CHROMATOGRAFICKÉ METODY 1

Chromatografické metody se řadí mezi separační metody, které jsou založeny na rozdílné distribuci dělených látek mezi dvěma navzájem nemísitelnými fázemi: **mobilní** (pohyblivou) a **stacionární** (nepohyblivou).

Vzorek je unášen pohybem mobilní fáze v chromatografickém systému. Jednotlivé složky vzorku jsou rozdělovány podle jejich interakce se stacionární fází. Čím silnější je interakce analytů se stacionární fází, než s fází mobilní, tím déle se zdržují na koloně. Složky s nižší afinitou jsou více pohyblivější, tím dochází k separaci jednotlivých složek.

Klasifikace chromatografických metod:

a. Podle povahy mobilní fáze:

- *kapalinová chromatografie (LC)*
  - mobilní fáze je kapalina
  - stacionární fáze je pevná látka nebo kapalina ukotvená na pevném nosiči
- *plynová chromatografie (GC)*
  - mobilní fáze je inertní plyn
  - stacionární fáze je zpravidla tenká vrstva viskózní kapaliny, nanesená na vnitřním povrchu kapilární kolony

b. Podle způsobu separace:

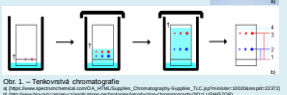
- *adsorpční (LSC)*
  - separace založena na rozdílné adsorpci analytů na povrch stacionární fáze
- *rozdělovací (LLC)*
  - separace je založena na různé rozpustnosti ve stacionární a mobilní fázi
- *iontově-výměnná (IEC)*
  - separace látek založena na silných elektrostatických interakcích mezi ionizovanými funkčními skupinami stacionární fáze s opačně nabitými ionty analyzovaného roztoku
- *afinitní (AC)*
  - stacionární fáze selektivně váže pouze specifický analyt - afinita
- *gelová (GPC)*
  - separace probíhá v gelu s póry definované velikosti, ve kterých jsou analyty rozděleny podle velikosti molekul

c. Podle účelu:

- *analytické (kvalitativní, kvantitativní)*
- *preparativní (příprava většího množství čistých látek)*

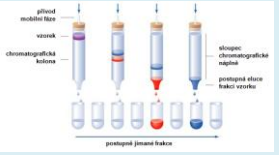
d. Podle prostorového uspořádání:

- *plošná*
  - papírová (PC), tenkovrstvá (TLC)



Obr. 1. – Tenkovrstvá chromatografie
a) (https://www.spectrumchemical.com/OA_HTML/Supplies_Chromatography-Supplies_TLC.jsp?minisite=10320&sess=psh22372)
b) (http://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/introduction-chromatography?ID=LU0M57OP)

- *sloupcová (kolonová)*
  - stacionární fáze je uložena ve formě sorbentu v chromatografické koloně



Obr. 2 – Sloupcová chromatografie - separace látek (Bioanalytické metody, VŠCHT2001)

Chromatografie slouží:

- ke kontrole technologických procesů
- při kontrole kvality potravin
- pro odhalení a potvrzení falšování potravin
- výzkum

Autoři: Gabriela Bartoníková, MVDr. Michaela Králová, Ph.D.

Práce vznikla za finanční podpory projektu IVA VFU Brno č. 2018FVHE/2340/49.

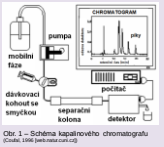
CHROMATOGRAFICKÉ METODY 2

Kapalinová chromatografie (LC)

- analyty jsou ve vzorku separovány na základě jejich interakcí jak se stacionární fází, tak i s fází mobilní

Chromatografie	Mobilní fáze	Stacionární fáze
na normální fázi (NP)	hexan, nepolární rozpouštědla	polární sorbent, silikagel
na reverzní fázi (RP)	methanol, acetonitril, voda, pufry, roztoky solí, kyselin	na sorbent (silikagel , polymer) navázán nepolární řetězec C18, C8

- **eluce**: *izokratická* (konstantní složení mobilní fáze)
  gradientová (změna polarity mobilní fáze mísením rozpouštědel)
- **detektory** – UV-VIS spektrofotometrický, fluorescenční, refraktometrický, vodivostní, elektrochemické, aerosolové, hmotnostně spektrometrický



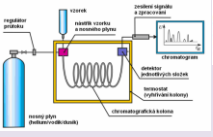
Obr. 1 – Schéma kapalinového chromatografu (Coubal, 1996 [web.natur.cuni.cz])

Obr. 2 Autosampler (https://www.globalspec.com/learnmore/laboratory_equipment_scientific_instruments/lab_automation/autosampler)

Obr. 3 – Kolony HPLC (http://nationalanalyticalcorporation.com/product/waters-spherisorb-columns)

Plynová chromatografie (GC)

- vzorek se dávkuje do proudu inertního plynu, který jej unáší dále kolonou
- vzorek musí být v plynném stavu a látky musí být termostabilní
- **mobilní fáze** je inertní plyn (dusík, vodík, helium)
- **stacionární fáze** je mikrofilm umístěný uvnitř kolony (křemenné kapiláry)
- **eluce**: *izokratická* (konstantní teplota po celou dobu analýzy)
  gradientová (programový nárůst teploty)
- **detektory** – plamenově ionizační, detektor elektronového záchytu, hmotnostně spektrometrické



Obr. 4 – Kolony GC (http://hanghoa.vn/hoa/)

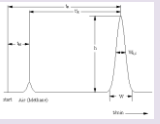
Obr. 5 – Schéma plynového chromatografu (Opekar, 1994)

Účinnost separace (chromatografické kolony)

- dosažení co nejlepšího rozdělení látek, v co nejkratší době
- charakterizována **počtem teoretických pater**, resp. výškovým ekvivalentem teoretického patra
- čím je jeho hodnota nižší, tím je kolona účinnější
- jeho velikost je závislá především na velikosti částic sorbentu, roste s klesající velikostí částic

Vyhodnocení výsledků - chromatogram

- grafický záznam odezvy detektoru, výstup analýzy
- popisuje základní chromatografické charakteristiky:
  - **retenční čas**
    - to je doba od nástřiku k vrcholu eluovaného píku
    - kvalitativně charakterizuje látku
    - retenční čas nesorbované látky se nazývá **mrtvý čas**
  - **plocha píku (výška)**
    - přímo úměrná koncentraci analytu
    - kvantitativně charakterizuje látku



h – výška píku

W – šířka píku v nulové linii

$W_{0,5}$ – šířka píku v polovině jeho výšky

t_R – retenční čas

t_M – mrtvý čas, tj. retenční čas nesorbované složky

Obr. 6 – Schéma chromatogramu jednosložkové směsi (Klouda, 2003)

Kvantitativní hodnocení

- cílem je nalezení vztahu mezi plochou (výškou) píku a množstvím látky
- hodnotíme v porovnání se standardem jako:
  - **metoda vnějšího standardu** (ESTD) za použití kalibrační křivky
  - **metoda vnitřního standardu** (ISTD)
  - **metoda standardního přídavku**

Kvalitativní hodnocení

- k identifikaci analytů používáme retenční čas nebo retenční objem
- lze využít i specifických detektorů, jako hmotností spektrometrie – lze tak získat detailní údaje o struktuře a molekulové hmotnosti analytu

Autoři: Gabriela Bartoníková, MVDr. Michaela Králová, Ph.D.

Práce vznikla za finanční podpory projektu IVA VFU Brno č. 2018FVHE/2340/49.