



Chromatografie  
„Královna analýz“

Monika Klusáčková

[monika.klusackova@jh-inst.cas.cz](mailto:monika.klusackova@jh-inst.cas.cz)

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, AVČR, v.v.i.

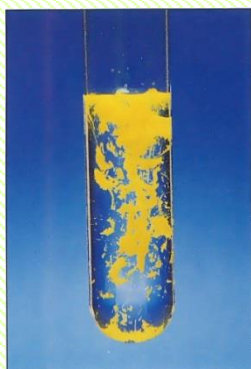
Jaké látky se nachází ve vzorku?



kvalitativní složení vzorku  
(druh látek)



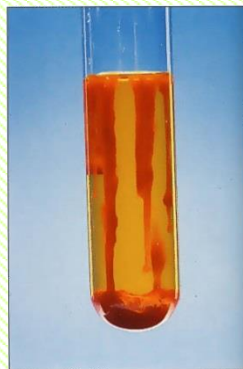
DŮKAZ  
IDENTIFIKACE



$\text{PbCrO}_4$



$\text{PbS}$



$\text{Fe(OH)}_3$



# Analytická chemie

Jaké látky se nachází ve vzorku?

Jaké je zastoupení těchto látek ve vzorku?

kvalitativní složení vzorku  
(druh látek)

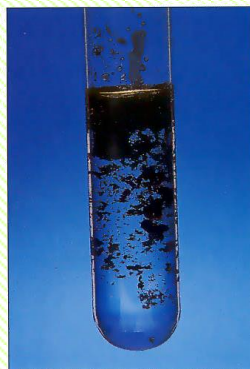
kvantitativní složení vzorku  
(množství látek)

DŮKAZ  
IDENTIFIKACE

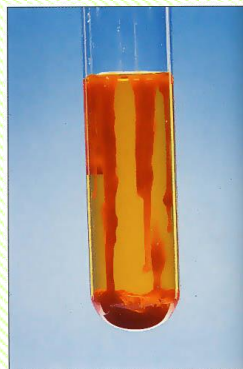
STANOVENÍ



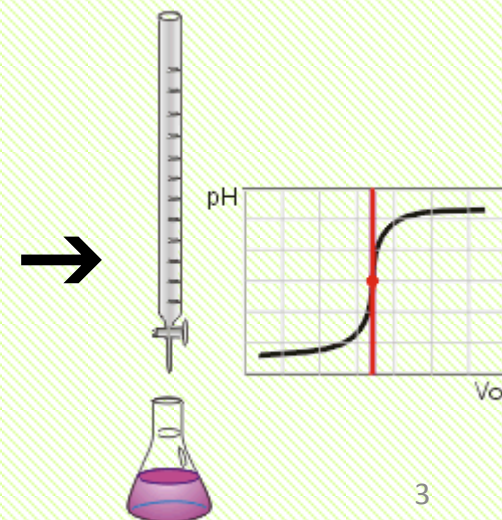
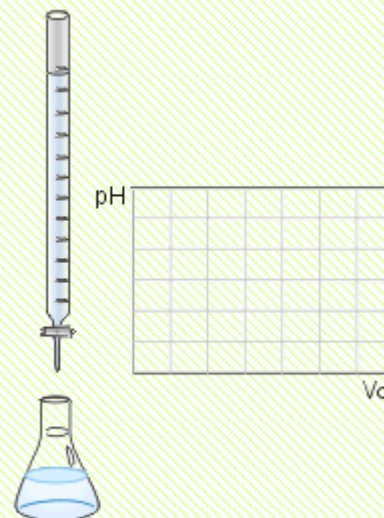
$\text{PbCrO}_4$



$\text{PbS}$



$\text{Fe(OH)}_3$



# Analytická chemie

Klasická analytická chemie



sraženiny a barevné sloučeniny

gravimetrie a volumetrie



# Analytická chemie

Klasická analytická chemie

Instrumentální analytická chemie

sraženiny a barevné sloučeniny

gravimetrie a volumetrie

**SEPARAČNÍ (DĚLÍČÍ) METODY**

spektrometrické metody

elektrochemické metody



HPLC

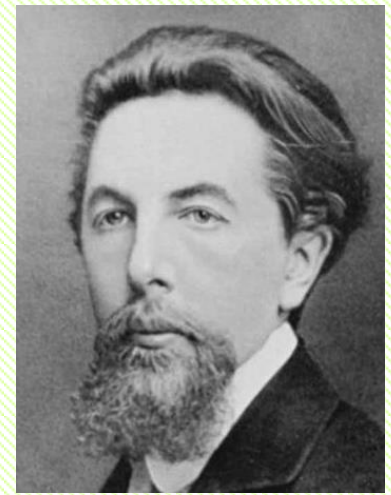
# Separáční metody

- **separace** je proces oddělování jednotlivých složek ze směsi za účelem získání čistých složek
- založeny na **rozdílné distribuci** dělených látek mezi dvě různé **nemísitelné fáze**
- lze je využít pro **kvalitativní** i **kvantitativní** analýzu
- zvyšují selektivitu a specifickou v analytické chemii
- srážení
- elektrodepozice
- krystalizace
- sublimace
- destilace
- dialýza
- extrakce
- nejrozšířenější **moderní separační metody v analytické chemii**

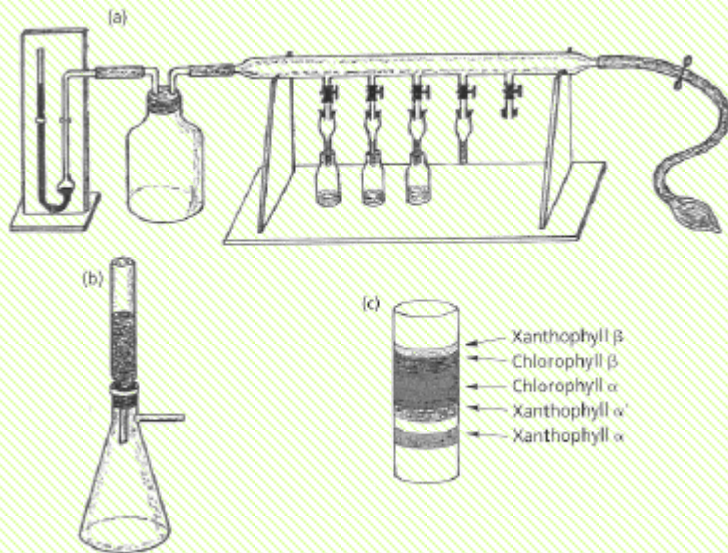


**ELEKTROMIGRAČNÍ METODY**  
**CHROMATOGRRAFIE**

# Historie chromatografie



- **Michail Semjonovič Cvět** (1872 – 1919)
- ruský botanik
- 1901 vynalezl separační techniku → chromatografii  
(**CHROMA** = barva a **GRAPHEIN** = psaní)
- 1903 „Chromatografická metoda je metoda, při níž jsou různé komponenty směsi rozděleny na adsorpční koloně v průtočném systému.“



**první kapalinový chromatograf**  
sestavený Cvětem  
pro dělení chlorofylů

- **stacionární fáze:** uhličitan vápenatý ( $\text{CaCO}_3$ )
- **mobilní fáze:** sirouhlík ( $\text{CS}_2$ )

# Nobelova cena za chemii 1952



**Richard Laurence  
Millington Syngé**

(1914 –1994)

britský biochemik



**Archer John Porter  
Martin**

(1910–2002)

britský chemik



- snaha o lepší a jednodušší metody pro identifikaci aminokyselin
- položili **základy papírové chromatografie** jako jedné z forem rozdělovací chromatografie
- papírová chromatografie patřila k **nejvýznamnějším analytickým metodám v té době!!!**



THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 1952  
ARCHER J. P. MARTIN, RICHARD L. M. SYNGE



# Základní pojmy

Chromatografie



metoda

Chromatograf



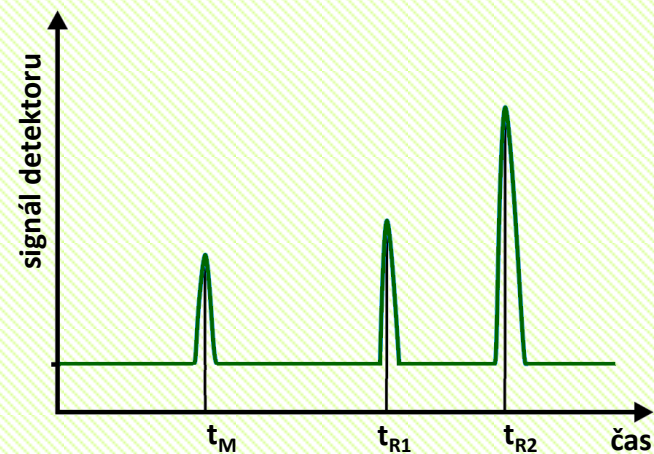
přístroj

Chromatogram



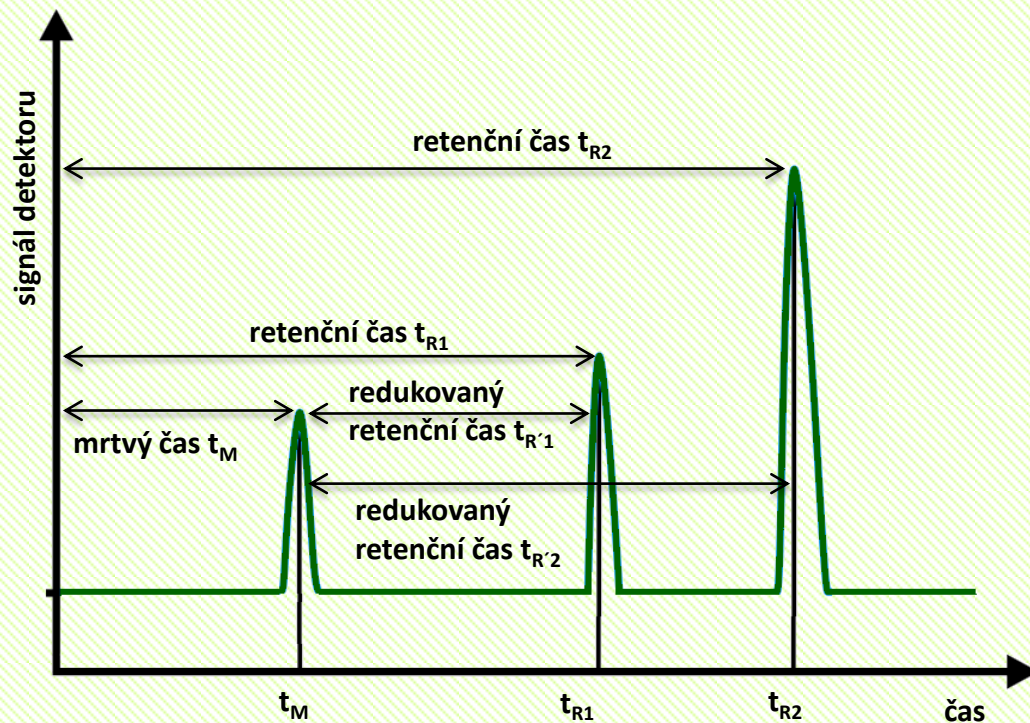
záznam

Vysokoučinná  
kapalinová  
chromatografie  
HPLC



# Chromatogram

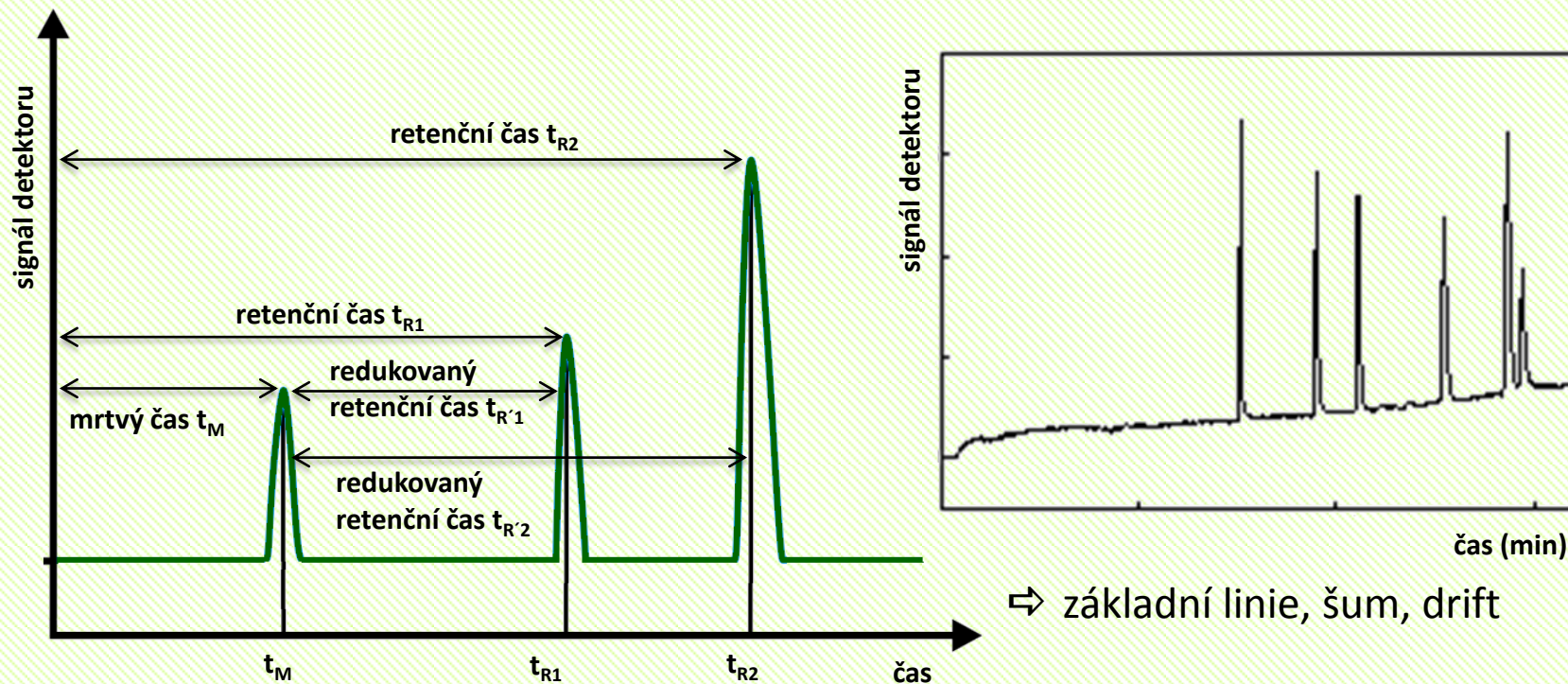
- **mrtvý čas kolony ( $t_M$ )** je retenční čas analytu, který **není v koloně zadržován**, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze
- **retenční čas ( $t_R$ )** je celkový čas, který příslušný analyt **stráví v separační koloně**
- **redukovaný retenční čas ( $t'_R$ )** je čas, který příslušný analyt **stráví ve stacionární fázi**



$$t_R = t_M + t'_R$$

# Chromatogram

- **mrtvý čas kolony ( $t_M$ )** je retenční čas analytu, který **není v koloně zadržován**, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze
- **retenční čas ( $t_R$ )** je celkový čas, který příslušný analyt **stráví v separační koloně**
- **redukovaný retenční čas ( $t_{R'}$ )** je čas, který příslušný analyt **stráví ve stacionární fázi**



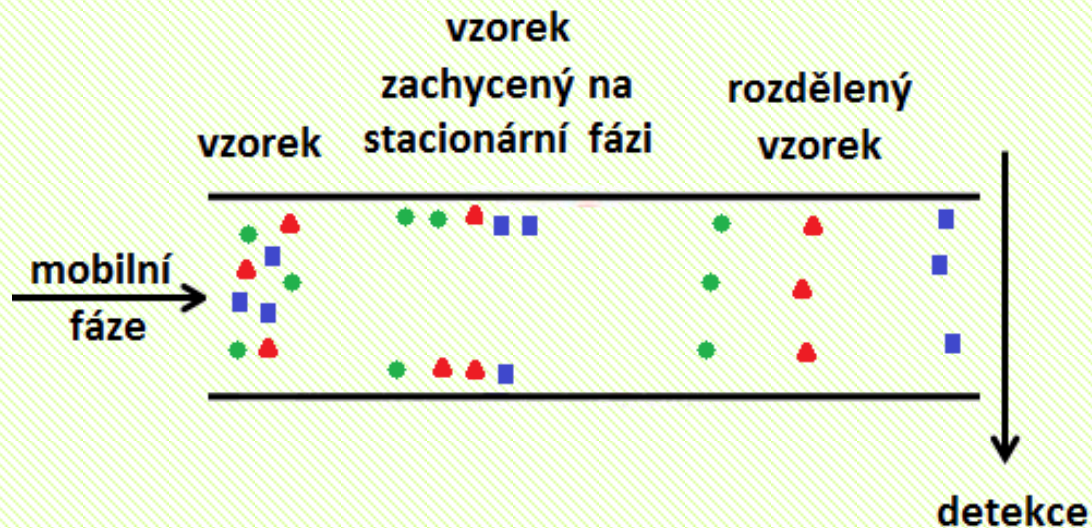
# Chromatografie

- **SEPARAČNÍ METODA** (= dělicí)
  - využívá rozdělení látek mezi dvě fáze
- separace probíhá v chromatografické koloně, která obsahuje:
  - ✓ **stacionární** (nepohyblivou) **fázi** = sorbent
  - ✓ **mobilní** (pohyblivou) **fázi** = eluent



# Chromatografie

- rozdílné analyty (dělené látky) mají rozdílnou **afinitu** ke stacionární fázi
- různé analyty podléhají různé **distribuci** (rozdělování) mezi mobilní a stacionární fázi
- rozdílné analyty jsou rozdílně **zadržovány** a rozdílně **zpoždovány** (retardovány)



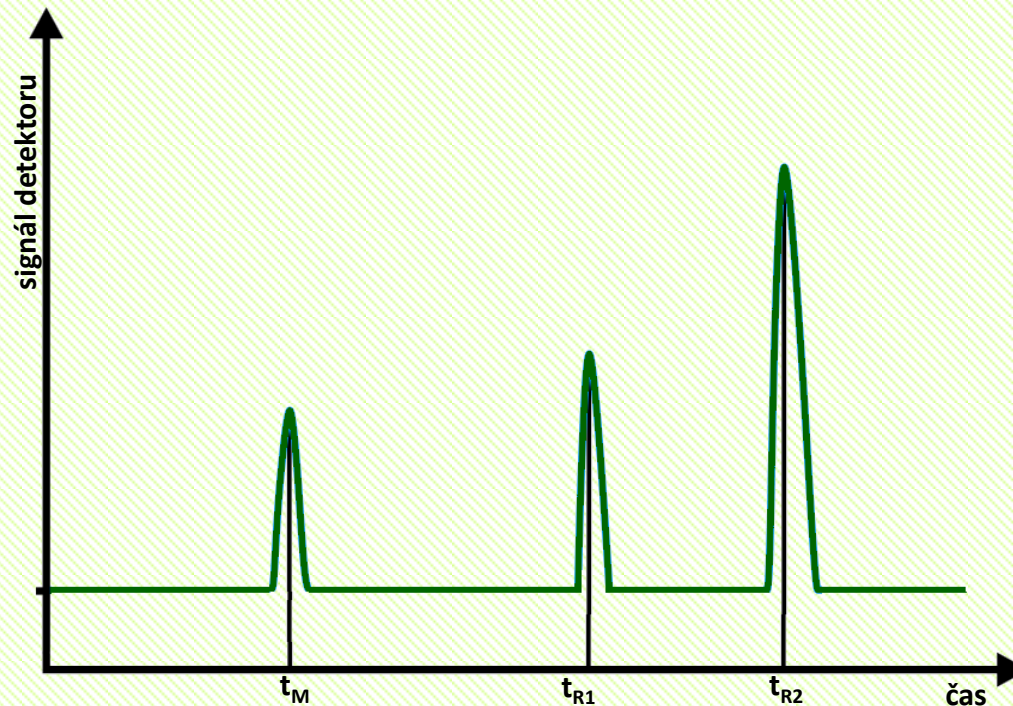
# Chromatografie

- **ANALYTICKÁ METODA**

- poskytuje analytické informace

- **kvalitativní informace**

- poloha píku (retenční čas  $t_R$ )  $\Leftrightarrow$  druh látky (metoda standardů)



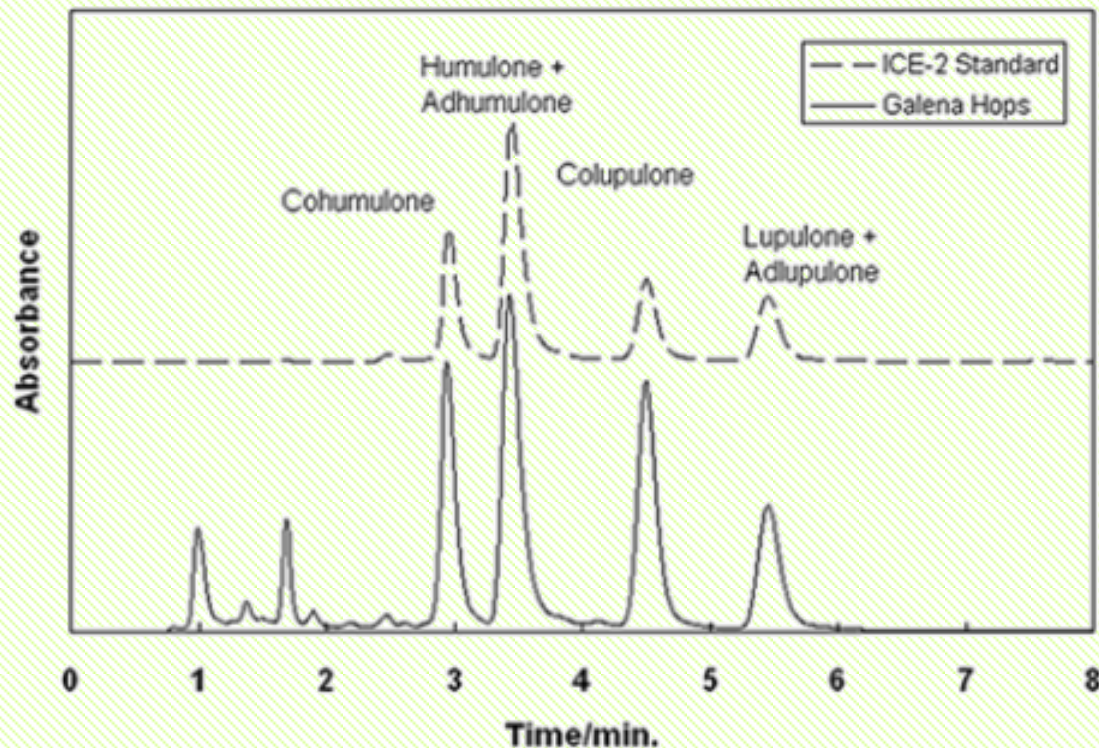
# Chromatografie

- **ANALYTICKÁ METODA**

- poskytuje analytické informace

- **kvalitativní informace**

- poloha píku (retenční čas  $t_R$ )  $\Leftrightarrow$  druh látky (metoda standardů)



- **ANALYTICKÁ METODA**

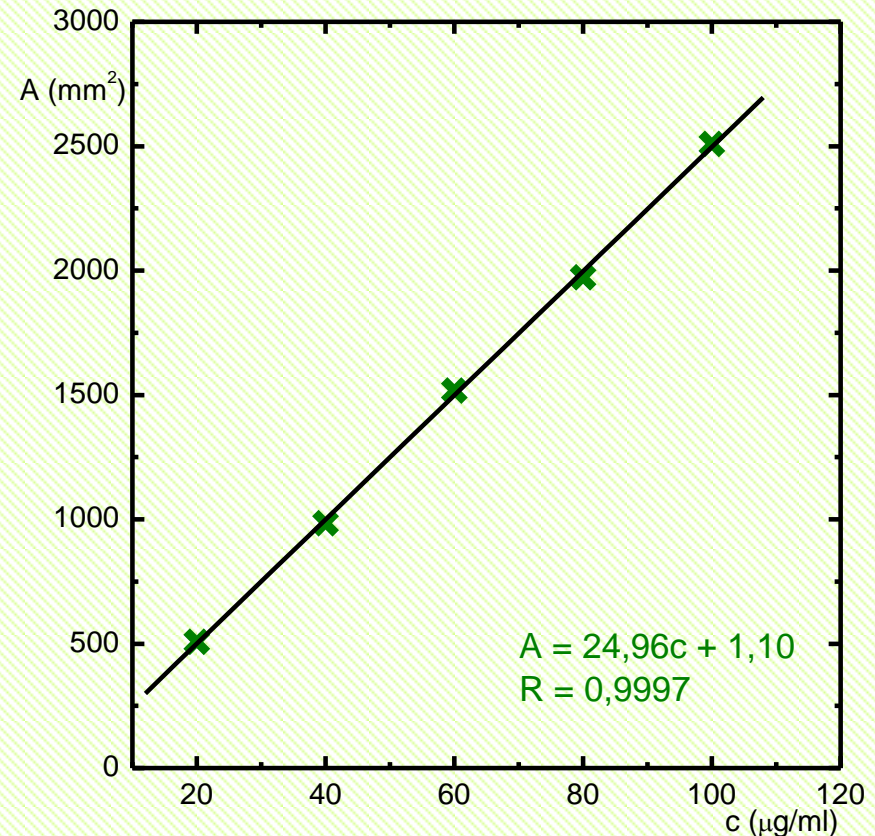
- poskytuje analytické informace

- **kvantitativní informace**

- plocha píku (množství, koncentrace látky)

- ⇒ metoda kalibrační přímky

$$A = 1,064 \times h \times w_{1/2}$$





# Chromatografie

- **ANALYTICKÁ METODA**

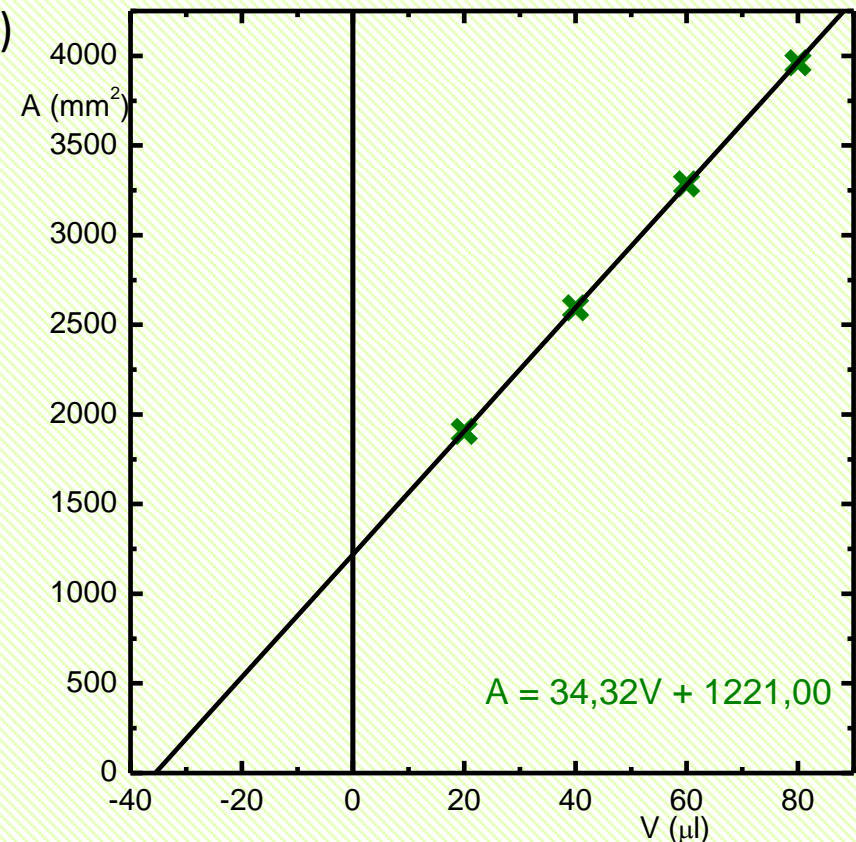
- poskytuje analytické informace

- **kvantitativní informace**

- plocha píku (množství, koncentrace látky)

- ⇒ metoda standardního přídávku

$$A = 1,064 \times h \times w_{1/2}$$



# Chromatografie

- **ANALYTICKÁ METODA**

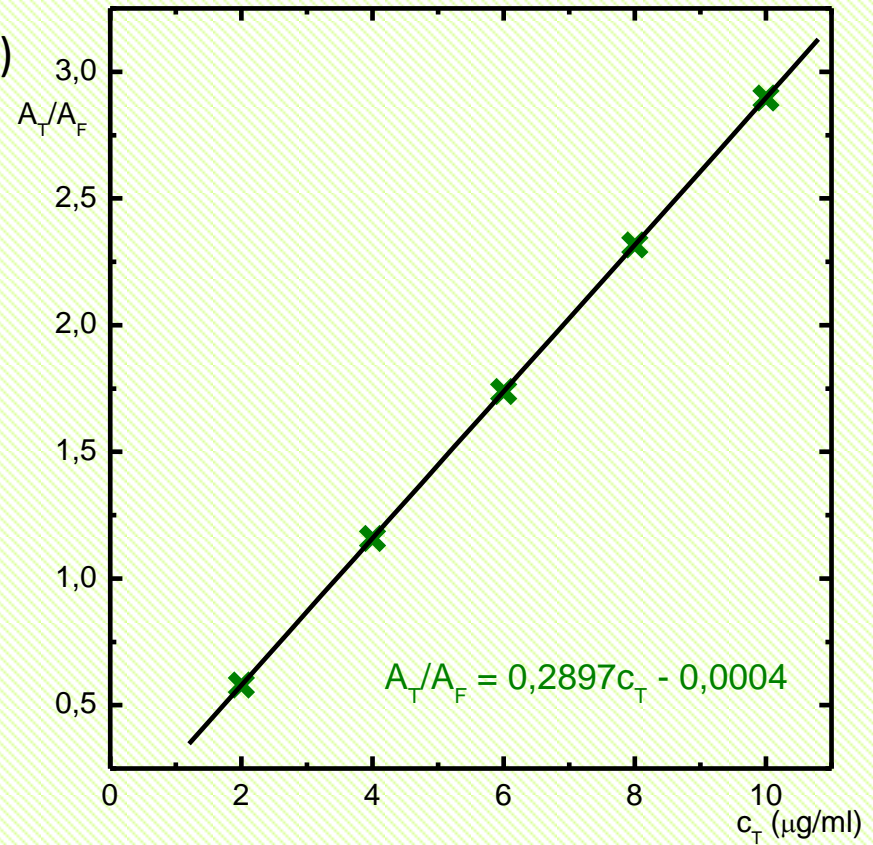
- poskytuje analytické informace

$$A = 1,064 \times h \times w_{1/2}$$

- **kvantitativní informace**

- plocha píku (množství, koncentrace látky)

- ⇒ metoda vnitřního standardu



# Chromatografie



## POLÁRNÍ LÁTKY

- se lépe rozpouští v **polárních** rozpouštědlech
- adsorbují se na **polárních** povrchích

## NEPOLÁRNÍ LÁTKY

- se lépe rozpouští v **nepolárních** rozpouštědlech
- adsorbují se na **nepolárních** povrchích

**Podobné se rozpouští v podobném  
!!!**

# Přehled chromatografických technik

mobilní fáze	stacionární fáze	mechanismus dělení	metoda	
<b>plyn</b>	kapalina	rozdělování	plynová rozdělovací chromatografie (GLC)	
	pevná látka	adsorpce	plynová adsorpční chromatografie (GSC)	
		sítový efekt	plynová chromatografie na molekulových sítích (GSC)	
<b>kapalina</b>	kapalina	rozdělování	kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)	
		sítový efekt	gelová permeační chromatografie (GPC)	
	pevná látka	adsorpce	kapalinová adsorpční chromatografie (LSC)	
		iontová výměna	iontově výměnná chromatografie (IEC)	
		biospecifická reakce	afinitní chromatografie (AC)	
	<b>planární</b>	kapalina	rozdělování	tenkovrstvá rozdělovací chromatografie (TLC)
			rozdělování	papírová rozdělovací chromatografie (PC)
pevná látka		adsorpce	tenkovrstvá adsorpční chromatografie (TLC)	

# Separáční mechanismy

---

⇒ prchiny zadrzovn a dlen separovaných látek

- **Rozdělovací chromatografie**

- využívá **rozdln rozpustnosti** (a tudz i rozdln distribuce) molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami

- **Adsorpční chromatografie**

- využívá **rozdln adsorpce** molekul analytů na povrchu tuh fáze s aktivními centry

- **Gelová permeační chromatografie**

- využívá **mechanického dlen** molekul analytů v prech gelu na základě jejich rozdln velikosti

- **Iontov vmnn chromatografie**

- využívá **rozdln vmnn adsorpce** analytů (iontů) na povrchu iontového měniče

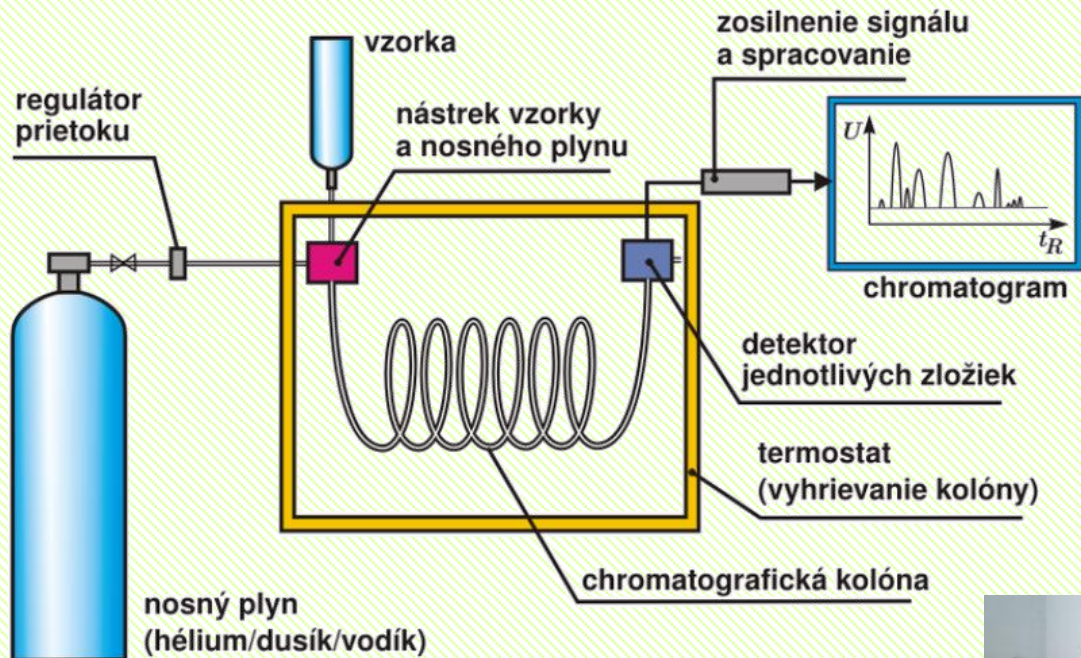
- **Afinitní chromatografie**

- využívá vjimen biologick schopnosti některých látek (afinant, ligandů) **specificky a reverzibiln vázat** jin látky

# Přehled chromatografických technik

mobilní fáze	stacionární fáze	mechanismus dělení	metoda	
plyn	kapalina	rozdělování	plynová rozdělovací chromatografie (GLC)	
	pevná látka	adsorpce	plynová adsorpční chromatografie (GSC)	
		sítový efekt	plynová chromatografie na molekulových sítích (GSC)	
kapalina	kolonová	rozdělování	kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)	
		sítový efekt	gelová permeační chromatografie (GPC)	
	pevná látka	adsorpce	kapalinová adsorpční chromatografie (LSC)	
		iontová výměna	iontově výměnná chromatografie (IEC)	
		biospecifická reakce	afinitní chromatografie (AC)	
	planární	kapalina	rozdělování	tenkovrstvá rozdělovací chromatografie (TLC)
			rozdělování	papírová rozdělovací chromatografie (PC)
		pevná látka	adsorpce	tenkovrstvá adsorpční chromatografie (TLC)

# Plynová chromatografie



**!!! analyt musí byť termicky stabilný a ťekavý,  
popřípadě derivatizovat !!!**

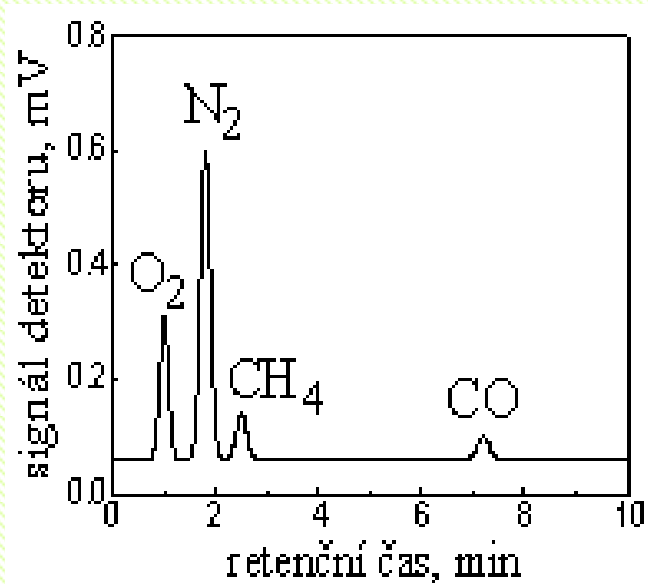


# Plynová chromatografie

- **Analýza životního prostředí**
  - analýza plyných a těkavých organických polutantů v ovzduší a ve vodách
  - významná je analýza pesticidů, herbicidů, insekticidů ve vzorcích vod a půd
  
- **Klinická a toxikologická analýza**
  - monitorování obsahu drog v krvi
  - stanovení obsahu alkoholu v krvi
  
- **Analýza potravin a kosmetických přípravků**
  - objektivní hodnocení chutí a vůní
  
- **Analýza ropných produktů**
  - posouzení kvality ropy a jejich destilačních produktů

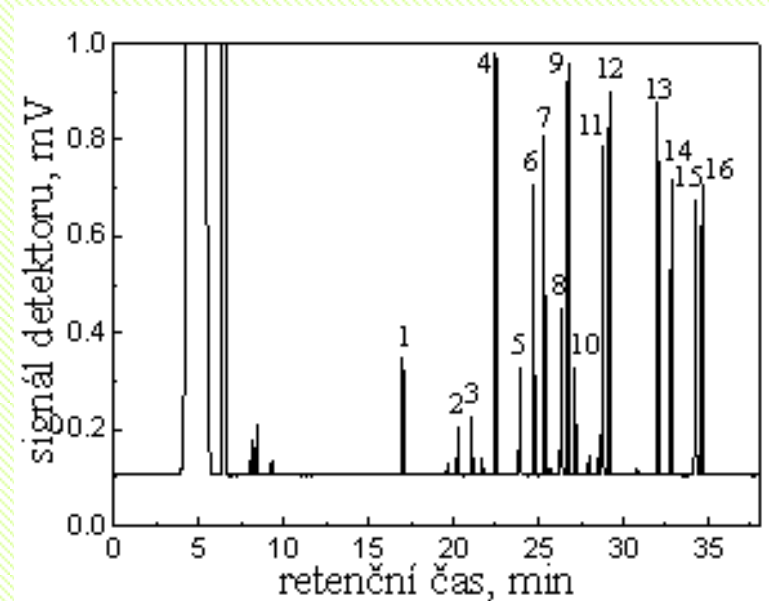


# Plynová chromatografie



## GC PLYNŮ ze VZDUCHU

**kolona** : náplňová, z nerezové oceli,  
**SF**: molekulové síto 5A  
**nosný plyn** : 30 ml/min He  
**dávkování** : 100 mL (35 °C)  
**teplota** termostatu kolony : 35 °C  
**detekce** : TCD (140 °C)



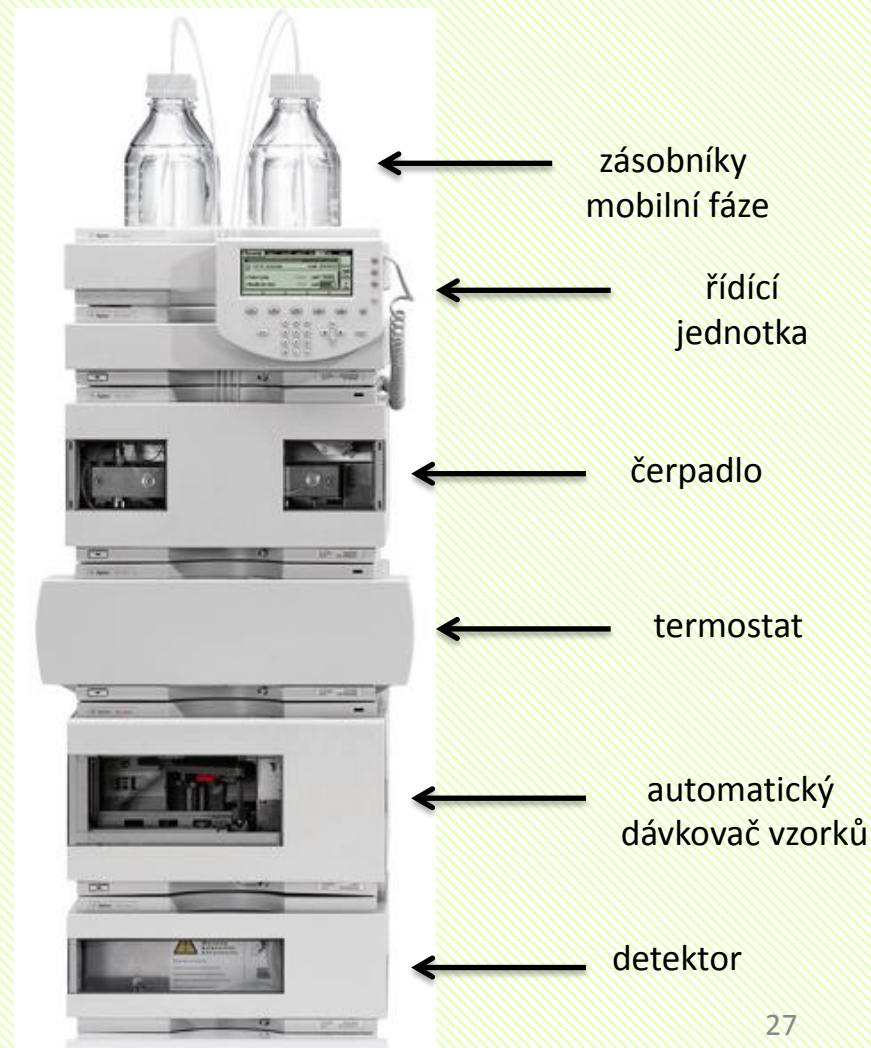
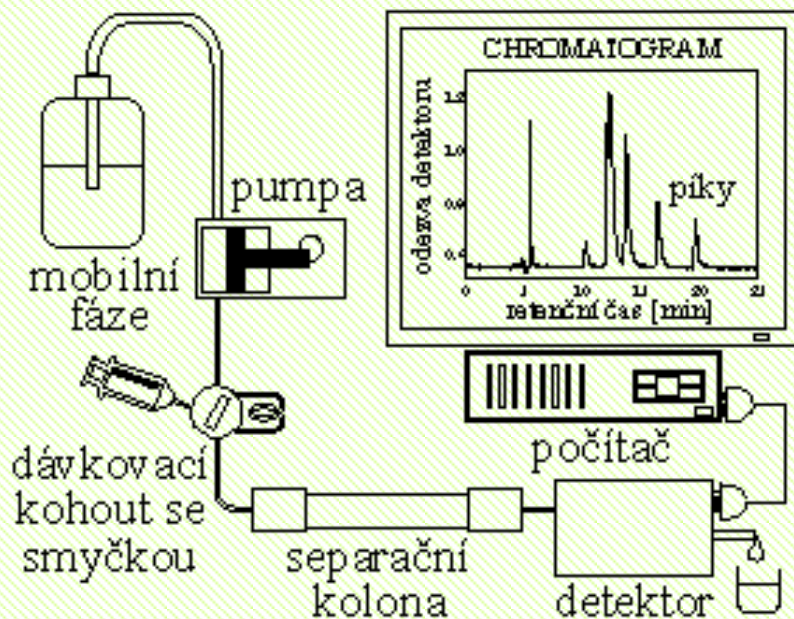
## GC polychlorovaných bifenyků (PCB)

**kolona** : FS-SE-54-DF-0,35; 50 m x 0,25 mm ID  
**SF**: SE-54 (*fenylpolysiloxan*)  
**nosný plyn** : N<sub>2</sub> (1,2 bar)  
**dávkování** : 1 mL (200 - 800 pg/mL v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  
**splitter** (dělič) : 1:70  
**teplota** kolony : 80 °C ® 280 °C, 8 °C/min  
**detekce** : ECD (260 °C)

# Přehled chromatografických technik

mobilní fáze	stacionární fáze	mechanismus dělení	metoda	
plyn	kapalina	rozdělování	plynová rozdělovací chromatografie (GLC)	
	pevná látka	adsorpce	plynová adsorpční chromatografie (GSC)	
		sítový efekt	plynová chromatografie na molekulových sítích (GSC)	
kapalina	kapalina	rozdělování	kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)	
		sítový efekt	gelová permeační chromatografie (GPC)	
	pevná látka	adsorpce	kapalinová adsorpční chromatografie (LSC)	
		iontová výměna	iontově výměnná chromatografie (IEC)	
		biospecifická reakce	afinitní chromatografie (AC)	
	planární	kapalina	rozdělování	tenkovrstvá rozdělovací chromatografie (TLC)
			rozdělování	papírová rozdělovací chromatografie (PC)
pevná látka		adsorpce	tenkovrstvá adsorpční chromatografie (TLC)	

# Kapalinová chromatografie



# Kapalinová chromatografie

- **Farmaceutická analýza**

- HPLC je standardní lékopisnou metodou pro identifikaci a hodnocení čistoty substancí a finálních lékových forem
- využívána pro stanovení koncentrace léčiv v tělních tekutinách

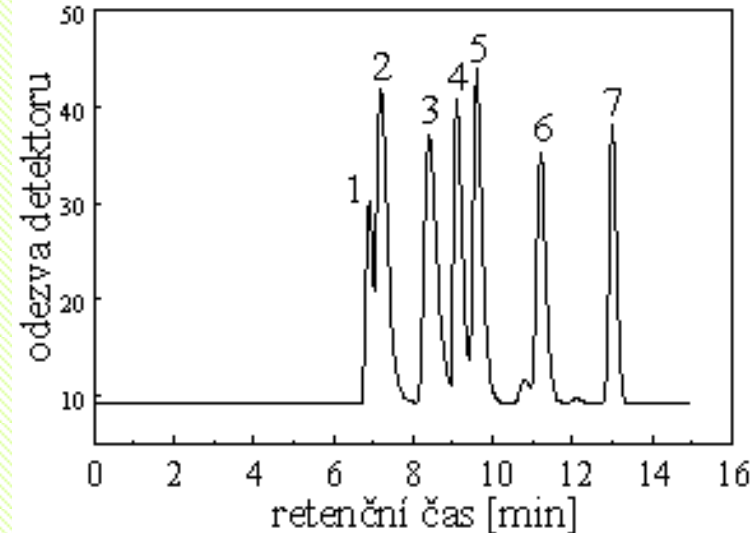
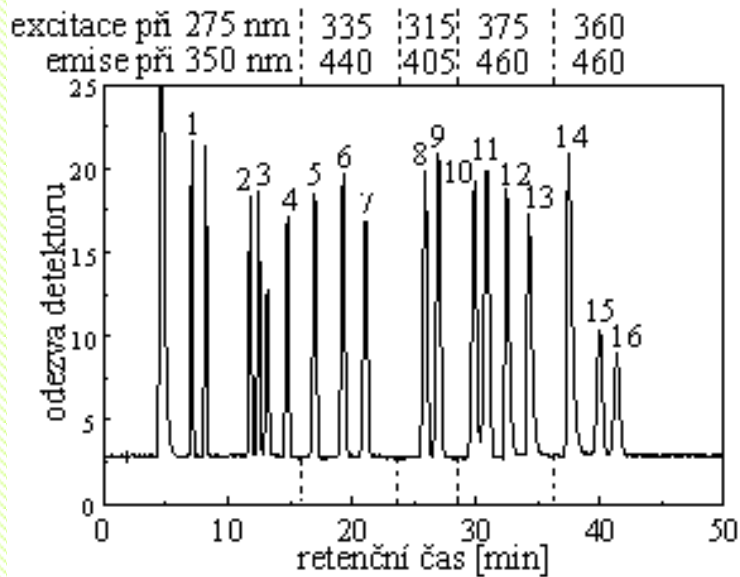
- **Analýza životního prostředí**

- analýza anorganických i organických polutantů ve vodách a půdách (PAH)

- **Analýza biomolekul a makromolekul**

- peptidy, bílkoviny, oligonukleotidy, sacharidy, lipidy, steroidy, karotenoidy, syntetické polymery

# Kapalinová chromatografie



## POLYAROMATICKÉ UHLOVODÍKY

**kolona** : 15 cm x 4 mm, **SF**: Nucleosil 5 C18 PAH

**průtok** eluentu : 0,9 ml/min při tlaku 100 bar

**eluent** : acetonitril / voda

5 min 60% ACN, isokraticky

60% → 90% ACN za 15 min, lineární gradient

90% → 100% ACN za 20 min, lineární gradient

20 min 100% ACN, isokraticky

**detekce** : fluorimetrická

**píky** : 1. naftalen, 2. acenaften, 3. fluoren, 4. fenanthren, 5. anthracen, 6. fluoranthen, 7. pyren, 8. benz[a]antracen, 9. chrysen, 10. benzo[e]pyren, 11. benzo[b]fluoranthen, 12. benzo[k]fluoranthen, 13. benzo[a]pyren, 14. dibenzo[ah]anthracen, 15. benzo[ghi]perylen, 16. indeno[1,2,3-cd]pyren

## HPLC BÍLKOVIN

**kolona** : 25 cm x 9,4 mm, **SF**: Zorbax GF-250

**eluent** : 130 mM NaCl + 20 mM KCl +

50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH = 7,0), **průtok** eluentu : 1 ml/min

**detekce** : UV fotometrická při 210 nm

**píky** :

1. myší IgM, Mh = 900 000
2. hovězí thyroglobulin, Mh = 669 000
3. β-amylasa z brambor, Mh = 200 000
4. hovězí serum albumin, Mh = 66 000
5. kuřecí albumin, Mh = 45 500
6. hovězí RNAasa, Mh = 13 700
7. azid ( $t_{max}$ ), Mh = 65

# Přehled chromatografických technik

mobilní fáze	stacionární fáze	mechanismus dělení	metoda	
plyn	kapalina	rozdělování	plynová rozdělovací chromatografie (GLC)	
	pevná látka	adsorpce	plynová adsorpční chromatografie (GSC)	
		sítový efekt	plynová chromatografie na molekulových sítích (GSC)	
kapalina	kapalina	rozdělování	kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)	
		sítový efekt	gelová permeační chromatografie (GPC)	
	pevná látka	adsorpce	kapalinová adsorpční chromatografie (LSC)	
		iontová výměna	iontově výměnná chromatografie (IEC)	
		biospecifická reakce	afinitní chromatografie (AC)	
	planární	kapalina	rozdělování	tenkovrstvá rozdělovací chromatografie (TLC)
			rozdělování	papírová rozdělovací chromatografie (PC)
pevná látka		adsorpce	tenkovrstvá adsorpční chromatografie (TLC)	

# Gelová chromatografie

## Gelová **permeační** chromatografie

SF = hydrofobní gel  
+  
MF = organická rozpouštědla  
↓  
**hydrofobní látky**

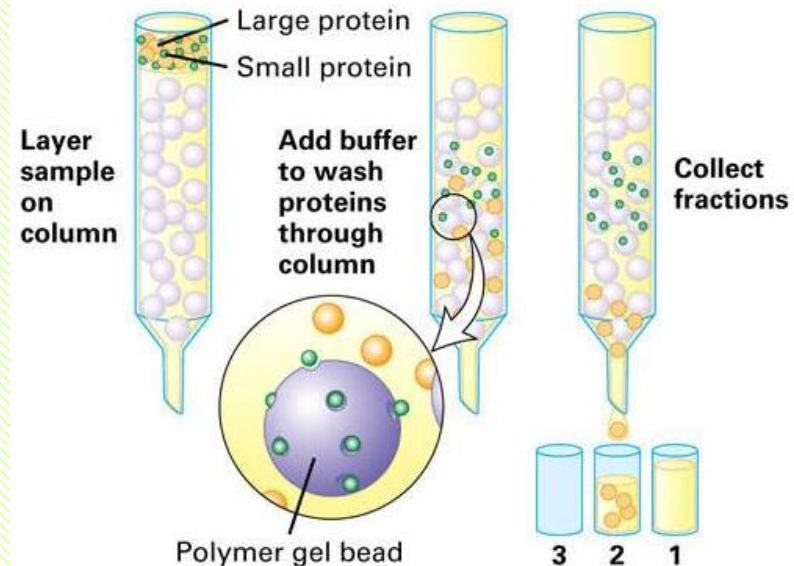
## Gelová **filtrační** chromatografie

SF = hydrofilní gel  
+  
MF = vodné pufrы  
↓  
**hydrofilní látky**

➤ využívá mechanického dělení molekul analytů v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti, tzv. **molekulově síťový efekt**

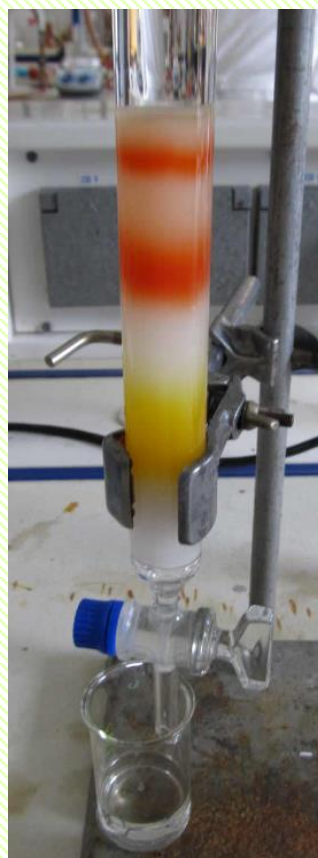
- **Skupinové dělení a odsolování**
- oddělování vysokomolekulárních látek od nízkomolekulárních
- **Předseparace komplexních vzorků**
- **Určení molekulové hmotnosti**

(a) Gel filtration chromatography



# Gelová chromatografie

- **syntéza:** 2-brombenzoylferocenu z 2-brombenzoylchloridu a ferocenu
- **SF:** silikagel
- **MF:** MTBE:hexan (4:1)



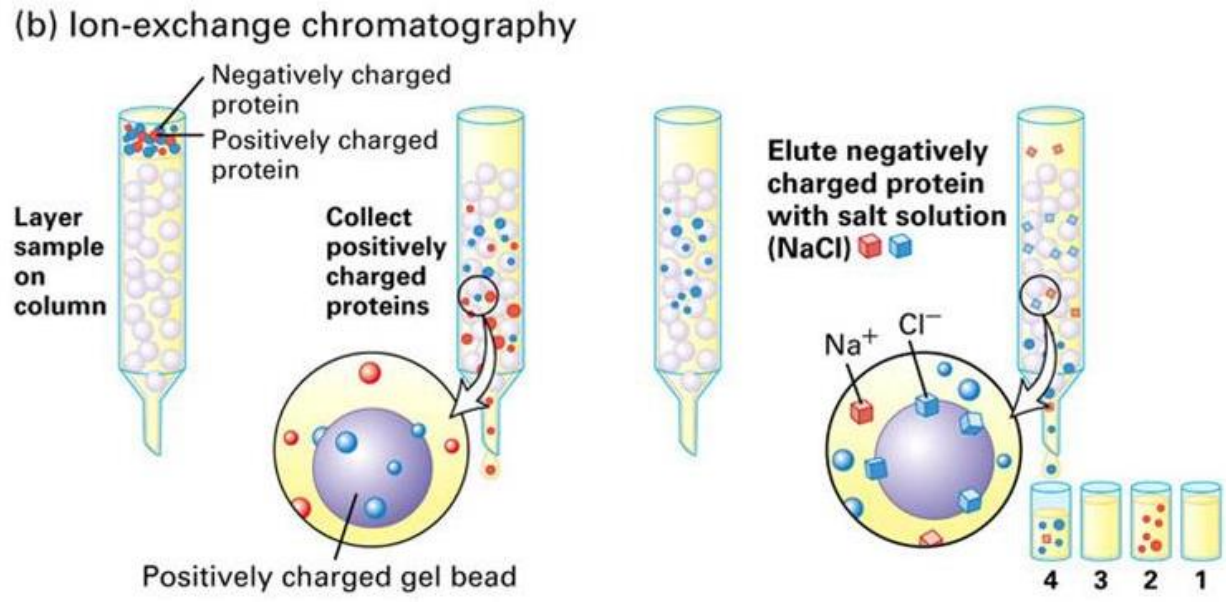
1. ferocen

2. 2-brombenzoylferocen

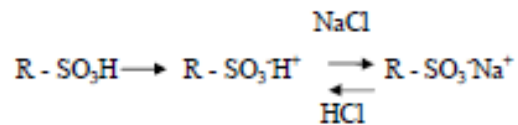


# Iontově výměnná chromatografie

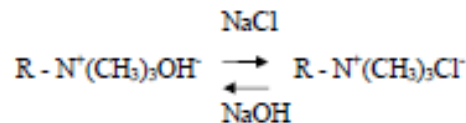
- využívá rozdílné **výměnné adsorpce** analytů (iontů) na povrchu iontového měniče



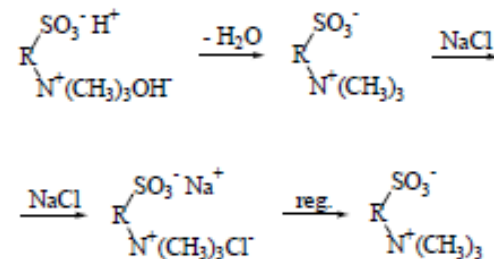
Silně kyselý katex



Silně bazický anex



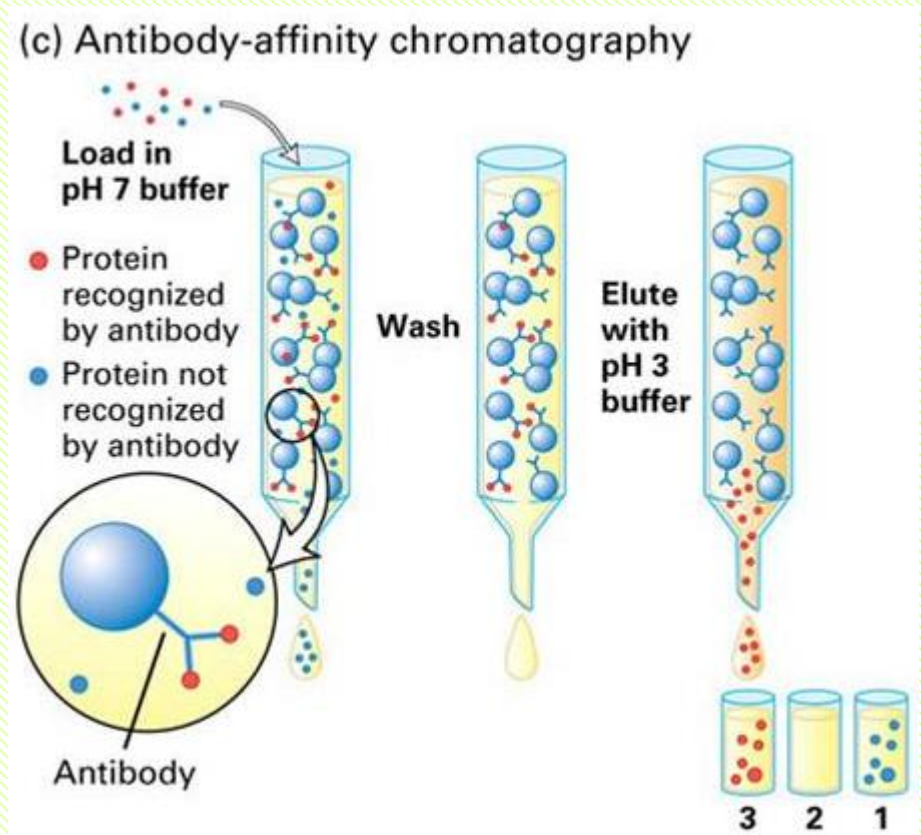
Amfoterní ionery: obsahují katexové i anexové funkční skupiny; vytvářejí vnitřní soli



# Afinitní chromatografie

➤ využívá výjimečné **biologické schopnosti** některých látek (afinantů, ligandů či afinantních ligandů) **specificky a reverzibilně vázat** jiné látky

- antigen – protilátka
- enzym – substrát
- hormon – receptor



# Přehled chromatografických technik

mobilní fáze	stacionární fáze	mechanismus dělení	metoda
plyn	kapalina	rozdělování	plynová rozdělovací chromatografie (GLC)
	pevná látka	adsorpce	plynová adsorpční chromatografie (GSC)
		sítový efekt	plynová chromatografie na molekulových sítích (GSC)
kapalina	kapalina	rozdělování	kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)
		sítový efekt	gelová permeační chromatografie (GPC)
	pevná látka	adsorpce	kapalinová adsorpční chromatografie (LSC)
		iontová výměna	iontově výměnná chromatografie (IEC)
		biospecifická reakce	afinitní chromatografie (AC)
	planární	kapalina	rozdělování
rozdělování			papírová rozdělovací chromatografie (PC)
pevná látka		adsorpce	tenkovrstvá adsorpční chromatografie (TLC)

# Tenkovrstvá chromatografie

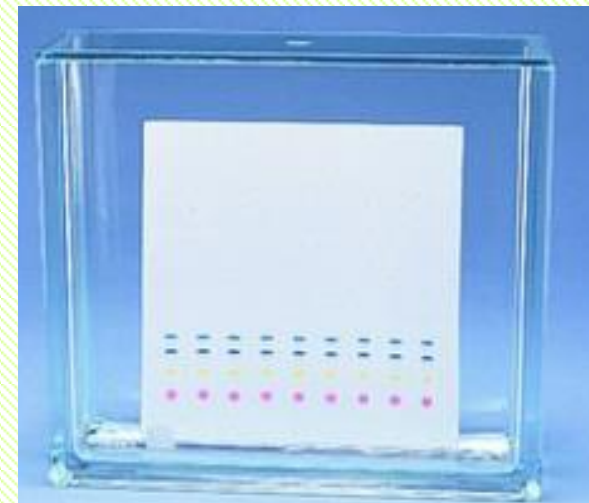


- **Rozdělovací chromatografie**

- využívá **rozdílné rozpustnosti** (a tudíž i rozdílné distribuce) molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami
- MF = kapalina
- SF = kapalina

- **Adsorpční chromatografie**

- využívá **rozdílné adsorpce** molekul analytů na povrchu tuhé fáze s aktivními centry
- MF = kapalina
- SF = adsorbent (silikagel, alumina) na skleněných či hliníkových fóliích



# Papírová chromatografie

- **Rozdělovací chromatografie**

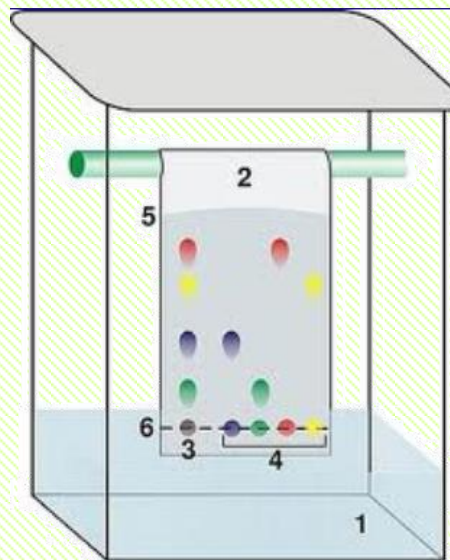
- využívá **rozdílné rozpustnosti** (a tudíž i rozdílné distribuce) molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami

- SF = kapalina zachycená na papíře

(je většinou **voda** zachycená na celulózovém filtračním papíře)

- MF = kapalina

(organická rozpouštědla nebo jejich směsi, které se s vodou nemísí nebo mísí omezeně)



# Papírová chromatografie

- **Rozdělovací chromatografie**

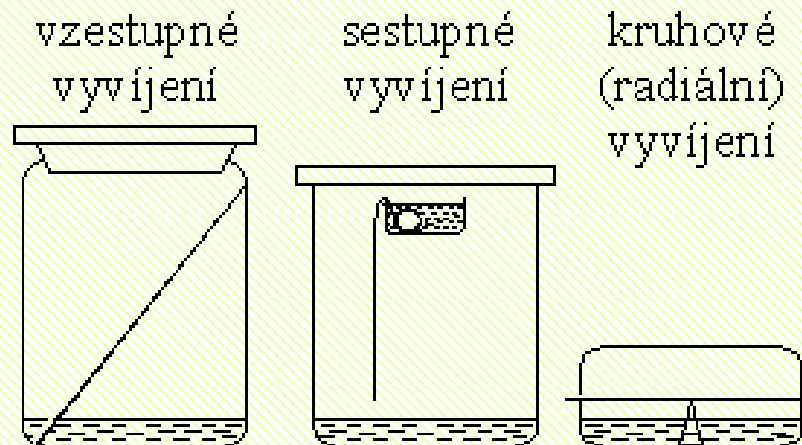
- využívá **rozdílné rozpustnosti** (a tudíž i rozdílné distribuce) molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami

- SF = kapalina zachycená na papíře

(je většinou **voda** zachycená na celulóзовém filtračním papíře)

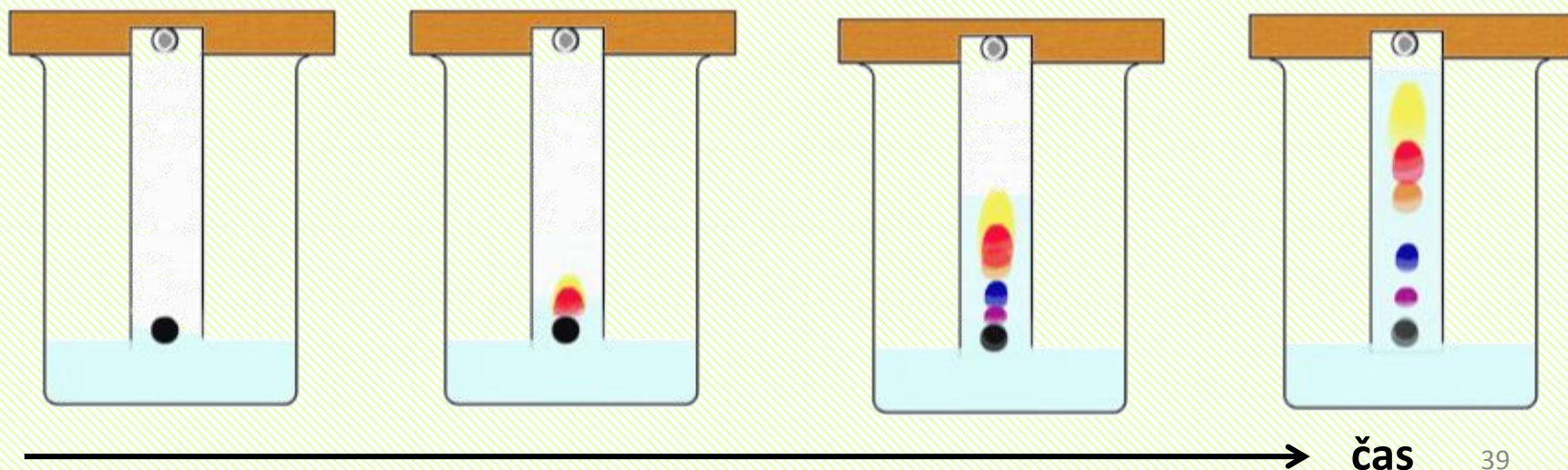
- MF = kapalina

(organická rozpouštědla nebo jejich směsi, které se s vodou nemísí nebo mísí omezeně)

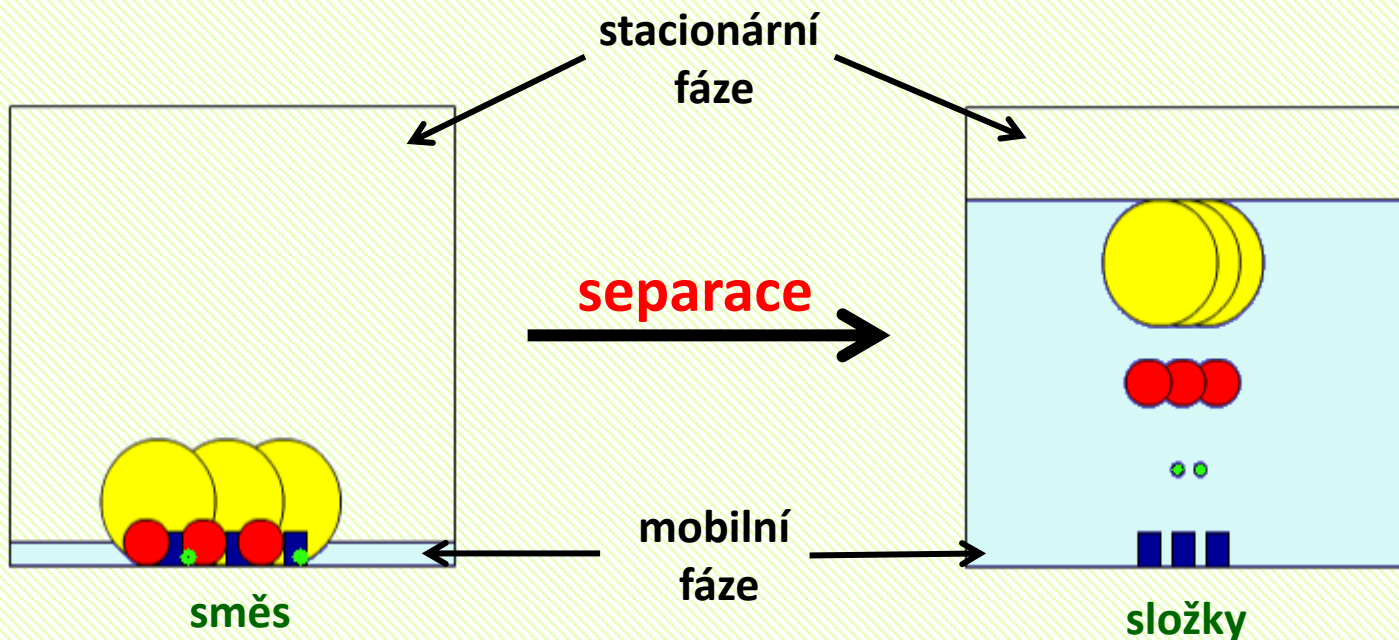


# Princip dělení analytů při PC

- vzorek se nanese ve formě malé skvrny na papír
- mobilní fáze se nechá vzlínat póry papíru
- mobilní fáze unáší dělené látky ze vzorku
- látky se více či méně zpožďují interakcí (rozpuštění) se stacionární fází
- tím se vzájemně dělí



# Princip dělení analytů při PC



složky	afinita k SF	afinita k MF
	–	nerozpustný
	+++	+
	++	++
	+	+++



# Analytické informace

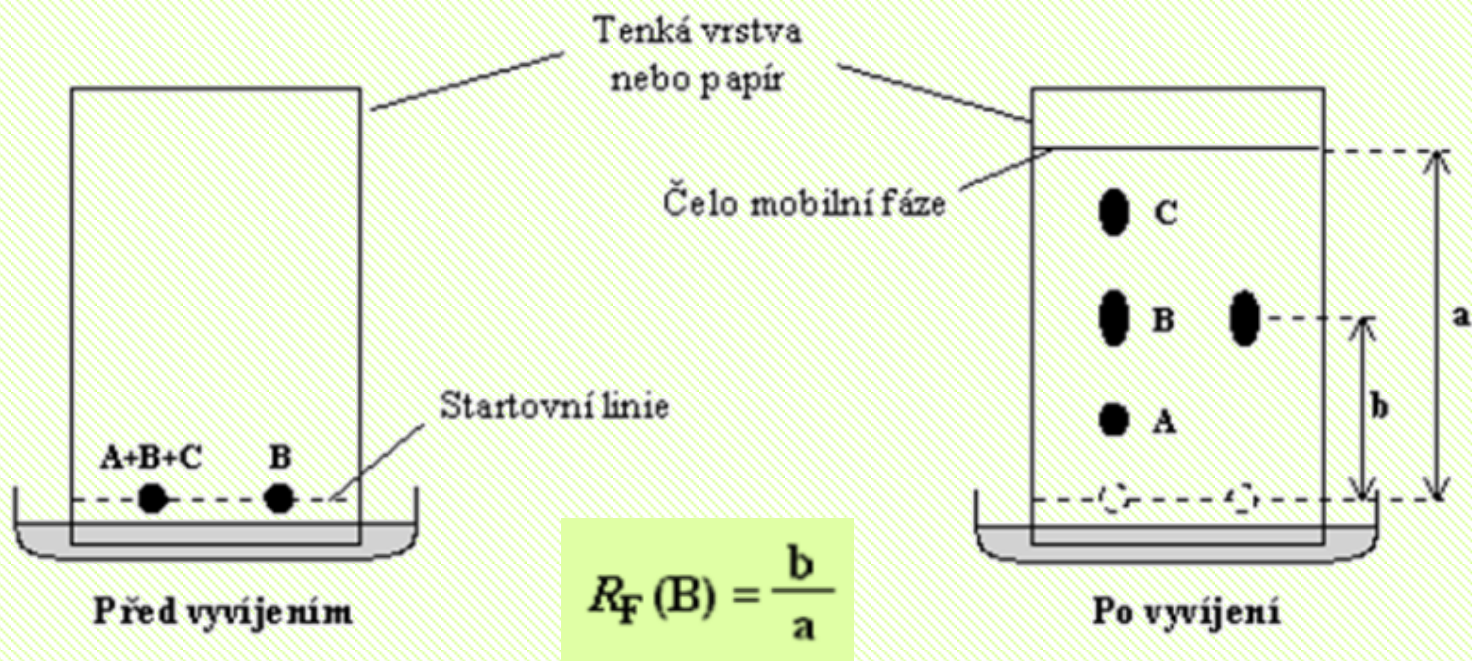
- kvalitativní informace

➤ **poloha skvrny** (druh látky)

⇒ retardační faktor  $R_f$

(metoda standardů)

**Retardační faktor ( $R_f$ )** je poměr vzdálenosti, kterou urazila látka oproti vzdálenosti, kterou urazilo čelo mobilní fáze



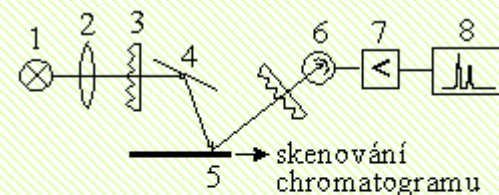
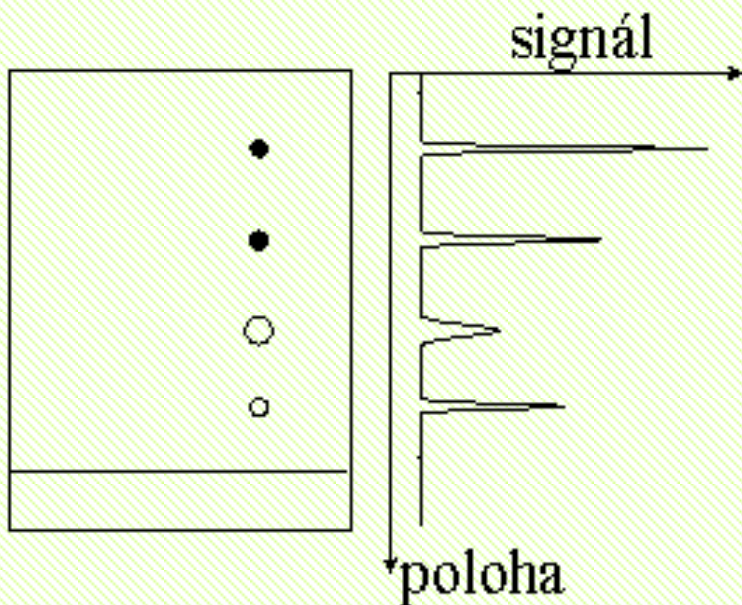
# Analytické informace

- kvantitativní informace

- plocha skvrny (množství, koncentrace látky)

- ⇒ extrakce skvrn

- ⇒ fotodenzitometr – převede skvrny analytů na chromatogram s píky, jejichž plocha je úměrná množství příslušného analytu ve skvrně



- |                  |                |
|------------------|----------------|
| 1 světelný zdroj | 5 chromatogram |
| 2 čočka          | 6 fotonásobič  |
| 3 monochromátor  | 7 zesilovač    |
| 4 zrcadlo        | 8 zapisovač    |

# TLC/PC chromatografie

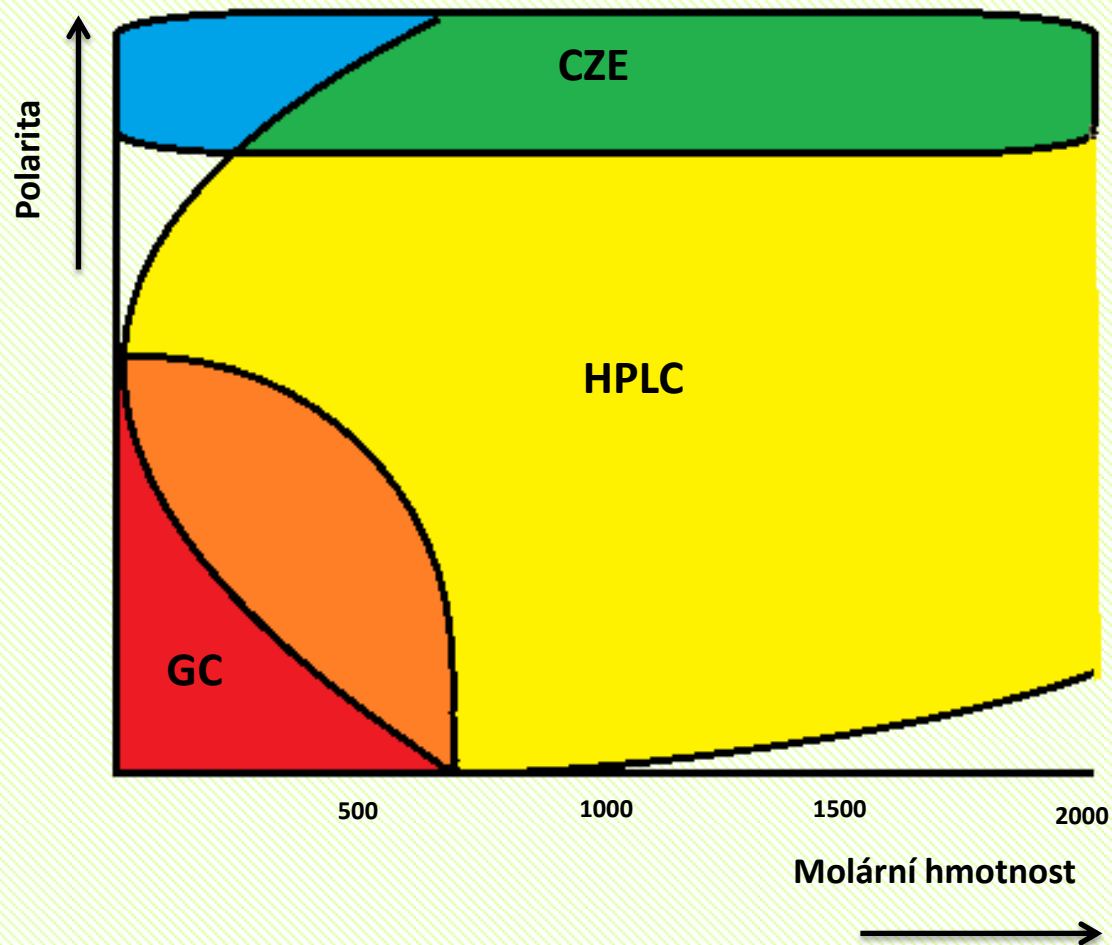


- vynikají jednoduchostí provedení a minimální ekonomické náklady
- **Monitorování průběhu organických syntéz**
  - rychlá kontrola čistoty meziproductů a finálních produktů
- **Klinická a toxikologická analýza**
  - nezastupitelná metoda při rychlém určování identity toxických a omamných látek v toxikologii
  - určování identity a hodnocení stability farmaceutických, potravinářských a kosmetických produktů

# Přehled chromatografických technik

mobilitní fáze	stacionární fáze	mechanismus dělení	metoda	
<b>plyn</b>	kapalina	rozdělování	plynová rozdělovací chromatografie (GLC)	
	pevná látka	adsorpce	plynová adsorpční chromatografie (GSC)	
		sítový efekt	plynová chromatografie na molekulových sítích (GSC)	
<b>kapalina</b>	kapalina	rozdělování	kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)	
		sítový efekt	gelová permeační chromatografie (GPC)	
	pevná látka	adsorpce	kapalinová adsorpční chromatografie (LSC)	
		iontová výměna	iontově výměnná chromatografie (IEC)	
	<b>planární</b>	kapalina	rozdělování	tenkovrstvá rozdělovací chromatografie (TLC)
			rozdělování	papírová rozdělovací chromatografie (PC)
pevná látka		adsorpce	tenkovrstvá adsorpční chromatografie (TLC)	
		biospecifická reakce	afinitní chromatografie (AC)	

# Chromatografie „Královna analýz“





Děkuji Vám  
za pozornost



# Separace barviv papírovou chromatografií

