



Historie

- n Ruský botanik Michail S. Cvět (Tswett) – objevitel chromatografie na přelomu 19. a 20. stol.
- n Dělení rostlinných pigmentů na barevné pásy

- n Skleněná kolona naplněna práškovým CaCO_3 a vymývána organickými rozpouštědly
- n M. Tswett, Trav. Soc. Nat. Warsawie, 6 (1903) 14
- n Dalších mnoho vědců – přispělo k rozvoji chromatografie po teoretické i praktické stránce
- n A. Tiselius – 1948 Nobelova cena
- n A. J. P. Martin (Nobelova cena 1952) spolu s R. L. M. Syngem - rozdělovací chromatografie



Princip chromatografie

- n chromatografie – fyzikální metoda separace látek – distribuce mezi dvě nemísitelné fáze - fází stacionární a mobilní v definovaném směru
- n chromatografický proces – výsledek opakované sorpce a desorpce
- n separace – rozdíl v distribučních konstantách jednotlivých látek



Chromatografie

je separační (dělící) a současně i analytická metoda (tj. poskytuje kvalitativní a kvantitativní informaci o vzorku).

využívá distribuce látek mezi dvě fáze:
mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou)

různá hlediska dělení chromatografie

1. povaha mobilní fáze: plynová (GC), kapalinová (LC)
2. způsob provedení: kolonová (sloupcová), plošná (planární)
3. princip separace: rozdělovací, adsorpční,
iontově-výměnná, gelová
4. pracovní provedení: eluční (analytická chemie),
frontální, vytěšňovací
5. účel: analytická, preparativní (preparační)

Označení chromatografických technik

Plynová chromatografie

GLC plynová rozdělovací chromatografie

GSC plynová adsorpční chromatografie

Kapalinová chromatografie

Sloupcová chromatografie

LLC kapalinová rozdělovací chromatografie

LSC kapalinová adsorpční chromatografie

IEC iontově-výměnná chromatografie

GPC gelová permeační chromatografie

Planární chromatografie

PC papírová rozdělovací chromatografie

TLC tenkovrstvá rozdělovací chromatografie

TLC tenkovrstvá adsorpční chromatografie



Rozsah použitelnosti HPLC ve srovnání s ostatními separačními metodami

Metoda	Přibližný rozsah M_r analytů	Analyzované látky
GC	1- 400	plyny, látky těkavé a teplotně stabilní, po derivatizaci i netěkavé, po pyrolýze i makromolekulární
HPLC	3 -10 ⁶	ionty, látky polární i nepolární, nízkomolekulární i polymery
PC, TLC	100 - 2000	ionty, látky polární i nepolární
CE (CZE, CEC, MEKC)	3 -10 ⁶	ionty, látky polární i nepolární, nízkomolekulární i polymery



Separační mechanismy u HPLC

příčiny zadržování a dělení separovaných látek

Gelová permeační chromatografie (GPC)

využívá mechanického dělení molekul analytů v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti.

Rozdělovací chromatografie (LLC)

využívá rozdílné rozpustnosti (a tudíž i rozdílné distribuce) molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami.

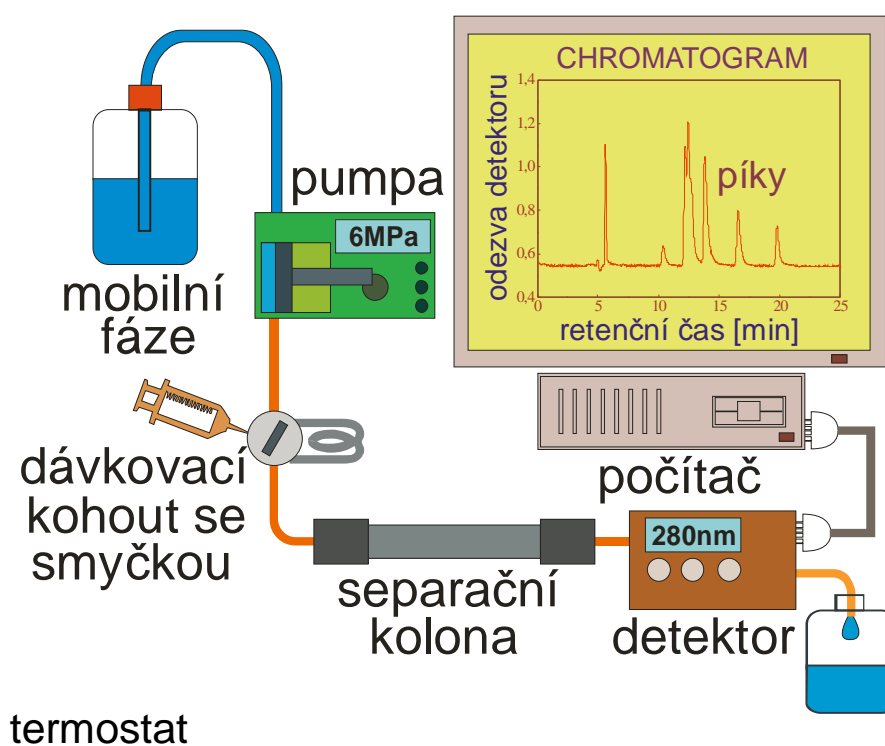
Adsorpční chromatografie (LSC)

využívá rozdílné adsorpce molekul analytů na povrchu tuhé fáze s aktivními centry.

Iontově výměnná chromatografie (IEC)

využívá rozdílné výměnné adsorpce analytů (iontů) na povrchu iontového měniče.

Schéma kapalinového chromatografu





Instrumentace

- n Zásobník mobilní fáze – skleněná nádoba, fritá
- n mobilní fáze – specifické složení (podle typu chromatografie),
- n kompatibilní s detektorem
- n Netoxické, netěkavé
- n inertní vůči stacionární fázi i analytům
- n nízká viskozita
- n organická rozpouštědla a jejich směsi, binární (ternární) mobilní fáze – organické rozpouštědlo/vodná složka (pufr)

Vlastnosti vybraných rozpouštědel používaných v HPLC (eluotropní řada)

Rozpouštědlo	Absorpční hrana ² (nm)	Index lomu	Teplota varu (°C)	Viskozita (mPa s, 25 °C)	Parametr polarity P'	Eluční síla ε ⁰ (alumina)
pentan	190	1,358	36	0,22	0,1	0,01
hexan	190	1,372	69	0,30	0,1	0,01
isooktan	197	1,389	99	0,47	0,1	0,01
diisopropylether	220	1,368	67,8	0,37	2,2	0,29
butanol	207	1,400	117	2,64	3,9	0,26
benzen	278	1,501	81	0,65	2,7	0,32
methyl terc. butylether	210	1,369	56	0,27	2,5	0,35
diethylether	202	1,353	35	0,23	2,9	0,38
chloroform	245	1,443	61	0,53	4,1	0,40
dichlormethan	233	1,421	40	0,41	3,1	0,42
dioxan	215	1,420	101	1,18	4,8	0,56
aceton	330	1,356	56	0,31	5,1	0,56
ethylacetát	256	1,370	77	0,43	4,4	0,58
acetonitril	190	1,341	82	0,34	5,8	0,65
propanol	240	1,385	97	1,94	4,0	0,82
tetrahydrofuran	212	1,405	66	0,46	4,0	0,82
ethanol	210	1,359	78	1,08	4,3	0,88
methanol	205	1,326	65	0,54	5,1	0,95
octová kyselina	230	1,370	118	1,06	6,0	vysoká
voda	180	1,333	100	0,89	10,2	vysoká

¹ Eluotropní řada je definována pro chromatografii s normálními fázemi – alumina jako stacionární fáze.

² Absorpční hrana je definována jako vlnová délka, při které rozpouštědlo způsobuje absorpenci rovnou jedné v optické dráze rovné 1 cm.



Čerpadla

- n vysokotlaká – kolony s velikostí částic okolo 10 μm a menší kladou velký odpor \rightarrow k dosažení optimálních průtoků mobilní fáze nutno vyvinout vysoké tlaky 200 - 250 bar
- n 1 bar = 10^5 Pa, 1,01972 atm, 14,5038 Psi (pound-weight per square inch)
- n Průtok – konstantní, reprodukovatelný a bezpulzní
- n nL min^{-1} kapilární kolony
- n $\mu\text{L min}^{-1}$ mikronáplňové kolony
- n $0,5 - 2 \text{ mL min}^{-1}$ náplňové kolony
- n desítky mL min^{-1} preparativní kolony

- n Pumpy – pístová čerpadla – pro malé průtoky- bezpulzní chod
- n pístová dvouúčinná (reciproká) čerpadla, jejich činnost fázově posunutá minimalizace pulsů
- n eluce – isokratická – konstantní složení mobilní fáze konstantní eluční síla)
- n eluční sílu lze měnit skokově
- n eluce gradientová



Dávkovací zařízení

- n dávkovací ventily se smyčkou
- n nejčastěji šesticestné ventily s vyměnitelnou smyčkou, plní se injekční stříkačkou
- n objem smyčky - od desítek nanolitrů po mililitry
- n Dávkování reprodukovatelné
- n u kapilárních kolon – velmi malé nástřiky (nanolitry) – dávkovače s regulovatelnou dobou vyplachování smyčky do kolony
- n Dávkovače s děličem (obdoba splitovacího zařízení v GC)

Schéma šesticestného ventilu

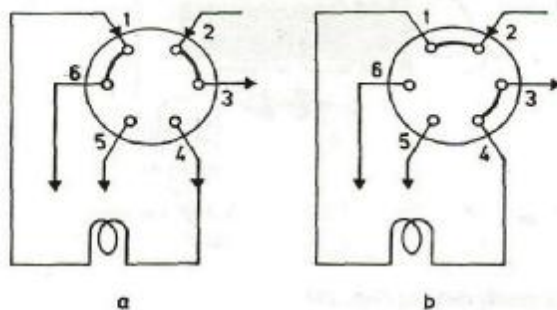


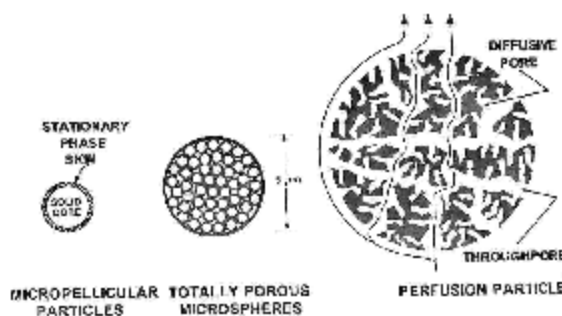
Schéma šesticestného ventilu se smyčkou

a – plnění smyčky, b – vymývání smyčky do kolony

1, 4 – připojení smyčky, 2 – přívod mobilní fáze od čerpadla, 3 – připojení kolony,
5, 6 – odpad; nástřik v poloze 4

Stacionární fáze v HPLC

- n kolony: skleněné, kovové, odolné vysokému tlaku
 - n nejčastěji – náplňové kolony – naplněny částicemi kulovitého tvaru o různé velikosti (zrnění) a pórovitosti
 - n důležité – pravidelný (kulový) tvar částic, jednotná velikost
 - n homogenní naplnění, co nejmenší mezičásticové prostory – 75 % objemu kolony naplněno
 - n v průběhu používání za vysokých tlaků – sesedání náplně kolony
 - n Difuzivita-
 - plyn $0,01-1,0 \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$
 - kapalina $3,3 - 0,1 \cdot 10^{-4}$
- neporézní sorbenty
porézní sorbenty
perfuzní sorbenty



Stacionární fáze v HPLC

- n monolitické kolony – kolona je zcela vyplněna polymerem o definované pórovitosti organického (na bázi styrenu a divinylbenzenu, methakrylátu aj) nebo anorganického (např. na bázi silikagelu) původu – vytvořeného nejčastěji *in situ* polymerizací
- n monomer + porogenní složka + iniciátor polymerizace
- n mikropóry (jednotky μm) - permeabilita kolony
- n mezopóry (jednotky, desítky nm) - velký povrch pro interakci s analyty
- n 5x větší průtoky mobilní fáze než u náplňových kolon 5 μm – stejné tlaky

- n vtištěné polymery





Kolony

typ	I.D.	délka	velikost zrnění	průtok M.F.
kapilár.náplň.	0,1 – 0,5 mm,	20 – 200 cm,	3 – 5 mm,	1 – 15 ml min ⁻¹
mikronáplň.	1 – 2,1 mm,	15 – 25 cm,	3 – 10 mm,	20 – 60 ml min ⁻¹
anal. náplň.	3 – 4,6 mm	3 – 25 cm	3 – 10 mm	0,5 – 2 ml min ⁻¹
semiprepar.	8 – 10 mm	10 – 25 cm	5 – 20 mm	
preparativní	20 – 50 mm	10 – 25 cm	5 – 20 mm	
otevřené kapiláry	10 μm			



Detektory

- n Spektrofotometrické UV/VIS, DAD
 - n Fluorimetrické fluorescenční
 - n Refraktometrický
 - n Elektrochemické Amperometrický
 - n Hmotnostní
-
- n Linearita odezvy v co nejširším rozmezí koncentrací
 - n Dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou
 - n Vysoká citlivost
 - n Malá citlivost ke změnám průtoku a tlaku

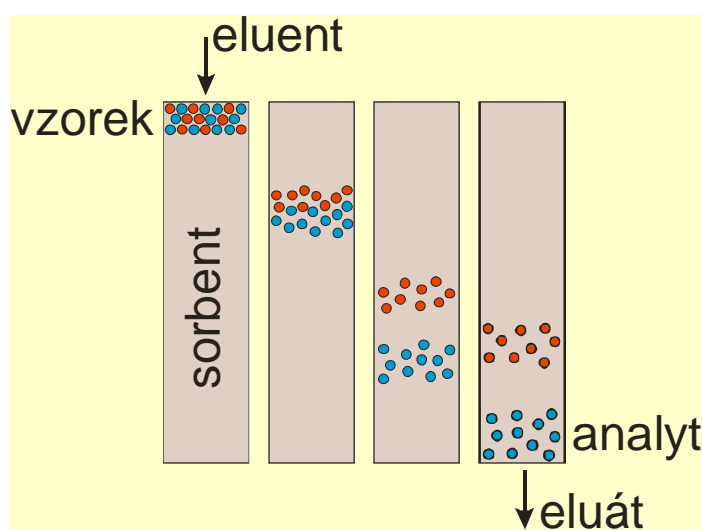


Současné trendy

- n Zkracování kolon a zmenšování velikosti částic sorbentu
- n Používání kolon s menším vnitřním průměrem, tj. mikro a kapilárních kolon
- n Komplexní miniaturizace celých separačních systémů
- n Automatizace analýz
- n Využití ultravysokých tlaků v chromatografii (100 mPa)
- n LC-MS, LC-MS/MS

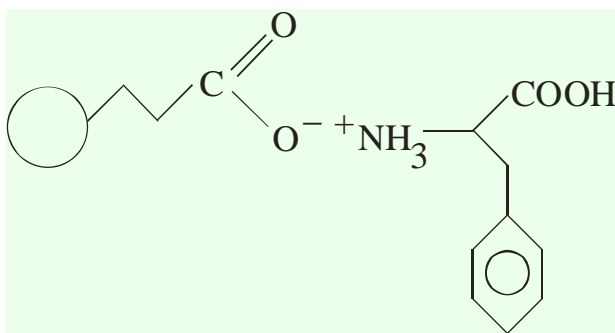
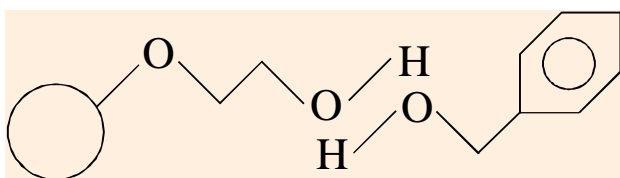
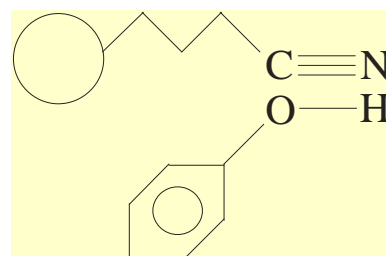
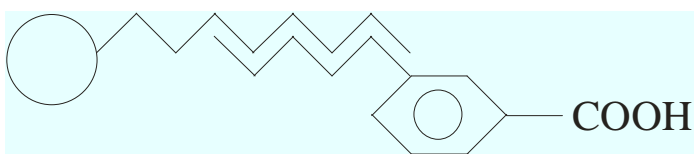
Separace (dělení)

probíhá v separační koloně, která obsahuje stacionární fázi (**sorbent**) a mobilní fázi (**eluent**).



Rozdílné analyty (dělené látky) mají rozdílnou **afinitu** ke stacionární fázi. Různé analyty podléhají různým **distribucím** (rozdělování) mezi mobilní a stacionární fází. Rozdílné analyty jsou rozdílně **zadržovány** a rozdílně **zpoždovány** (retardovány).

Druhy interakcí



Retenční veličiny

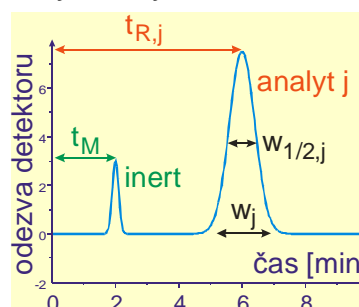
Retenční objem je objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony.

Retenční čas je celkový čas, který příslušný analyt stráví v separační koloně.

Mrtvý objem kolony je objem eluentu, který musí projít kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od počátku ke konci kolony.

Mrtvý čas kolony je retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Všechny analyty stráví v mobilní fázi stejný čas - mrtvý čas kolony.

Redukovaný retenční čas je čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi.



Základní pojmy a vztahy

objem stacionární fáze V_s [mL]

objem mobilní fáze V_m [mL]

objemový průtok mobilní fáze F_m [mL/min]

lineární rychlost mobilní fáze u [cm/min]

retenční objem i-tého analytu $V_{R,i}$ [mL] $V_{R,i} = F_m \cdot t_{R,i}$

retenční čas i-tého analytu $t_{R,i}$ [min]

mrtvý objem kolony V_M [mL] $V_M = F_m \cdot t_M = V_m$

mrtvý čas kolony t_M [min]

redukovaný retenční objem $V'_{R,i}$ [mL] $V'_{R,i} = F_m \cdot t'_{R,i}$

redukovaný retenční čas $t'_{R,i}$ [min]

$$u = \frac{L}{t_M}$$

$$V'_{R,i} = V_{R,i} - V_M$$

$$t'_{R,i} = t_{R,i} - t_M$$

Distribuce a retence

Distribuční konstanta (rozdělovací konstanta)

$$K_{D,i} = \frac{(c_i)_s}{(c_i)_m} = \frac{(n_i)_s}{(n_i)_m} \cdot \frac{V_m}{V_s}$$

Retenční faktor (kapacitní faktor, kapacitní poměr)

$$k_i = \frac{(n_i)_s}{(n_i)_m} = K_{D,i} \cdot \frac{V_s}{V_m}$$

$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} = \frac{t'_{R,i}}{t_M}$$

$$k_i = \frac{V_{R,i} - V_M}{V_M} = \frac{V'_{R,i}}{V_M}$$

$K_{D,i}$ a k_i charakterizují selektivitu,
tj. jak moc se analyty na koloně zadržují a zpožďují.

Základní rovnice chromatografie

$$V_{R,i} = V_M + K_{D,i} \cdot V_S$$

platí především pro
rozdělovací chromatografii


$$V'_{R,i} = K_{D,i} \cdot V_S$$

$$t_{R,i} = \frac{V_{R,i}}{F_m} = \frac{V_M + K_{D,i} \cdot V_S}{F_m}$$

$$t'_{R,i} = \frac{V'_{R,i}}{F_m} = \frac{K_{D,i} \cdot V_S}{F_m}$$



Chromatografie s normálními a obrácenými fázemi

- 
- n adsorpce, rozdělování mezi dvě fáze na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, biospecifické interakce a síťový efekt
 - n mimo posledního – termodynamické rovnováhy – chemické potenciály analyzované látky v obou fázích stejné

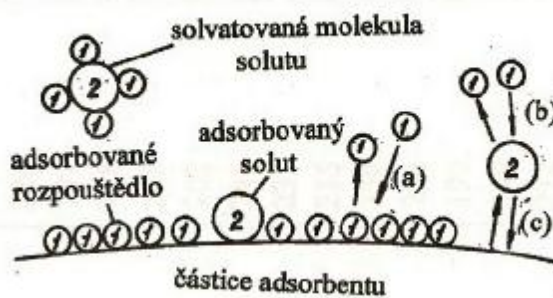
$$m_1 = m_2 \quad m_1^0 + RT \ln a_1 = m_2^0 + RT \ln a_2$$

$$\frac{a_2}{a_1} = e^{(m_1^0 - m_2^0)/RT} = K_D$$

reálný chromatografický systém – uplatnění více typů interakce současně

Adsorpce

- n plynová chromatografie – látky naadsorbovány přímo na povrchu adsorbentu
- n kapalinová chromatografie – povrch adsorbentu obsazen monovrstvou molekul mobilní fáze – molekuly analytu – soutěž o aktivní místa adsorbentu



Adsorpční izotermy

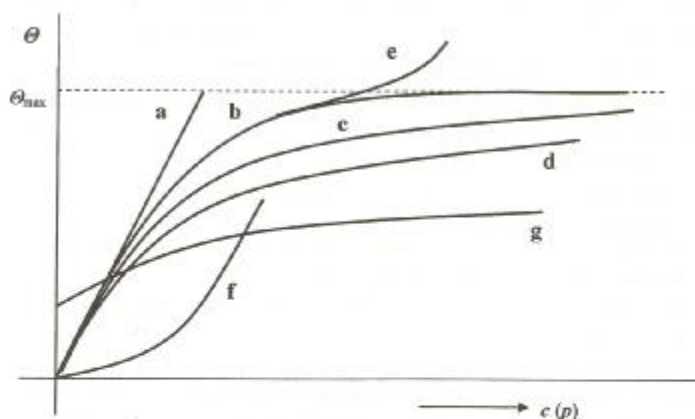
- n fyzikální adsorpce – slabší interakční síly (disperzní, indukční, orientační aj.), chemisorpce je nežádoucí – příliš silná vazba analyt-adsorbent → deformace elučních křivek
- n adsorpční děj popsán adsorpční izotermou – závislost rovnovážné koncentrace adsorbátu (analytu) na povrchu adsorbentu a v původní fázi při T_{kons}
- n koncentrace na povrchu – stupeň pokrytí $F = c_{\text{akt.povrch}}/c_{\text{max.povrch}}$
- n nejjednodušší model – *Henryho izoterma* $F = kp$
ideální plyn, monomolekulární vrstva, zcela homogenní povrch adsorbentu
- n menší idealizace – *Langmuirova izoterma*
konečný počet adsorpčních center na adsorbentu, 1 centrum = 1 molekul adsorbátu, adsorpční centra rovnocenná = adsorpční teplo stejné, nezávislé na F , žádná intrakce mezi adsorbovanými molekulami

$$\Theta = \frac{k_a p}{k_d + k_a p} = \frac{bp}{1 + bp}; b = \frac{k_a}{k_d}$$

Adsorpční izotermy

-analytická chemie –
dávkovány malé
koncentrace analytu →
adsorpční izotermy lineární
v preparativní chemii –
křivky asymetrické

Polární adsorbent – polární
analyt – nepolární mobilní
fáze
(a naopak)



Obr. 1.1 Schematické průběhy některých modelových adsorpčních izoterm

a – Henry, b – Langmuir, c – Temkin, d – Freundlich, e – BET, f – anomální, konkávní izoterma, g – schematická izoterma pro chemisorpci

Skutečné směrnice ovšem závisejí na hodnotách empirických faktorů v rovnicích (1.4) až (1.7) a na podmínkách chemisorpce

Adsorbenty

- n nejběžnější – **silikagel**, SiO_2 , vyráběn z křemičitanu sodného
- n částice pravidelné i nepravidelné, 2 – 12 μm
- n vysoce porézní - průměr pórů 6 - 50 nm → zajištění volného průniku analytů, vysoký měrný povrch 100 - 800 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$,
- n snadné pohlcování vody (pohlčovač vody, desikant)
- n mikropóry < 1 – 2 nm - nežádoucí efekty → ireverzibilní adsorpce a vylučovací efekt
- n silikagel – polární,
silanolové (-SiOH) - důležité – specifické interakce – vodíková vazba
siloxanové (Si-O-Si) - nežádoucí – nespecifické interakce

Nevýhoda

- stabilita v rozsahu pH 2 - 8





Adsorbenty

- n silně polární – **alumina – oxid hlinitý** (Al_2O_3), vyráběn jako porézní kuličky (silikagel)
- n dostupný jak s úzkými, tak širokými póry
- n nativní Al_2O_3 - pro normální separační mód – slabě polární látky
- n stability pH 2 – 12 použité i vysoké pH (12) – separace vysoce basických sloučenin bez přídavku iontově-párových činidel
- n selektivně zadržuje donory elektronů (halogenové deriváty, nenasycené sloučeniny)

- n **grafitizované saze**
- n speciální materiál – má rovinný charakter
- n užitečný pro separaci polohových izomerů, pro hydrofilní látky, málo interagující s C8 a C18
- n jakákoli teplota, rozpouštědlo, pH – není problém
- n vs. nižší účinnost a křehkost
- n nutnost vysoce čistých mobilních fází – nečistoty se mohou shromažďovat v koloně a pak se jednorázově vymýt
- n prakticky ireverzibilní zadržování naftalenu a vyšších PAH



Mobilní fáze

- n polární adsorbenty – mobilní fáze – nepolární rozpouštědla (hexan, heptan + přídavek polárního modifikátoru (alkoholy, acetonitril, tetrahydrofuran) < 1 % obsahu – velký vliv na separaci – přednostní sorpce na aktivní povrch adsorbentu – povrch homogennější – zlepšení (zrychlení) separace,
- n pro reprodukovatelnost separace - nutnost přídavek modifikátoru přesně dodržovat
- n přítomnost i stop vody – velký vliv na separaci

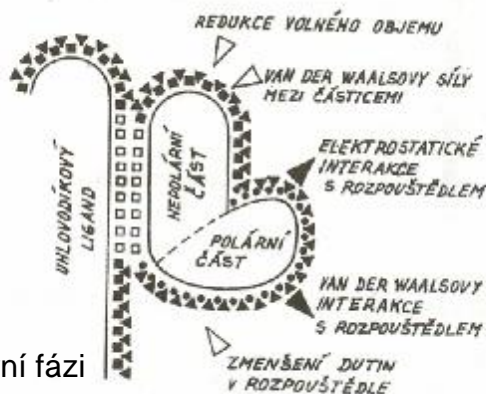
- n adsorpční chromatografie vhodná pro:
- n Separaci - polárních látek (cukry)
 - polohových izomerů
 - silně bazických látek – při užití vhodného sorbentu - možnost pracovat při vysokých hodnotách pH

Chromatografie na chemicky vázaných fázích

- n Chemicky vázané (zejména nepolární reverzní fáze) – nejpoužívanější stacionární fáze (SF)
- n Široký aplikační okruh (asi 80 % všech aplikací)
- n Velký počet SF –aplikační flexibilita
- n Rychlé ustavování rovnováhy v koloně, rychlejší, reprodukovatelnější
- n Použití levných mobilních fází, uživatelsky příjemnějších
- n SF v kombinaci s vodnými mobilními fázemi – přímá aplikace na biologické (moč, krevní plazma aj.)

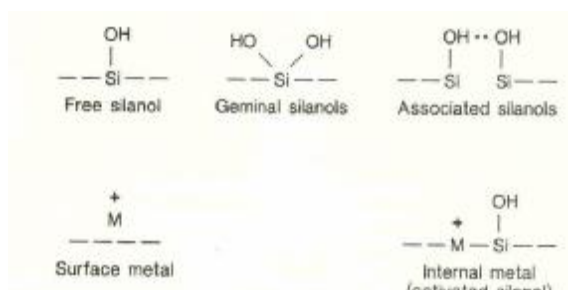
Mechanismus separace:

- interakce solutu s mobilní fází
- interakce mobilní fáze se stacionární fází
- rozdělování solutu mezi mobilní a stacionární fází



Nosiče pro chemicky vázané fáze

- n chemicky vázané SF – nosič + vlastní navázaná skupina
- n kovalentní vazba
- n nosič – nejčastěji silikagel – vysoká pórovitost, specifický povrch, levný, dobře definovaný, omezená stabilita pH
- n polymerní nosiče (polystyren)
- n oxid zirkoničitý



prvek
Ni
Zn
Al
Fe

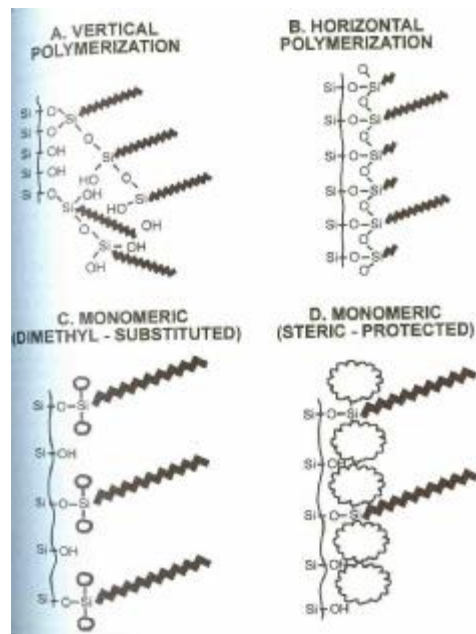
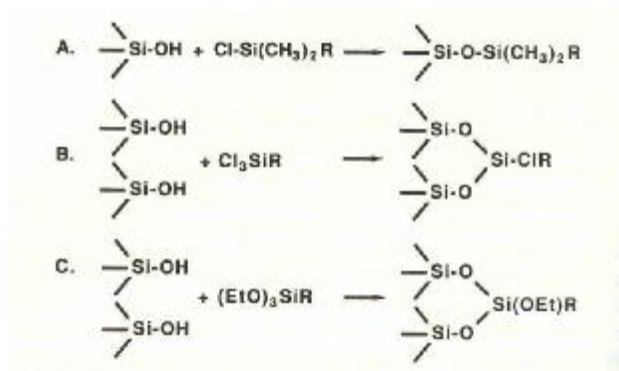


Nosiče

- n **ZrO₂**
- n porézní vs. neporézní, pokrytí polymerním filmem, stabilní pH 1-14 do 100 °C – separace vysoce basických látek v jejich neionizované formě – alternativa k nízkému pH nebo přidavku iontově-párových činidel
- n **porézní polymery** (polystyren) - pH stabilní, hydrofobní
- n nižší (poloviční) účinnost oproti silikagelu – různá smáčivost v organických rozpouštědlech – více se to projevuje při gradientové eluci – hlavně isokratická eluce

Příprava chemicky vázaných fází

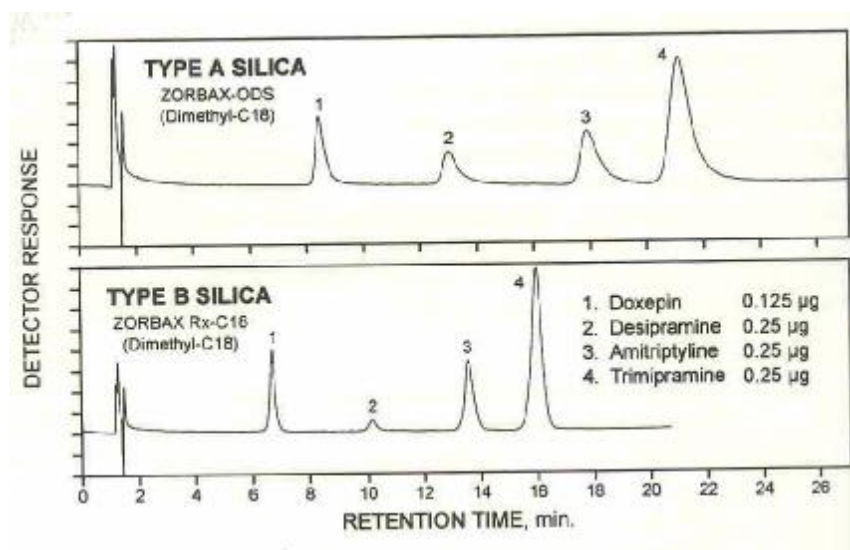
- n reakce silanových skupin - chlorsilanovou sloučeninou - uhlíkaté radikály určují charakter chromatografického materiálu
- n Různý způsob navázání – různé typy ramínek (spacer) – stérická dostupnost pro analyt
- n asi 50 % silanolových skupin –
- n nezreagovaných – nežádoucí elektrostatické (tzv. silanofilní) interakce zejména s ionizovatelnými analyty
- monomerní x polymerní, dodatečná silanizace (endcapping) trimethylchlorsilan, dimethyldichlorsilan



- n radikály s krátkými uhlíkatými řetězci, sorbent bude mít povrch hydrofilní (alkoholové, aminové a kyanoskupiny - **normální chromatografie**)
- n radikály - alkylové řetězce (nejčastěji C8 a C18) charakter hydrofobní - **chromatografie s reversní RP (převrácenou) fází.**

Funkční skupina R	Struktura	Aplikace
alkyl	-CH ₃	RP
	-C ₄ H ₉	
	-C ₈ H ₁₇	
	-C ₁₈ H ₃₇	
fenyl	-C ₆ H ₅	RP
kyano	-(CH ₂) ₃ CN	NP, RP
amino	-(CH ₂) ₃ NH ₂	NP, RP, slabý měnič aniontů
diol	-(CH ₂) ₃ OCH ₂ CH(OH)CH ₂ (OH)	NP, SEC
amid	-(CH ₂) ₃ CONHCH ₃	SEC
sulfonová	-(CH ₂) ₃ SO ₃ H	silný měnič kationtů
	-C ₆ H ₄ SO ₃ H	
	-(CH ₂) ₃ C ₆ H ₄ SO ₃ H	
karboxylová	-(CH ₂) ₃ COOH	slabý měnič kationtů
	-(CH ₂) ₃ OCH ₂ COOH	
	-(CH ₂) ₃ C ₆ H ₄ COOH	
diethylamin	-(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	slabý měnič aniontů
kvartérní amin	-(CH ₂) ₃ N ⁺ (CH ₃) ₃	silný měnič aniontů

Separace bazických léčiv



Dva typy silikagelového nosiče: méně kyselý (B), 30/70
acetonitril/0,025 M fosfátový pufr, pH 2,5 + 0,2% TEA a TFA



RP systém

- n vlastnosti chemicky vázaných fází – typ a koncentrace funkčních skupin (obsah vázaného uhlíku)
 - n RP chromatografie
 - n selektivita
 - délka alkylového řetězce – čím delší, tím vyšší retence nepolárních látek
 - složení mobilní fáze
- retenční faktor klesá s klesající hodnotou povrchového napětí (největší retence v čisté vodě)
- $\log k = \log k_w + aF + bF^2$, k_w - k solutu v čisté vodě
 F - objemový zlomek rozpouštědla
- $\log k = \log k_w - sF$ pro $0,9 > F > 0,1$
- přídavek neutrální soli – zvýšení povrchového napětí – prodloužení retence



Výběr počátečních separačních podmínek

- n **kolona** 150 x 4,6 mm, velikost zrnění 5 μm ,
- n **stacionární fáze** C18 (C8) navázaná na silikagelové matrici
- n **mobilní fáze** acetonitril (70 -100 %) – voda/(pufr - typ, koncentrace, pH), (aditiva)
- n **izokratická eluce**
- n **průtoková rychlost mobilní fáze** 0,7- 2,0 ml/min
- n **dávkovaný objem** < 25 μl
- n **hmotnost** < 100 μg



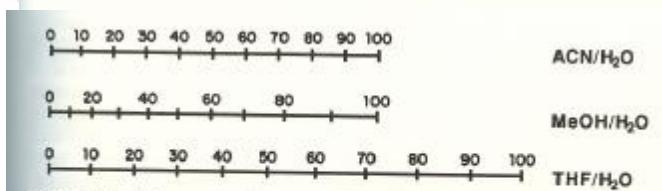
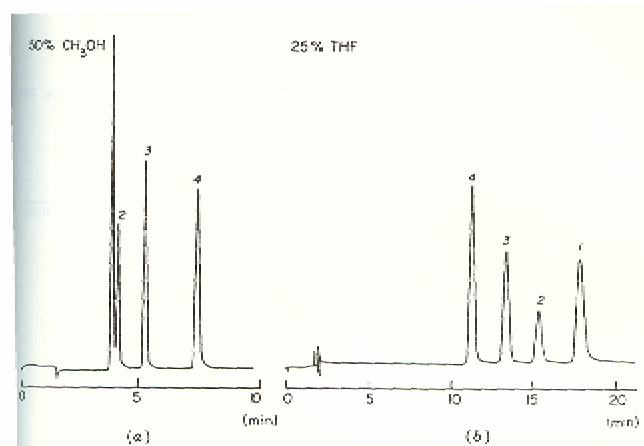
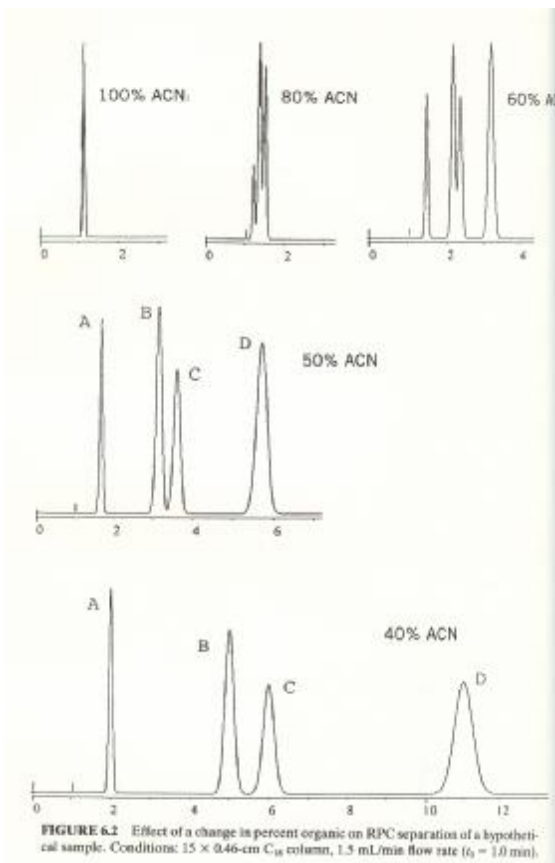
Proces optimalizace

- n retence na dané stac. fázi příliš velká - zvýšit obsah organického modifikátoru nebo zaměnit OM za ten, mající vyšší eluční sílu
- n použít stac. fázi s kratším alkylem
- n směs látek - použít gradientovou eluci
- n teplota
- n **reversní separační mód** - vodně-organická mobilní fáze (ACN, MeOH), (voda, citrátový, octanový, fosfátový, borátový pufr s ohledem na pKa analytu
- n látky snadno denaturující (peptidy, proteiny) – kratší řetězec + vodné mobilní fáze
- n vzorky obtížně rozpustné ve vodné složce – mobilní fáze s vyšším obsahem organického modifikátoru
- n iontové látky (anorganické soli, silné kyseliny a báze)
 - potlačení disociace volbou pH vodné složky mobilní fáze
 - přidavkem iontově-párového činidla – vytvoření méně polárního iontového asociátu (alkansulfonové kyseliny, alkansulfáty vs tetraalkylamoniové sole)

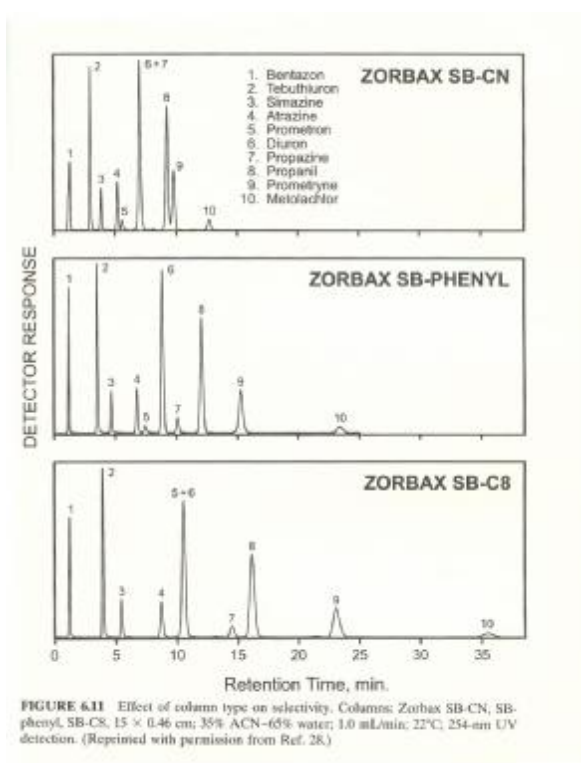
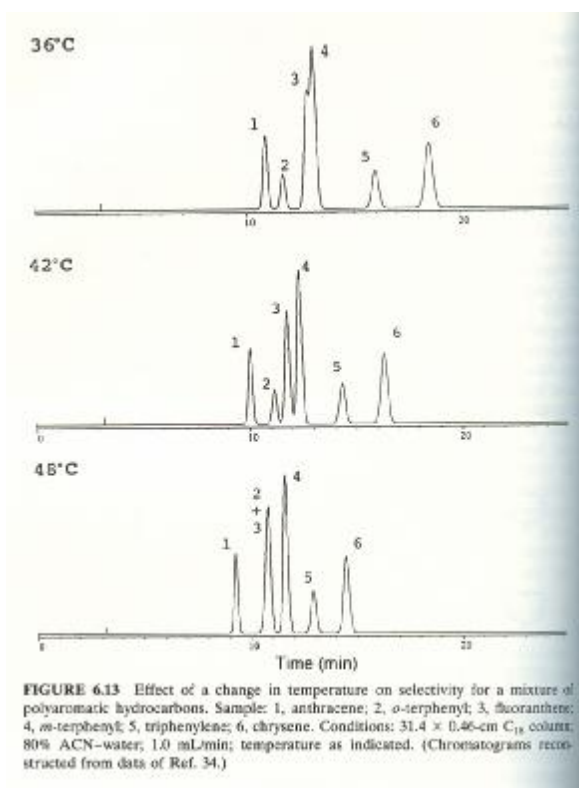
- n polární látky – NP separační mód
- n mírně polární stac. fáze – fenyllová
- n silně polární - amino a kyanopropylová



Proces optimalizace



Proces optimalizace



Isokratická vs. gradientová eluce

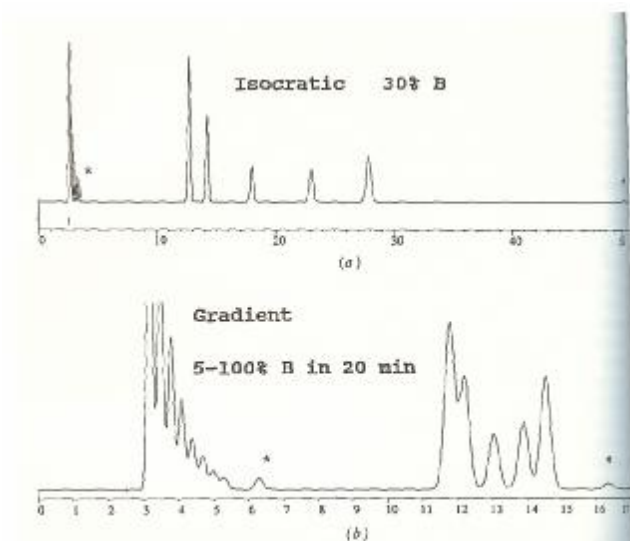


FIGURE 8.5 Separation of hypothetical sample by initial isocratic or gradient run. Minus early- and late-eluting bands indicated by an asterisk; computer simulations.

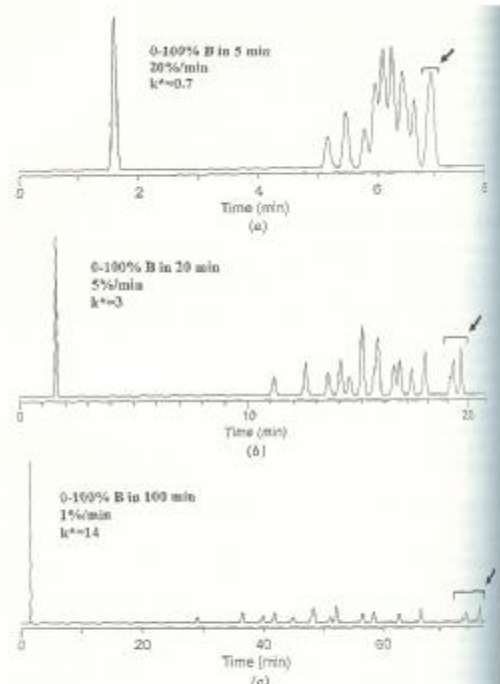


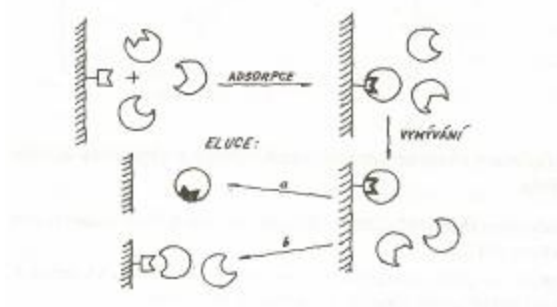
FIGURE 8.8 Gradient separation of a herbicide sample as a function of gradient time or steepness. Sample: mixture of nine phenylureas and six s-triazines. Conditions: 25×0.46 -cm, $10\text{-}\mu\text{m}$ C_{18} methanol-water gradients as indicated; 1.7 mL/min ; ambient temperature. (Computer simulations based on data reported in Ref. 17.) Arrows indicate last three bands in chromatogram.



Afinitní (biospecifická) chromatografie

Afinitní (biospecifická) chromatografie

- n afinitní chromatografie klasická i v HPLC uspořádání – v poslední době rozvoj – biomedicína a biotechnologie
- n princip – silné biospecifické, nekovalentní, reverzibilní interakce analytu s komplementární látkou (afinitní ligand, afinant) – nejčastěji bílkovina
- interakce enzymů s inhibitory, substráty, kofaktory, komplexy protilátek s antigeny, lektinů s glykoproteiny aj.
- stacionární fáze – nosič s kovalentně vázaným ligandem
po nástřiku analytu na kolonu zadrženy pouze analyty s komplementární vazbou k ligandu
ostatní – eluce s mrtvým časem



Stacionární fáze - nosiče

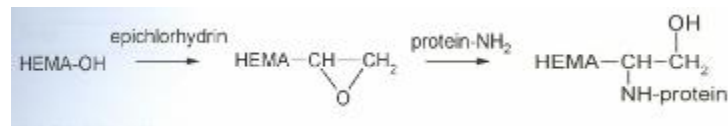
- n Nosič musí být:
 - nerozpustný v použitých rozpouštědlech
 - dostatečnou permeabilitu a specifický povrch, dostatečně porézní
 - chemicky a mechanicky stabilní
 - hydrofilní
 - Nosiče – agarosové – Sepharosa (2 polysacharidové jednotky), velké póry, pH 4 - 9, $0 < \text{teplota} < 40 \text{ }^\circ\text{C}$, odolná vůči org. rozpouštědlům (50 %), žádné nespecifické interakce x stlačitelná → nevhodná pro HPLC, podobně i celulosové deriváty
 - organické polymery:
 - Polyakrylamid – hydrofilní kopolymer akrylamidu a akrylamidových derivátů, neobsahuje skupiny nesoucí náboj – iontově výměnné interakce – minimální, syntetický polymer – nenapadán mikroorganismy, Bio-Gel P-100, Bio-Gel P-300 pH 1-10
 - $$\begin{array}{ccccccc} -\text{CH}_2 & -\text{CH} & -\text{CH}_2 & -\text{CH} & -\text{CH}_2 & -\text{CH} & - \\ & | & & | & & | & \\ & \text{CONH}_2 & & \text{CONH}_2 & & \text{CONH}_2 & \end{array}$$
 - Hydroxyalkylmethakrylát - hydrofilní, avšak částečně hydrofobní charakter – možnost hydrofobních interakcí s bílkovinami - HEMA Biospher

Aktivace nosičů, afinanty

- n aktivace bromkyanem (agarosové a hydroxyalkylmethakrylátové nosiče)

nosič	aktivace	vazba	afinant
-OH	+BrCN -O-CN	+N ₂ H-ligand	-O-CNH-ligand

- n aktivace epichlorhydrinem (hydroxyalkylmethakrylátové nosiče)



- n triazinová metoda (agarosa a celuloza)
- n jako ligandy- všechny látky schopné biospecifické reverzibilní vazby
- n bílkoviny (glykoproteiny → ovalbumin, kyselý α-glykoprotein, lektiny)
- n nízkomolekulární ligandy – stabilnější, stericky lépe dostupné
- n vysokomolekulární ligandy – i hůře definovatelné, sklon k denuraci
- n afinanty – specifické
 - skupinová selektivita

Eluce

- nízká afinita analytu k ligandu – pro eluci není třeba měnit mobilní fázi
- velká afinita analytu k ligandu- nutná změna některé (některých) vlastností mobilní fáze (M.F.)
- Eluční metody
- nespecifické - změnou koncentrace solí, typu solí, změnou pH, změnou teploty či přidávkem disociačních činidel do mobilní fáze – pro širokou škálu systémů analyt-afinitní ligand vs. změny vlastností M.F. mohou dosáhnou extrémních hodnot – denaturace interagujících bílkovin
- specifické – do mobilní fáze přidána látka, vytvářející stabilnější komplex s afinitním ligandem – rozrušení stávajícího komplexu analyt-afinant

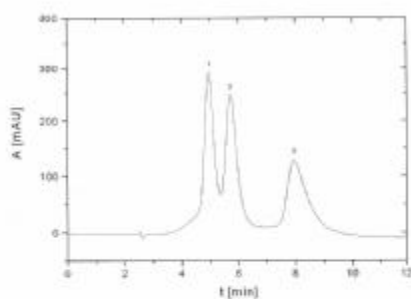
Analyty – izolace enzymů,
protilátek, nukleových kyselin,
hormonů, enzymů

Tab. 2.2 : Příklady měkčích elučních činidel

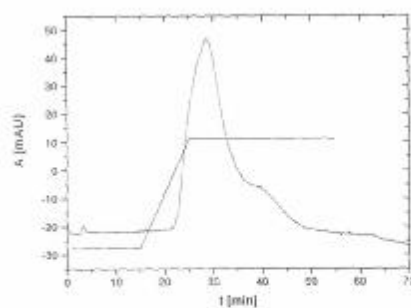
Analyzovaná látka	Eluční činidlo
Antipeptidasa A	2 mM TRIS-HCl, pH 8,0
Maltoz – glukosylasa	1 mM K ₂ PO ₄ , pH 7,4
Lidlo (liponitry) zbiologicki apoliponitri II	3 M NaSCN voda, pH 6,0 0,7 mM NaOH, pH 9,5 1 mM NaOH, pH 10,0
čtyřho oxidaci	0,05 M Na ₂ PO ₄ , pH 7,0 0,1 M kys. octová, pH 3,0
Glykoprotein	0,05 - 0,1 M M ₂ - α -D-glukozid

Separace

nosič- HEMA,
ligand – konkanavalin A (rostlinný lektin – *Jack Bean*, tetramerní (dimerní) metaloprotein, 4 podjednotky – každá podjednotka $M_r = 25\ 000$, 237 aminokyselin, Mn^{2+} a Ca^{2+} , jedno vazebné místo pro α -D-glukosylové, α -D-mannosylové a *N*-acetyl- α -D-glukosaminové zbytky



Obr. 4.6 : Separace směsi 4-nitrofenyl- α -D-galaktosidu (1), 4-nitrofenyl- α -D-glukosidu (2) a 4-nitrofenyl- α -D-mannosidu (3).
Experimentální podmínky: Diskusový objem 5 μ l, koncentrace (1), (2), (3) ve směsi 2 μ g/ml, průtoková rychlost 1,0 ml/min, mobilní fáze: 0,05 M TRIS-HCl (pH 7,2), 0,15 M NaCl, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $CaCl_2$; detektor při 280 nm.



Obr. 4.9 : Testování kolony konkanavalin α -glukopyranosidem
Experimentální podmínky: Diskusový objem 5 μ l, koncentrace α -glukopyranosidu 0,25 mg/ml, průtoková rychlost 0,6 ml/min, gradient 13 min A, během 10 minut změna z 0 % B na 100 % B, 30 min B; detektor při 280 nm.

0 - 15 min.- M.F. jako vlevo, 15 – 25 min.-
M.F. s přidavkem 0,1 M methyl- α -D-glukopyranosidu




Iontově výměnná chromatografie



Princip

- n podstatou – elektrostatické interakce
je třeba odtrhnout ion vázaný v tuhé fázi, převést jej do roztoku a nahradit jiným iontem z roztoku
- n Možnost výměny:
 - na podstatě a intenzitě sil poutající ion ve struktuře měniče
 - na koncentraci vyměňovaného iontu
 - na nábojích, rozměrech, tvaru a polarizovatelnosti obou iontů
 - na dostupnosti iontu ve struktuře měniče iontů na stupni nemísitelnosti měniče iontů a kapalné fáze obsahující vyměňovaný ion
- n Transport iontu z roztoku k výměnnému místu - měnič – charakterizován póry o určité velikosti – síťový efekt, děj iontové výměny velmi rychlý – celková rychlost určována rychlostí difúze
- n botnání organických polymerních nosičů – nutnost ekvibrace - osmotický tlak kompenzován napětím v pružné síti polymeru
- n afinita iontu k výměnnému místu - stupeň solvatace – vzrůstá s rostoucím nábojem a klesajícím poloměrem iontů



Obecná pravidla

- a) Při malé koncentraci a běžné teplotě –
výměnná interakce (retence) roste s rostoucím
nábojem
- b) Při stejném náboji roste s atomovým číslem
- c) Při vysokých teplotách a koncentracích iontů –
rozdíly v afinitě k měniči se smazávají
- d) Velké organické ionty – velká afinita



Stacionární fáze

- n organické polymery (velká kapacita pro dávkované vzorky)
- n anorganické materiály nejčastěji na bázi silikagelu – (rychle se ustavující rovnováha – možnost gradientové eluce)
- n nosiče – modifikovány iontově výměnnými skupinami
 - karboxylová (-COOH) – slabý měnič kationtů
 - sulfoskupina (-SO₃H)- silný měnič kationtů
 - aminoskupina (-NH₂) – slabý měnič aniontů
 - tetraalkylamoniová (-N⁺(R)₃) – silný měnič aniontů
- n pro kyselé nebo anionogenní látky – měnič aniontů
- n pro bazické nebo kationogenní látky – měnič kationtů
- n Simultání separace aniontů a kationtů se neprovádí
 - $X^+ + R \cdot K^+ \leftrightarrow X^+R^- + K^+$ měnič kationtů
 - $X^- + R^+Cl^- \leftrightarrow X^-R^+ + Cl^-$ měnič aniontů



Separace

- n výběr vhodné stacionární fáze
 - n výběr vodného pufru, zajišťující ionizaci analytů, typicky $\text{pH} > 6$ ($\text{p}K_a$) pro měnič aniontů
 - n $\text{pH} < 6$ ($\text{p}K_a$) pro měnič kationtů
 - n mobilní fáze – tlumivé roztoky - jejich ionty (protionty) jsou v dynamické rovnováze s ionty měniče
 - n Ovlivnění retence:
 - n typ pufru nebo sole, jejich koncentrace
 - n vyšší koncentrace – rychlejší eluce
- F^- (slabý) $< \text{OH}^- < \text{octan}^- < \text{Cl}^- < \text{SCN}^- < \text{Br}^- < \text{CrO}_4^- < \text{NO}_3^- < \text{I}^- < \text{šřavelan}^{2-} < \text{citrát}^{3-}$ (silný)
- Li^+ (slabý) $< \text{H}^+ < \text{Na}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{K}^+ < \text{Rb}^+ < \text{Cs}^+ < \text{Ag}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Pb}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$ (silný)
- n vliv pH – ovlivnění míry ionizace
 - n organická rozpouštědla – přídavek – snížení retence (ACN, MeOH)



Smíšený separační mód

- n Stacionární fáze – vykazuje chování RP módu i iontové výměny (směs 1:1)
- n Látky nabité – přednostně iontovou výměnou – zvýšení iontové síly M.F. – snížení retence
- n Neutrální látky – přednostně hydrofobní interakce – zvýšení obsahu organického modifikátoru - snížení retence



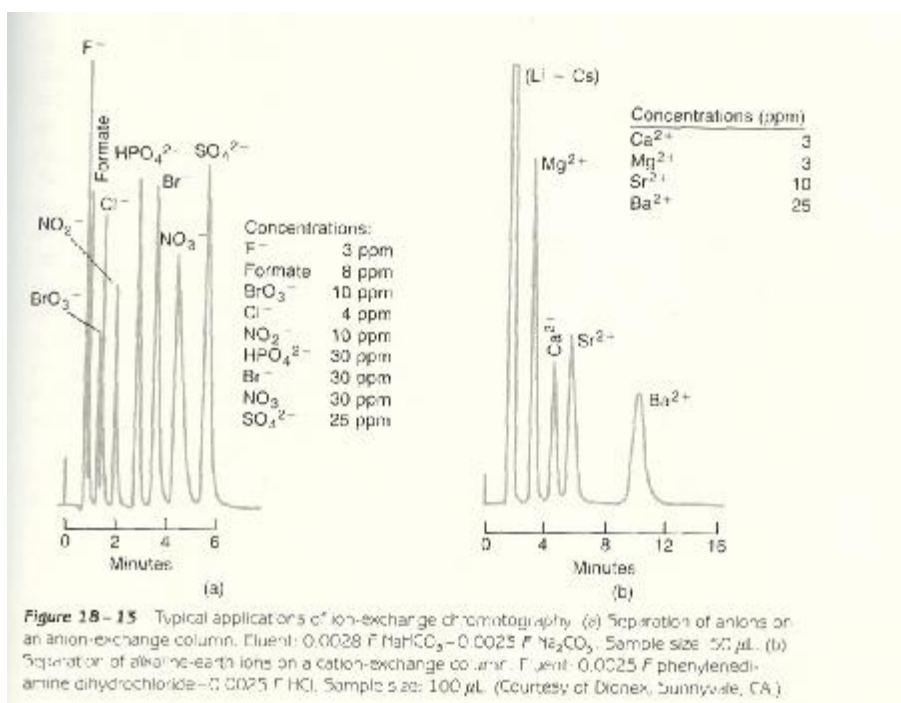
Analyty

silné elektrolyty

slabé elektrolyty (převedené na iontovou formu)

- n Anorganické ionty (nepřímá UV detekce, vodivostní detekce, nutno zařadit potlačující kolonu, snižující vodivost vlastní mobilní fáze (HCO_3^- , CO_3^{2-} , H^+))- iontová chromatografie
- n Amfoterní ionty $pI = (pK_a + pK_b)/2$
- n Aminokyseliny, peptidy, proteiny
- n Odlišné chování bílkovin od aminokyselin a peptidů – v závislosti na pH se zcela nebo vůbec sorbují (pI), výhodné $\text{pH} \pm 1$ než pI – eluce sorbovaných bílkovin – většinou pH gradient

Aplikace



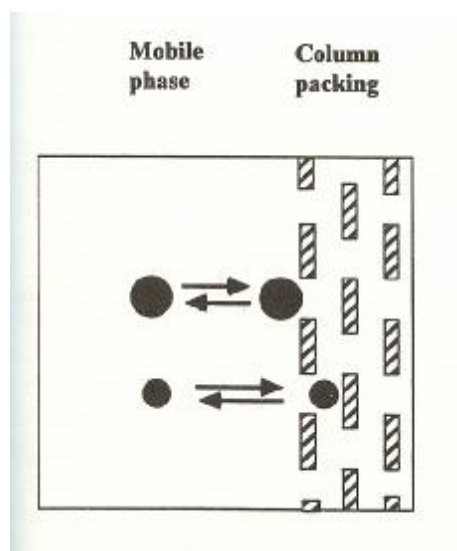


Vylučovací chromatografie

(Size Exclusion Chromatography, SEC)

■ Gelová filtrační chromatografie (hydrofilní gel + s vodnými pufrý jako M.F.), gelová permeační chromatografie (hydrofobní gel + organická rozpouštědla), gelová filtrace oddělování látek s velmi rozdílnými molekulovými hmotnostmi

- n Molekuly se dělí podle své velikosti, princip rozdělování je nerovnovážný – síťový efekt
- n Interakce analytu se stacionární fází jsou minimální a nežádoucí



Princip separace

objem mobilní fáze uvnitř pórů V_i

objem mobilní fáze mezi částicemi V_o

celkový objem $V_t = V_o + V_i$

molekuly větší než je objem pórů – eluce v objemu V_o

malé molekuly, pronikající zcela do průř. fáze - eluce v objemu V_t

ostatní eluují v retenčním objemu V_R $V_o < V_R < V_t$

$$K_o = (V_R - V_o) / V_i$$

$$V_R = V_o + K_o V_i$$

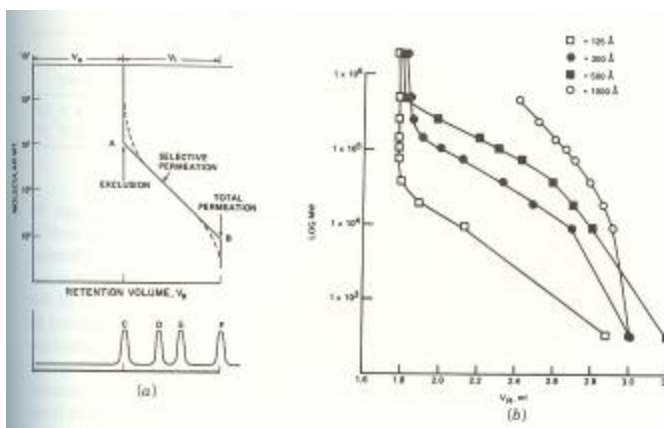
K_o distribuční konstanta

frakcionační rozsah

$<1000; 10^6>$

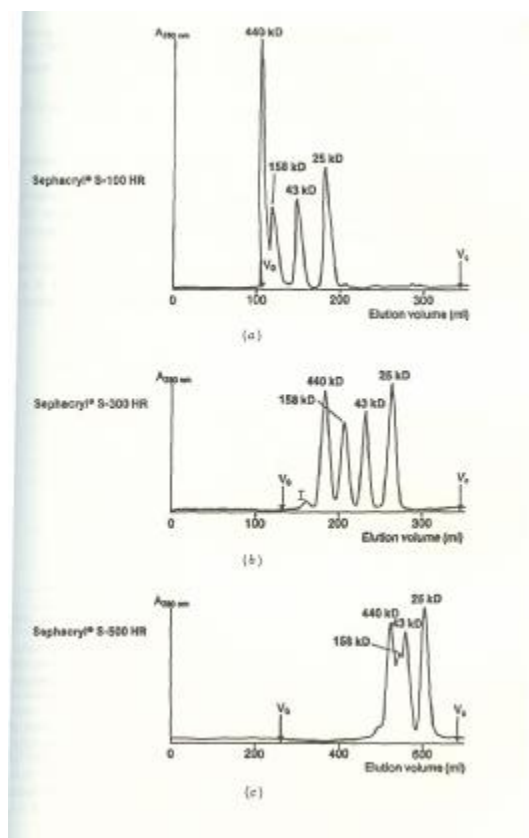
vyřučovací limit

dalton



v ideálním případě (o retenci rozhoduje jenom tvar a velikost pórů stac. fáze a velikost molekul analytu) platí: $t_R = a - b \log M_r$

okalibrování kolony látkami o známé molekulové hmotnosti – určit molekulovou hmotnost analytu





Stacionární fáze

- n Klasická gelová chromatografie – zesíťované agarosové a dextranové gely – průtok mobilní fáze – gravitace – stlačitelné x HPLC
- n HPLC
- n – hydrofobní - styren-divinylbenzenový kopolymer, methakrylátový polymer + organická rozpouštědla jako mobilní fáze
- n -hydrofilní – - organické polymery - polyakrylamidové, hydroxyalkylmethakrylátové
- n Anorganické – silikagel, porézní sklo – velká permeabilita, kompatibilita s běžnými rozpouštědly x omezený rozsah pH a adsorpce analytů a složek mobilní fáze



Mobilní fáze

- n musí rozpouštět analyty
- n Neinteragovat se stacionární fází, ale smáčet ji
- n Solvatace analytů je nežádoucí – zvyšuje jejich zdánlivou molekulovou hmotnost
- n Kompatibilní s detektorem
- n Pro biopolymery – vodné mobilní fáze
- n Syntetické polymery – toluen, tetrahydrofuran aj
– absorpce v UV oblasti – často používán refraktometrický detektor



Aplikace

- n Pro látky s molekulovou hmotností nad 2 000 ,
pro menší – výhodnější a rychlejší RP mod
- n Předseparace komplexních vzorků
- n Oddělení nízko a vysokomolekulárních látek
- n Určení molekulové hmotnosti (chyba 2-10%)