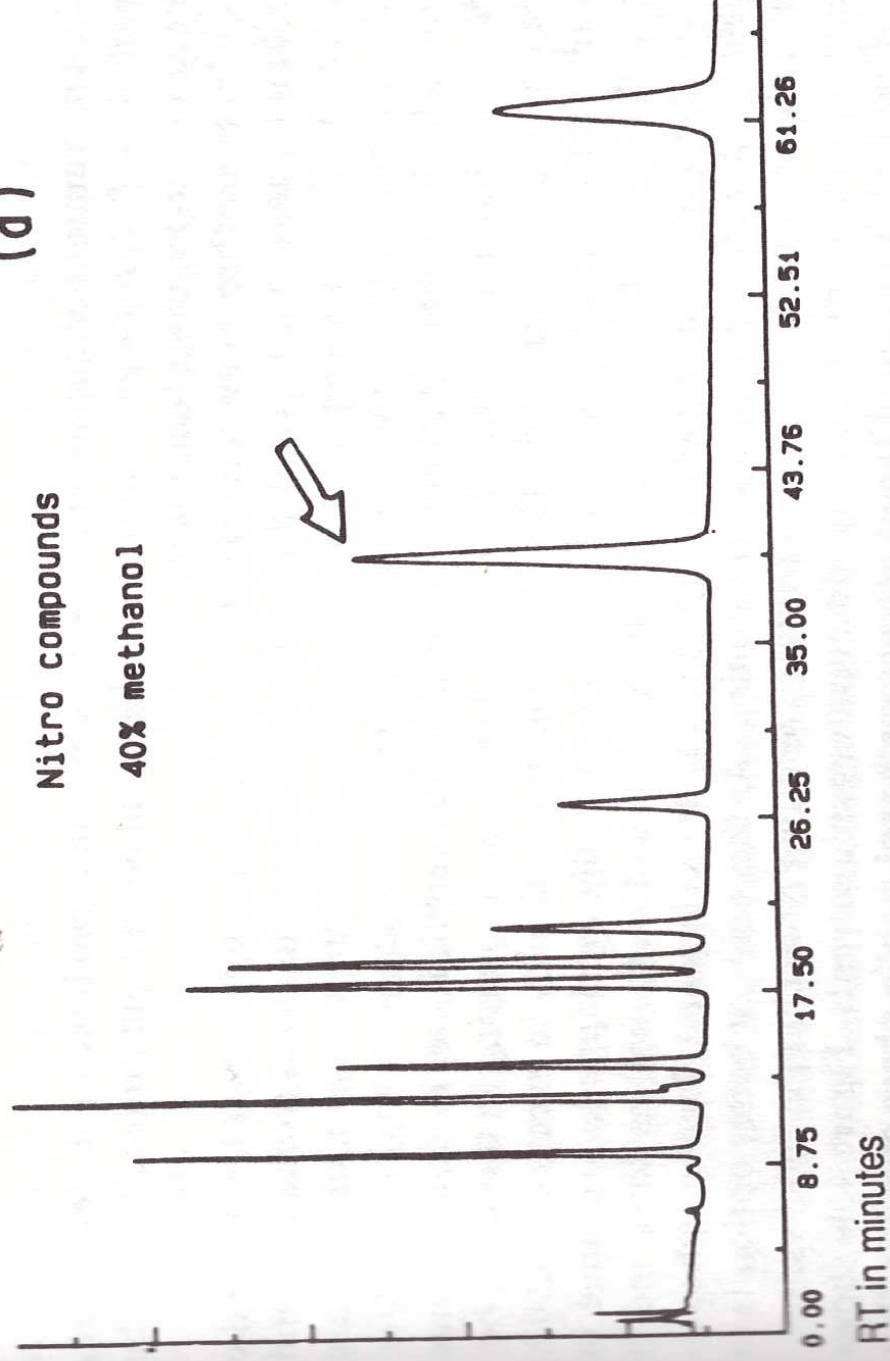
Nitro compounds
60% methanol

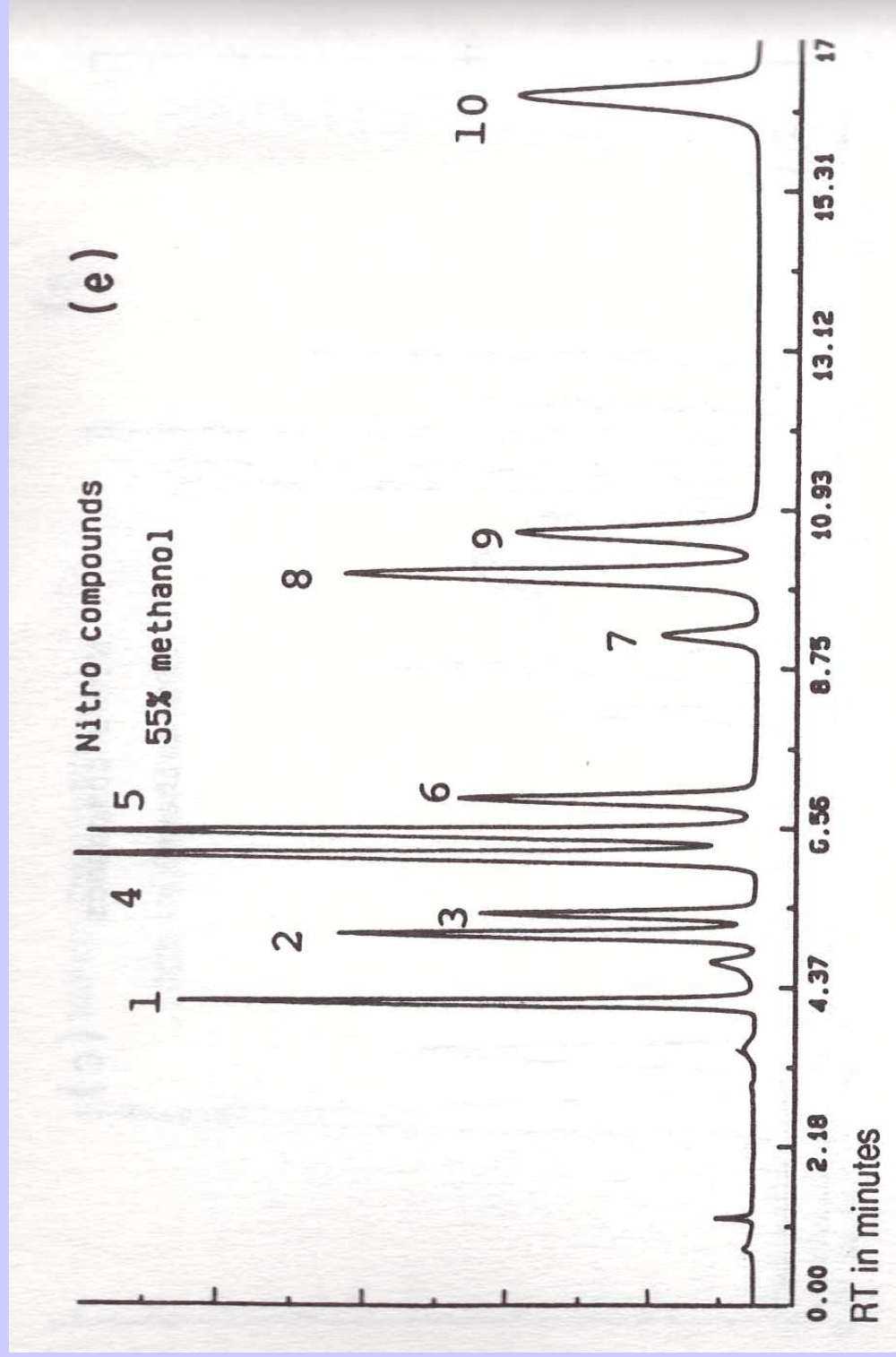


(d)

Nitro compounds

40% methanol





Kolonová chromatografie – příklady separací

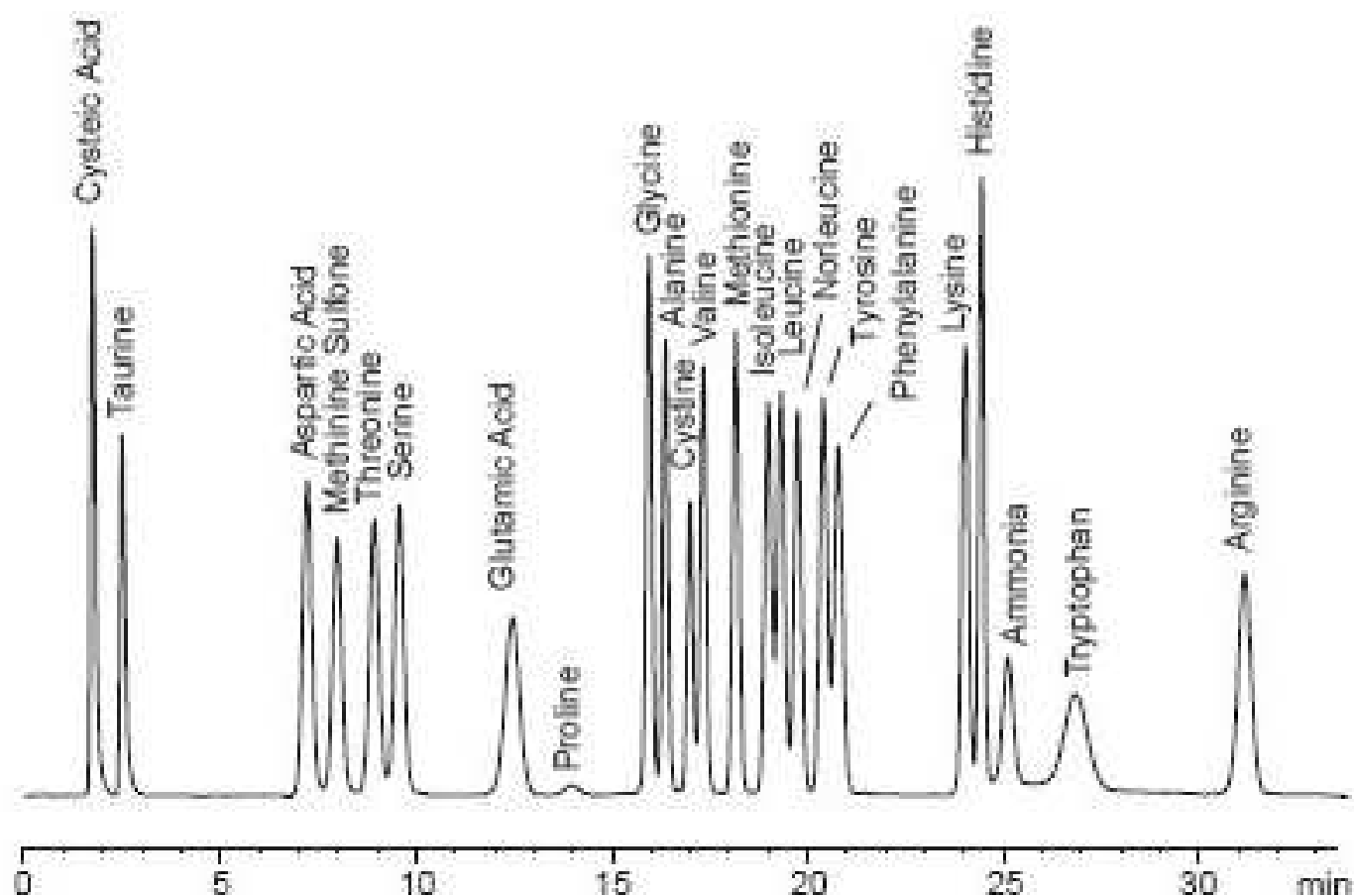
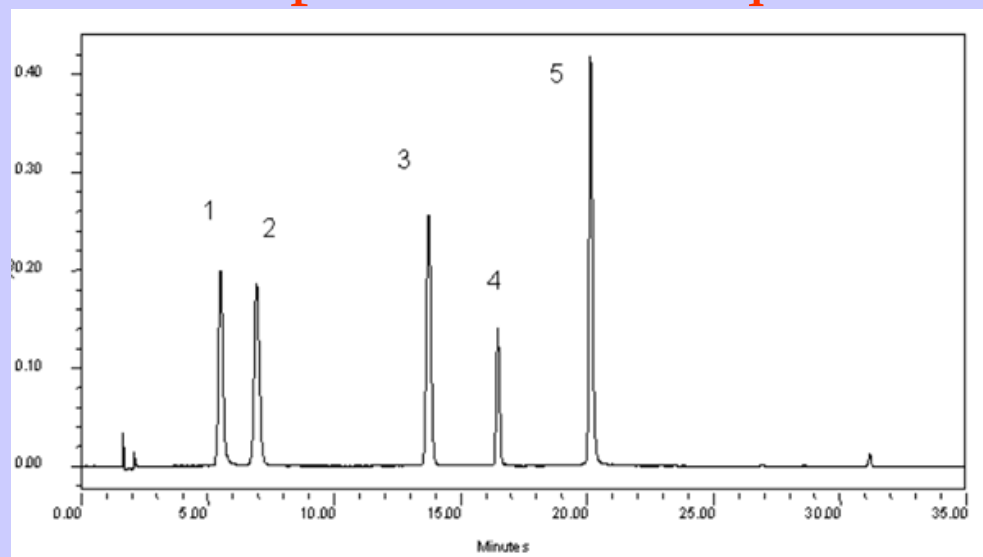


Fig 1. Amino Acid standard. Eluants: Na270, Na740, RG011, column 1154110T, temperature gradient from 50 °C to 70 °C.

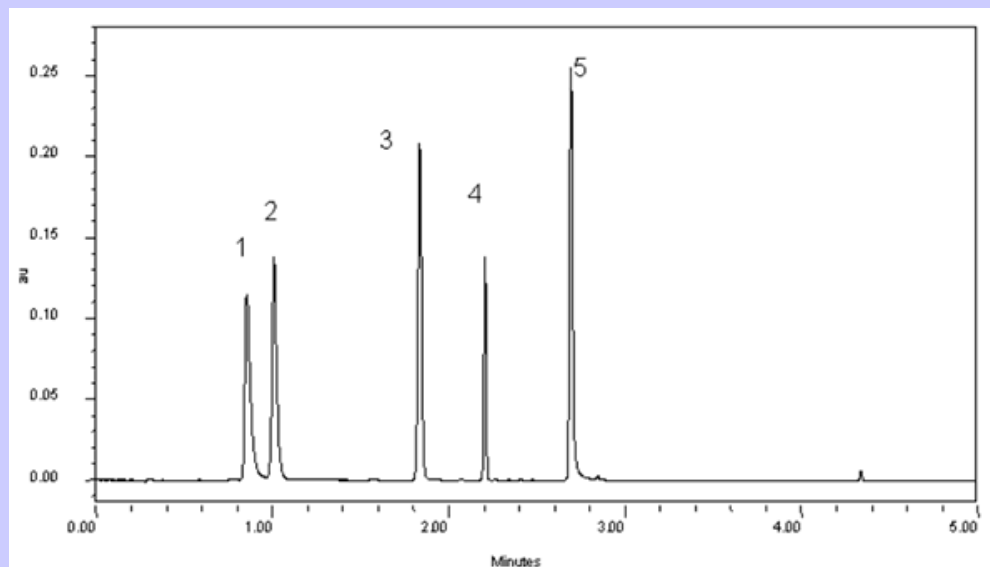
Ultra performance liquid chromatography (UPLC)



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

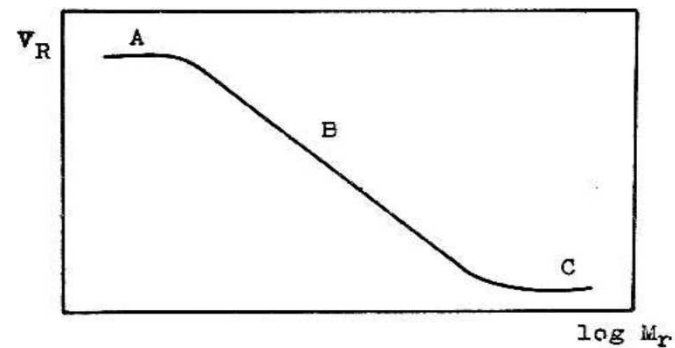
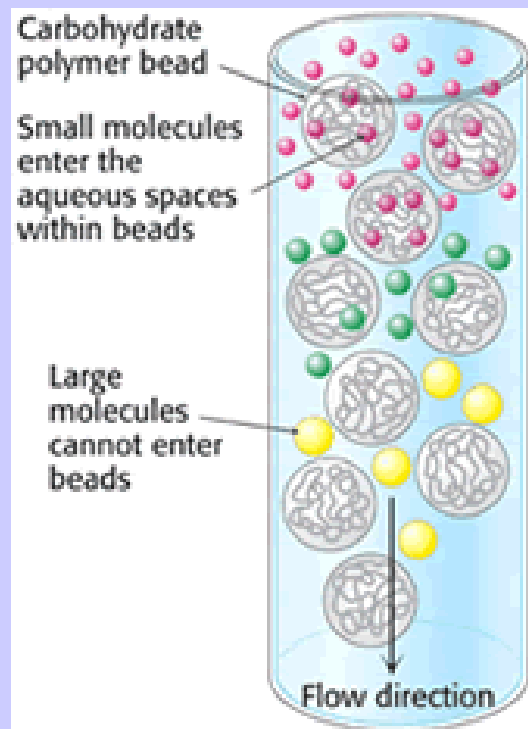
UPLC separation (↓)

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



Kolonová chromatografie – další druhy:

GPC - Gelově permeační chromatografie vhodná pro dělení makromolekul

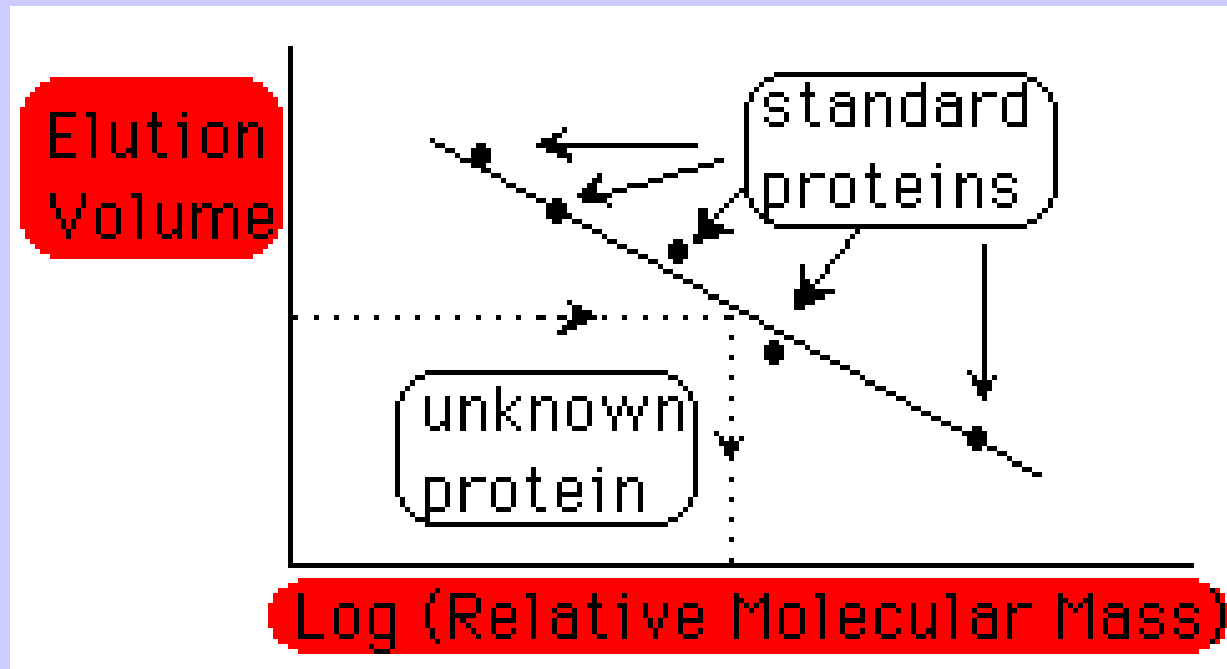


Závislost elučního objemu V_R na logaritmu relativní molekulové hmotnosti M_r při GPC

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

Kolonová chromatografie – další druhy:

GPC – určení molekulové hmotnosti



! Na ose x je logaritmus relativní molekulové hmotnosti

Kolonová chromatografie – další druhy:

Afinitní chromatografie na nosičích obsahujících
navázaná barviva:

Barviva jsou podobná některým kofaktorům

Použití při separacích proteinů

Chirální separace: důležité zejména ve farmacii

Stacionární fáze např. cyklodextriny

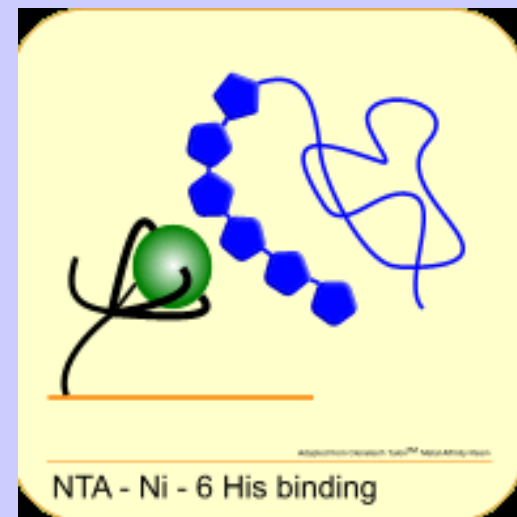
Kolonová chromatografie – další druhy:

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

Chromatografie na ionexech, 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)



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)