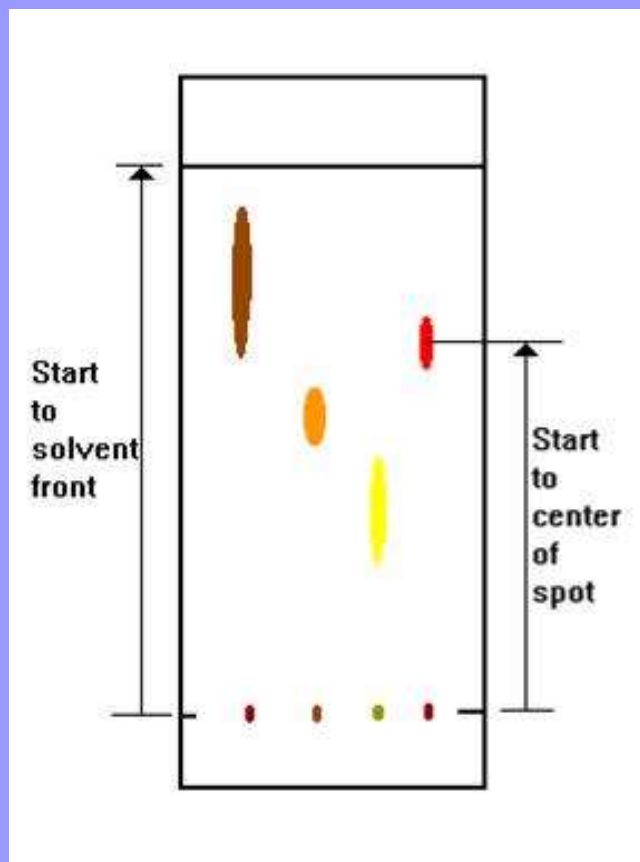
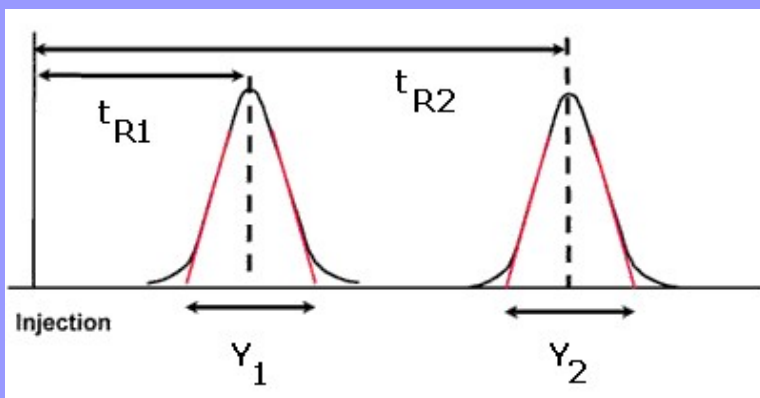


Repetitorium chemie VII.

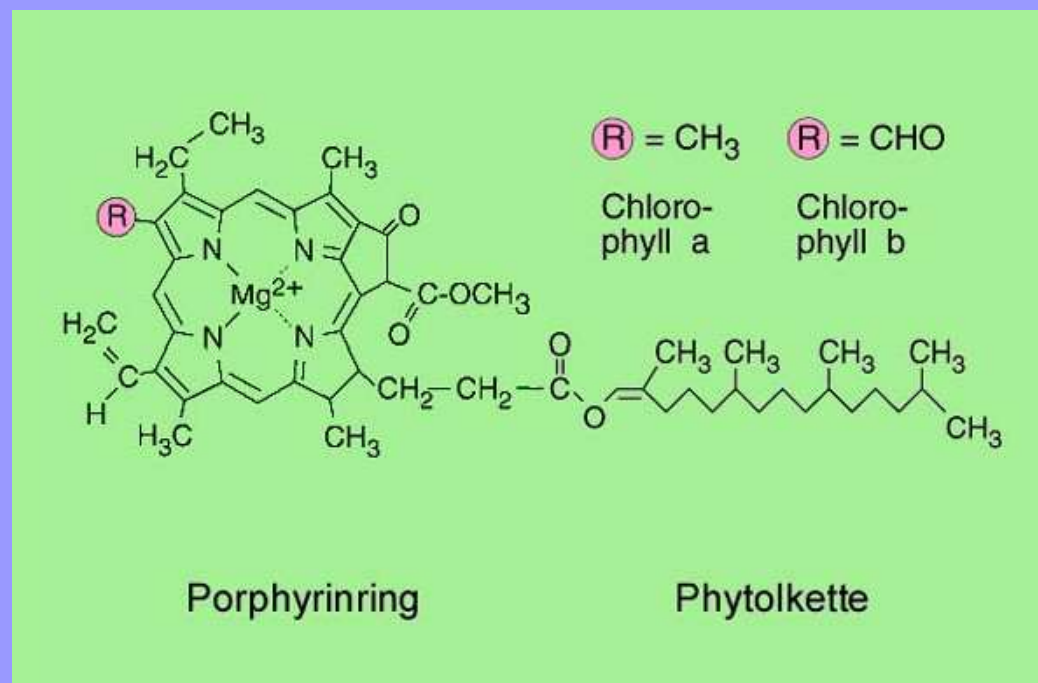
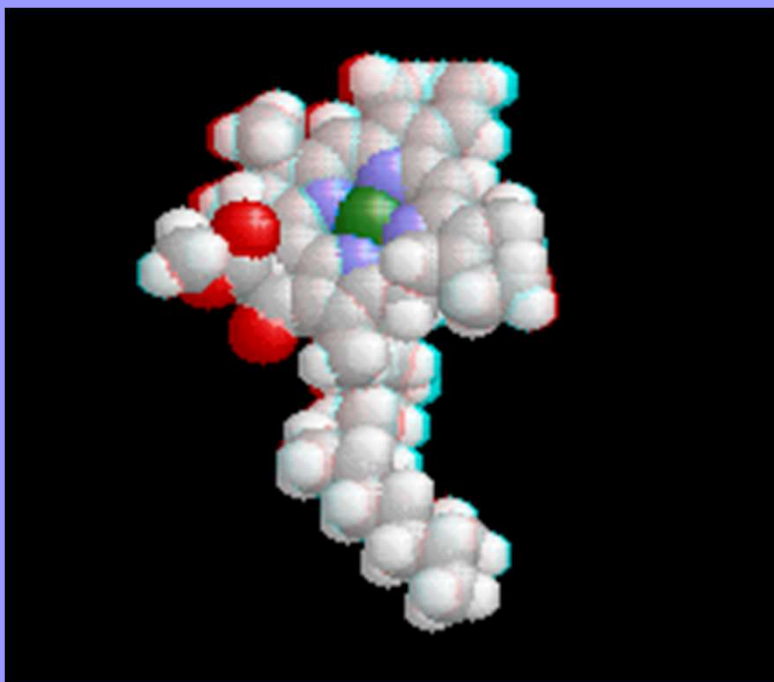
Teorie a praxe chromatografie

a jaký je princip PCR (2025)



Historie objevu chromatografie a Michail Semjonovič Cvět

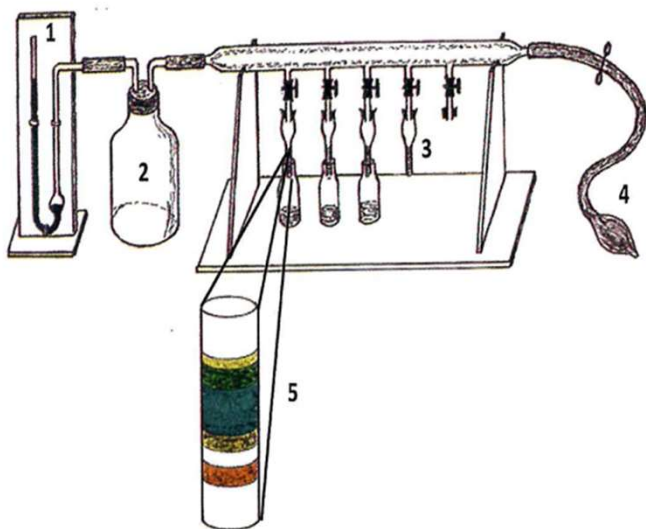
Michail Semjonovič Cvět (1872-1912) rozdělil v roce 1903/1906 na sloupci jemně práškovaného uhličitanu vápenatého listovou zeleň na několik složek. Poprvé od sebe oddělil a popsal **chlorofyl a** a **chlorofyl b**



Historie objevu chromatografie a Michail Semjonovič Cvět

Michail Semjonovič Cvět (1872-1912) rozdělil v roce 1903/1906 na sloupci jemně práškovaného uhličitanu vápenatého listovou zeleň na několik složek. Poprvé od sebe oddělil a popsal **chlorofyl a** a **chlorofyl b**

Obr. 1: Schéma prvního chromatografu: 1 - manometr, 2 - zásobník tlaku, 3 - nádoby na roztoky vzorků a naplněné kolony, 4 - ruční pumpa, 5 - kolona obsahující rozdělené chlorofyly a xantofyly z petroletherového extraktu listů hluchavky bílé (*Lamium album*) [1].



M. Tswett, "Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorption." Ber. dtsh. botan. Ges. **24**, 316–323 (1906). For English translation see ref. [20b].

M. S. Tswett, "Fiziko-Khimicheskoe Stroenie Khlorofil'nogo Zerna. Eksperimental'noe i Kriticheskoe Izsledovanie" (The Physico-chemical Structure of the Chlorophyll Particle. Experimental and Critical Study). Trudy Obshchestva Estestvoispytatelei pri Imperatorski Kazanskom Universitet **35** (No. 3), 1–268 (1901). A summary of this thesis, written by Tswett, was published in Botan. Centralbl. **89**, 120–123 (1902).

Princip 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.

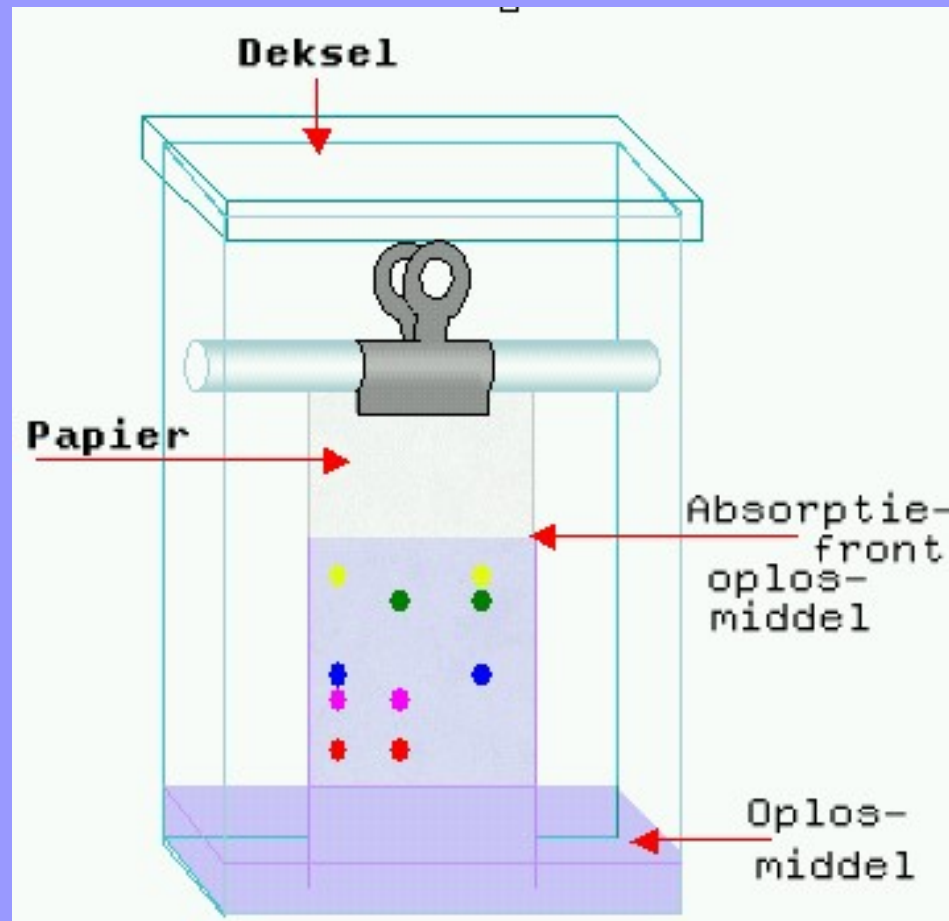
Technika planární a sloupcová (kolonová)

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

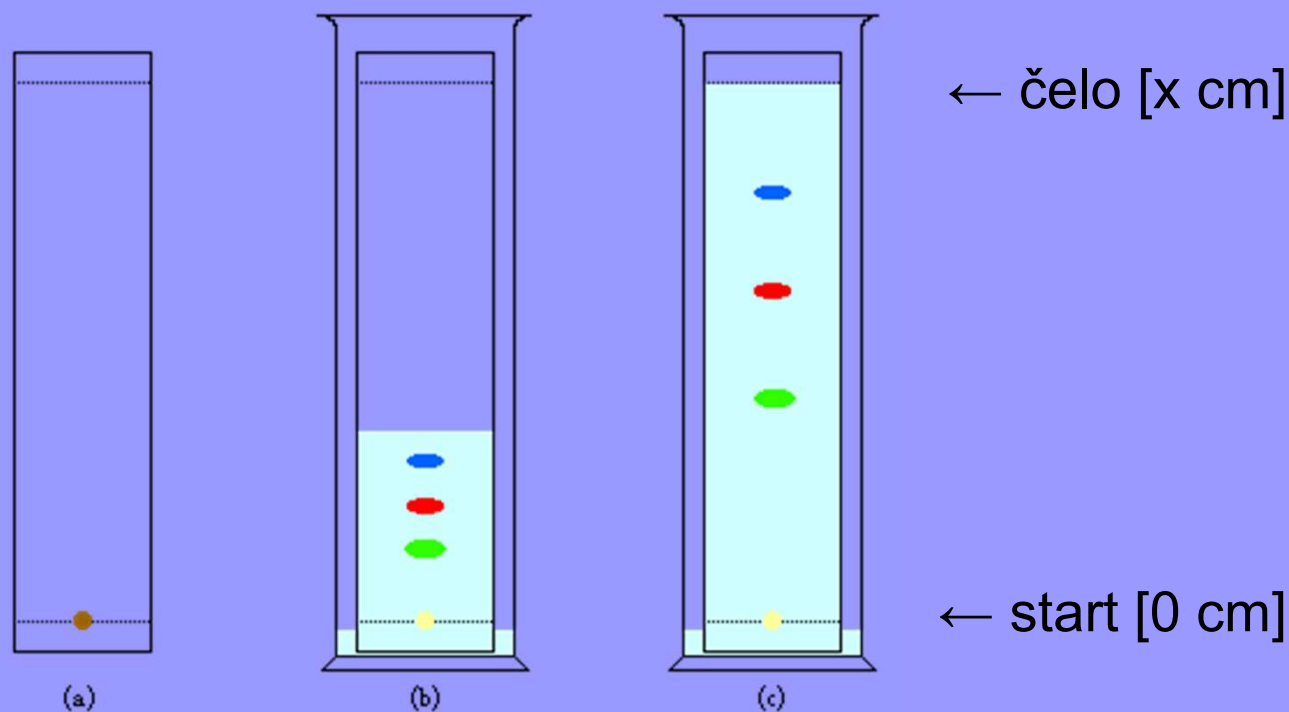


(tenkovrstvá /TLC/, papírová /PC/)

Potřeby:

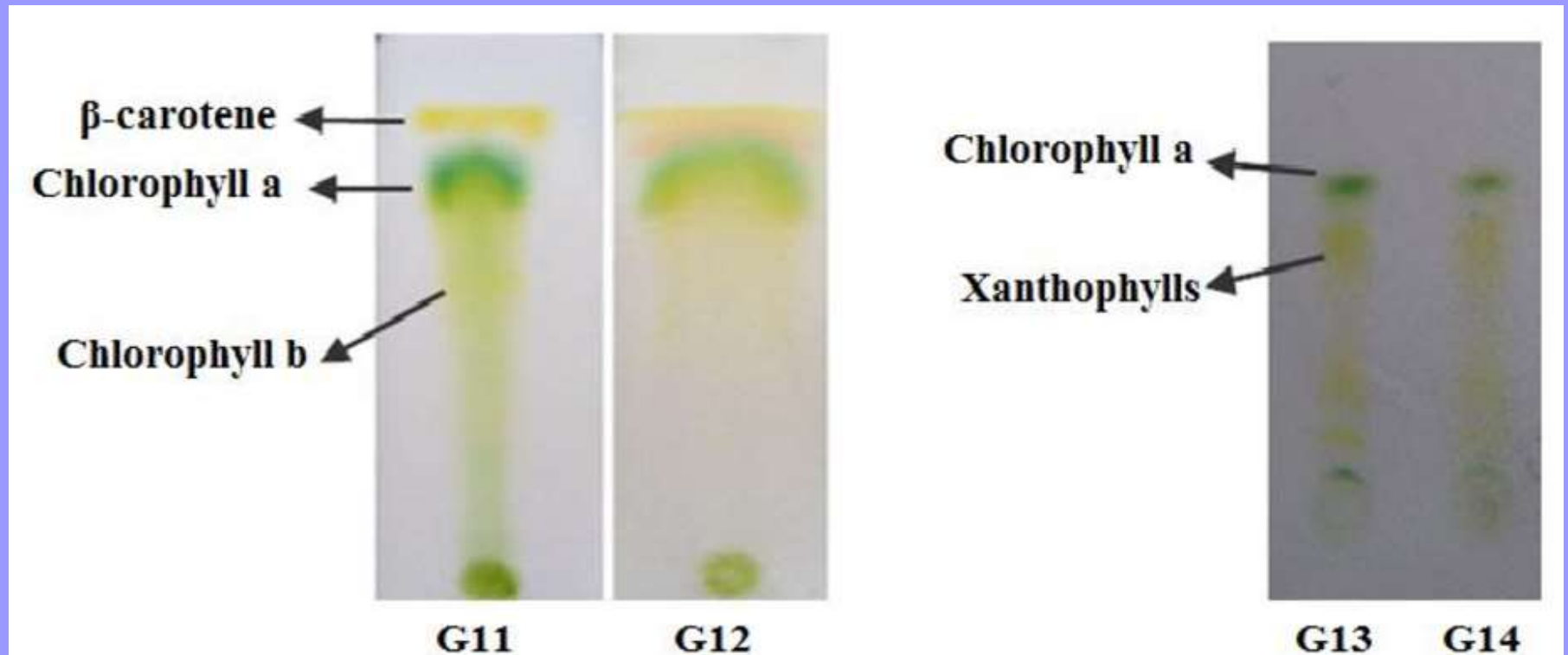
- Vyvíjecí tank (nádobá)
- Stacionární fáze (chromatografické desky, chromatografické papíry)
- Mobilní fáze (voda, organická rozpouštědla)
- Nanášecí zařízení (pipeta, kapilára)
- Detekční činidlo / sušárna / UV lampa

Planární chromatografie



Dělená směs se opatrně nanese na start (a), vyznačený na papíru nebo tenké desce a pomalu se vyvíjí v uzavřené nádobě s rozpouštědlem (mobilní fází). Během vztlínání mobilní fáze dochází k rozdělení směsi na jednotlivé složky (b) a (c)

Planární chromatografie

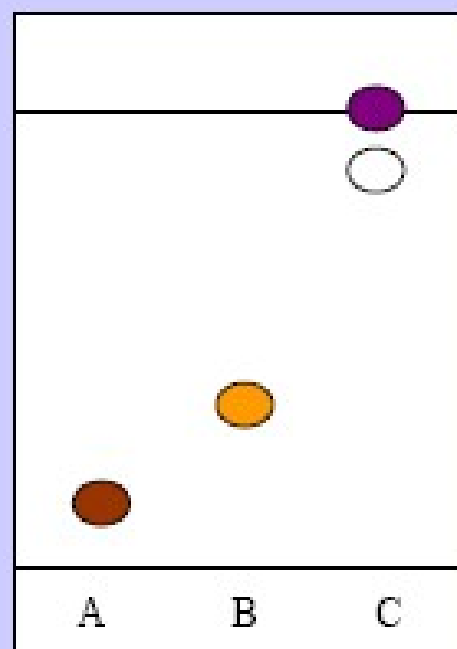


TLC separation of pigments in green algae.

<https://www.semanticscholar.org/paper/SEPARATION-OF-ALGAL-PIGMENTS-BY-THIN-LAYER-%28TLC%29-Sathya/d662d04918cdf8ef9b6eed6ced5c8df01f434c36>

Planární chromatografie

Planární chromatografie – vyhodnocení dat



Retenční faktor:

Vzdálenost od startu ke
středu skvrny
Vzdálenost start-cíl

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

R_B

$$R_F(A) = 0.14$$

$$R_F(B) = 0.33$$

$$R_F(C_1) = 0.84$$

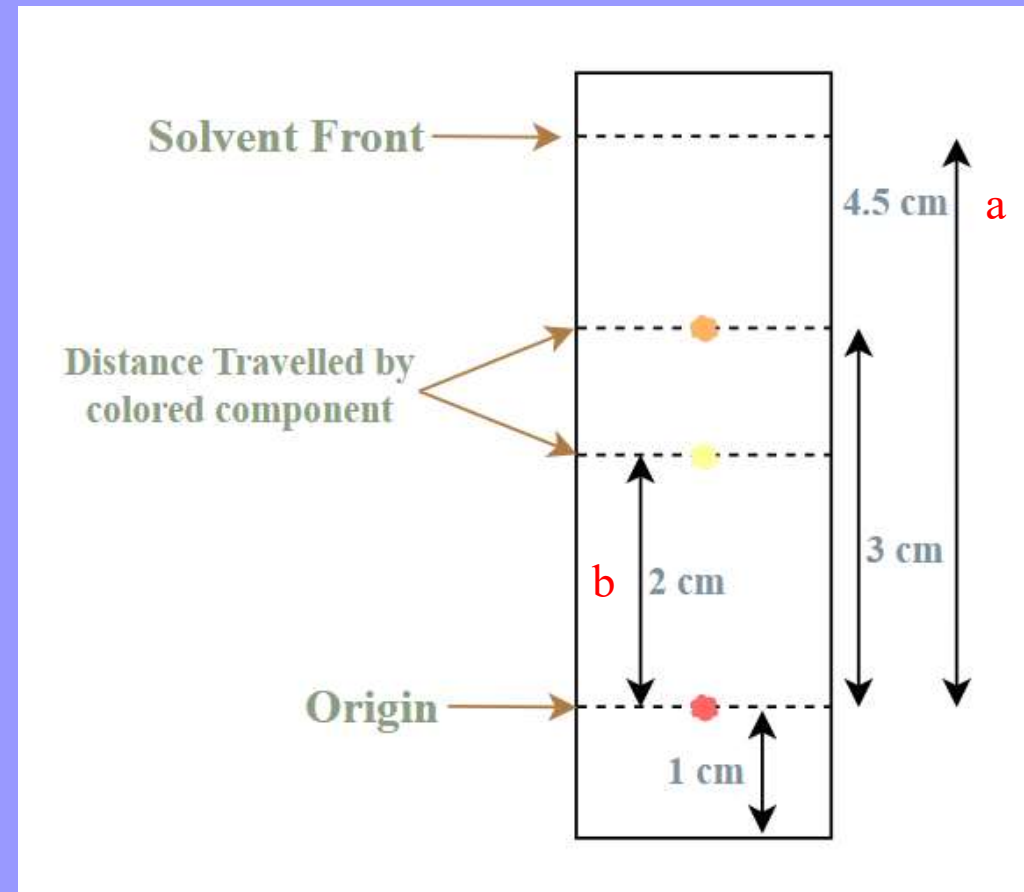
$$R_F(C_2) = 1.00$$

Planární chromatografie

Kvalita: retenční faktor R_F :

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

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

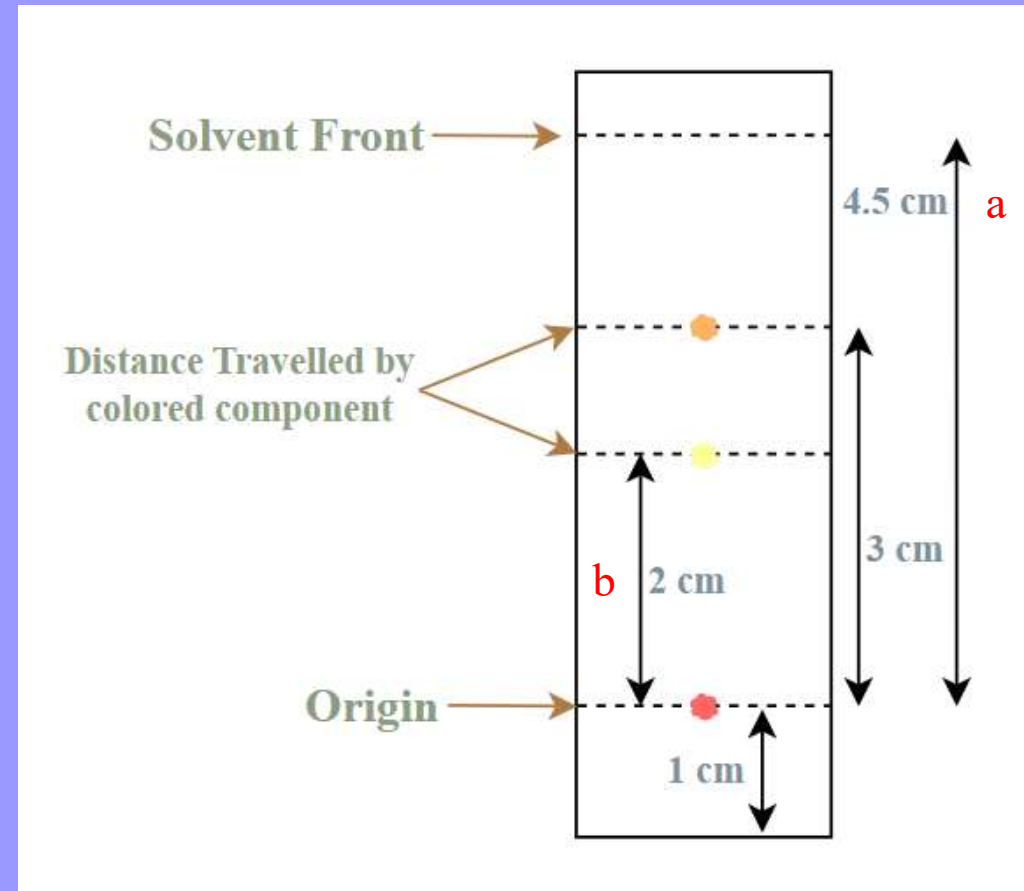
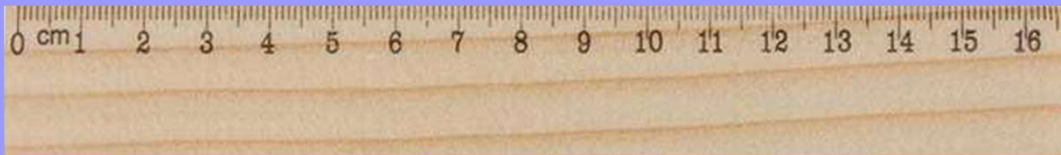


Planární chromatografie

Kvalita: retenční faktor R_F :

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

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

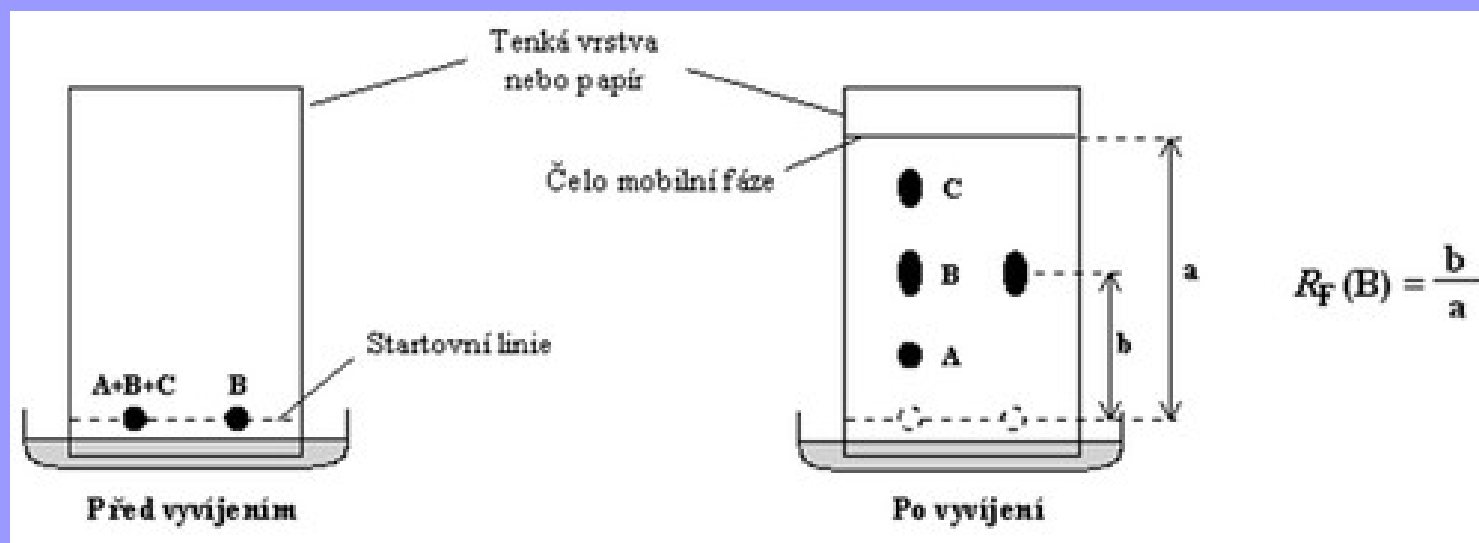


<https://www.geeksforgeeks.org/retention-factor-formula/>

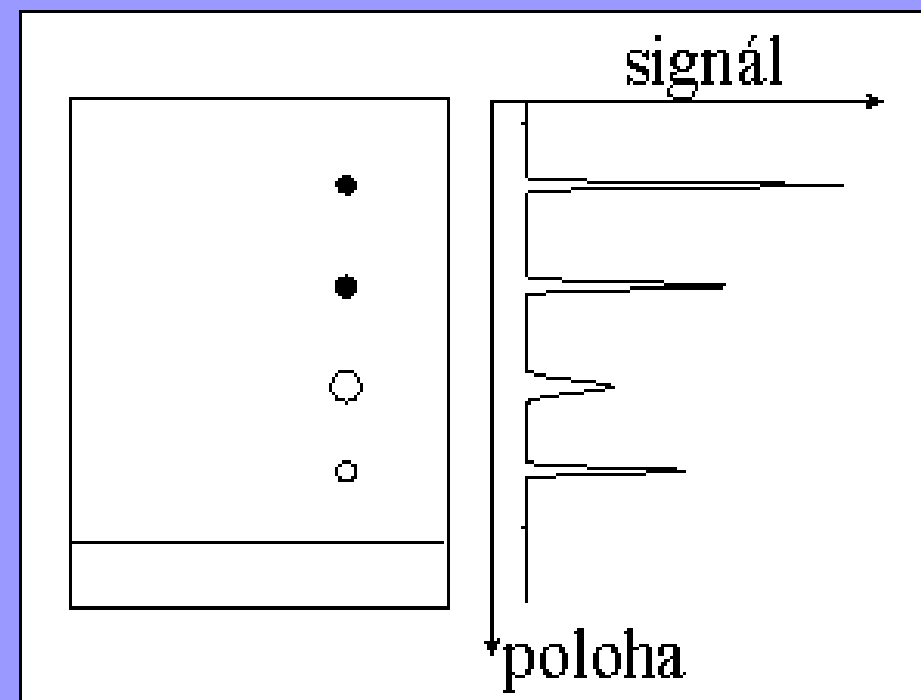
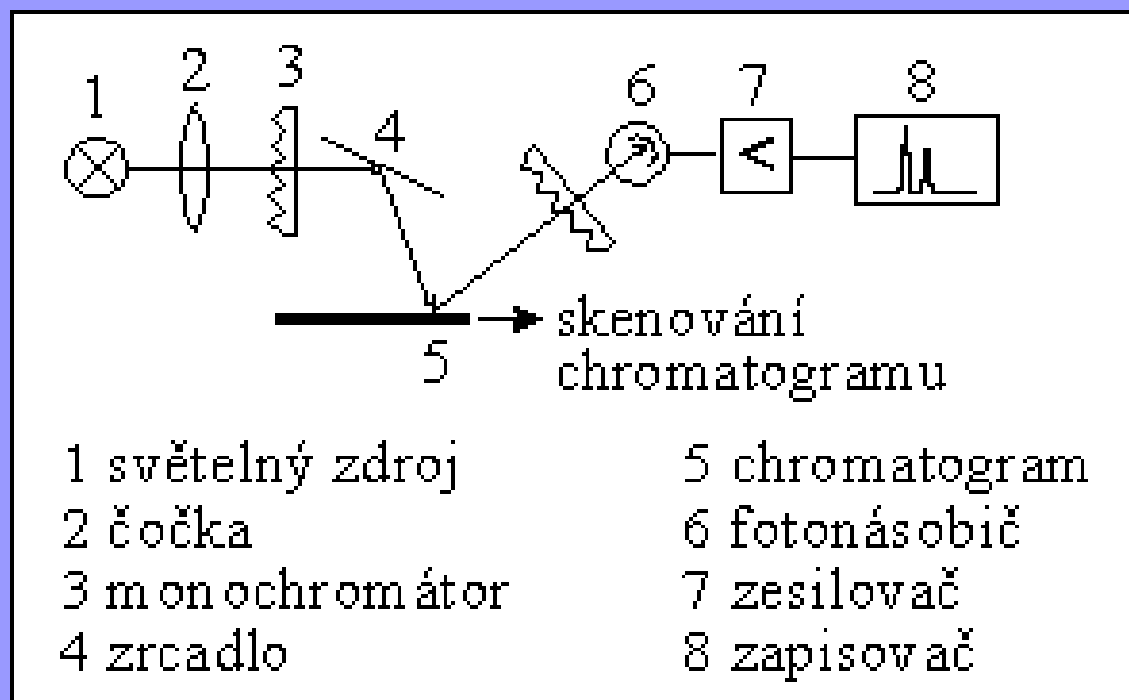
Planární chromatografie

Nejběžnější stacionární fáze:
Papír, Celulóza, Silikagel, C-18 reverzní fáze, Polyamid

Nejběžnější mobilní fáze:
Směsi organických rozpouštědel s vodou, často je nutné adjustované pH

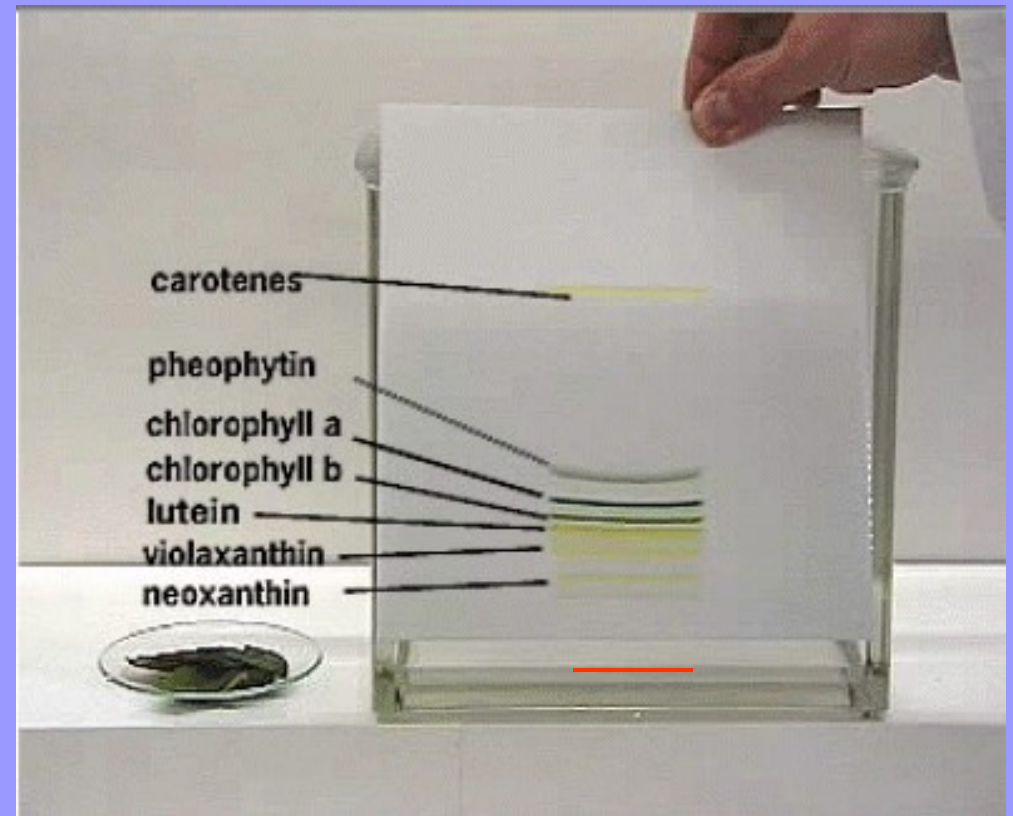
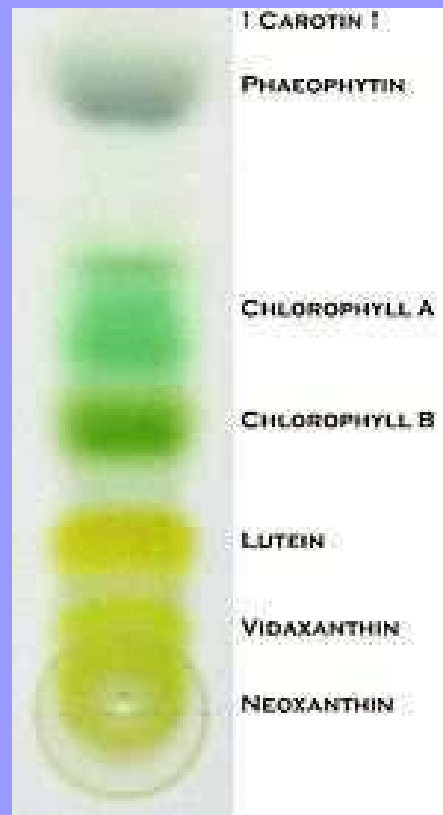


Planární chromatografie



Planární chromatografie – vyhodnocení dat (kvantita)

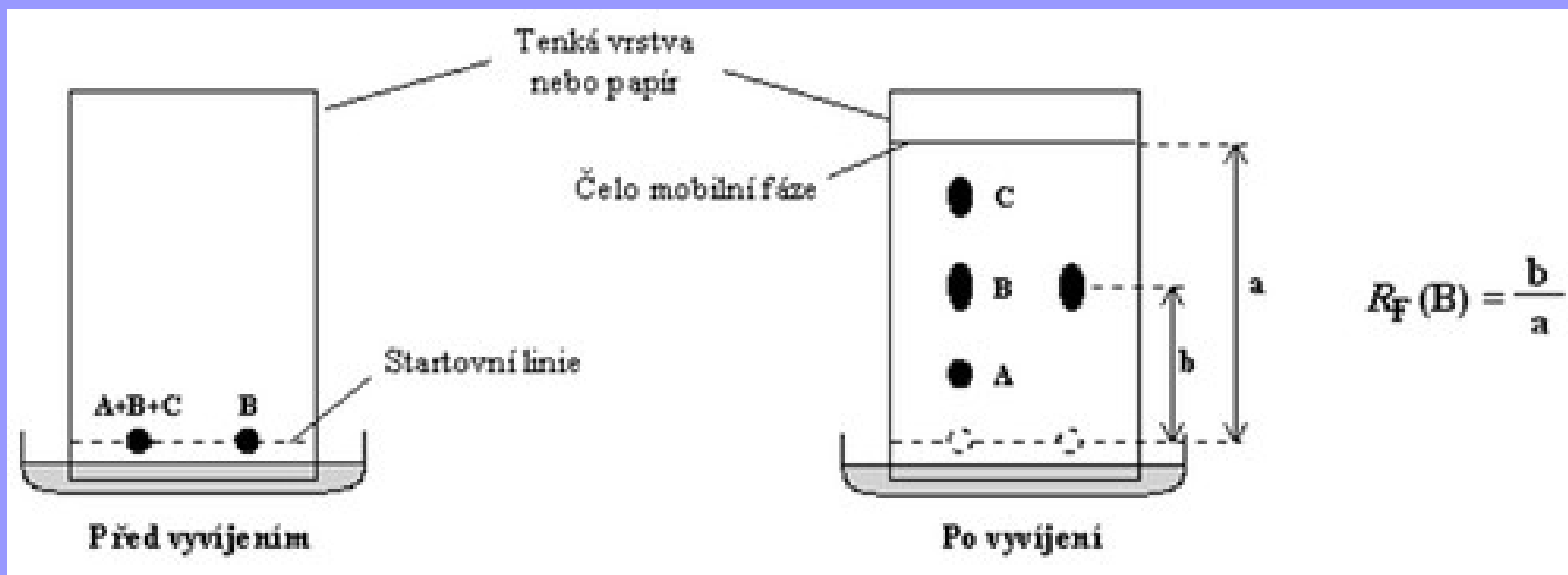
Planární chromatografie



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

https://is.muni.cz/el/sci/jaro2018/C7640/um/18_IA_tenkovrstva__chromatografie__TLC__navod.pdf

Planární chromatografie – identifikace látek porovnáním se standardem



Porovnání směsi látek se standardem při TLC/PC

Planární chromatografie – TLC, PC

(tenkovrstvá /TLC/, papírová /PC/)

Potřeby:

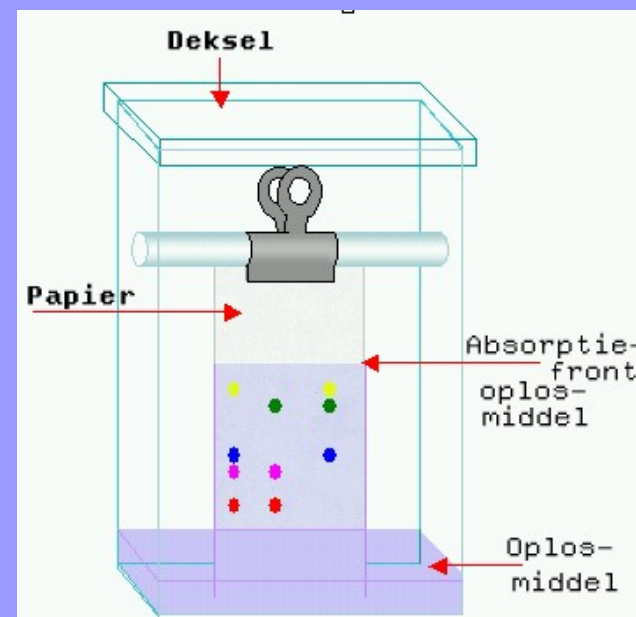
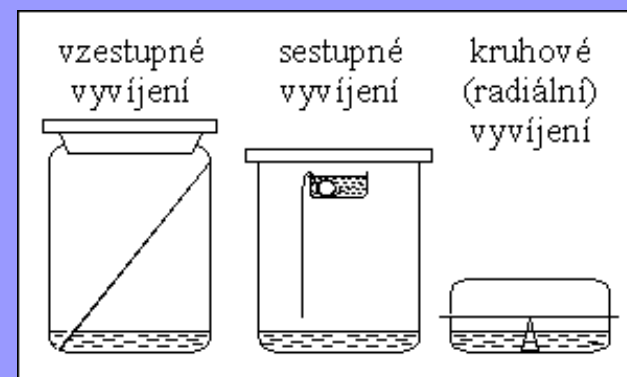
Vyvíjecí tank (nádoba)

Stacionární fáze (chromatografické desky,
chromatografické papíry)

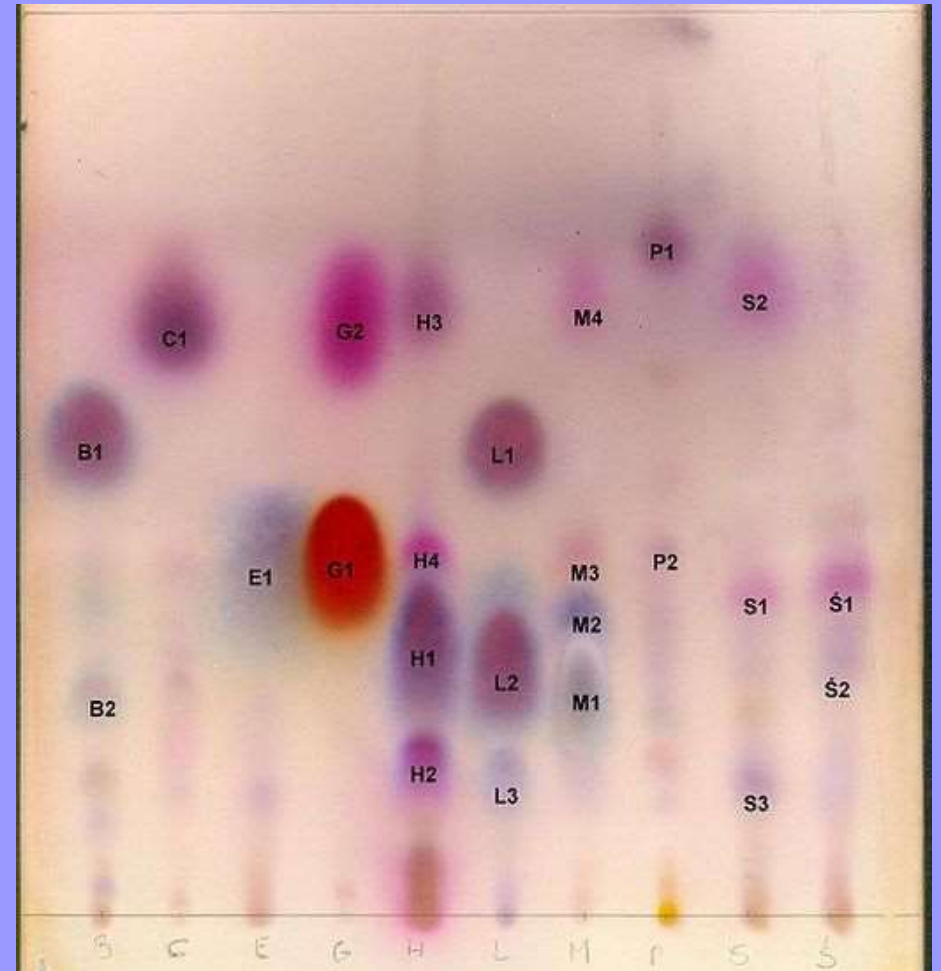
Mobilní fáze (voda, organická rozpouštědla)

Nanášecí zařízení (pipeta, kapilára)

Detekční činidlo / sušárna / UV lampa

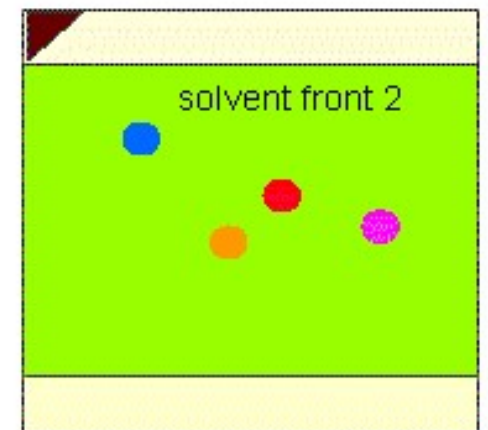
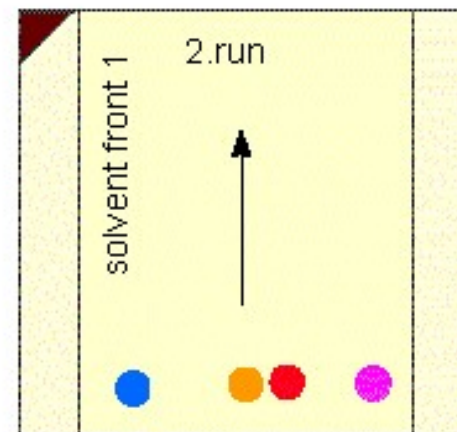
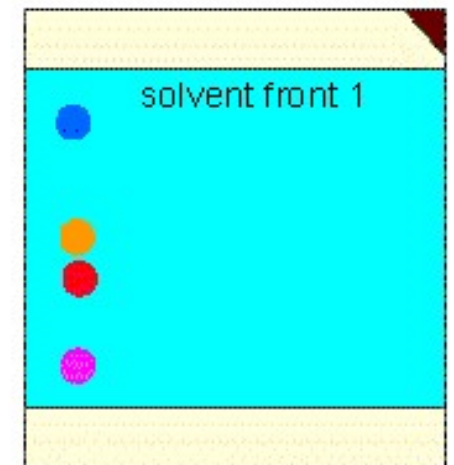
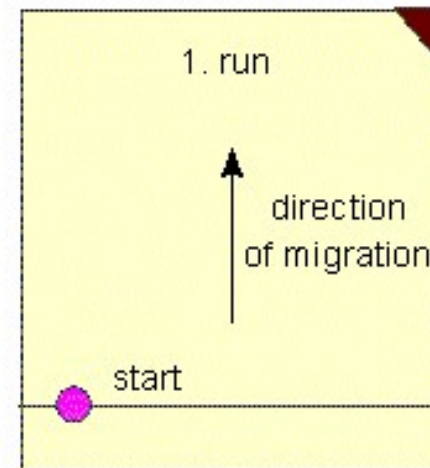


Planární chromatografie – TLC

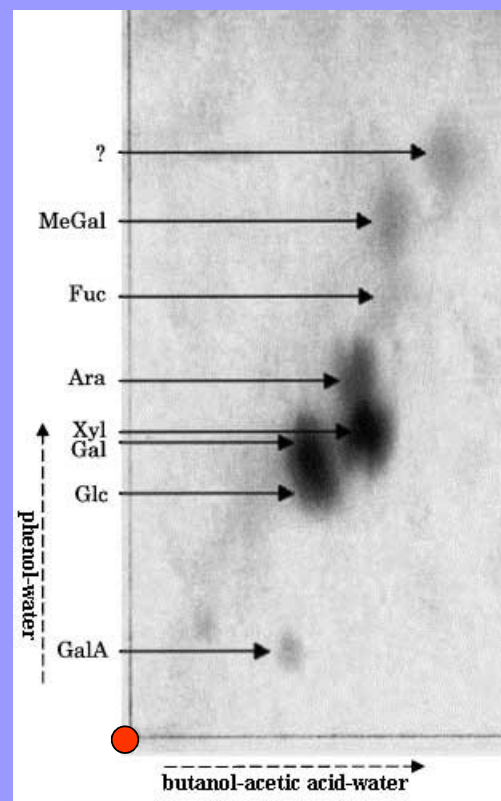


The scan of TLC plate (silica gel G) with 10 essential oils developed with mobile phase toluene - ethyl acetate (93:7 v/v), next sprayed with vanillin in H₂SO₄ and heated. From left to right oils from: bergamot, cedar, eucalyptus, syzygium, lavandula, mint, orange, pine, spruce. Identified components: 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 2D



Planární chromatografie 2D



„Dvoj-dimenzionální“ technika dělení cukrů z plavuně (start vpravo dole)

Kolonová chromatografie

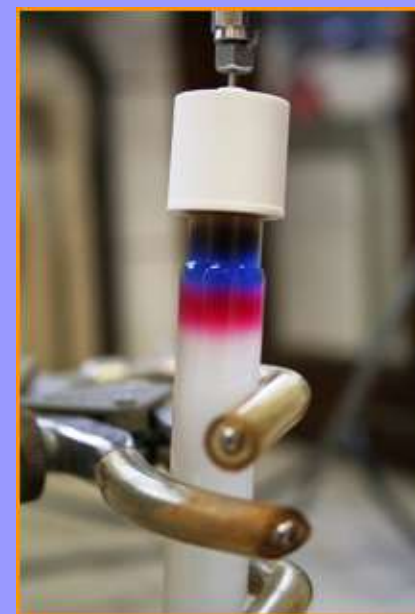


Dělení neprobíhá v plošném uspořádání, ale na
různě dlouhé (**náplňové**) koloně

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)

Kolonová chromatografie – LC



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 – LC



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



Kolonová chromatografie

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

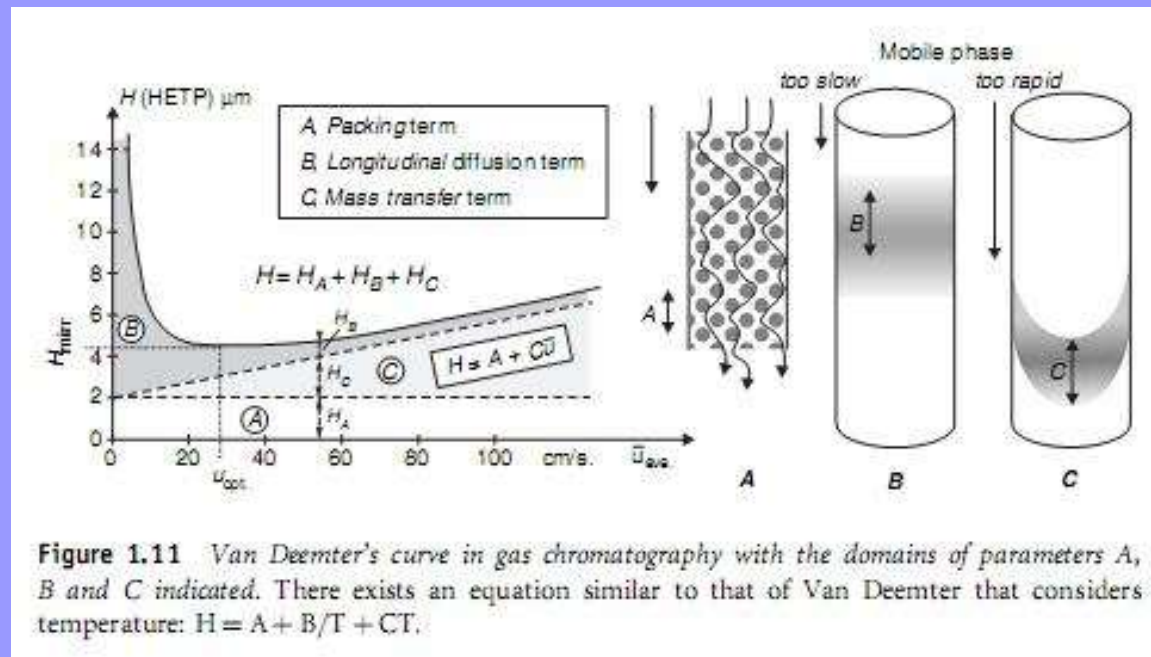
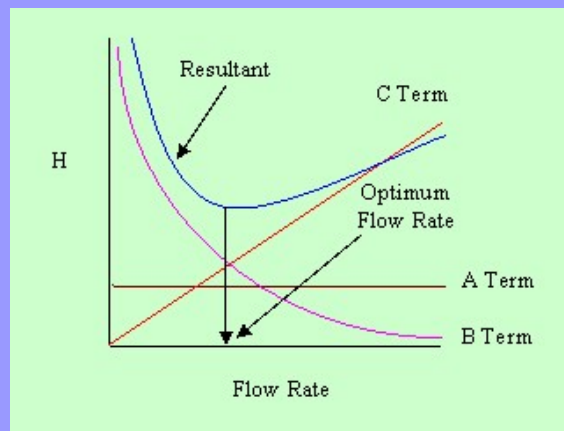


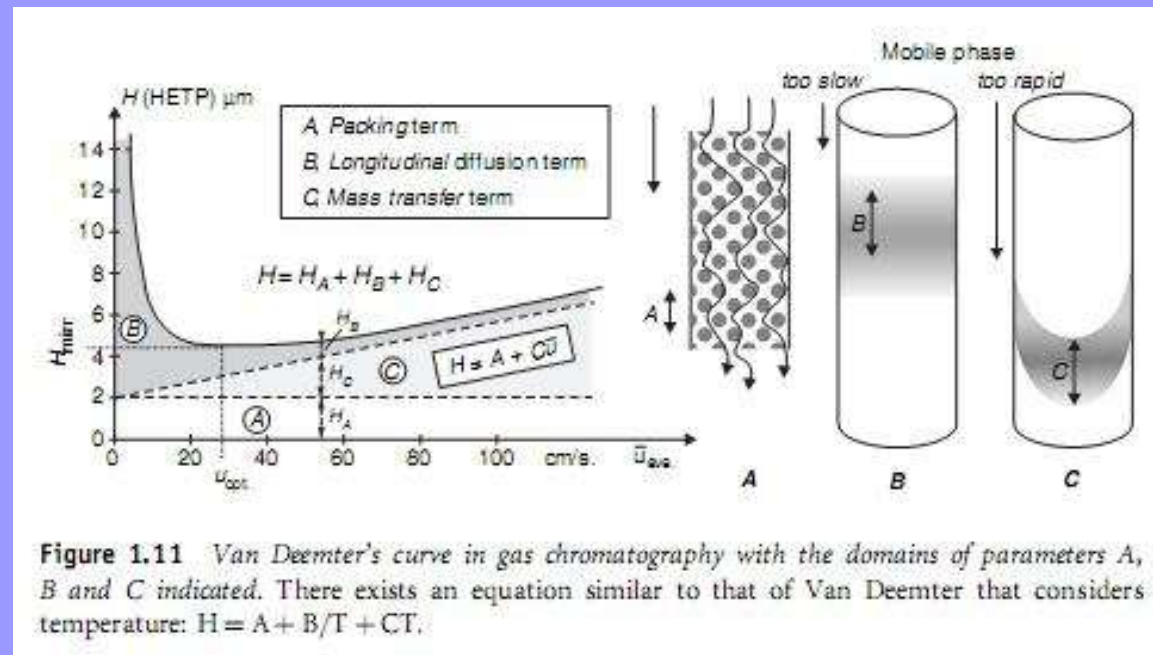
Figure 1.11 Van Deemter's curve in gas chromatography with the domains of parameters A, B and C indicated. There exists an equation similar to that of Van Deemter that considers temperature: $H = A + B/T + CT$.

Van Deemterova rovnice: hledání optimální průtokové rychlosti v daném uspořádání

Kolonová chromatografie



Jan Jozef van Deemter
(31 March 1918 – 10 October 2004)



Van Deemterova rovnice: hledání optimální průtokové rychlosti v daném uspořádání

Kolonová chromatografie – LC

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)

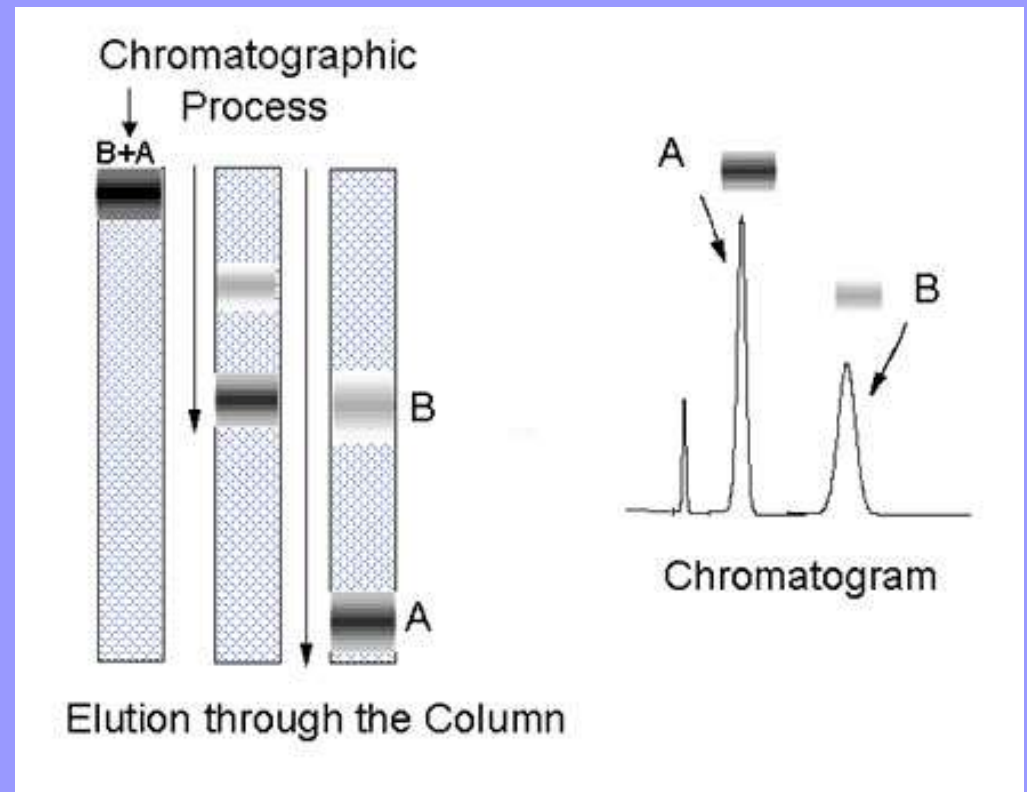
MS (detektor na principu hmotnostního spektrometru)

RI (refraktometrický detektor)

CD (elektrochemický detektor)



Kolonová chromatografie – LC



Kolonová chromatografie – získávání dat

Kolonová chromatografie – HPLC

Rok	Typ	Velikost μm	Počet pater/15 cm (přibližně)
1950	 Nepravidelný tvar	100	100
1967	 Sklo	50 (Porézní povrch)	1,000
1972		10	6,000
1982		5	12,000
1992		3.0-3.5	22,000
1998		1.5-2.0 (Neporézní)	30,000
1999		5.0 (Porézní povrch)	8,000
2000		2.5	25,000
2003		1.8	32,500
2007/2008		2.7 (Porézní povrch)	32,000

Kolonová chromatografie – HPLC

HPLC = high pressure (performance) liquid chromatography

Potřeby: kapalinový chromatograf



Základní součásti

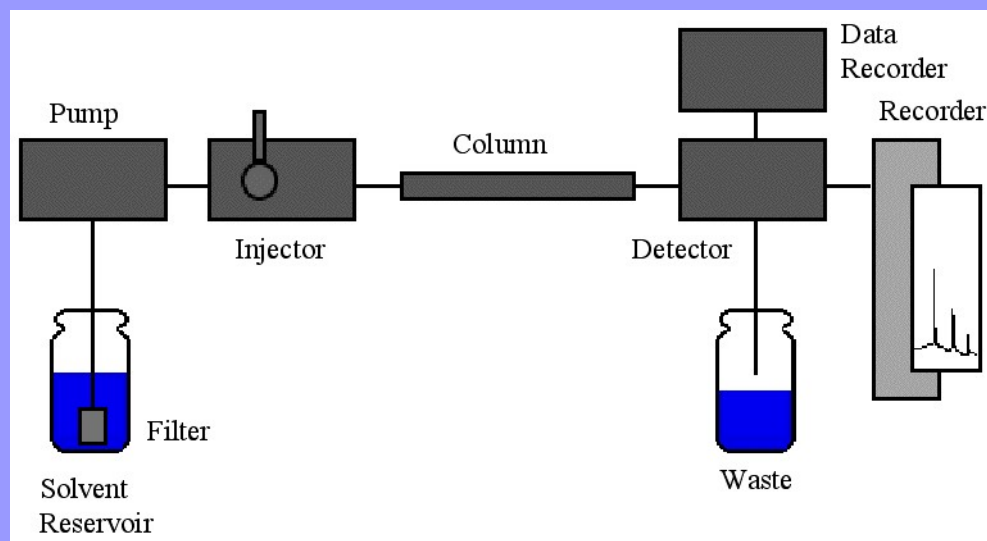
Rezervoár mobilní fáze

a vysokotlaká pumpa s mixérem

Dávkovací zařízení

Kolona a termostat

Detekční zařízení



Kolonová chromatografie – HPLC



Kolonová chromatografie – HPLC

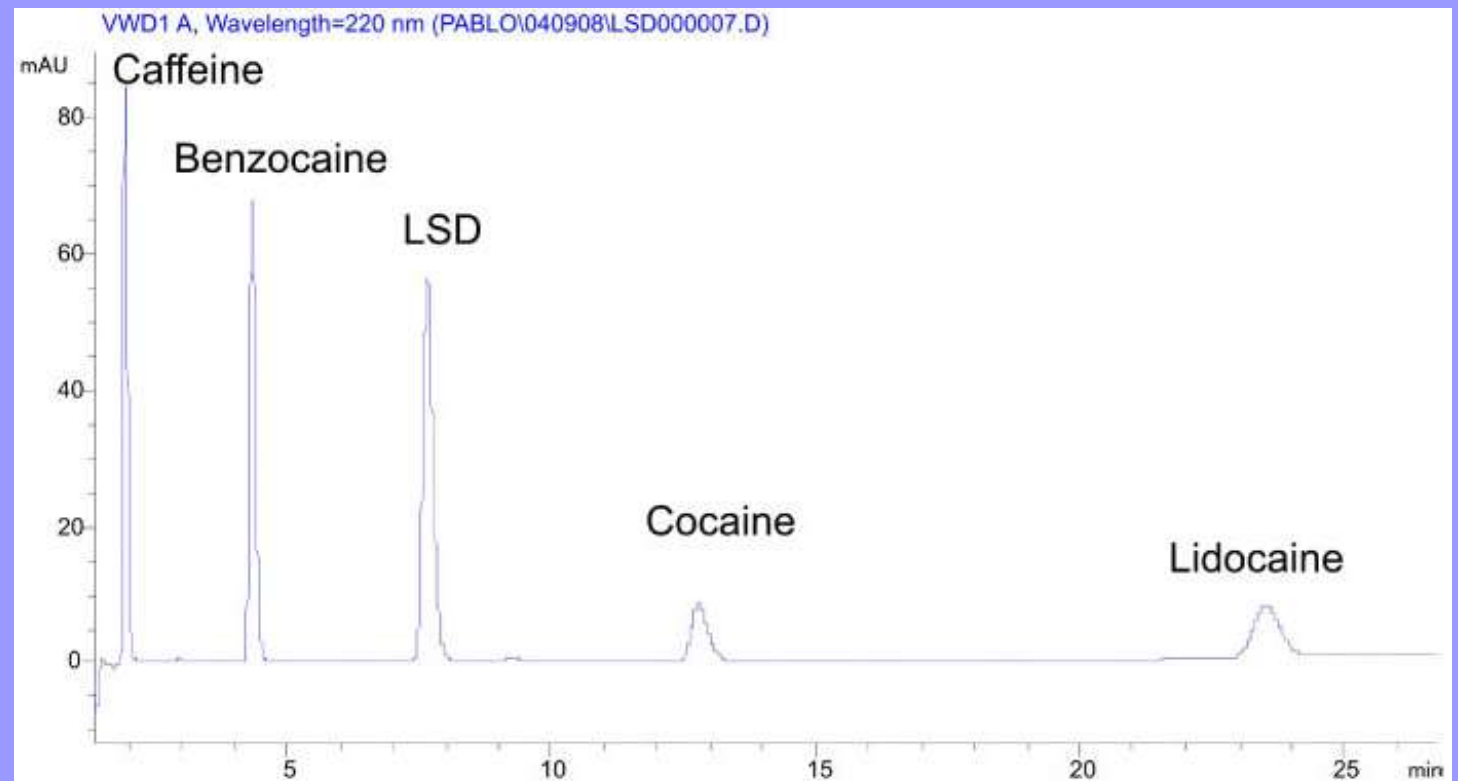
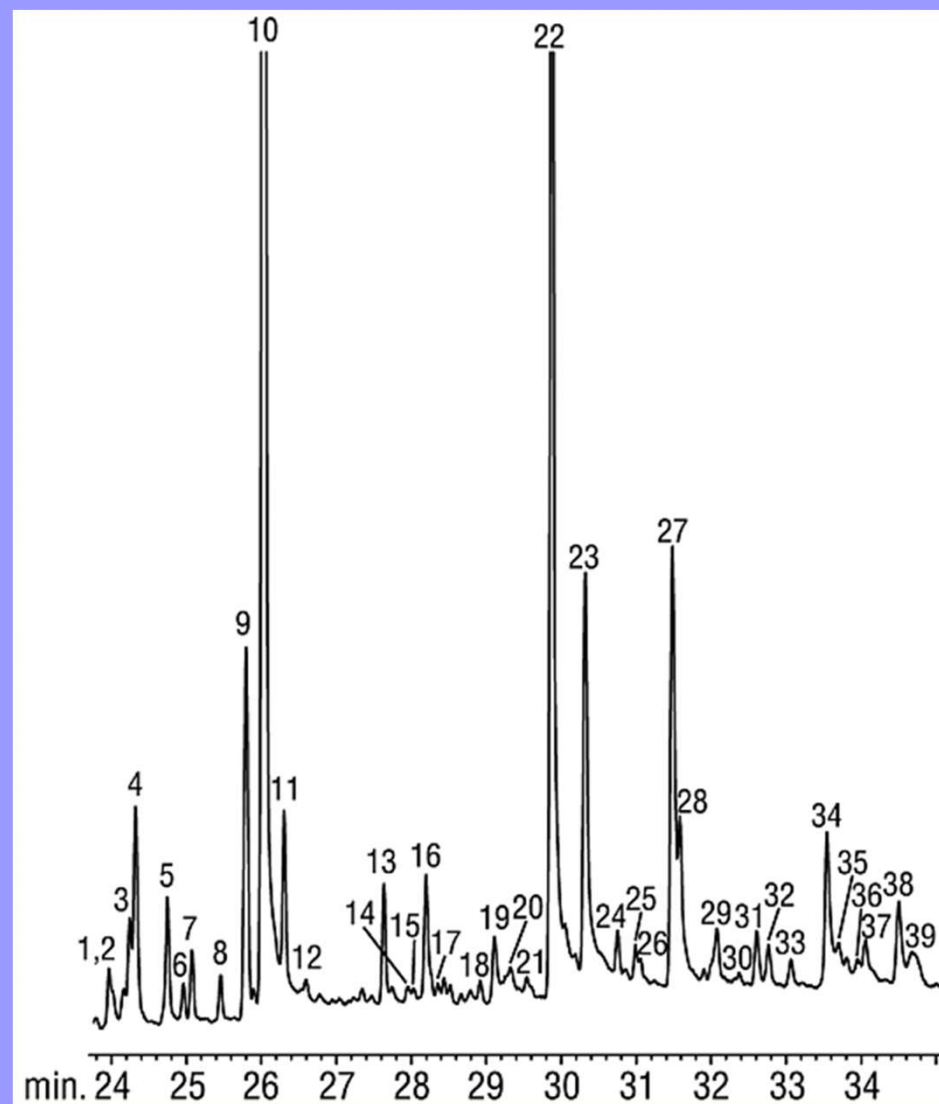


FIGURE 6 - Chromatogram obtained after injection of standards of caffeine ($t_r = 1.92$ min), benzocaine ($t_r = 4.33$ min), LSD ($t_r = 7.64$ min), cocaine ($t_r = 12.77$ min) and lidocaine ($t_r = 23.51$ min).

Kolonová chromatografie – HPLC



HPLC separace základních aromatických složek whisky

Kolonová chromatografie – HPLC

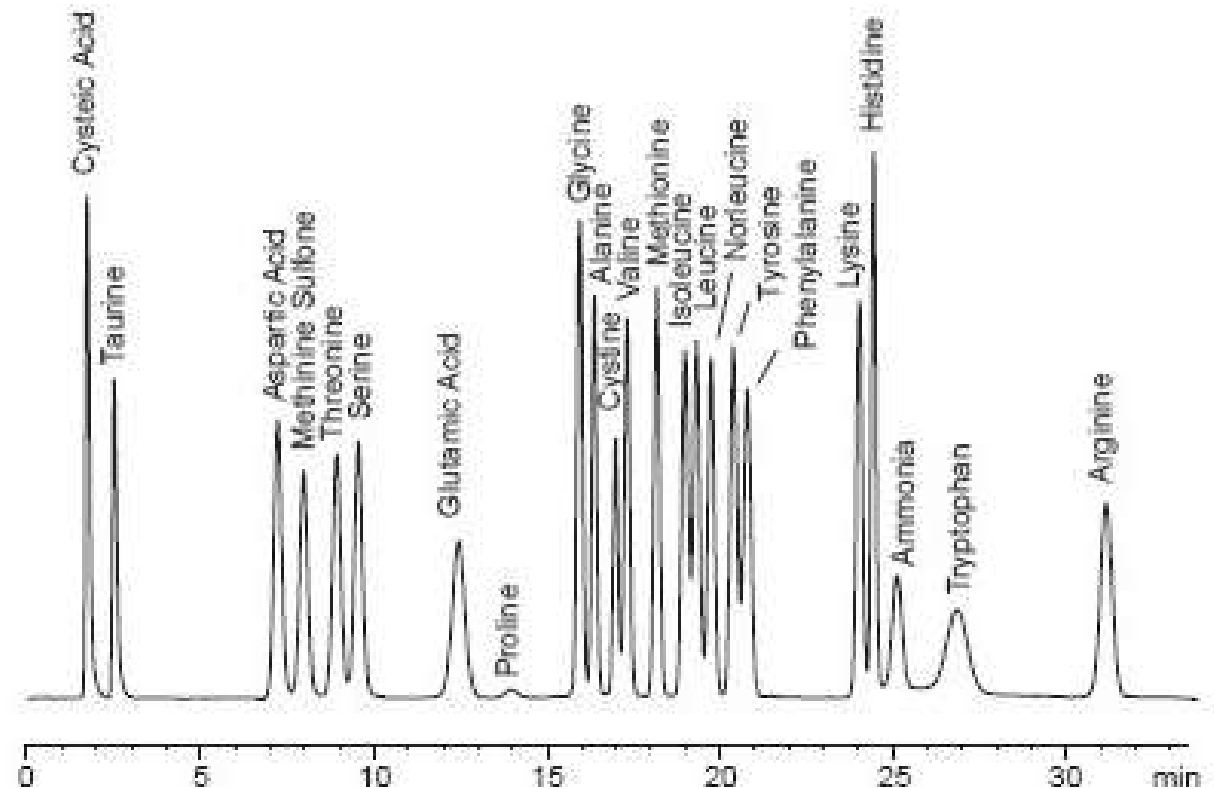
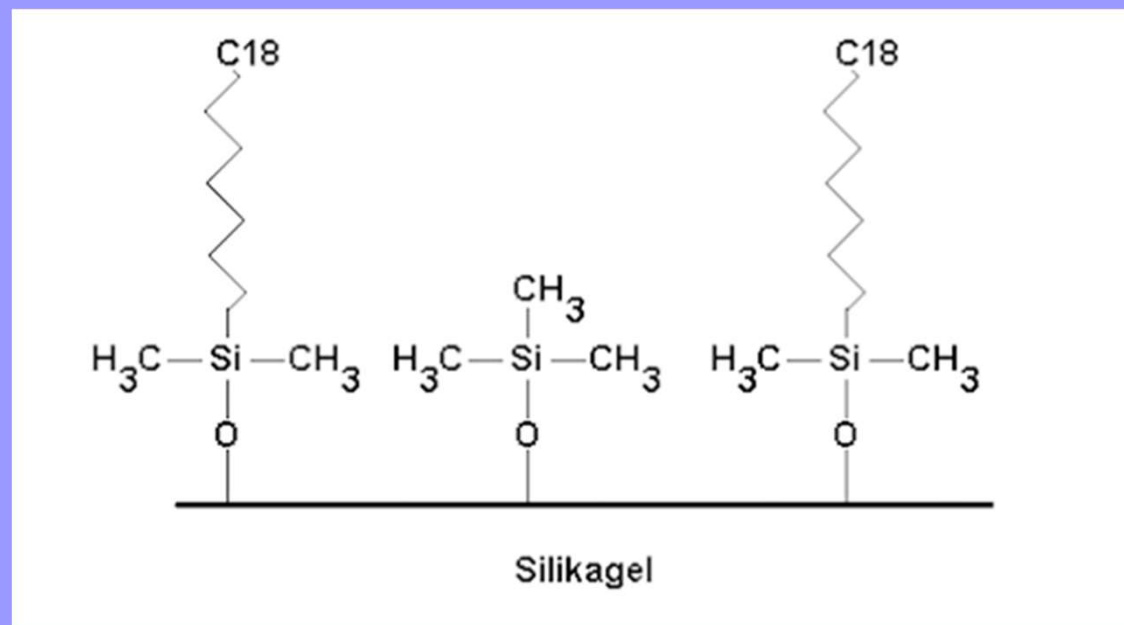


Fig 1. Amino Acid standard. Eluants: Na270, Na740, RG011, column 1154110T, temperature gradient from 50 °C to 70 °C.

HPLC separace aminokyselin

Kolonová chromatografie – HPLC



Běžné náplňové kolony užívané při HPLC:

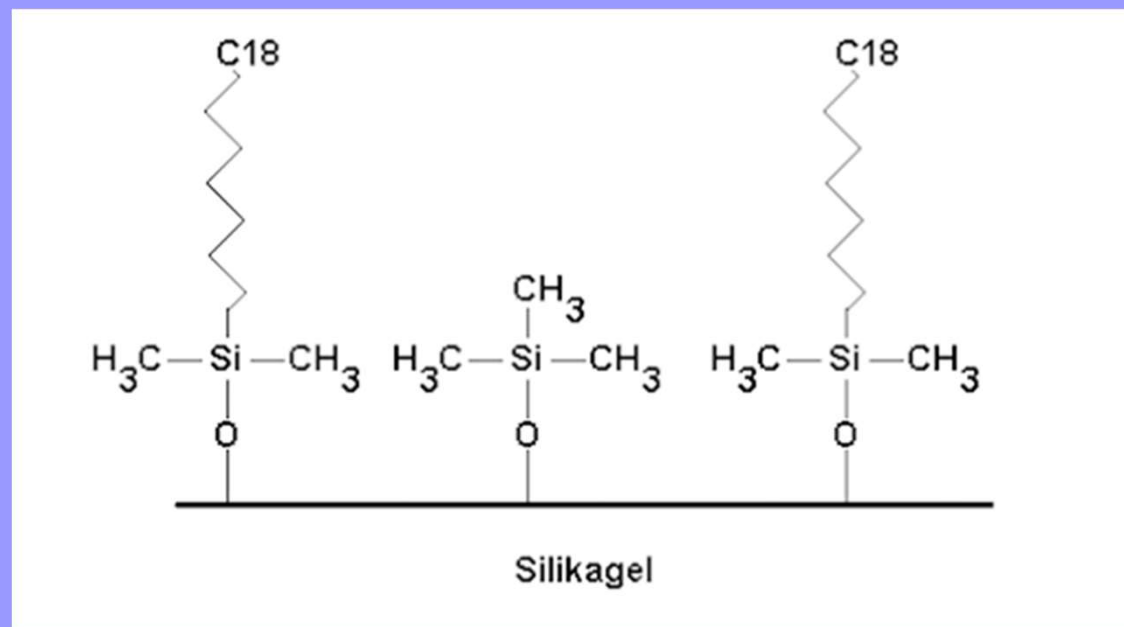
Silikagelové (normální fáze) polární

Modifikovaný silikagel C18, tzv. reverzní fáze – nepolární

Speciální

Modifikovaný silikagel, tzv. aminofáze NH₂, tzv. nitrilová CN
lontoměniče

Kolonová chromatografie – HPLC



Běžné náplňové kolony užívané při HPLC:

Silikagelové (normální fáze)

polární

Modifikovaný silikagel C18, tzv. **reverzní fáze** – nepolární

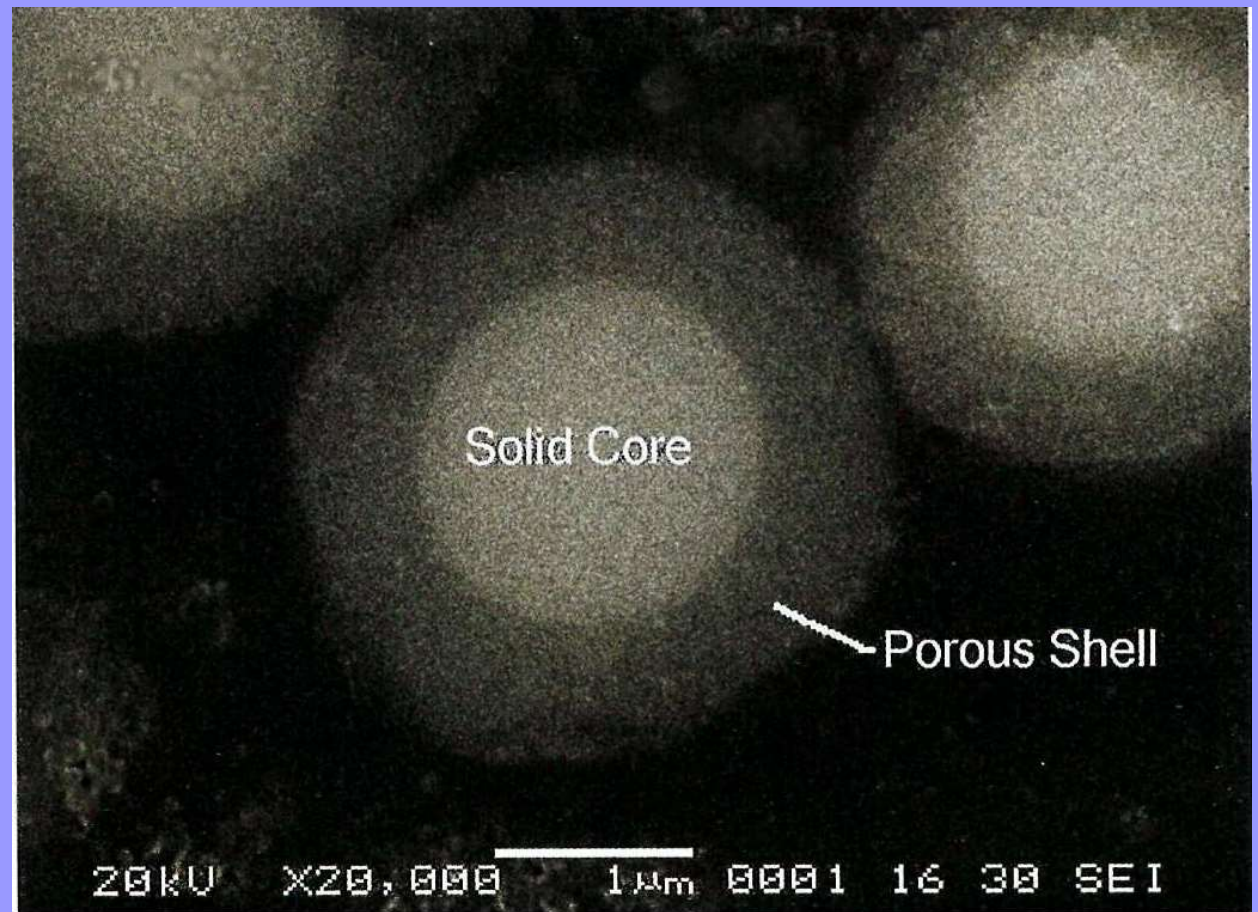
Speciální

Modifikovaný silikagel, tzv. aminofáze NH₂, tzv. nitrilová CN
lontoměniče

Kolonová chromatografie – HPLC



<https://www.joom.com/cs/products/>



Kolonová 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)

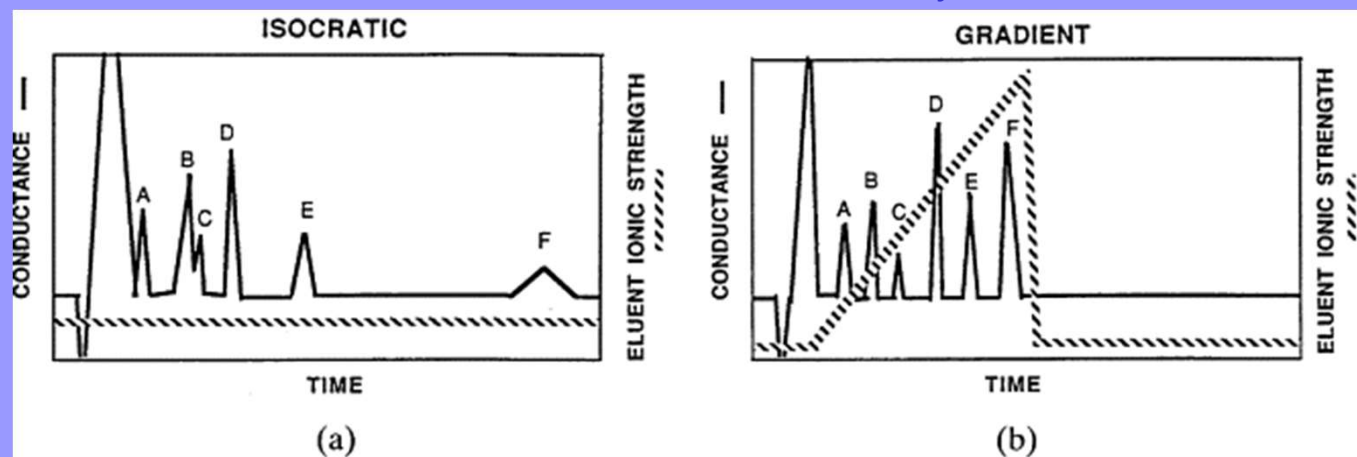
Isokratický režim

složení mobilní fáze je stále stejné

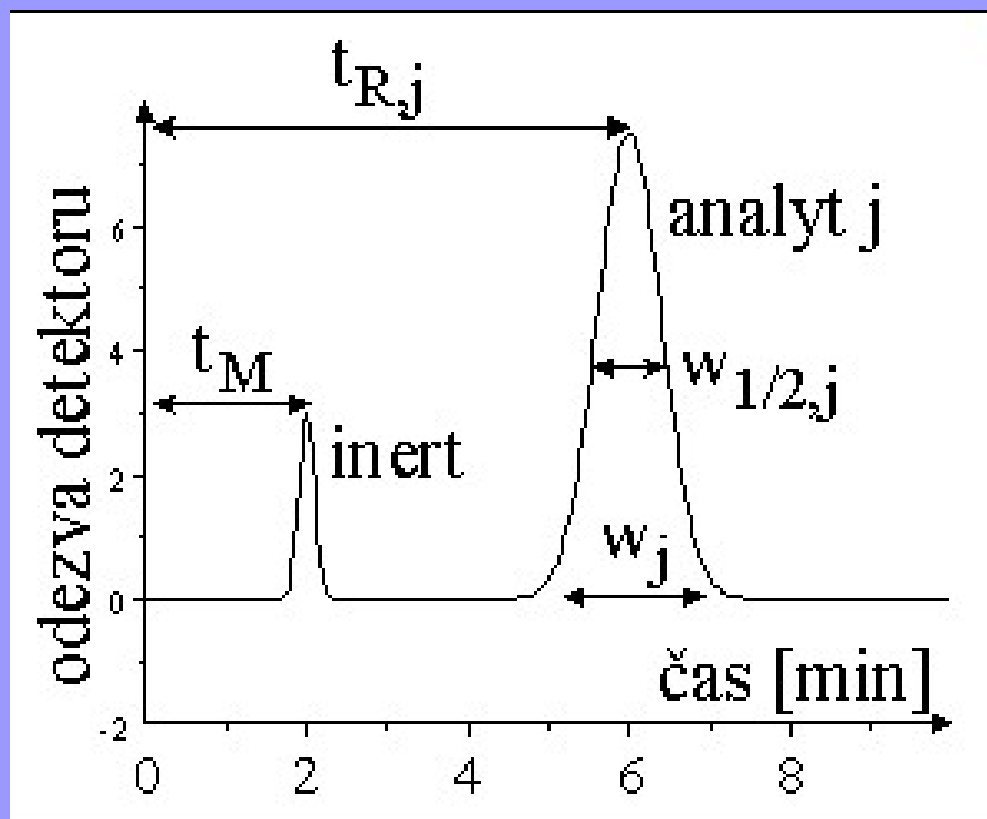
Gradientový režim

složení mobilní fáze se v průběhu analýzy mění

například 0 min 100% vody 0% MeOH
10 min 10% vody 90% MeOH

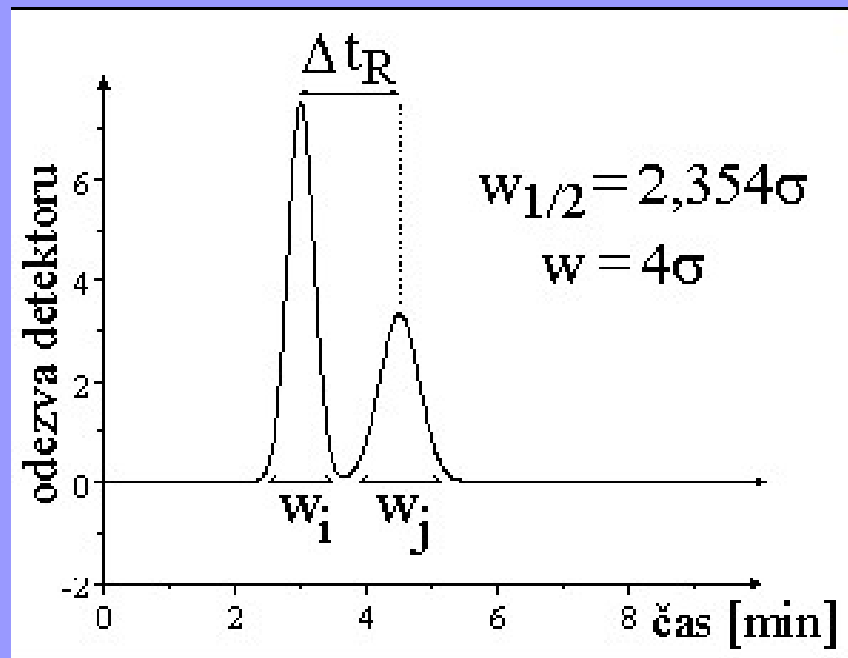


Kolonová chromatografie – HPLC



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

Kolonová chromatografie – HPLC



Rozlišení píků (vzdálenost maxim)

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

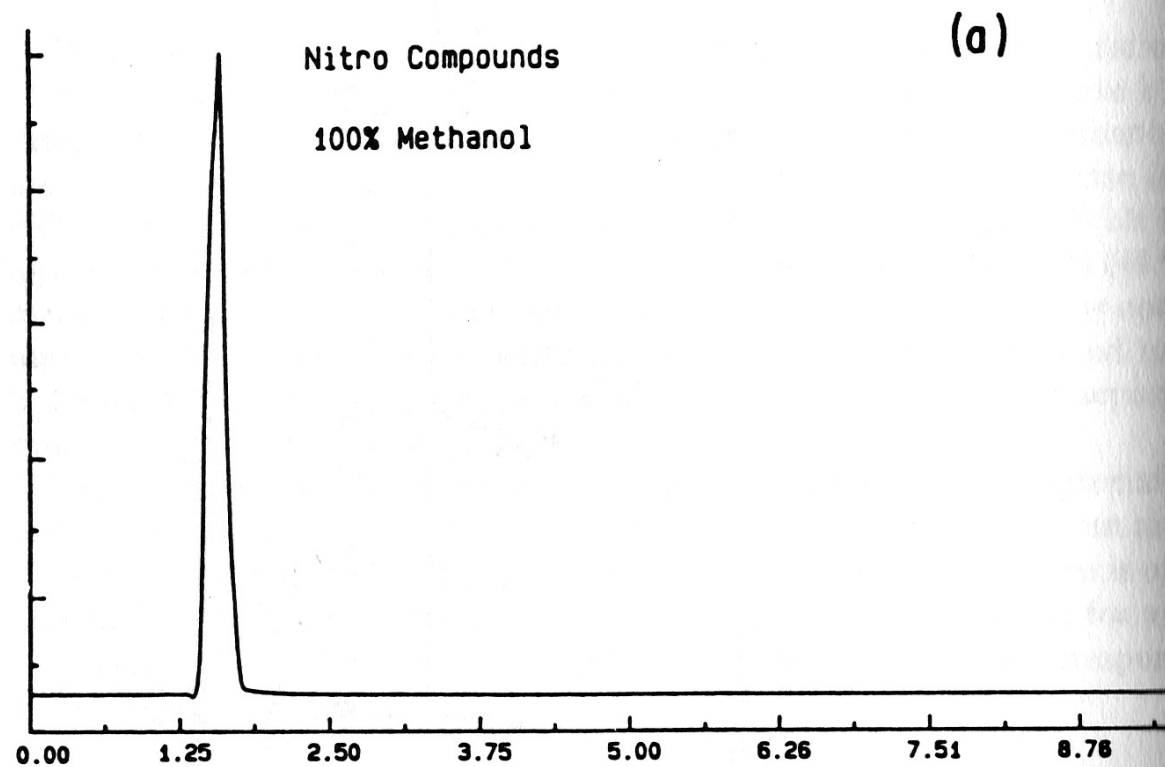
Rozlišení lze ovlivnit:

Volbou stacionární a mobilní fáze

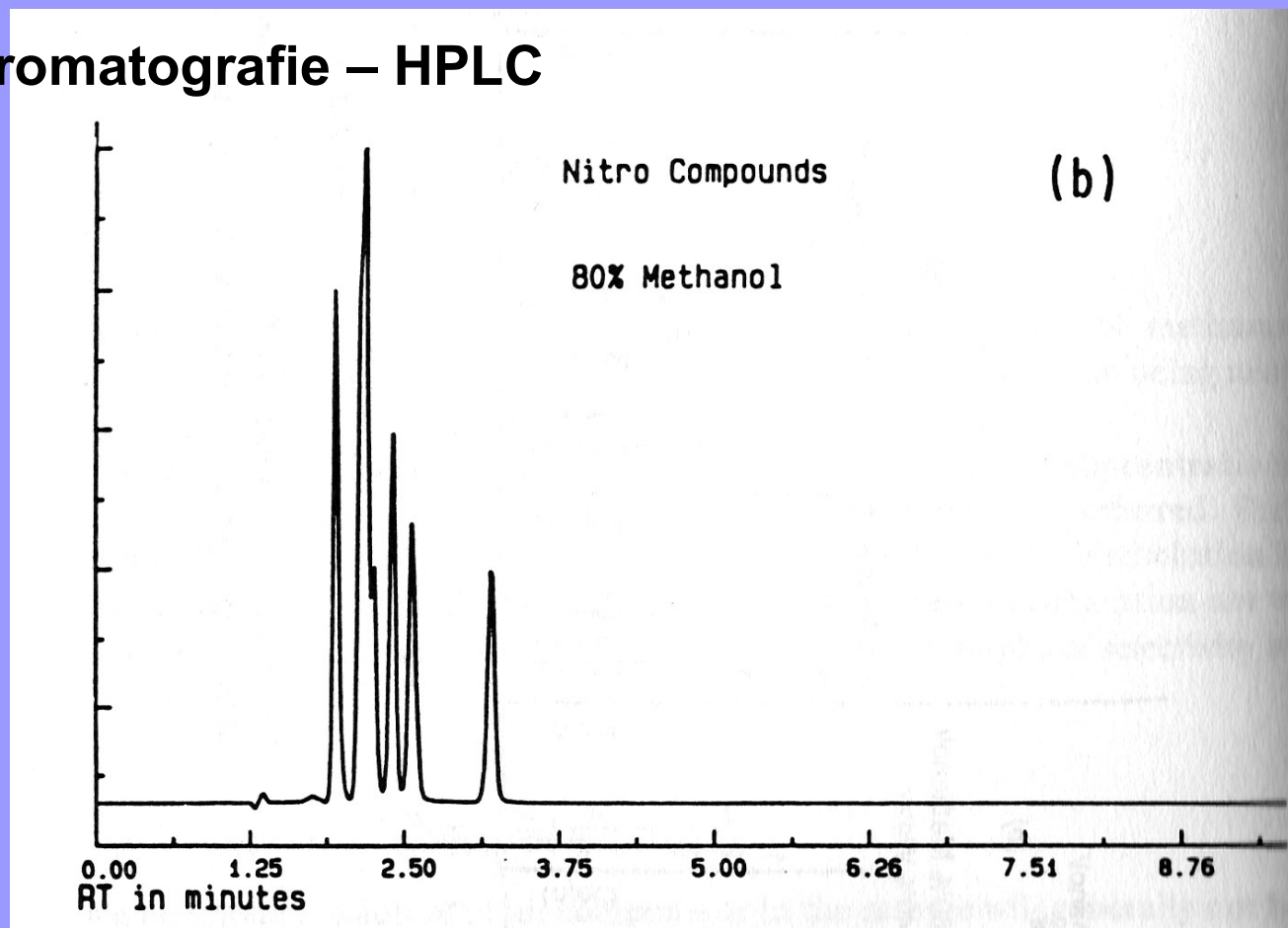
Teplotou, průtokovou rychlostí

Isokratickým / gradientovým uspořádáním

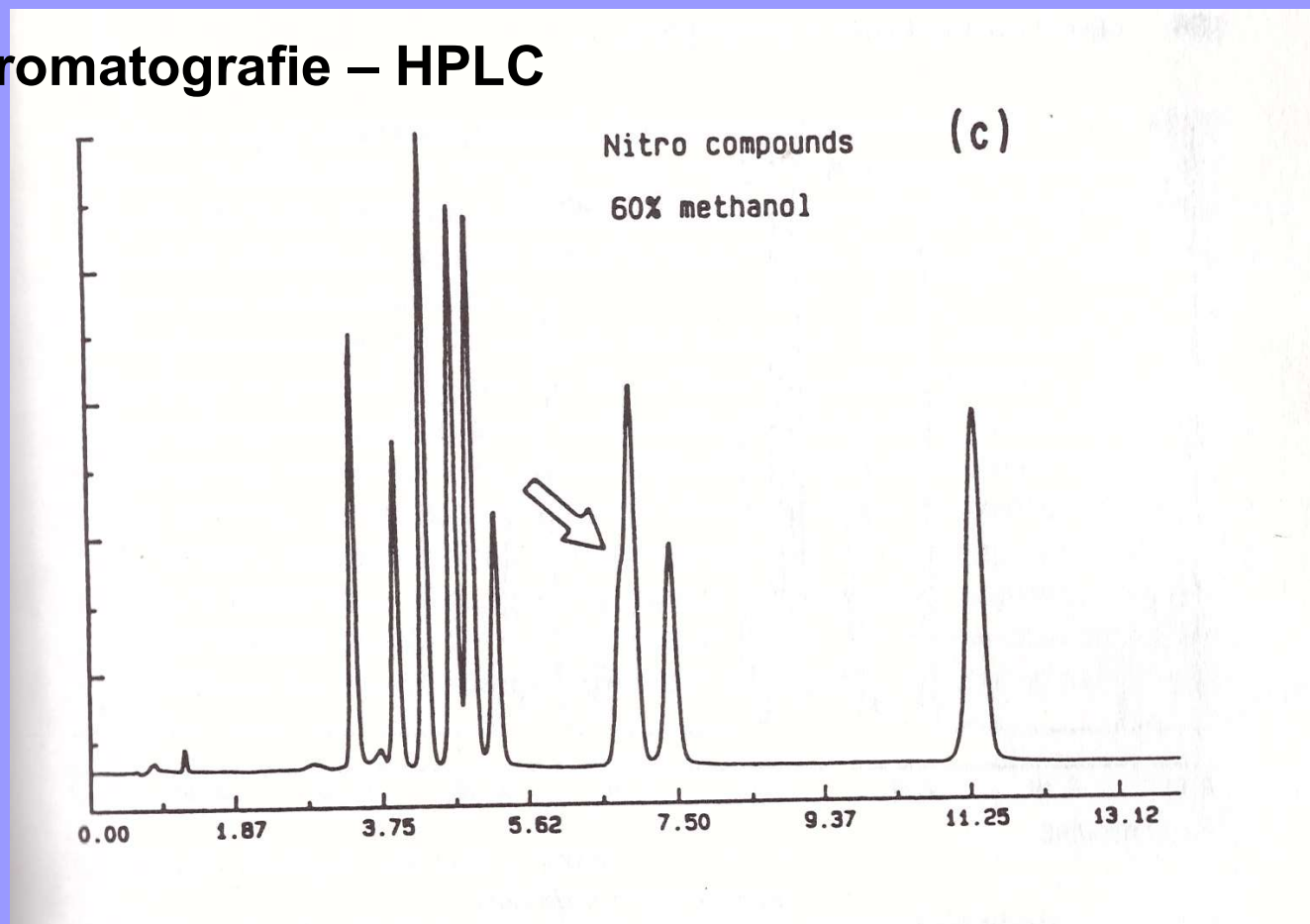
Kolonová chromatografie – HPLC



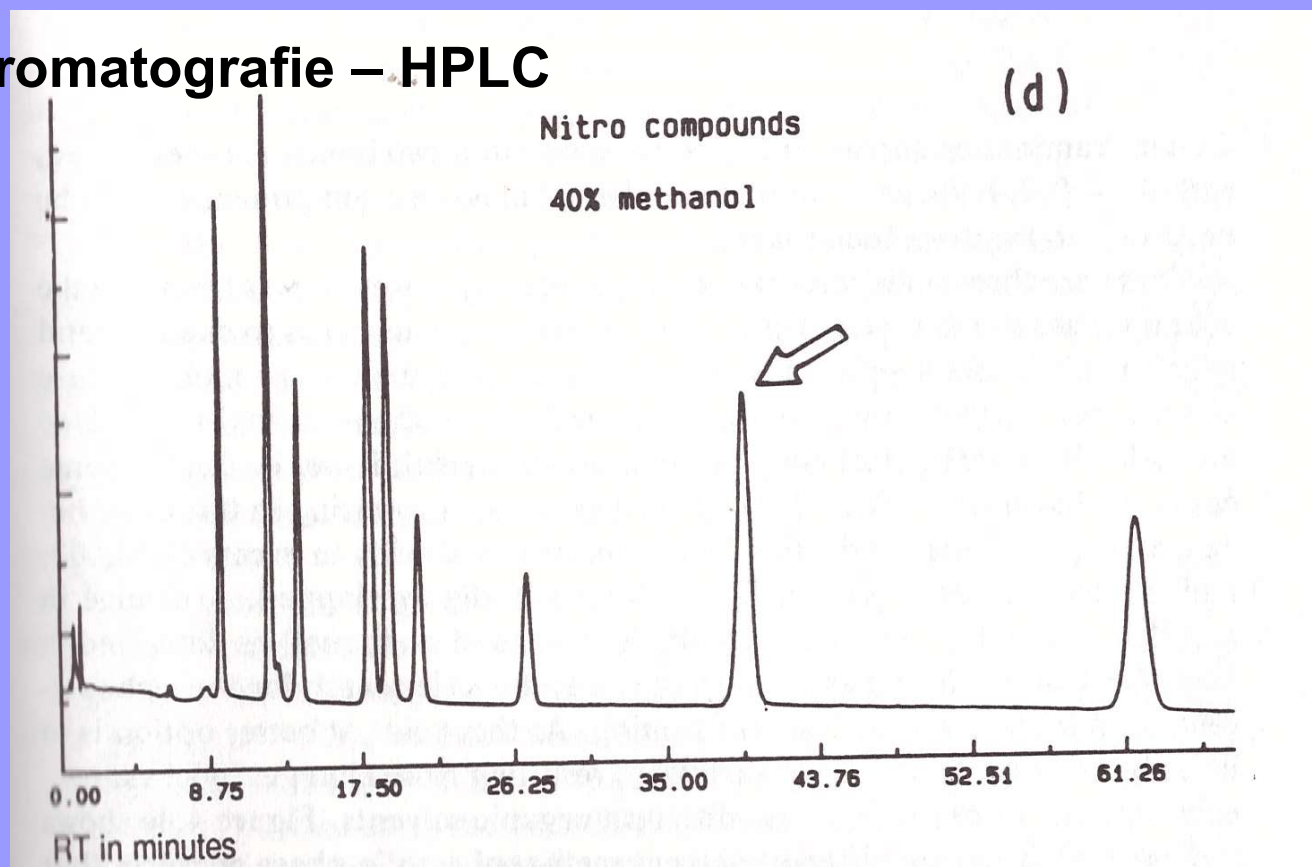
Kolonová chromatografie – HPLC



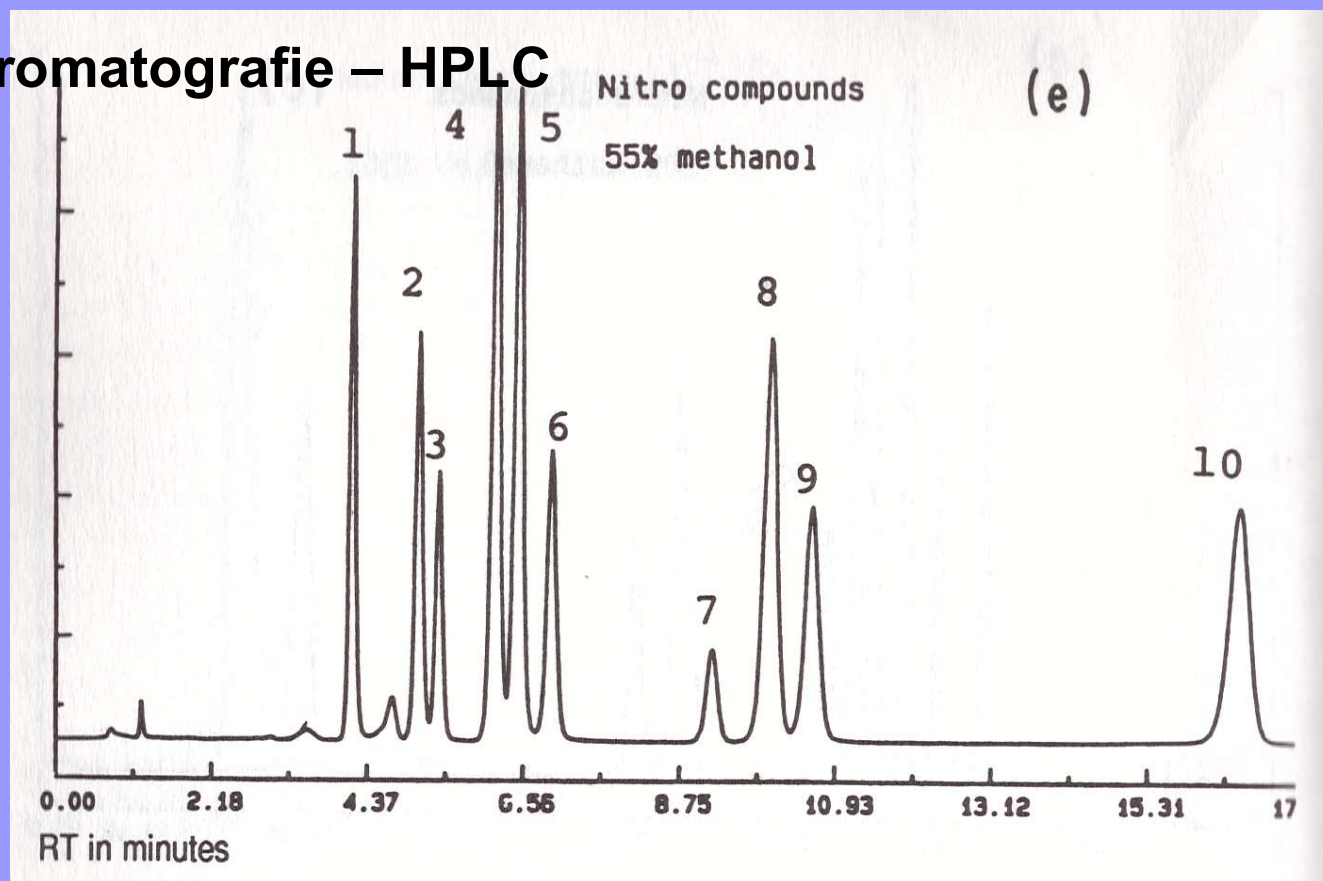
Kolonová chromatografie – HPLC



Kolonová chromatografie – HPLC



Kolonová chromatografie – HPLC



Plynová chromatografie – GC

Potřeby: plynový chromatograf

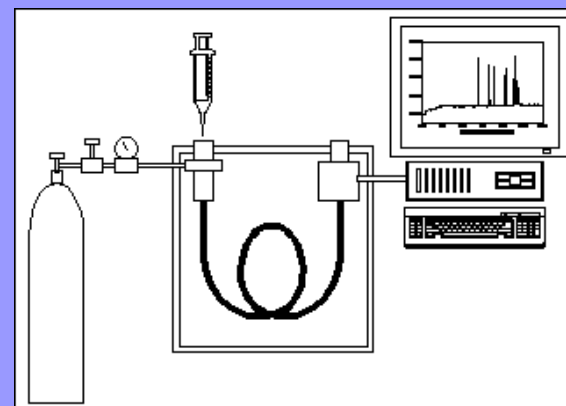
Základní součásti

Zdroj plynu a regulace průtoku

Dávkovací zařízení

Kolona a termostát

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

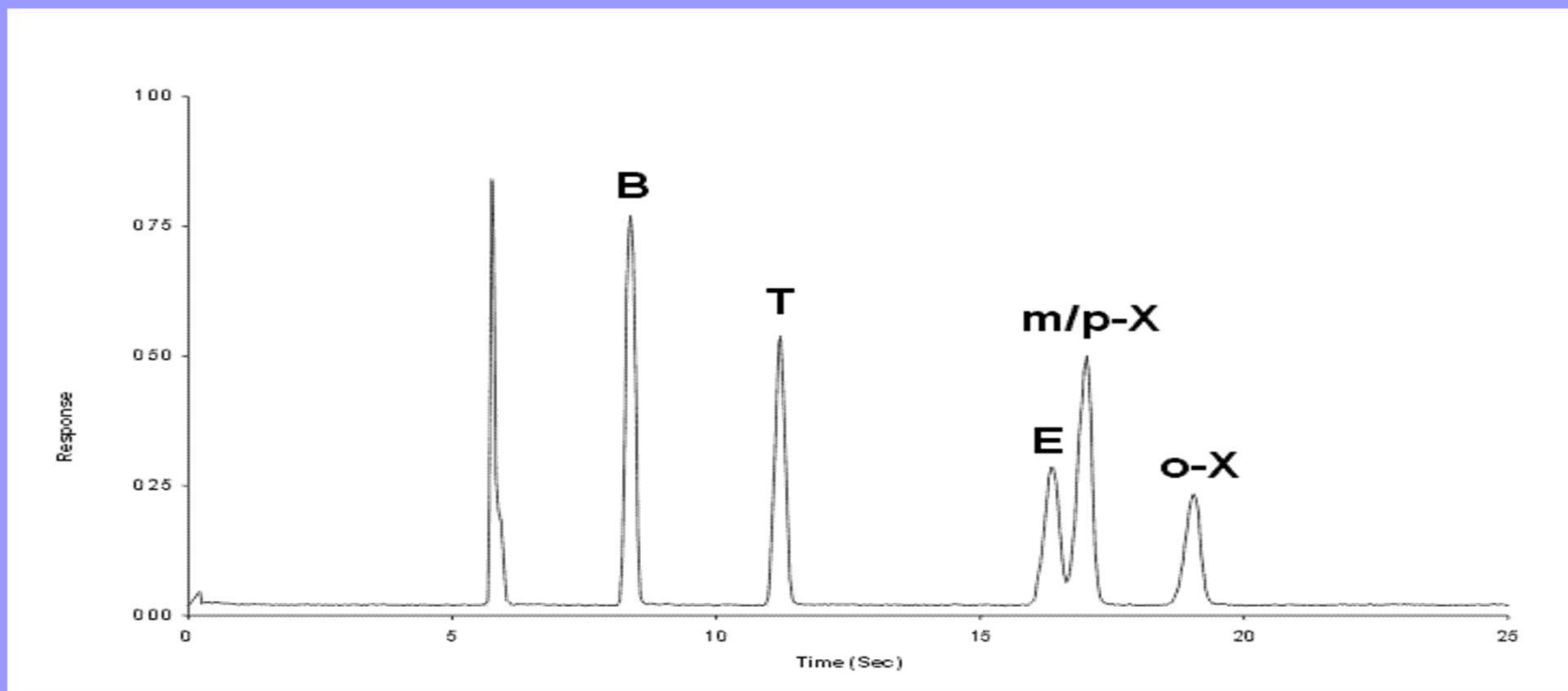
Běžná detekční zařízení:

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)

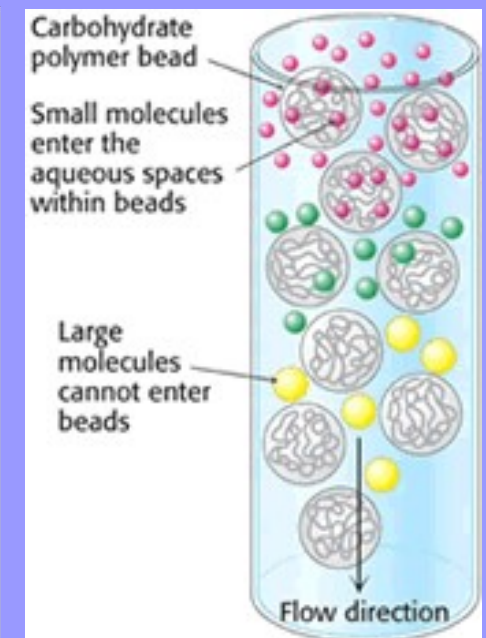
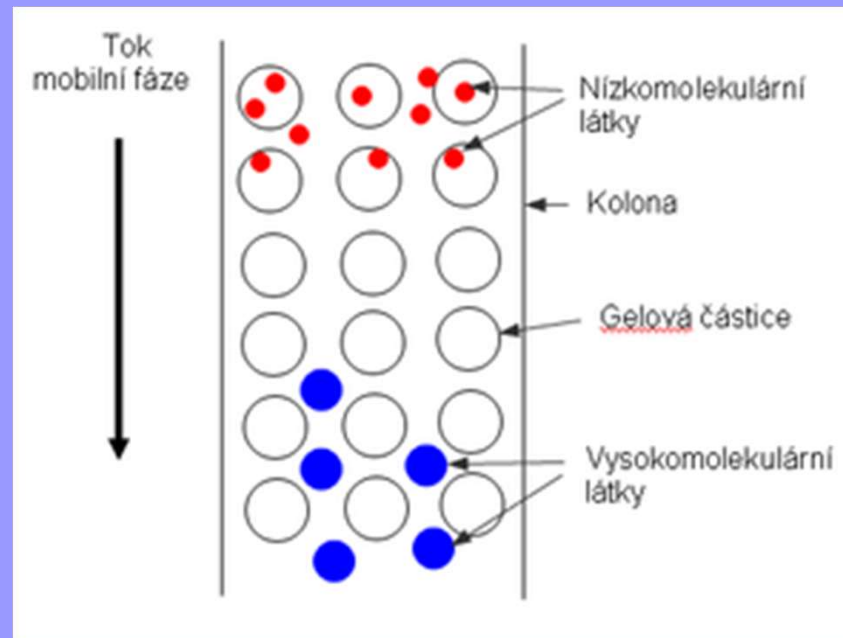
Plynová chromatografie – GC



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

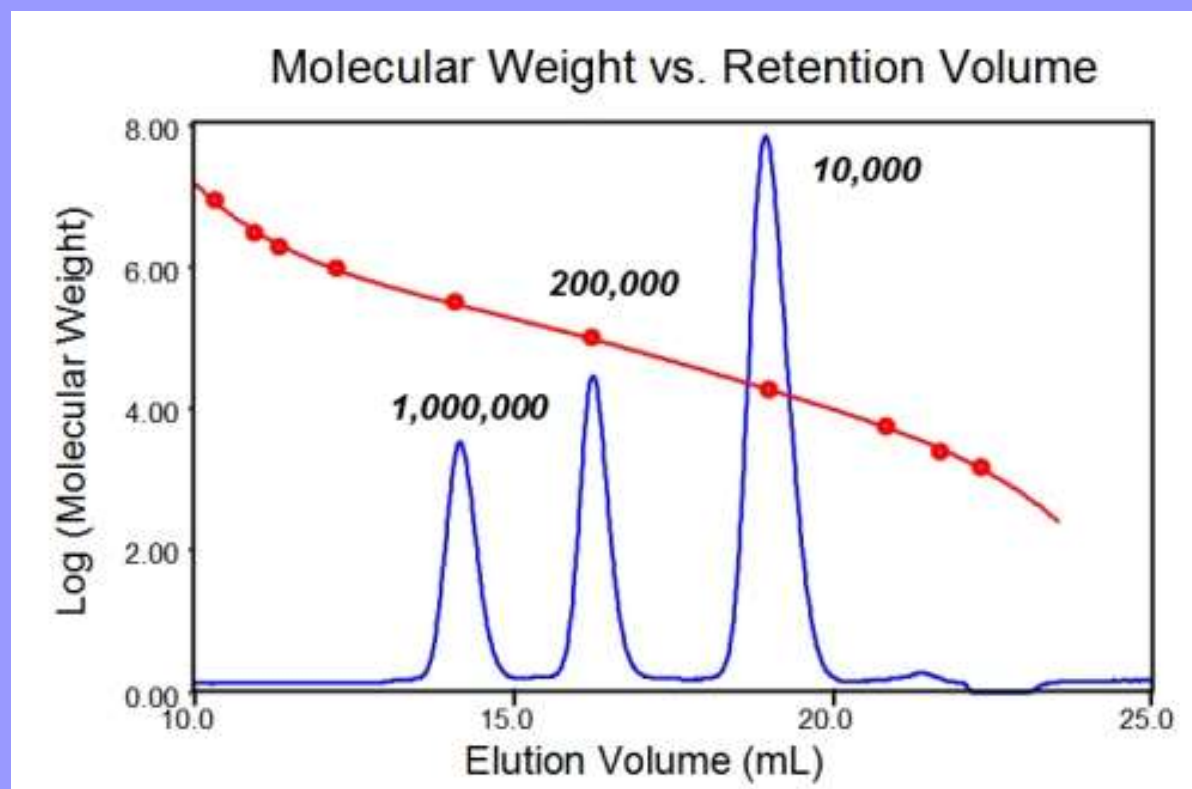
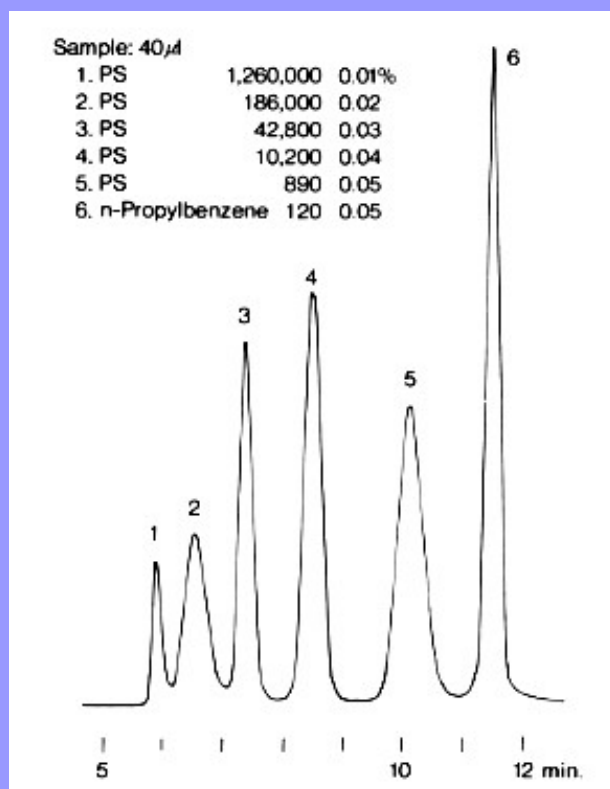
Kolonová chromatografie – Gelově permeační chromatografie – GPC

vhodná pro dělení makromolekul



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

Kolonová chromatografie – Gelově permeační chromatografie – GPC



Využití při určení molekulové hmotnosti vysokomolekulárních látek

https://www.wikiskripta.eu/w/Gelov%C3%A1_permea%C4%8Dn%C3%AD_chromatografie, <https://www.alfatest.it/tecniche/gpcsec/>,
<https://www.shodex.com/en/dc/06/06/01.html>

Kolonová chromatografie – HPLC



Afinitní chromatografie na nosičích obsahujících
navázaná barviva

Barviva jsou podobná některým kofaktorům

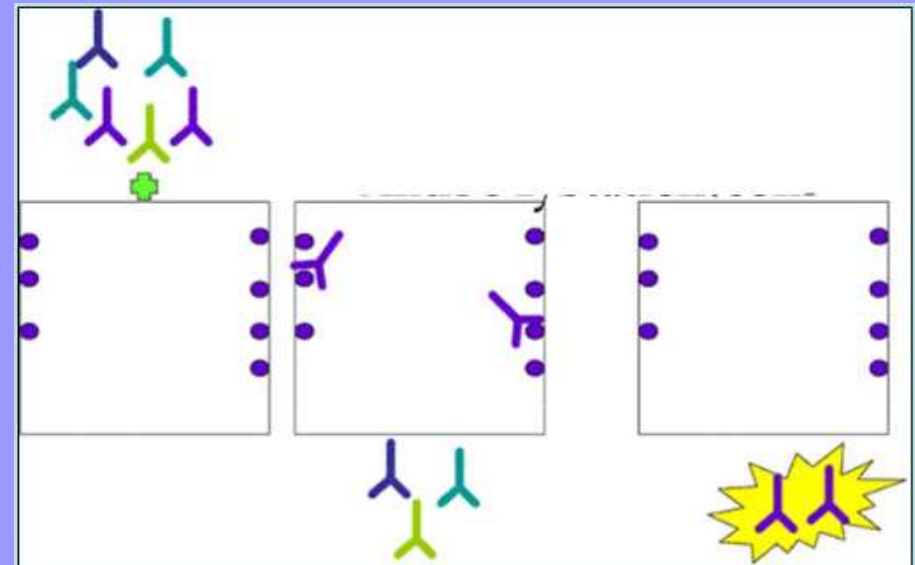
Použití při separacích proteinů

Chirální separace důležité zejména ve farmacii

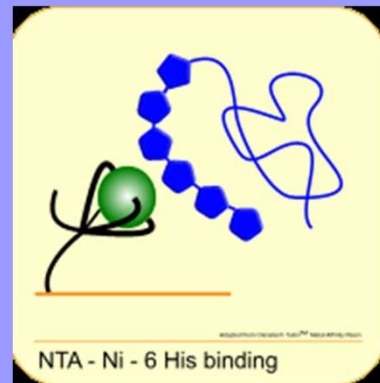
Stacionární fáze např. cyklodextriny

Kolonová chromatografie – HPLC

Afinitní chromatografie na ligandech
nebo iontech kovů
vhodná pro dělení makromolekul



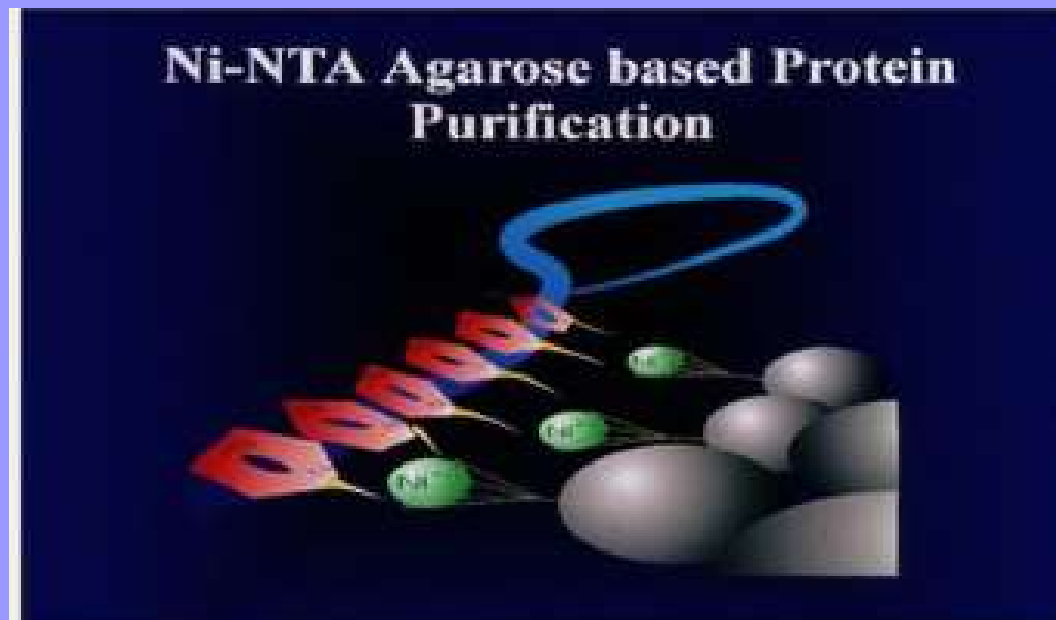
Kolonová chromatografie – HPLC



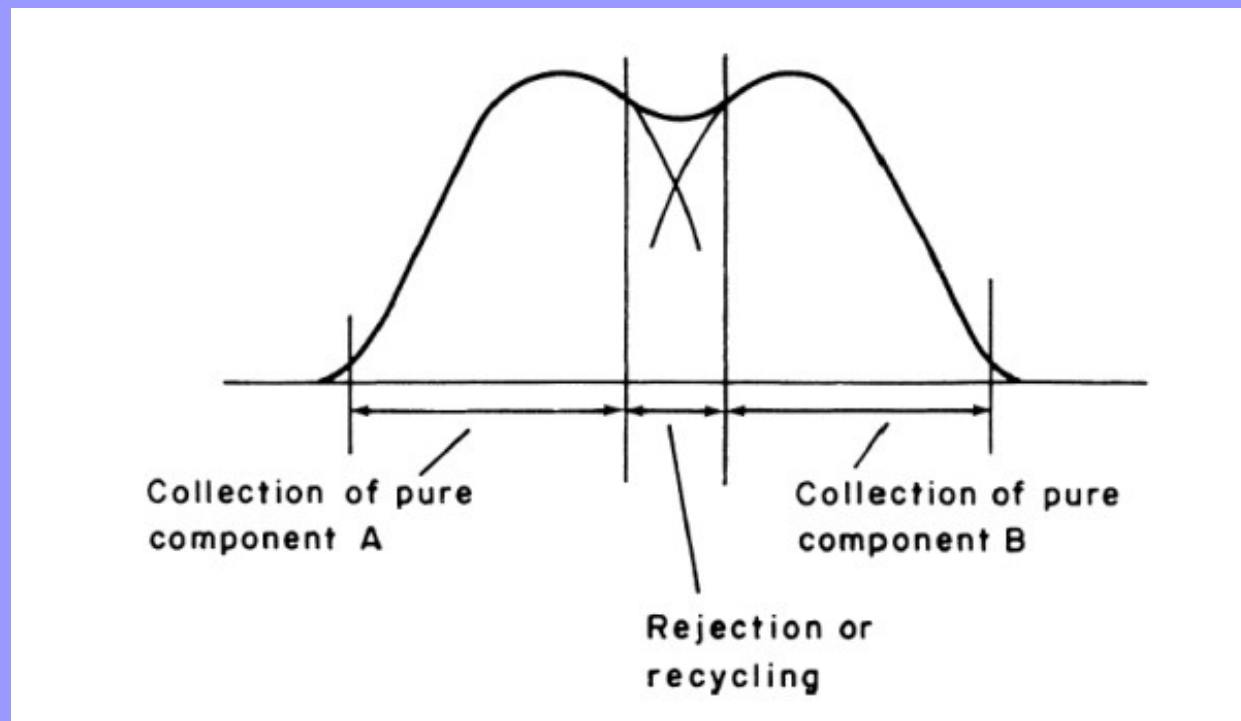
Chromatografie na ionexech, obsahujících navázané dvojmocné ionty Co, Cu, Ni, Zn s kladným nábojem (2^+); Porath et al. 1975.

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

Afinitní chromatografie na ligandech
nebo iontech kovů
vhodná pro dělení makromolekul



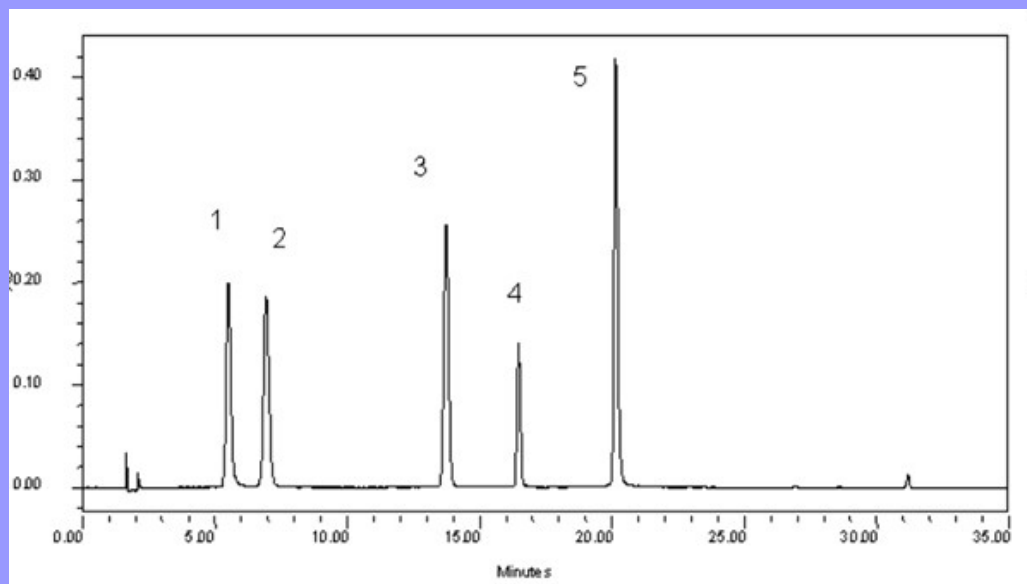
Kolonová chromatografie – preparativní uspořádání



Pro vzorky 10-100 mg je nutná kolona o vnitřním průměru 10 mm a pro vzorky od 100 mg do 1 g roste průměr kolony až na 21,5 mm. Přenos podmínek z analytické separace na preparativní separaci je jednodušší, pokud jsou kolony naplněny stejnou stacionární fází.



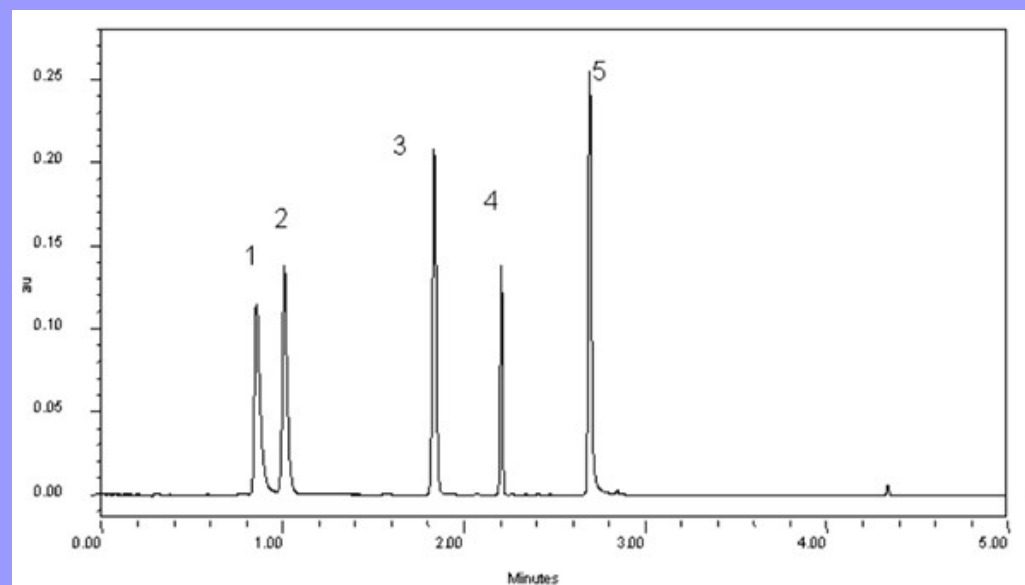
Kolonová chromatografie – UPLC



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

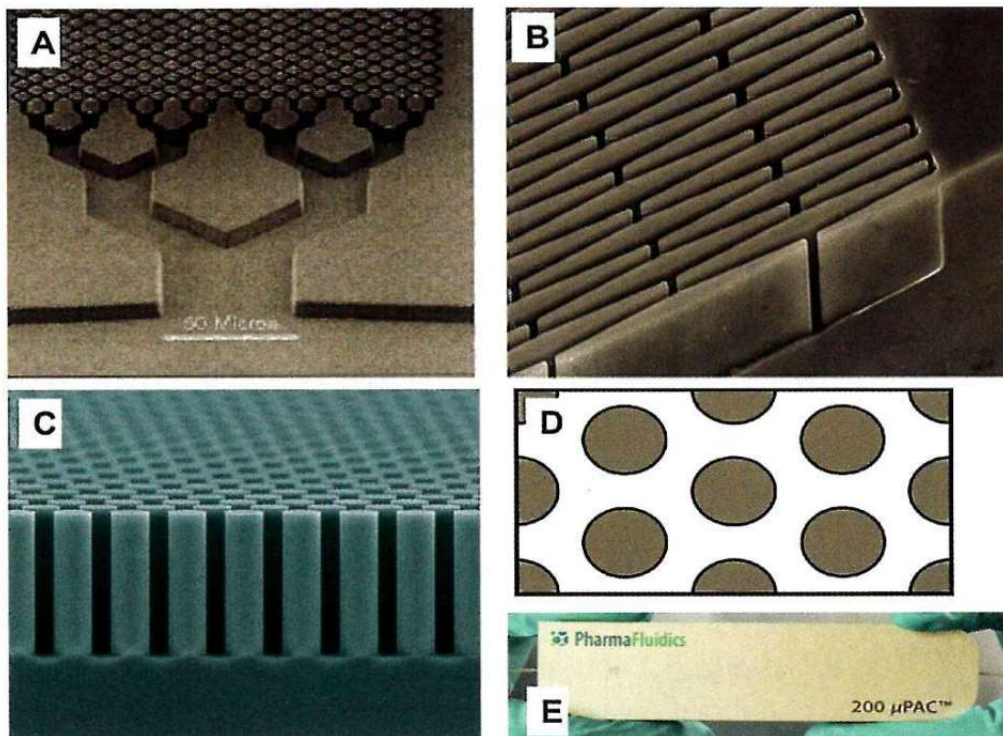
Original HPLC separation of caffeic acid derivatives from Echinacea Purpurea, a natural product. (←)

UPLC separation (↓)

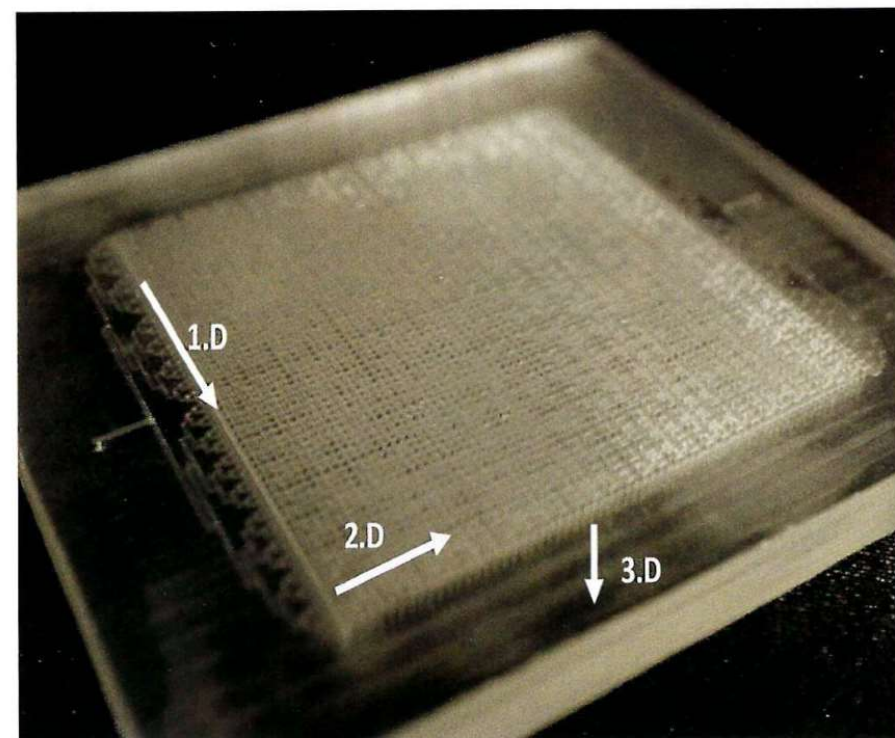


Kolonová chromatografie – chromatografie na čipech

Obr. 4: Elektronově mikroskopické snímky separačního mikročipu vyrobeného na skleněné destičce [11] (A), čipu obsahujícího sloupky s roztaženým šestiúhelníkovým průřezem [12] (B) a komerční mikrofluidní separační HPLC jednotka 200 μ PAC firmy PharmaFluidic (D-E).

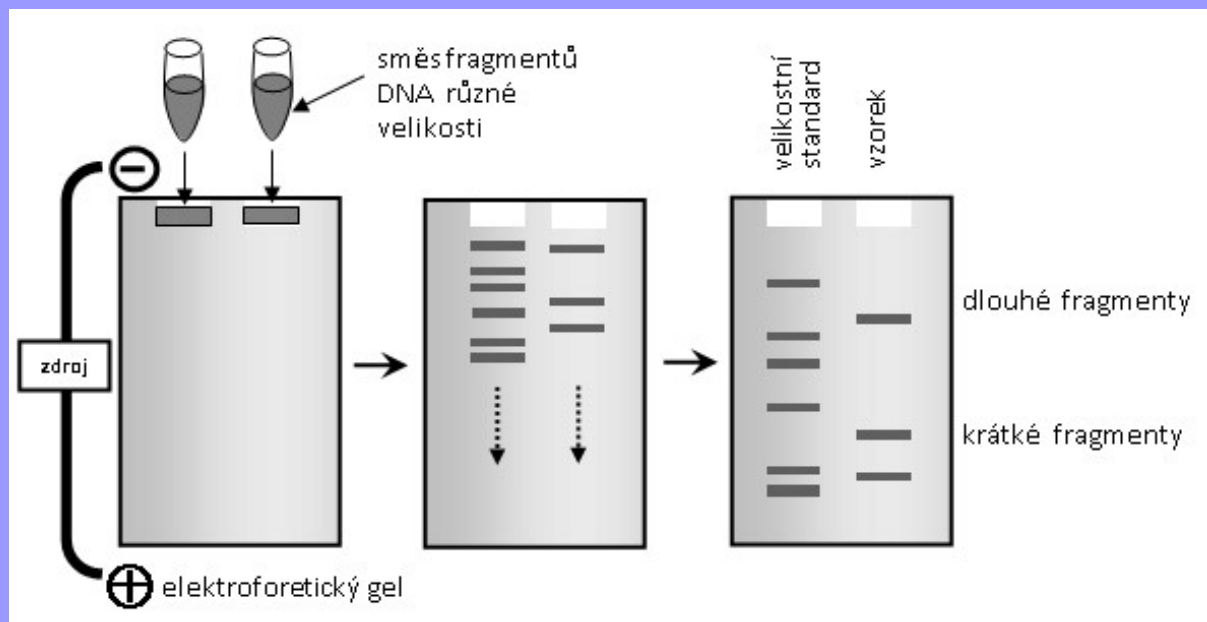


Obr. 5: Fotografie prototypu čipu určeného k separaci ve třídimenziálním prostoru (3D separace) využívající jeden separační kanál v první dimenzi, 64 ve druhé a 4096 kanálů ve třetí [14].



Elektroforéza

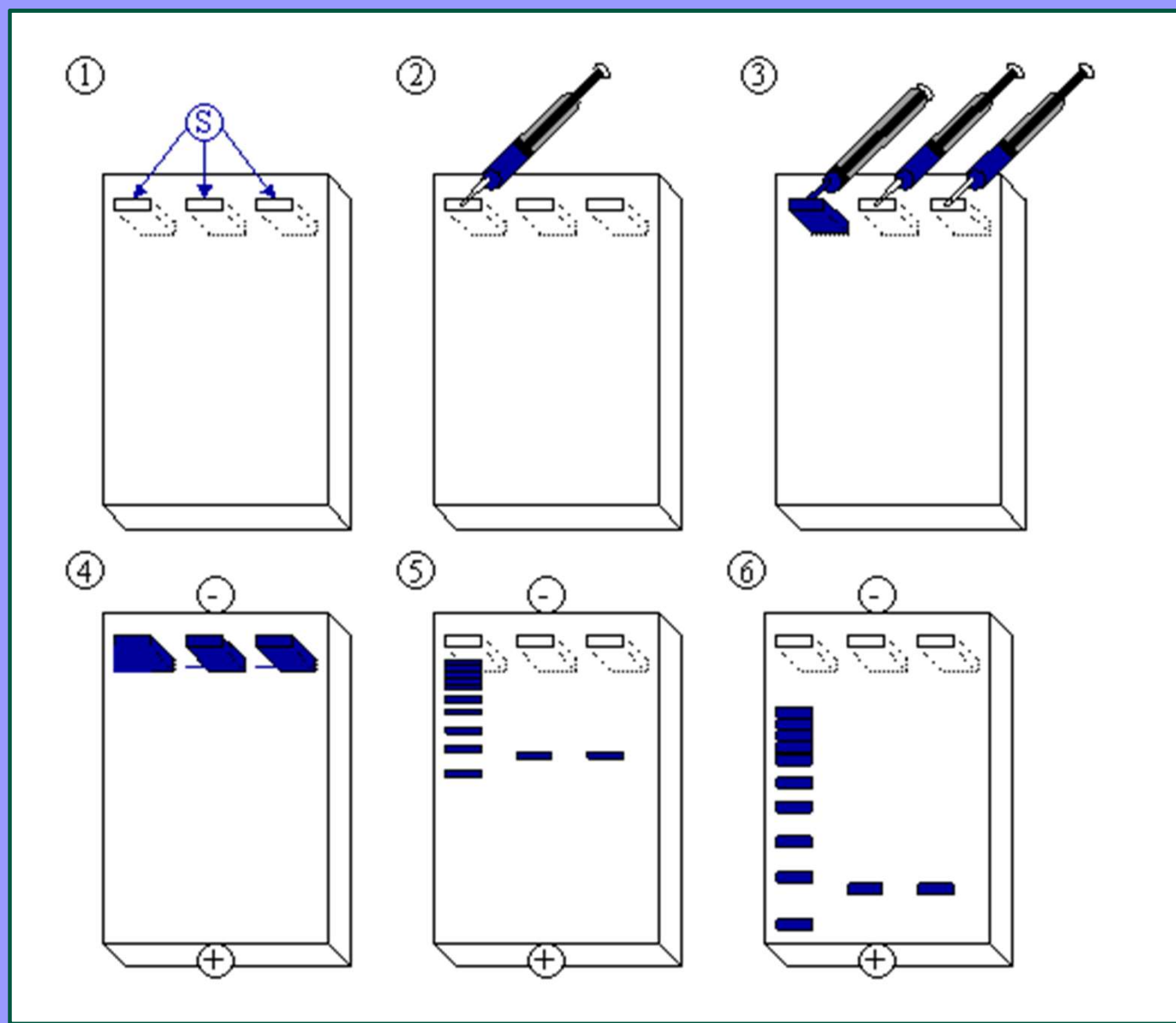
Separace makromolekul v biochemii – molekulární biologii



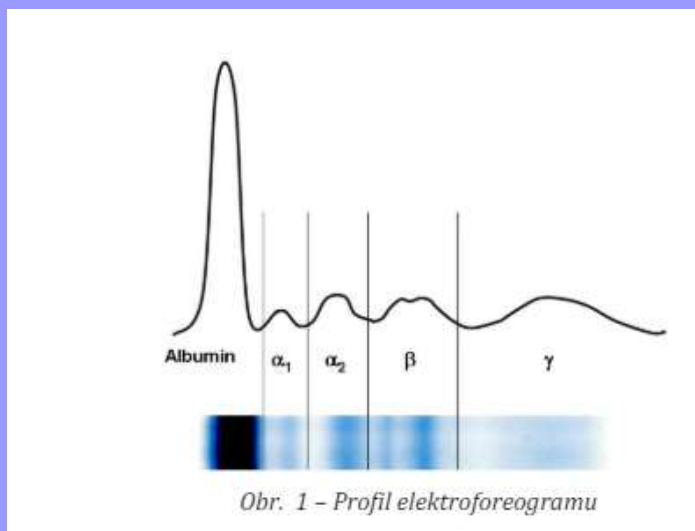
Elektroforéza je soubor separačních metod, které využívají k dělení látek jejich odlišnou pohyblivost ve stejnosměrném elektrickém poli. Na principu rozdílných elektroforetických mobilit se při ní dělí

https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-metody_molekularni_biologie&lang=cz různé molekuly (ionty).

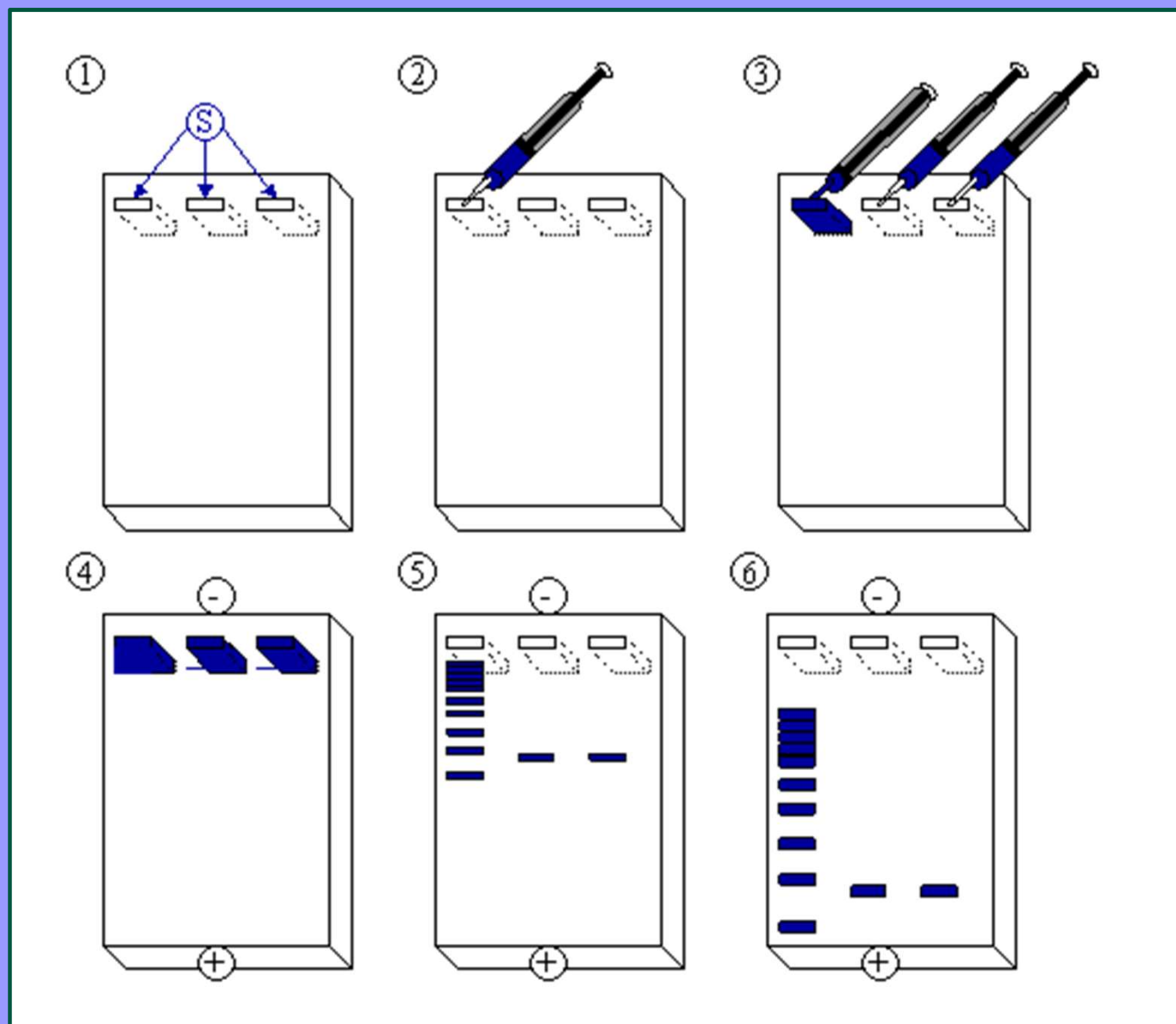
Elektroforéza



Elektroforéza

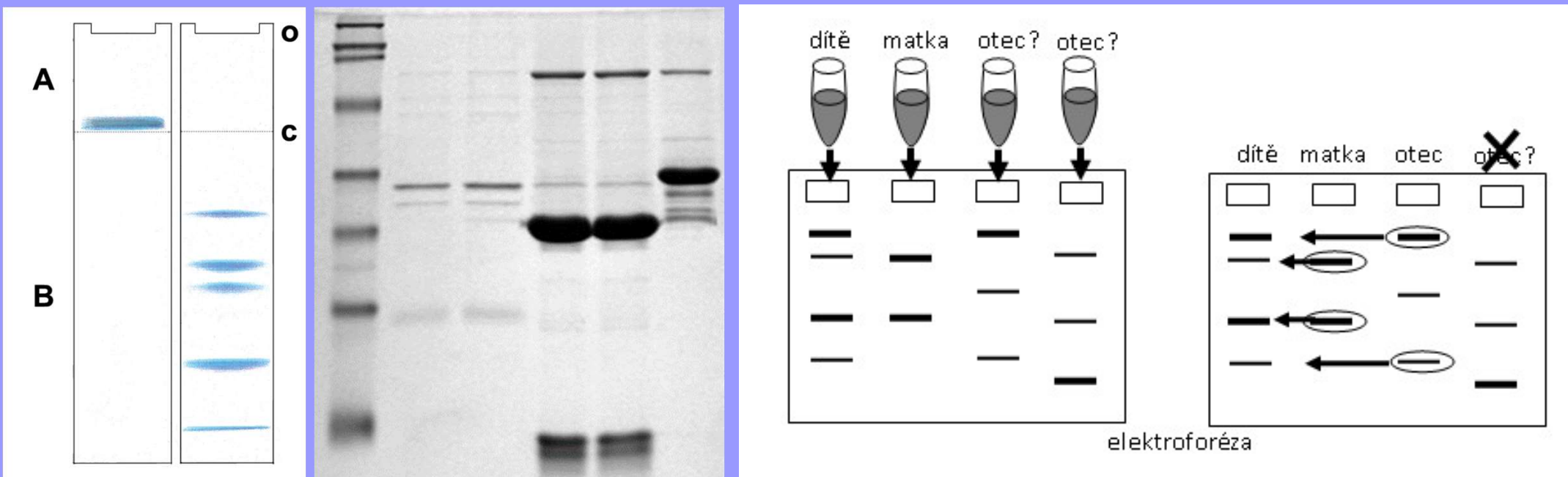


Kudlová Andrea
ELEKTROFORÉZA BÍLKOVIN
KREVNÍHO SÉRA (z eseje k
předmětu Repetitorium chemie
2024)



Elektroforéza

Separace makromolekul v biochemii – molekulární biologii



Nejčastěji používanými typy gelové elektroforézy je elektroforéza DNA v agaróze a elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu při metodě SDS-PAGE.

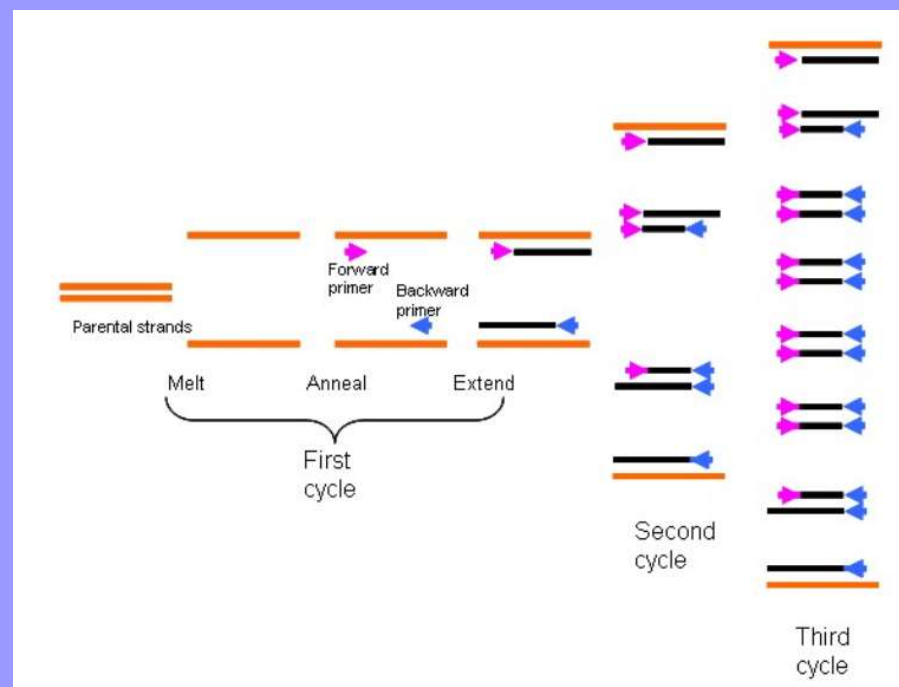
https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-metody_molekularni_biologie&lang=cz

PCR (polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce)

Využití

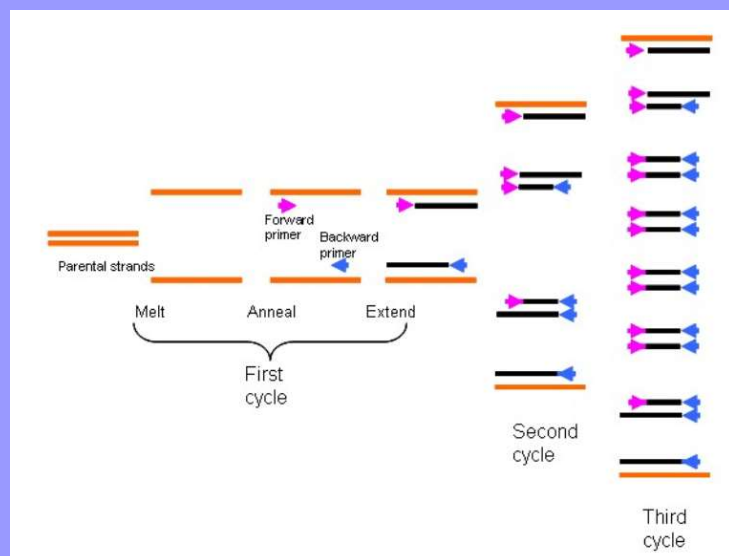
PCR slouží k namnožení DNA pro další biotechnologické metody, jako je:

- sekvenování DNA
- analýza genů
- DNA fingerprinting
- diagnostika infekčních nemocí
- zjišťování genetických nemocí
- identifikace osob



PCR (polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce) je metoda sloužící k mnohonásobnému zmnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA in vitro. Princip syntézy DNA touto metodou je podobný replikaci: kopie úseku DNA jsou syntetizovány pomocí enzymu DNA-polymerázy podle templátu ve formě jednořetězcové DNA na principu komplementarity bází. K zahájení reakce je zapotřebí dvou primerů (čti prajmrů) – chemicky syntetizovaných krátkých oligonukleotidů, které se připojují ke komplementárním úsekům protilehlých řetězců DNA tak, že jejich 3'-OH-konce směřují proti sobě. Pomocí primerů je zároveň vymezen úsek DNA, který bude amplifikován. Jako templáty pro syntézu slouží oba řetězce dsDNA, po předchozí denaturaci.

PCR (polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce)



1. počáteční denaturace DNA (separace řetězců) (94 °C, 2-5 min)

Vlastní řetězová reakce:

2. **denaturace** (separace řetězců) (94 – 95 °C, 20 – 45 s)

3. **připojení (nasedání) primerů** (55 – 65 °C, 30 – 90 s)

4. **polymerační reakce** (72 °C, 45 – 90 s)

(prodlužování řetězců pomocí DNA-polymerázy, která syntetizuje komplementární řetězce DNA z volných nukleotidů, nově syntetizované řetězce slouží jako templáty pro další cyklus)

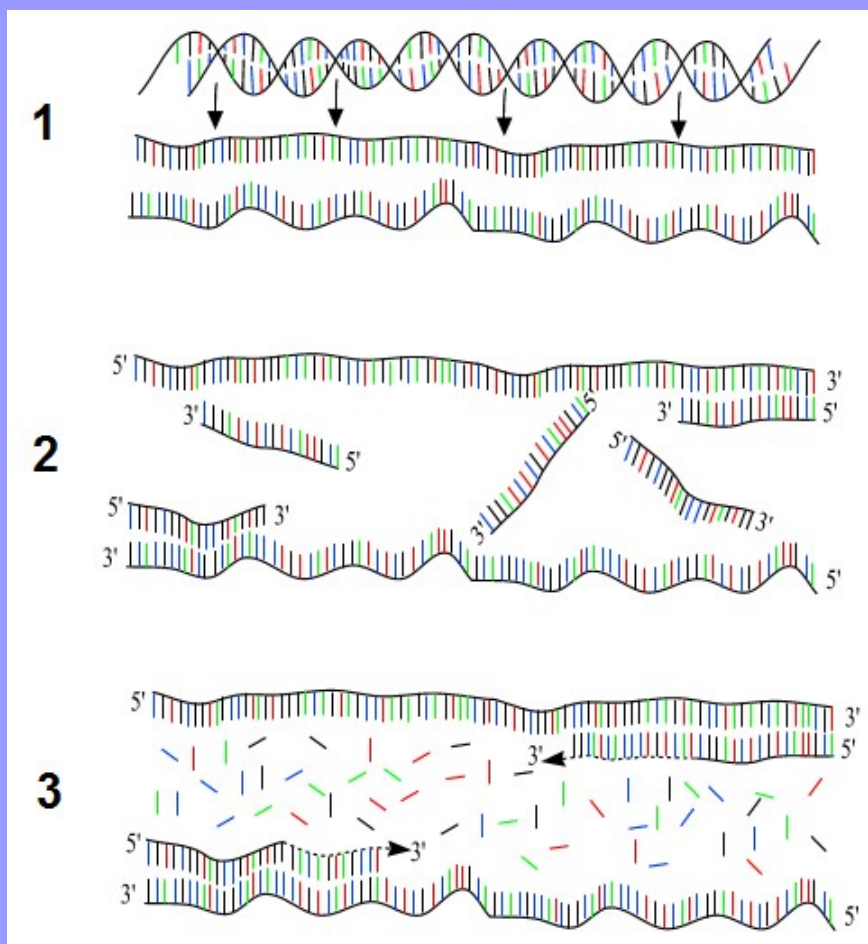
➡ tyto kroky se cyklicky opakují (25-30 cyklů)

5. **závěrečná extenze** (72 °C, 5 min)

(dosyntetizování případně nedosyntetizovaných řetězců)

PCR (polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce) je metoda sloužící k mnohonásobnému zmnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA in vitro. Princip syntézy DNA touto metodou je podobný replikaci: kopie úseku DNA jsou syntetizovány pomocí enzymu DNA-polymerázy podle templátu ve formě jednořetězcové DNA na principu komplementarity bází. K zahájení reakce je zapotřebí dvou primerů (čti prajmrů) – chemicky syntetizovaných krátkých oligonukleotidů, které se připojují ke komplementárním úsekům protilehlých řetězců DNA tak, že jejich 3'-OH-konce směřují proti sobě. Pomocí primerů je zároveň vymezen úsek DNA, který bude amplifikován. Jako templáty pro syntézu slouží oba řetězce dsDNA, po předchozí denaturaci.

PCR (polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce)



PCR (polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce)



*PCR zavedl do praxe v roce 1983 Kary Mullis (za objev této metody dostal Nobelovu cenu).
PCR = polymerázová řetězová reakce (polymerázová, protože se používá enzym DNA polymeráza, řetězová reakce, protože množství DNA roste během jednotlivých cyklů řetězovou řadou, tj. 2, 4, 8, 16, 32,...).
Jelikož výsledkem polymerázové řetězové reakce je mnohonásobné zmnožení vybraného úseku DNA, lze označit tento způsob za klonování DNA.*

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, nechť 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)