



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. Warsovie, 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, vytěsňovací
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.

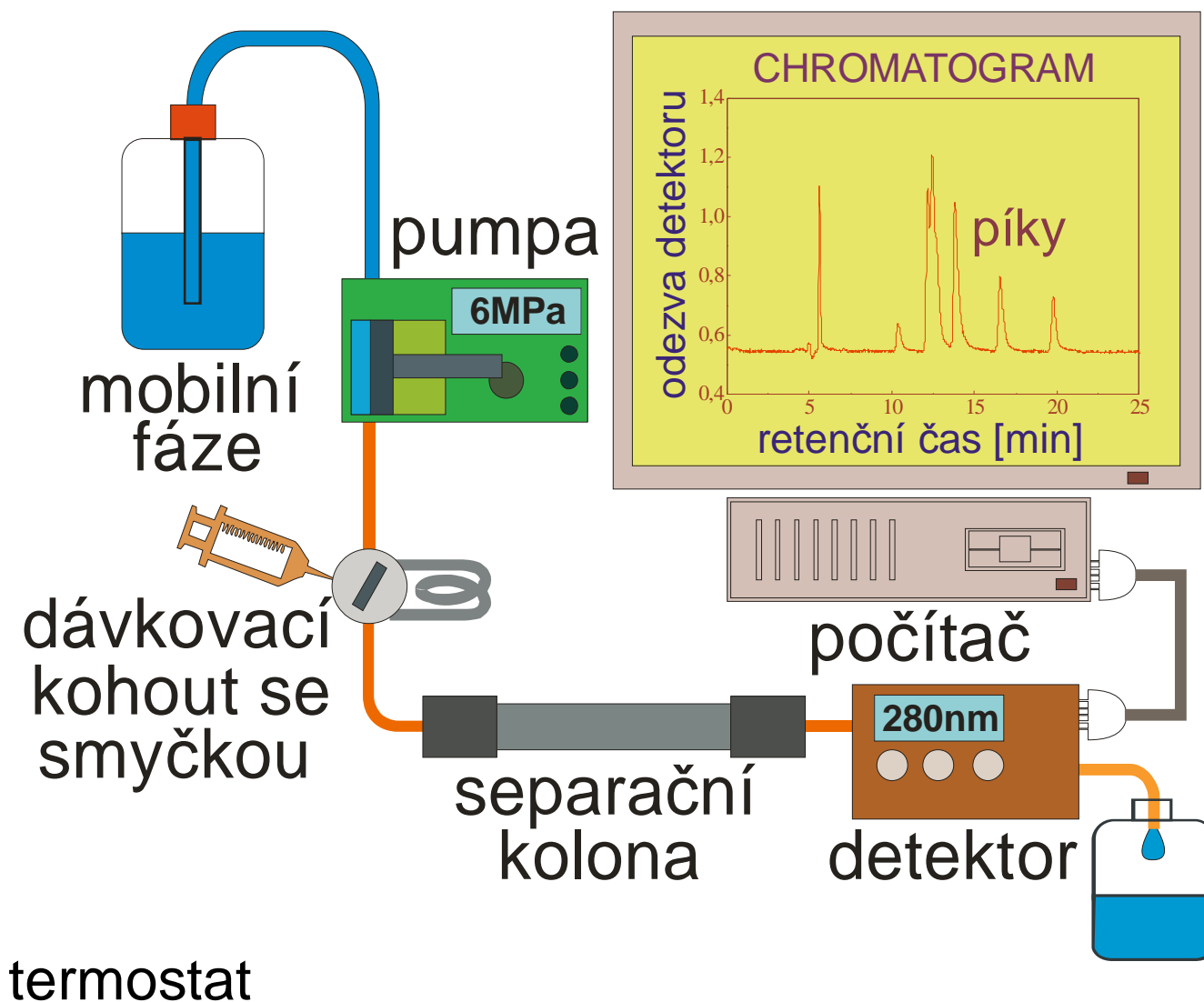
Adsorpční chromatografie (LSC)

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 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

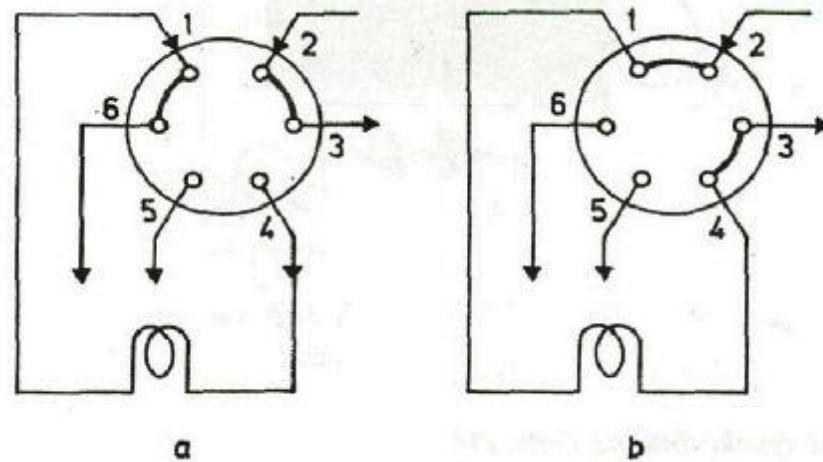


Schéma šesticestného ventilu se smyčkou

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-

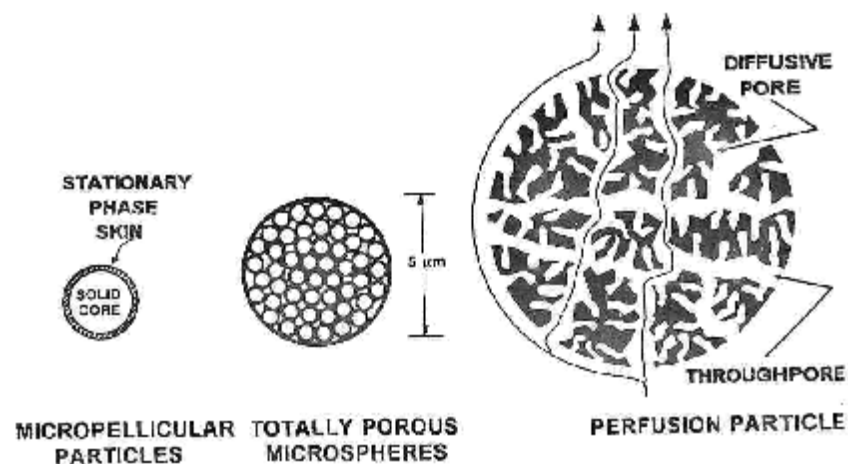
plyn $0,01-1,0 \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$

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 | | | |



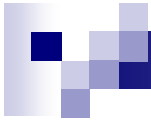
Detektory

- 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



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

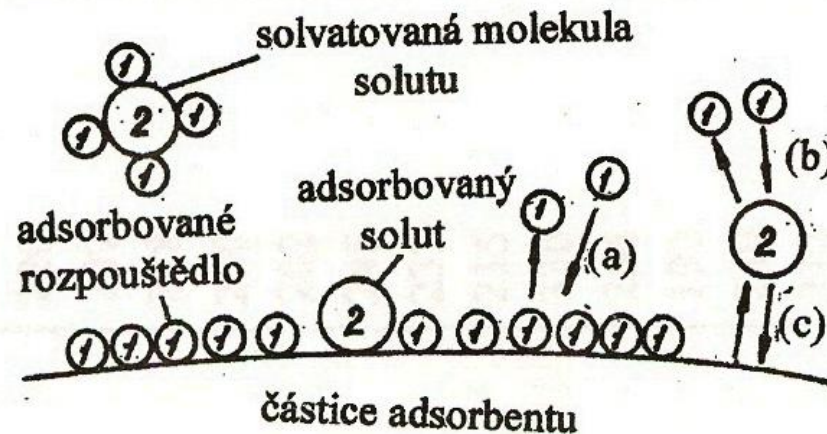
$$m_1 = m_2 \qquad m_1^0 + RT \ln a_1 = m_2^0 + RT \ln a_2$$

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

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

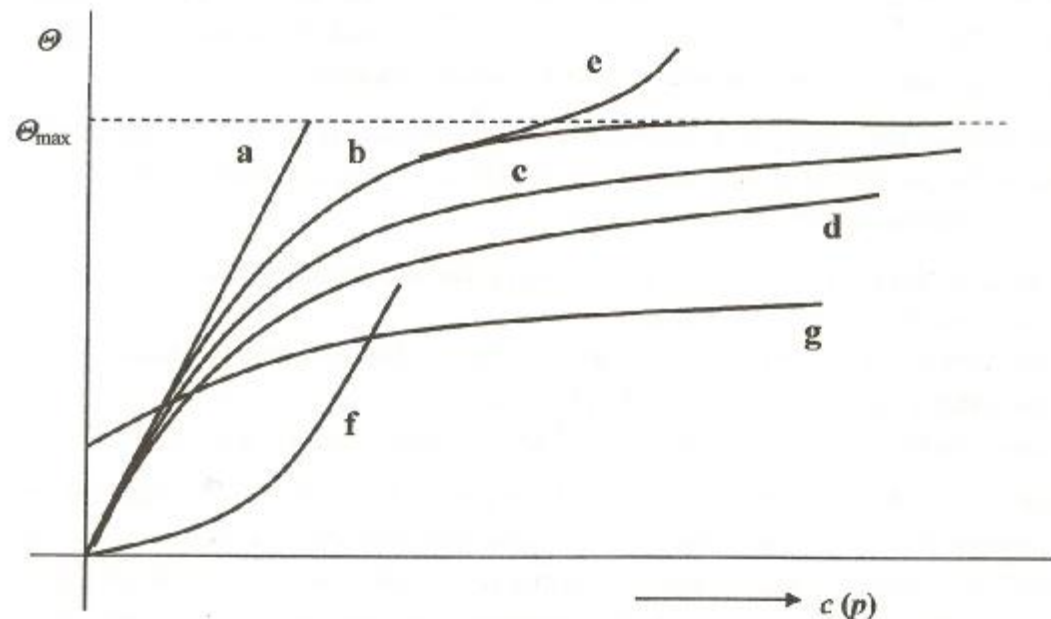
$$\Theta = \frac{k_a p}{k_d + k_a p} = \frac{bp}{1 + bp}; b = \frac{k_a}{k_d}$$

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 izoterem

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 (pohlcovač 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

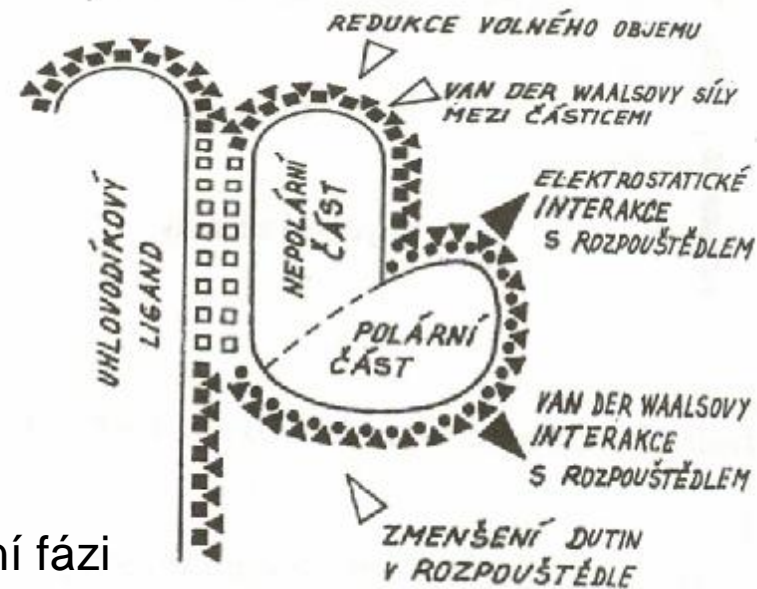
- n Chemicky vázané (zejména nepolární reverzní fáze) – nejpožívanější stacionární fáze (SF)
- n Široký aplikační okruh (asi 80 % všech aplikací)
- n Velký počet SF – aplikační flexibilita
- n Rychlé ustavování rovnováhy v koloně, rychlejší, reprodukovatelnější
- n Použití levných mobilních fází, uživatelsky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

Mechanismus separace:

interakce solutu s mobilní fází

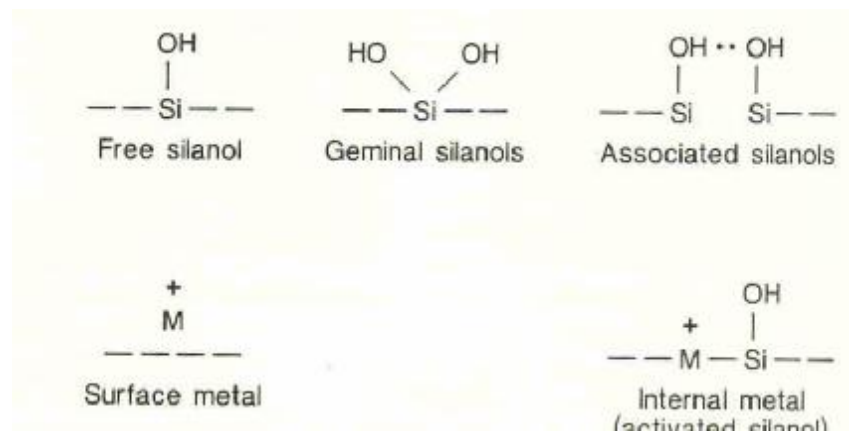
interakce mobilní fáze se stacionární fází

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

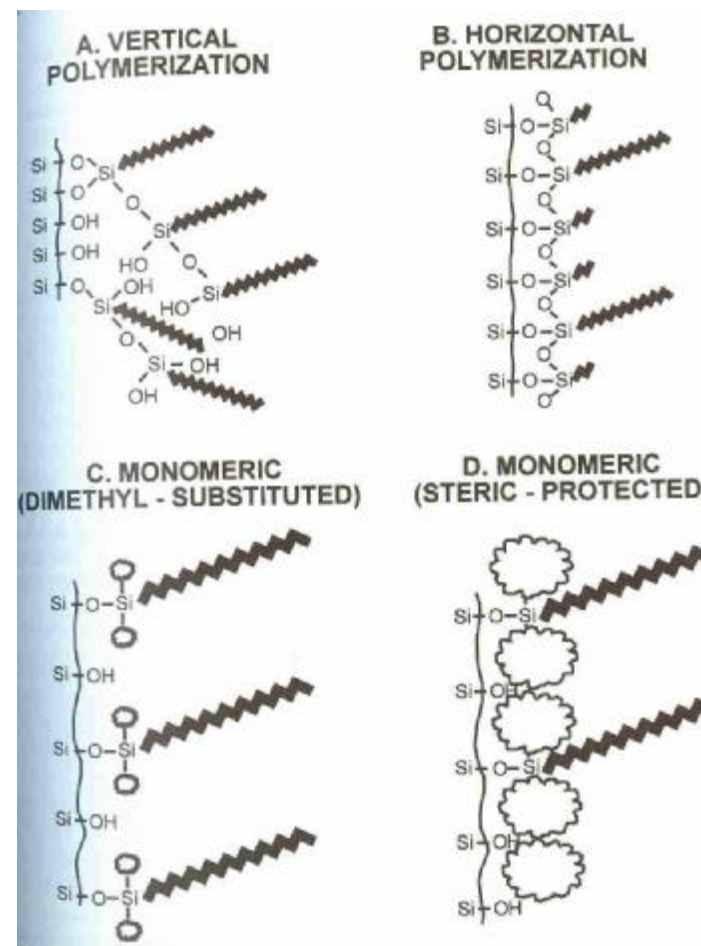
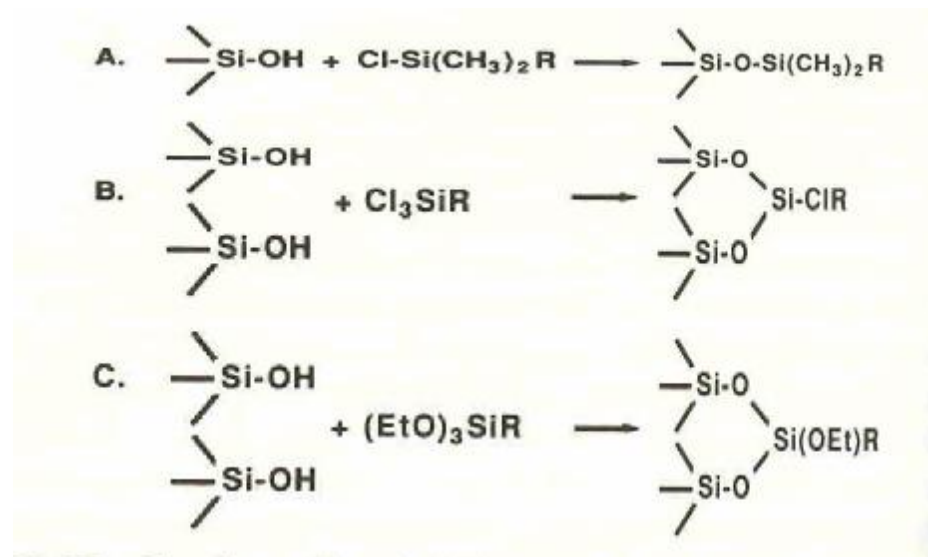


Nosiče

- 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

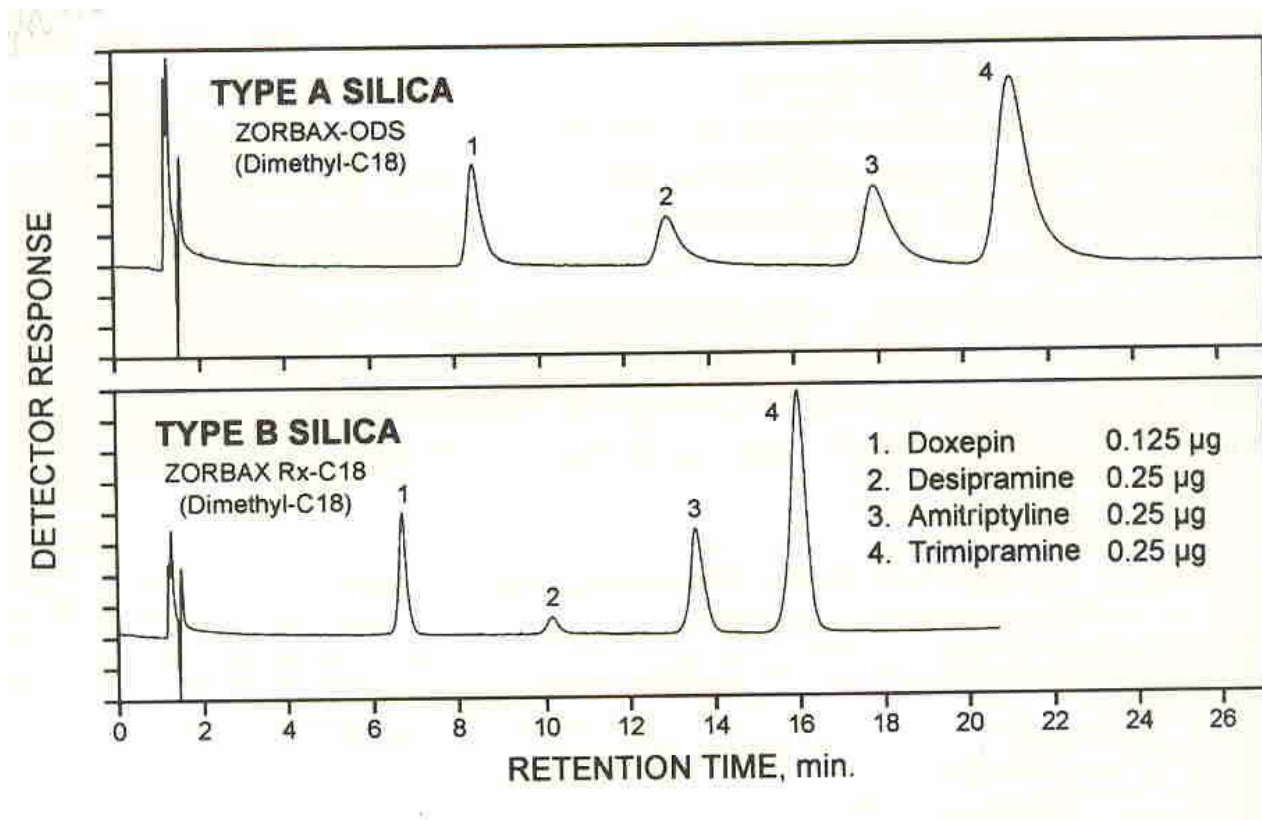
- n reakce silanových skupin - chlorsilanovou sloučeninou - uhlíkaté radikály určují charakter chromatografického materiálu
- n Různý způsob navázání – různé typy ramínek (spacer) – stérická dostupnost pro analyt
- n asi 50 % silanolových skupin –
- n nezreagovaných – nežádoucí elektrostatické (tzv. 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)
- $$\log k = \log k_w + aF + bF^2, \quad k_w - k \text{ solutu v čisté vodě}$$
- F - objemový zlomek rozpouštědla
- $$\log k = \log k_w - sF \quad \text{pro } 0,9 > F > 0,1$$
- přídavek neutrální soli – zvýšení povrchového napětí – prodloužení retence



Výběr počátečních separačních podmínek

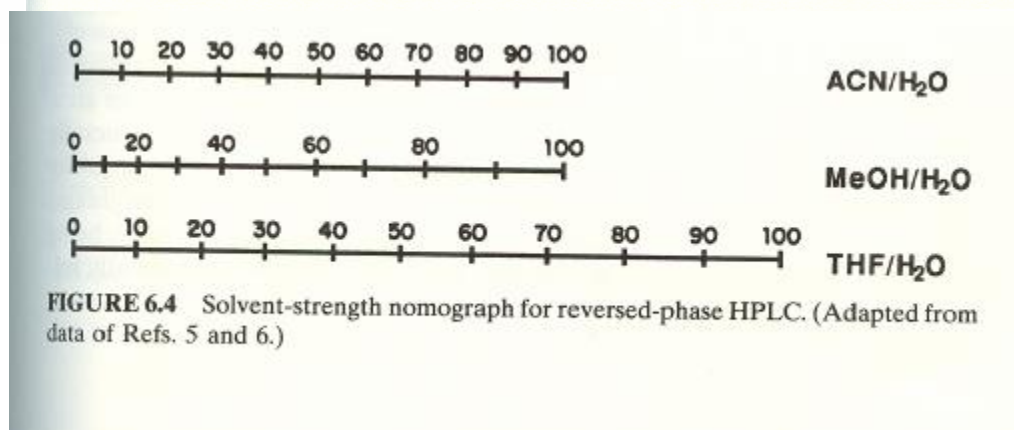
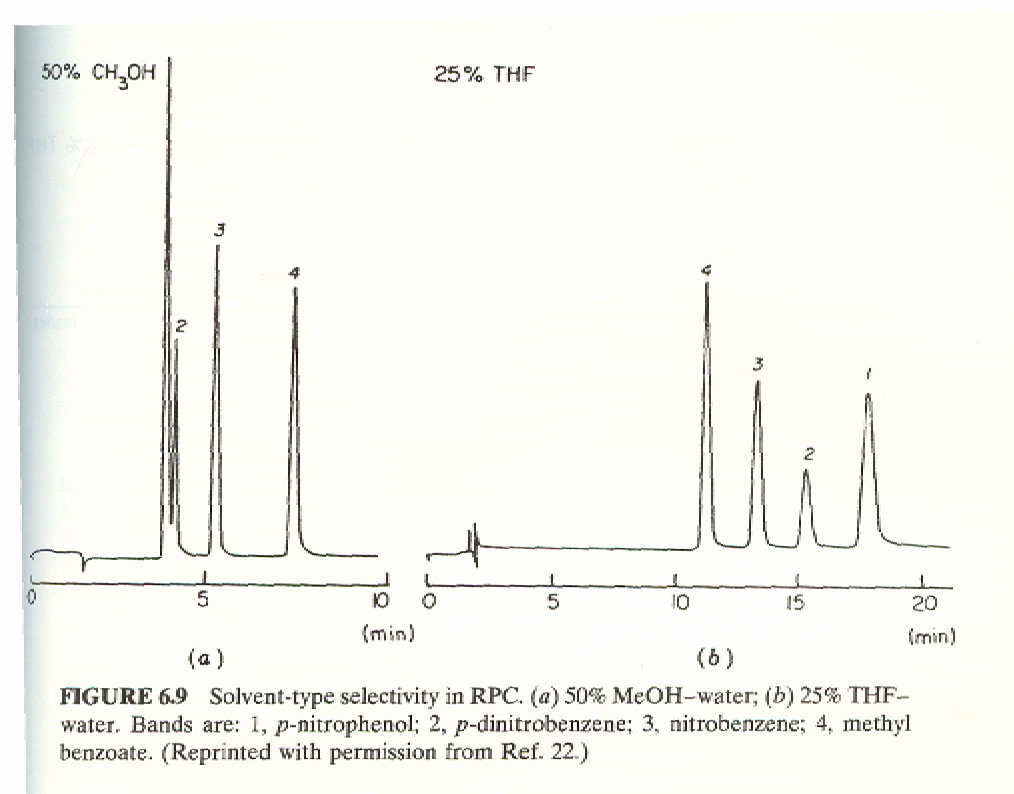
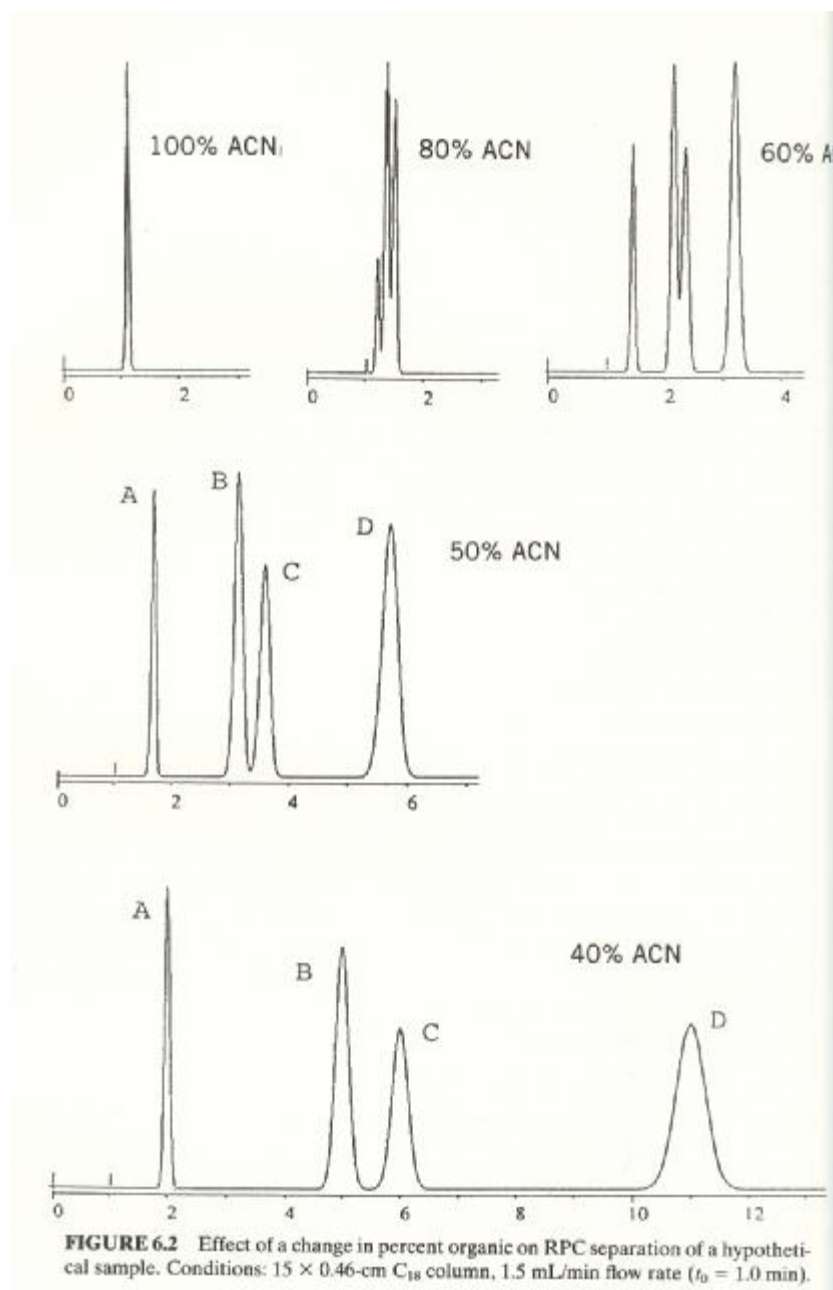
- n **kolona** 150 x 4,6 mm, velikost zrnění 5 μm ,
- n **stacionární fáze** C18 (C8) navázaná na silikagelové matrici
- n **mobilní fáze** acetonitril (70 -100 %) – voda/(pufr - typ, koncentrace, pH), (aditiva)
- n **izokratická eluce**
- n **průtoková rychlost mobilní fáze** 0,7- 2,0 ml/min
- n **dávkový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



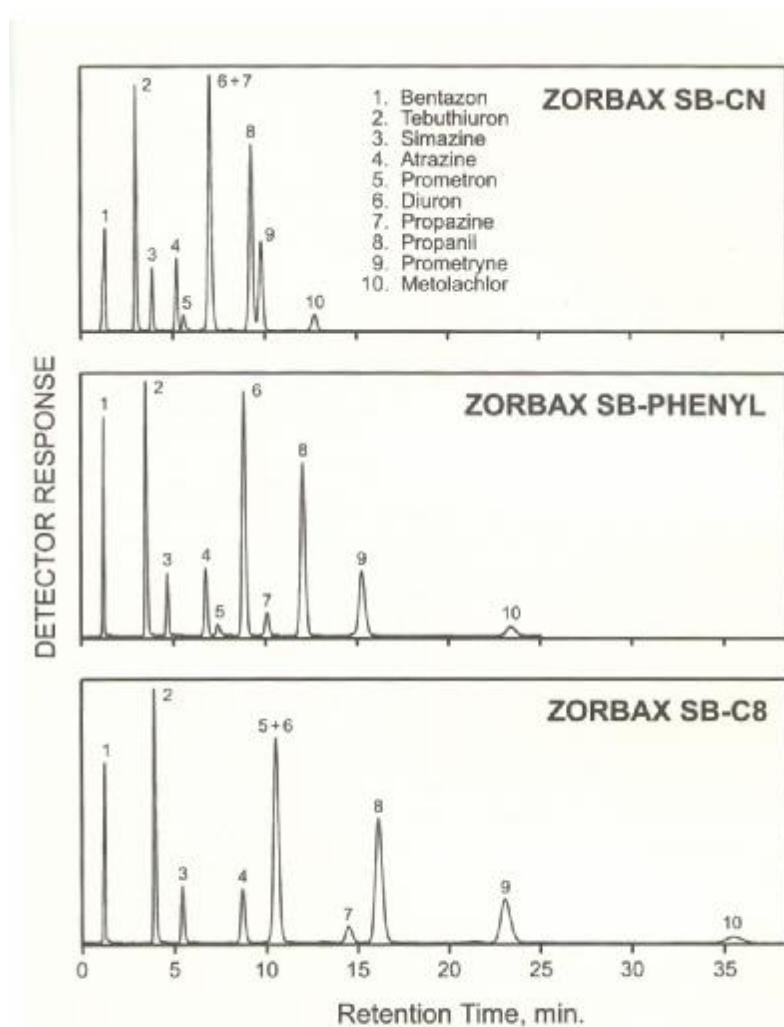
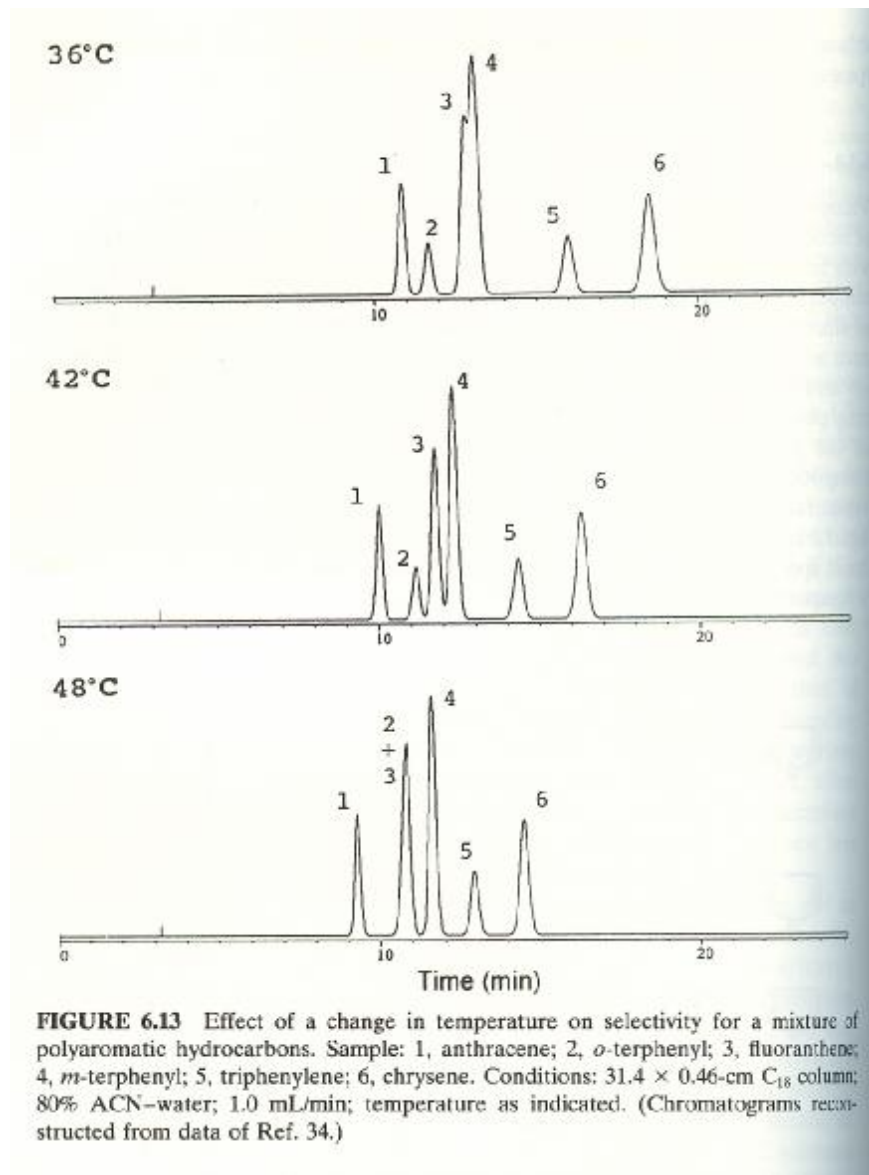
Proces optimalizace

- 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 – fenylová
- n silně polární - amino a kyanopropylová

Proces optimalizace



Proces optimalizace



Isokratická vs. gradientová eluce

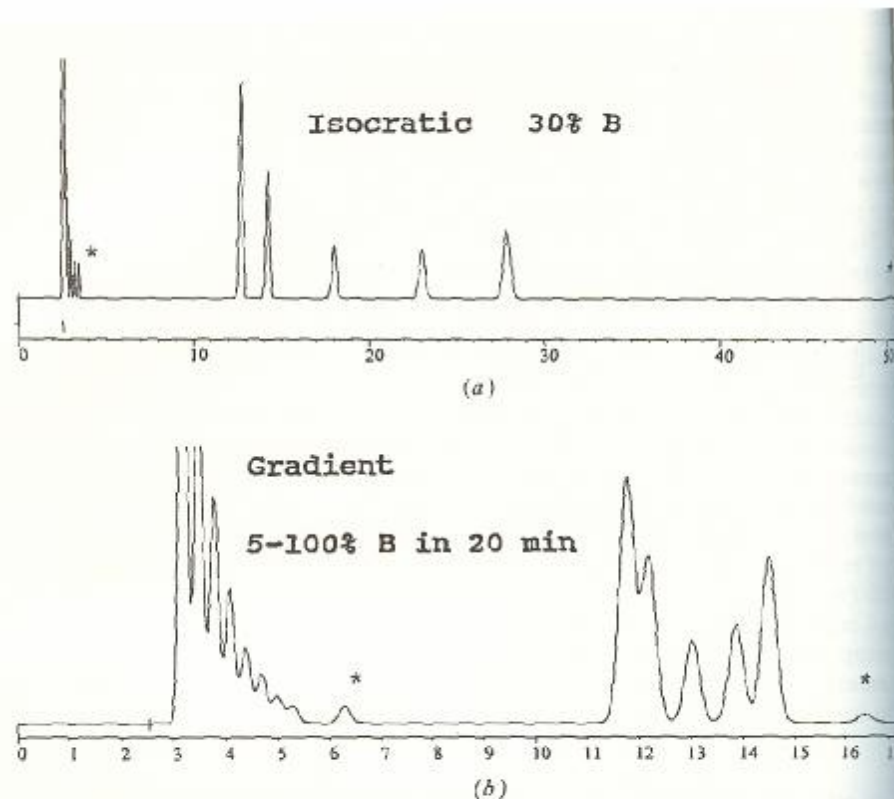


FIGURE 8.5 Separation of hypothetical sample by initial isocratic or gradient runs. Minor early- and late-eluting bands indicated by an asterisk; computer simulations.

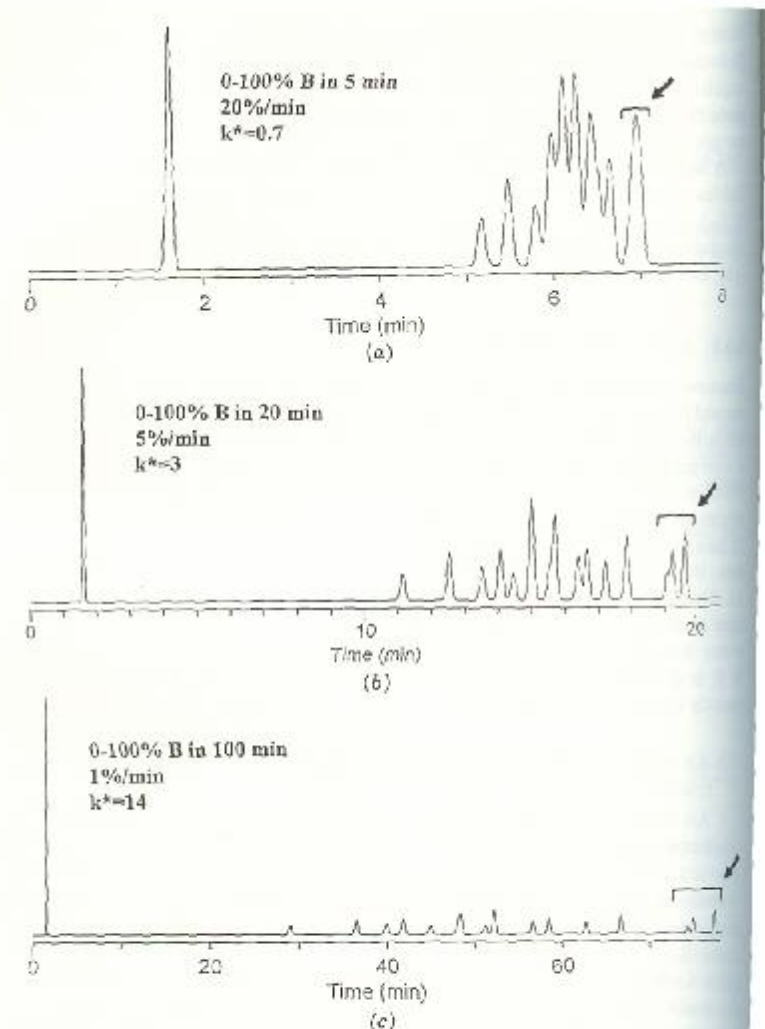
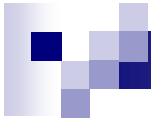


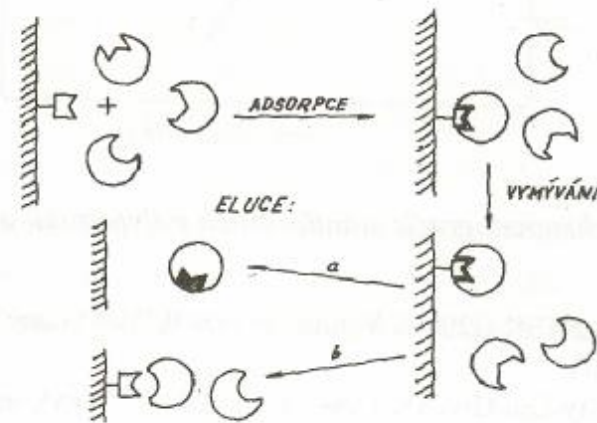
FIGURE 8.8 Gradient separation of a herbicide sample as a function of gradient time or steepness. Sample: mixture of nine phenylureas and six *s*-triazines. Conditions: 25×0.46 -cm, $10\text{-}\mu\text{m}$ C_{18} ; methanol-water gradients as indicated; 1.7 mL/min; ambient temperature. (Computer simulations 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

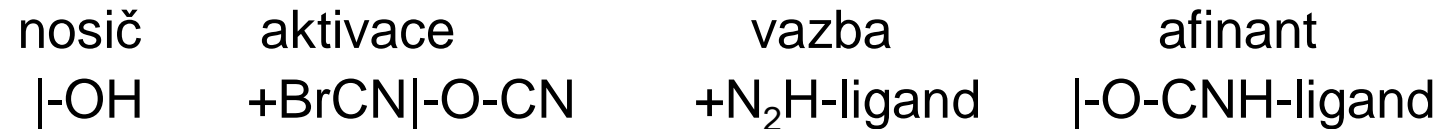


Stacionární fáze - nosiče

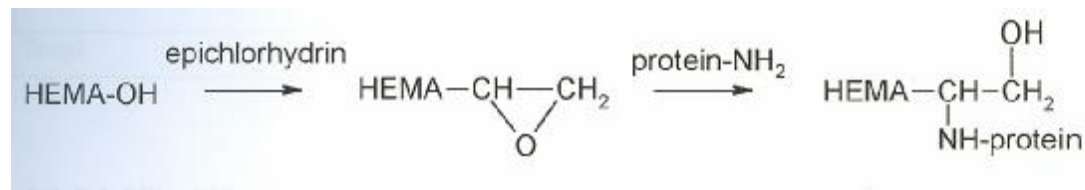
- n Nosič musí být:
 - nerozpustný v použitých rozpouštědlech
 - dostatečnou permeabilitu a specifický povrch, dostatečně porézní
 - chemicky a mechanicky stabilní
 - hydrofilní
 - Nosiče – agarosové – Sepharosa (2 polysacharidové jednotky), velké póry, pH 4 - 9, $0 < \text{teplota} < 40 \text{ }^\circ\text{C}$, 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 bromcyanem (agarosové a hydroxyalkylmethakrylátové nosiče)



- 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 denaturaci
- 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

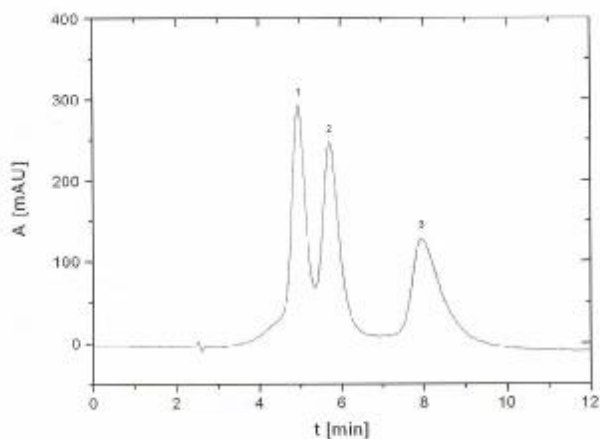
Analyty – izolace enzymů,
protilátek, nukleových kyselin,
hormonů, enzymů

Tab. 2.2 : Příklady některých elučních činidel

| Analyzovaná látka | Eluční činidlo |
|---|--|
| Aminopeptidasa A | 2 mM TRIS-HCL, pH 8,0 |
| Maltasa – glukooamylasa | 1 mM K ₂ PO ₄ , pH 7,4 |
| Lidské lipoproteiny obsahující apolipoprotein B | 3 M NaSCN voda, pH 6,0 0,7 mM NaOH, pH 9,6 1 mM NaOH, pH 10,0 |
| <i>Bacillus anthracis</i> | 0,05 M Na ₂ PO ₄ , pH 7,0 0,1 M kys. octová, pH 3,0 |
| Glykoproteiny | 0,05 - 0,1 M Me- α -D-glukosid |

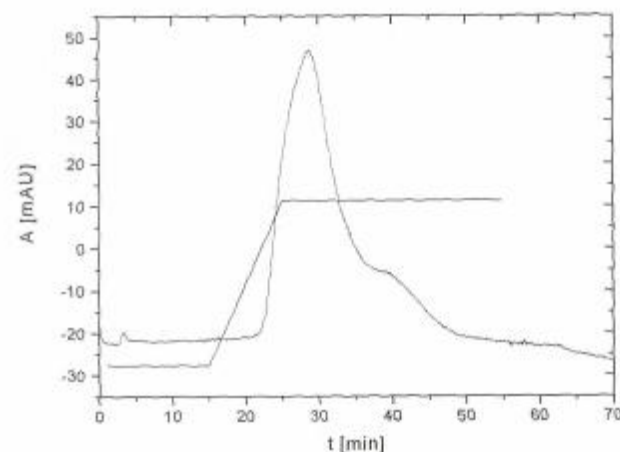
Separace

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).

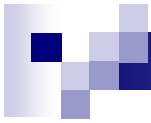
Experimentální podmínky: Dávkovaný objem 5 μ l; koncentrace (1), (2), (3) ve směsi 2 mg/ml; průtoková rychlost 1,0 ml/min; mobilní fáze 0,01 M TRIS-HCl (pH 7,2), 0,15 M NaCl, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$; detekce při 280 nm.



Obr. 4.9 : Testování kolony kyselým α -glykoproteinem

Experimentální podmínky: Dávkovaný objem 5 μ l; koncentrace α -glykoproteinu 0,25 mg/ml; průtoková rychlost 0,6 ml/min; gradient 15 min A, během 10 minut změna z 0 % B na 100 % B; 30 min B; detekce 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 poutajících 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 – (rycle 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
 - $X^+ + R-K^+ \leftrightarrow X^+R^- + K^+$ 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 nabitě – přednostně iontovou výměnou – zvýšení iontové síly M.F. – snížení retence
- n Neutrální látky – přednostně hydrofobní interakce – zvýšení obsahu organického modifikátoru - snížení retence



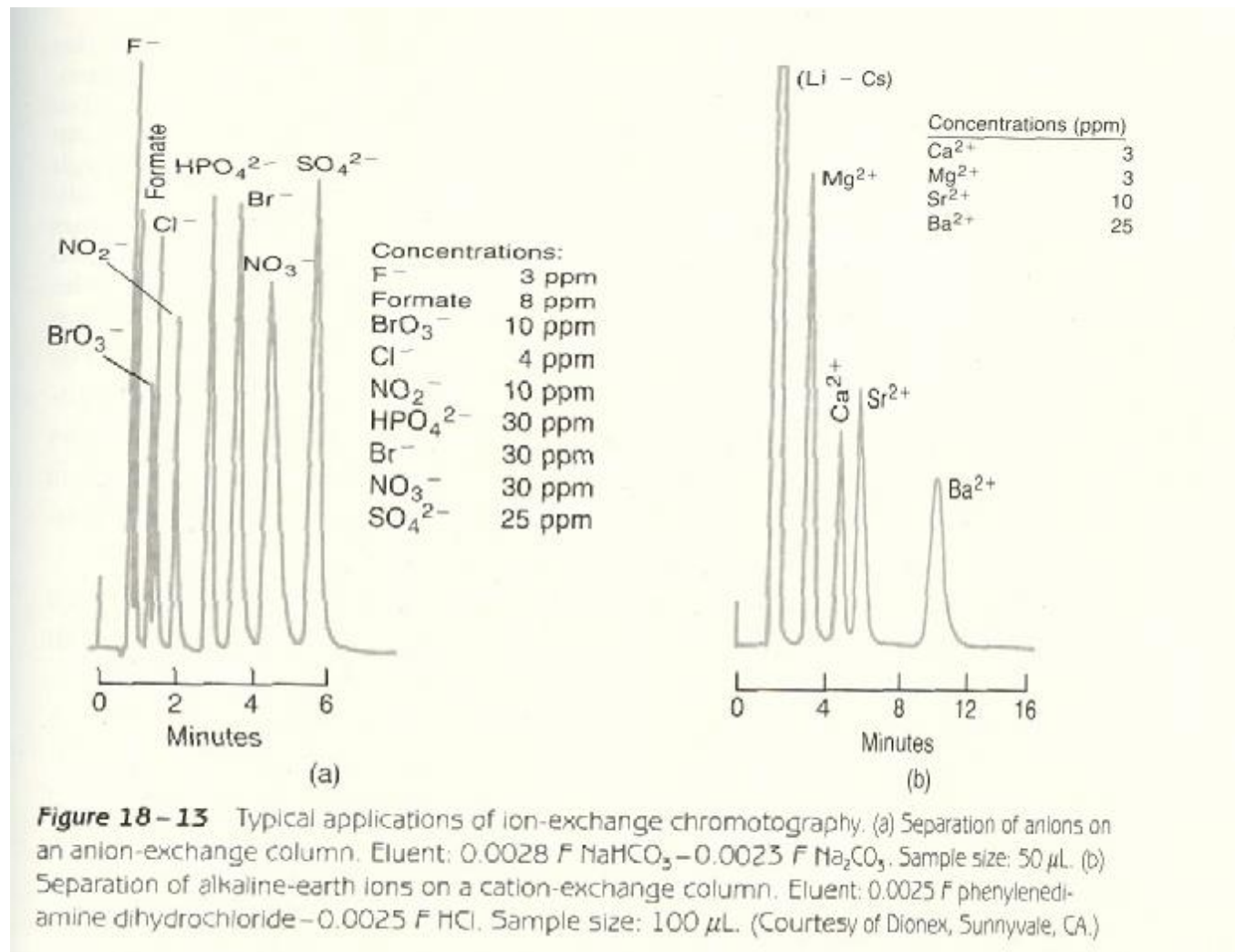
Analyty

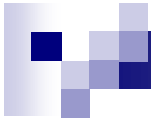
silné elektrolyty

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 $pI = (\text{p}K_a + \text{p}K_b)/2$
- 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



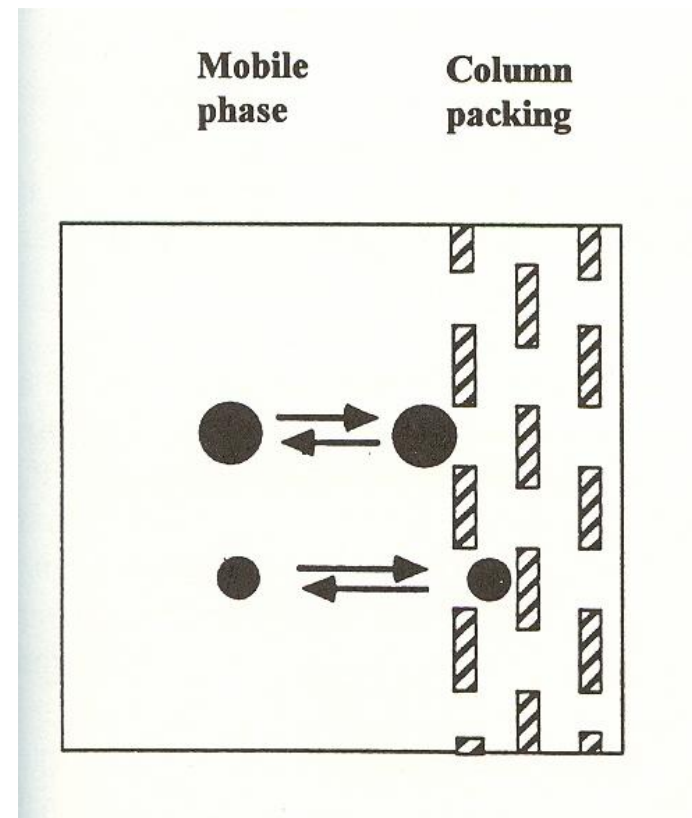


Vylučovací chromatografie

(Size Exclusion Chromatography, SEC)

■ Gelová filtrační chromatografie (hydrofilní gel + s vodnými pufrů 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 $V_o < V_R < V_t$

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

$$V_R = V_o + K_o V_i$$

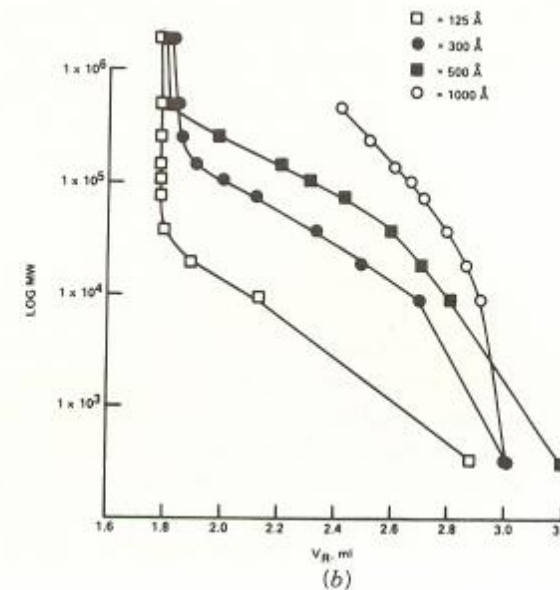
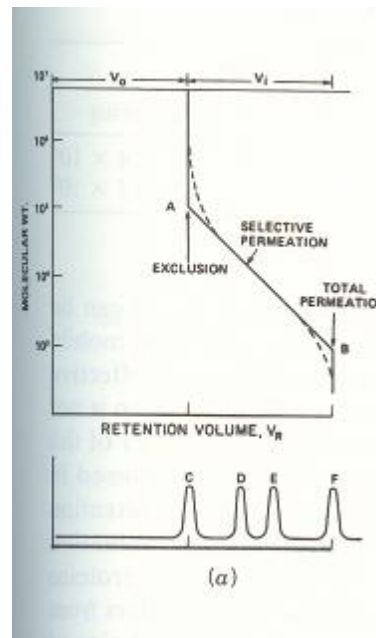
K_o distribuční konstanta

frakcionační rozsah

<1000; 10^6 >

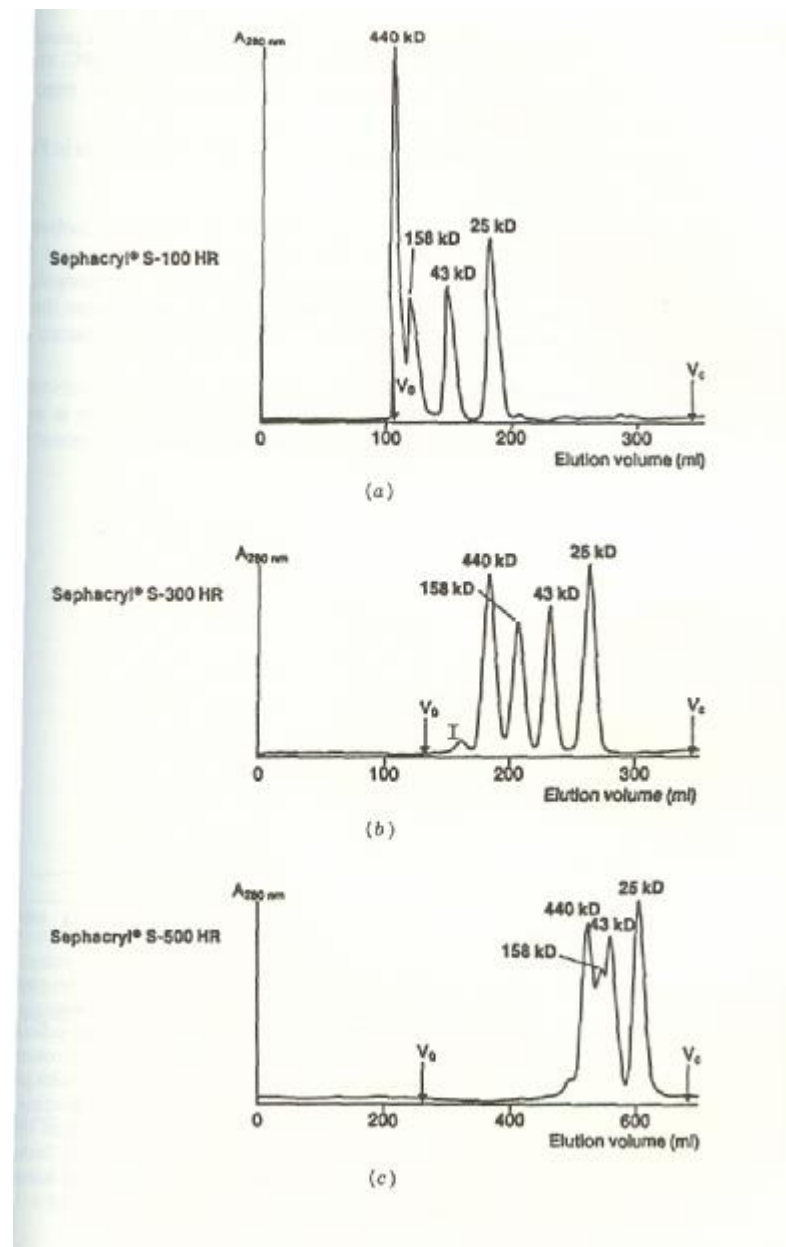
vylučovací limit

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%)