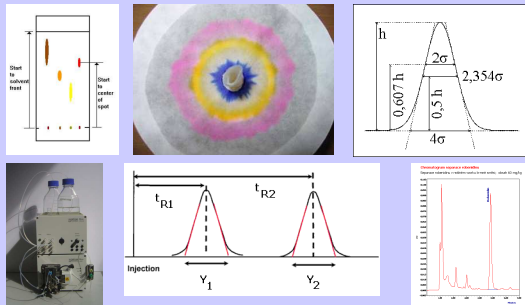


Repetitorium chemie IV (2014)



(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, pufrý či směs organických rozpouštědel)

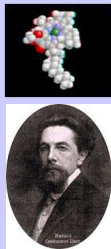
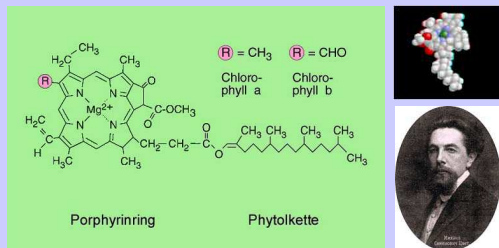
Různé složky vzorku se více či méně ochotně poutají ke stacionární fázi

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 práškovatého uhlíkatu 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)

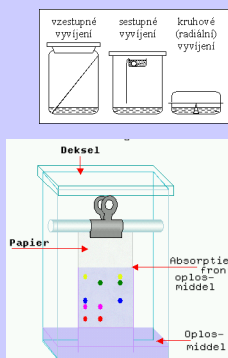
Složitější **sloupcovou**
(vyžaduje složitě přístrojové zajištění)

Planární chromatografie

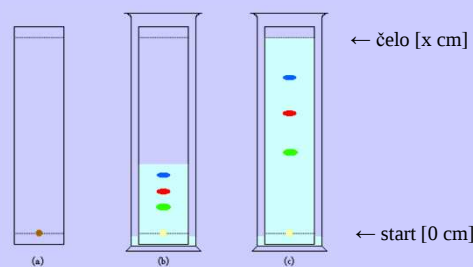
(tenkovrstvá / TLC/, papírová / PC/)

Potřeby:

- Vývíjecí tank (nádob)
- 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 :

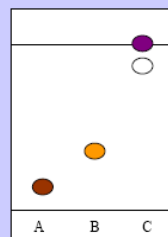
$$R_F = \frac{\text{vzdálenost od startu ke střední zóně látky}}{\text{vzdálenost od startu k čelu mobilní fáze}} = \frac{a}{b}$$

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

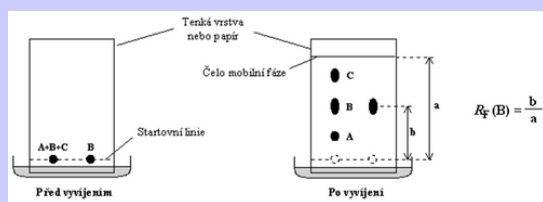


Retenční faktor:

Vzdálenost od startu ke střední skvrny
Vzdálenost start-cíl

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

$$\begin{aligned} R_F(A) &= 0.14 \\ R_F(B) &= 0.33 \\ R_F(C) &= 0.84 \\ R_F(C_2) &= 1.00 \end{aligned}$$



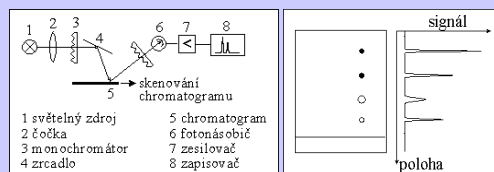
Nejběžnější stacionární fáze:

Papír
Celulóza
Silikagel
C-18 reverzní fáze
Polyamid

Nejběžnější mobilní fáze:

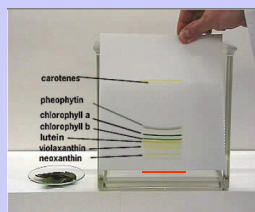
Směsi organických rozpouštědel
s vodou, často je nutné adjustované pH

Planární chromatografie – vyhodnocení dat (kvantita)



10/32

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.

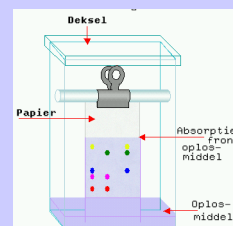
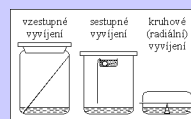
11/34

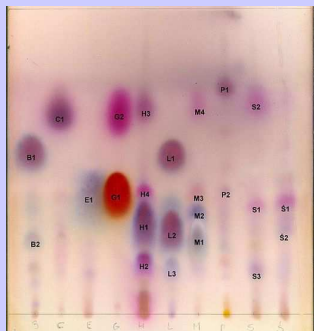
Planární chromatografie

(tenkovrstvá /TLC/, papírová /PC/)

Potřeby:

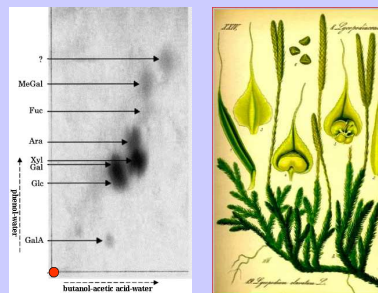
Vývíjecí tank (nádob)
Stacionární fáze (chromatografické desky, chromatografické papíry)
Mobilní fáze (voda, organická rozpouštědla)
Nanášecí zařízení (pipeta, kapilára)
Detekční činidlo / sušárna / UV lampa





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.

Planární chromatografie – příklad



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

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
různé 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.

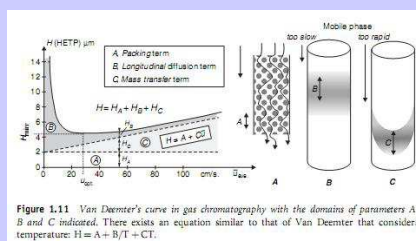
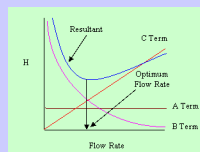


Figure 1.11 Van Deemter's curve in gas chromatography with the domains of parameters A, B and C indicated. There exists an equation similar to that of Van Deemter that considers temperature: $H = A + B/T + CT$.



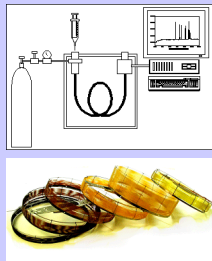
Van Deemterova rovnice: hledání optimální
průtokové rychlosti v daném uspořádání

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Plynová chromatografie (GC)

Potřeby: plynový chromatograf

Základní součásti
Zdroj plynu a regulace průtoku
Dávkovací zařízení
Kolona a termostat
Detekční zařízení



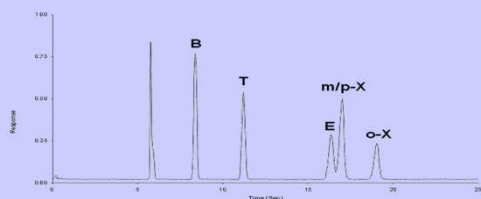
Plynová chromatografie (GC)

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

Mobilní fáze: vodík, dusík, argon, oxid uhlíčitý
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

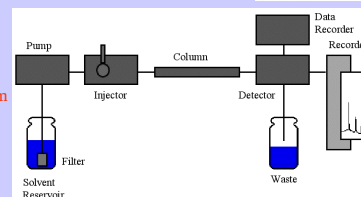
21/34

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 ₂	(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

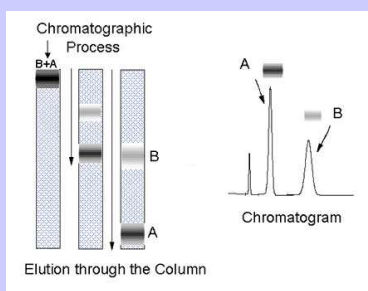
Kapalinová chromatografie (HPLC)

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

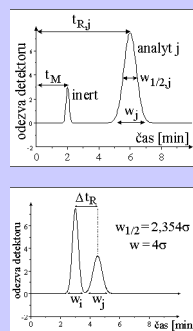
Metanol, acetonitril, voda	(reverzní fáze)
Hexan, isopropanol, HAC	(normální fáze)
Pufrý	(jiné kolony)

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

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

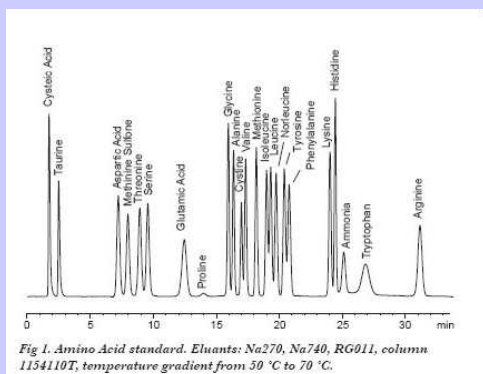
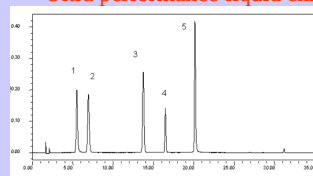


Fig 1. Amino Acid standard. Eluants: Na270, Na740, RG011, column 1154110T, temperature gradient from 50 °C to 70 °C.

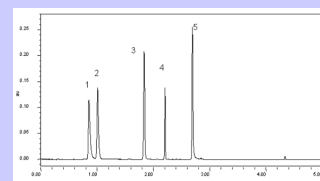
Ultra performance liquid chromatography (UPLC)



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

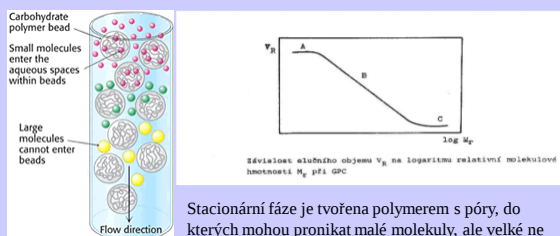
UPLC separation (↓)

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



Kolonová chromatografie – další druhy:

GPC - Gelově permeační chromatografie vhodná pro dělení makromolekul

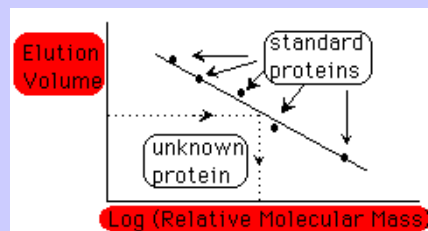


Stacionární fáze je tvořena polymerem s póry, do kterých mohou pronikat malé molekuly, ale velké ne

31/34

Kolonová chromatografie – další druhy:

GPC – určení molekulové hmotnosti



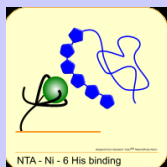
Kolonová chromatografie – další druhy:

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)