



Organická chemie pro biochemiky II

část 21-B



Hmotová spektrometrie

Mass Spectrometry (MS)

Hmotová (hmotnostní) spektrometrie (mass spectrometry, MS) je metoda založená na charakterizaci hmotného vzorku jeho rozdělením a detekcí v plynné fázi v podobě iontů podle jejich hmoty v závislosti na jejich náboji (poměr hmoty/náboj – m/z).

Před obdobím v polovině 80-tých let minulého století až do cca 1990, byla MS orientována převážně na hmotné vzorky, které existovaly v plynné fázi, nebo do ní byli převeditelné. Od té doby byla vyvinuta řada technik, různé *desorpce / ionizace* tak, aby pevnou fázi bylo možno zkoumat v „plynném stavu“.

Tak dospěla MS do role techniky, která dovoluje studovat vysokomolekulární termolabilní substráty jako proteiny a nukleové kyseliny. Začátek 21. století znamená pro MS prudký rozmach studia biologických substancí, kovů, povrchů pevných látek, molekulárních asociátů atp.

MS je mocný nástroj studia všech druhů látek, neboť poskytuje obrovské množství informací o jejich složení, kvantitativních aspektech a struktuře a to z menšího množství látky než obvyklé analytické techniky.

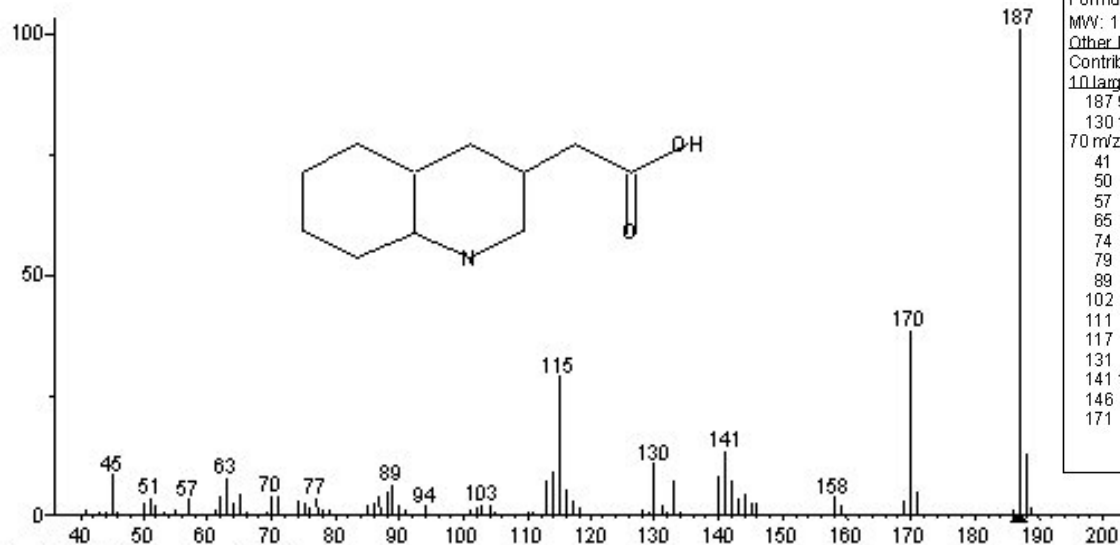
Tak mohou být studovány femtogramy (10^{-15} g) rakovinotvorných látek v potravinách, zeptomoly (10^{-21} mol) proteinů odpovědných za genetické problémy, či pikogramy (10^{-12} g) železa v křemíku použitém pro výrobu polovodičů.

MS se vyvinula z techniky, kterou fyzikové zkoumali strukturu atomů na začátku 20. Přičemž první pokusy se odehrály již kolem roku 1897. Kolem roku 1930 a 1940, sehrála MS svoji úlohu ve výzkumu atomové energie a bomby. Teprve kolem roku 1940 se začala používat ke studiu organických látek.

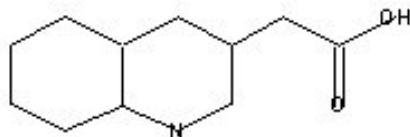
Co je vlastně molekulová hmota?

Tak například uhlík je běžně přítomen jako směs ^{12}C a ^{13}C izotopů v poměru 98.9 % ku 1.1 %. Podle definice byla uhlíku ^{12}C přiřčena atomová hmota 12.00000 a všechny ostatní izotopy mají relativní hmotu od této odvozenou ^{13}C má pak hmotu 13.00335.1, H je 1.00783 a ^{16}O je 15.99491.

Běžně užívaný termín 'relativní molekulová hmota' molekuly používá průměrné hodnoty hmot atomů zahrnující atomové hmoty všech přítomných izotopů dohromady v rámci jejich výskytu tak, jak jsou definovány periodicky IUPAC. Taková hmota je pak průměrná molekulová hmota. MS deteguje ionty s různým izotopovým složením samozřejmě při rozdílných „hmotách“. Dospíváme pak k termínům jako jmenovitá (nominální) monoisotopická hmota a přesná isotopická hmota.



(mainlib) Quinolin-3-acetic acid



Name: Quinolin-3-acetic acid
 Formula: C₁₁H₉NO₂
 MW: 187 CAS#: N/A NIST#: 128384 ID#: 79578 DB: mainlib
 Other DBs: None
 Contributor: LAC, NIDDK, NIH, Bethesda, MD 20892

10 largest peaks:

187 999	170 376	115 282	141 128	188 123
130 102	114 86	45 80	140 79	63 72

70 m/z Values and Intensities:

41 6	43 4	44 4	45 80	46 1
50 24	51 32	52 14	53 5	55 7
57 29	61 8	62 35	63 72	64 21
65 40	66 4	69 3	70 37	71 33
74 25	75 22	76 13	77 31	78 10
79 10	85 18	86 23	87 33	88 41
89 59	90 16	91 7	94 14	101 6
102 12	103 17	104 15	105 4	110 1
111 1	113 68	114 86	115 282	116 49
117 26	118 13	128 7	129 2	130 102
131 17	132 1	133 66	134 5	140 79
141 128	142 67	143 29	144 40	145 20
146 20	158 33	159 14	169 26	170 376
171 45	186 8	187 999	188 123	189 11

MS chinolin-3-octové kyseliny získané elektronovou ionizací (EI) zobrazené jako čárový graf s intenzitami v %. Signál (v hantýrce píků z angl. peak) u m/z 187 je molekulární iontový signál a zároveň základní (nejintenzivnější) signál pro intenzitu v % (base peak). Reprezentuje celou molekulu s jedním nábojem ionizovanou přijetím či odevzdáním elektronu. V tabulce jsou uvedeny intenzity k arbitrární jednotce 999.

Data z hmotového spektrometru jsou hmotová spektra zobrazující okamžitou intenzitu (množství) iontu u každého jednotlivého měřitelného m/z jako čárový graf. Intenzita je ukázána buď v pro nezasvěceného abstraktních arbitrárních jednotkách anebo v procentech vztažených na největší signál (100 %).

Možnost rozlišení dvou vedle jdoucích hodnot m/z je zvána rozlišovací schopnost stroje.

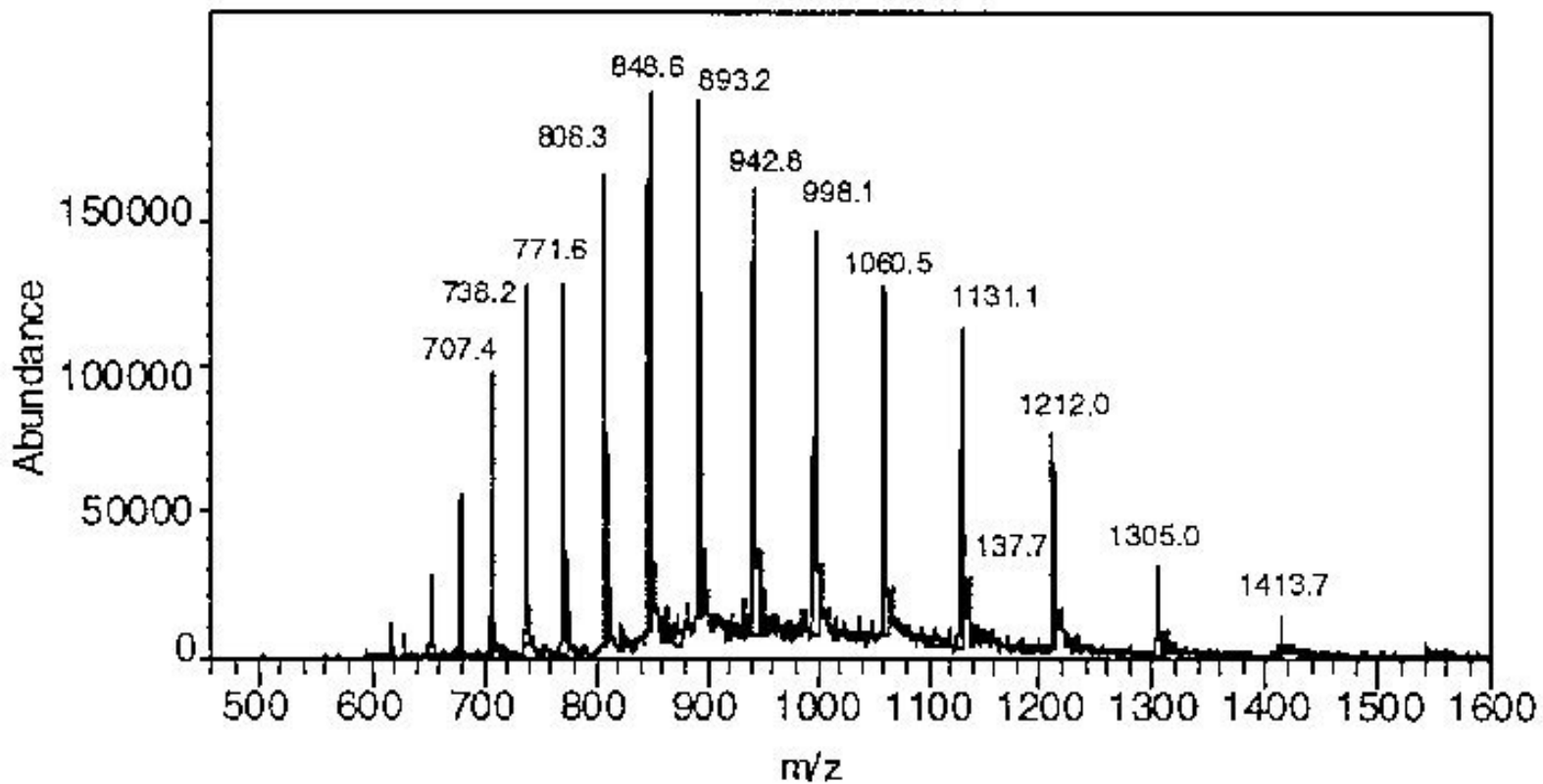
Zopakujme si, že MS se zabývá jednotlivými isotopy prvků a JEJICH hmotou a ne „atomovými vahami prvků“ (relativními atomovými hmotami [hmotnostmi]).

MS deteguje přesnou isotopovou hmotu iontu (v relaci k náboji) tudíž brom uvidíme jako dva stabilní isotopy, ^{79}Br a ^{81}Br , (cca 1:1), tj. 78,91839 a 80,91642 a ne 79,916.

Tudíž molekuly obsahující jeden atom bromu se budou lišit podle toho který isotop bromu obsahují. Molekulární iont methylbromidu má *nominální hmotu* (celočíslně vyjádřenou hmotu nejběžněji vyskytujícího se stabilního isotopu prvku) 94, $(1\text{C} \times 12) + (3\text{H} \times 1) + (1\text{Br} \times 79) = 94$.

Ve spektru však detegujeme i ionty 95, 96 a 97. To je proto, že brom i uhlík mají po dvou běžně se vyskytujících isotopech: ^{79}Br a ^{81}Br ; ^{12}C a ^{13}C . Podobná četnost výskytu ^{81}Br , a ^{79}Br znamená, že intenzita signálů obsahujících jeden ^{12}C , tři ^1H a jeden ^{81}Br bude podobný iont obsahující ^{79}Br .

Nominální hmota se někdy vyjadřuje v jednotkách Da (Dalton), nepatřících do SI.



přesné (profilové) MS

21b-7

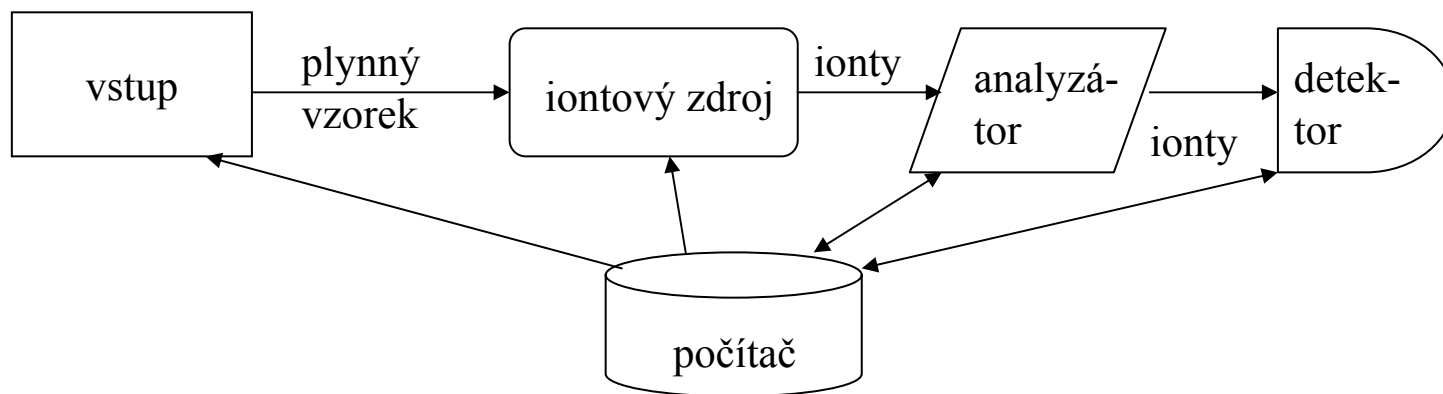
Přístroje pro MS, hmotové spektrometry jsou charakterizovány technikou dělení iontů podle jejich m/z a způsobem jakým se ionty tvoří (technikou ionizace).

Hmotové spektrometry (MS) se mohou použít v kombinaci s celou škálou separačních technik GC, LC, CE a pod.

Hmotový spektrometr se skládá z části na dávkování vzorku (vstup, sample inlet), části, ve které probízá ionizace (ionization region), separátoru m/z , a detektoru iontů.

Všechny tuto komponenty pracují při značně sníženém tlaku a dnes již jsou ovládány téměř výhradně počítači.

V některých případech je vstup a ionizace umístěna v témže kompartmentu přístroje. Takové uspořádání je běžné u techniky *electrospray* používané u LC/MS.



Blokové schema MS

Molekuly v plynném stavu jsou ionizovány v „iontovém zdroji“ na molekulární ionty. Některé molekuly se zde rozpadnou na fragmenty. Molekulární a fragmenové ioty jsou urychleny polem do analyzátoru (mass analyzer / mass filter) a jsou vedeny do detektoru. V detektoru jsou ionty zaznamenány a jejich množství převedeno na odpovídající intenzitu elektrického signálu, který je proporcionalně přiřazován velikostem hmot, vycházejícím z analyzátoru, podle předchozí kalibrace.

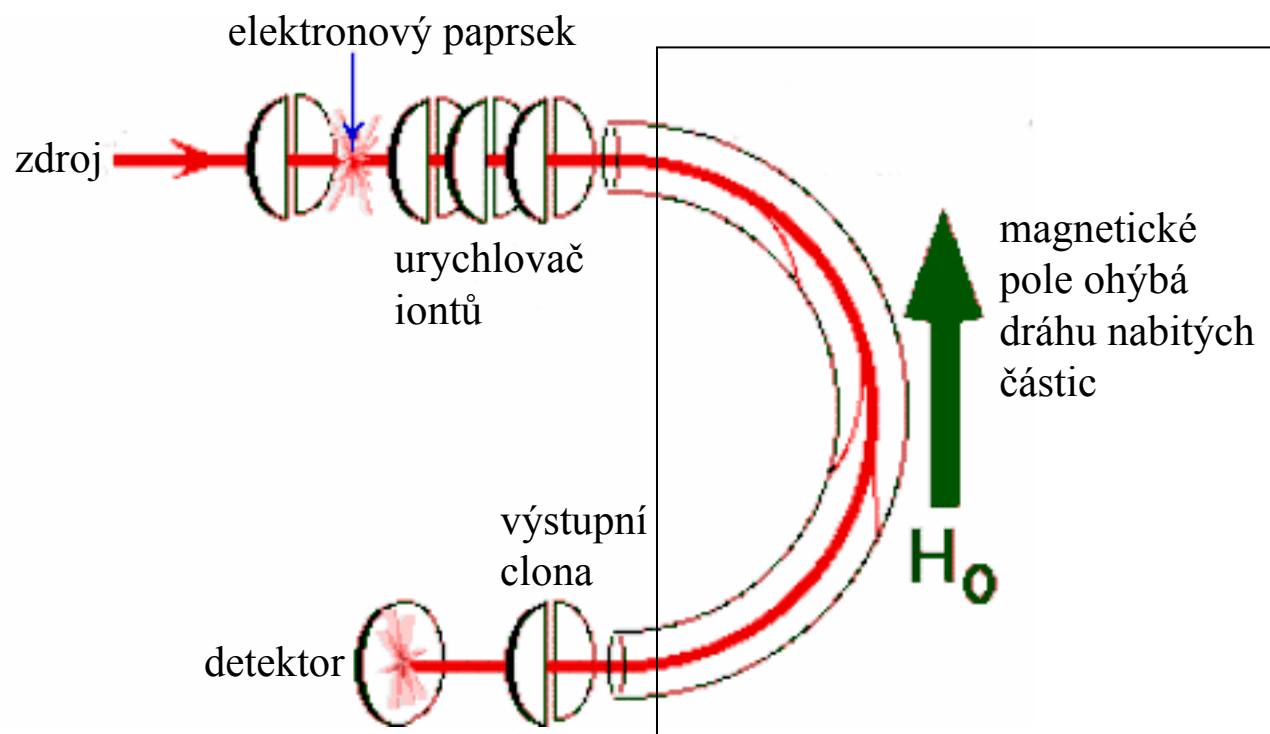
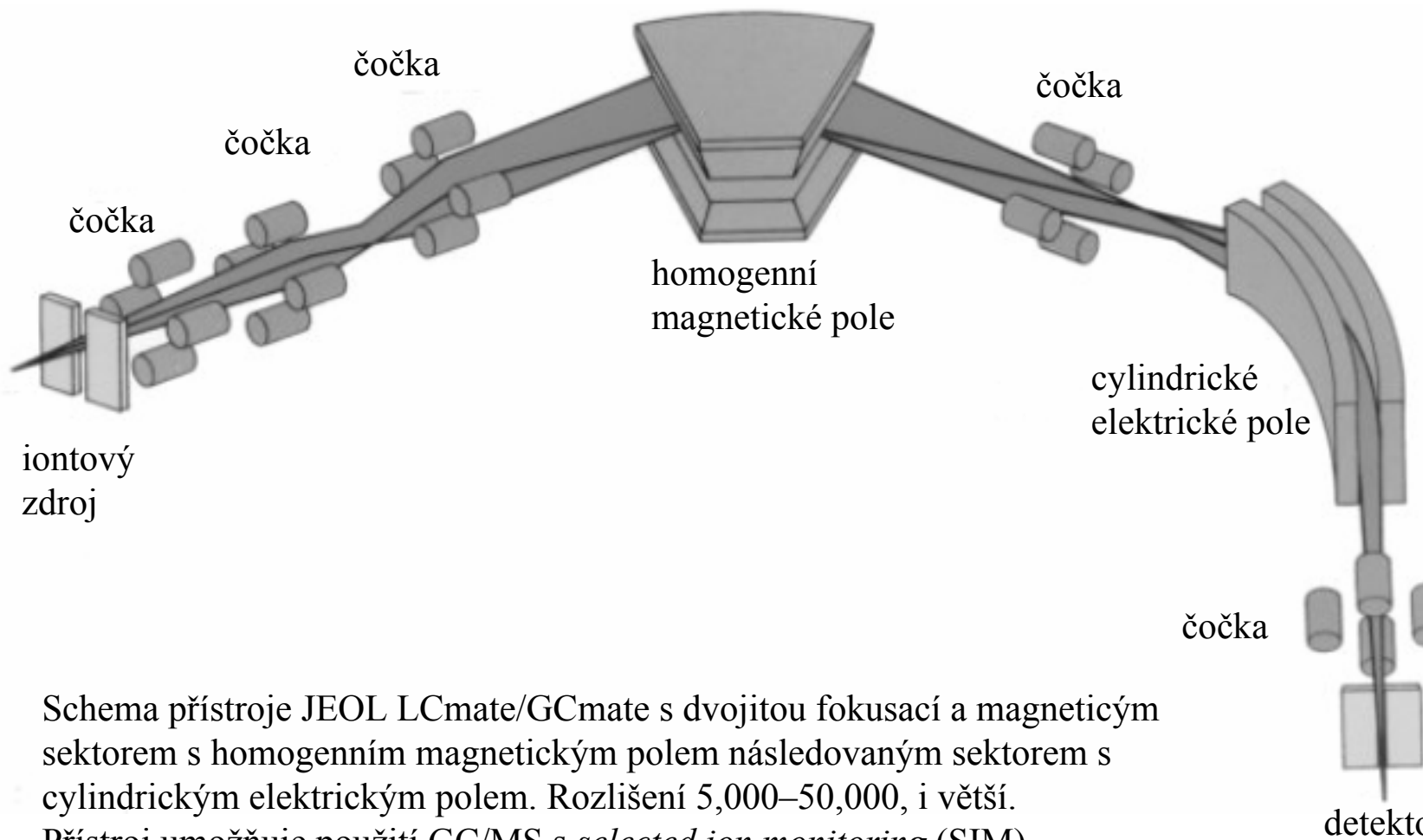
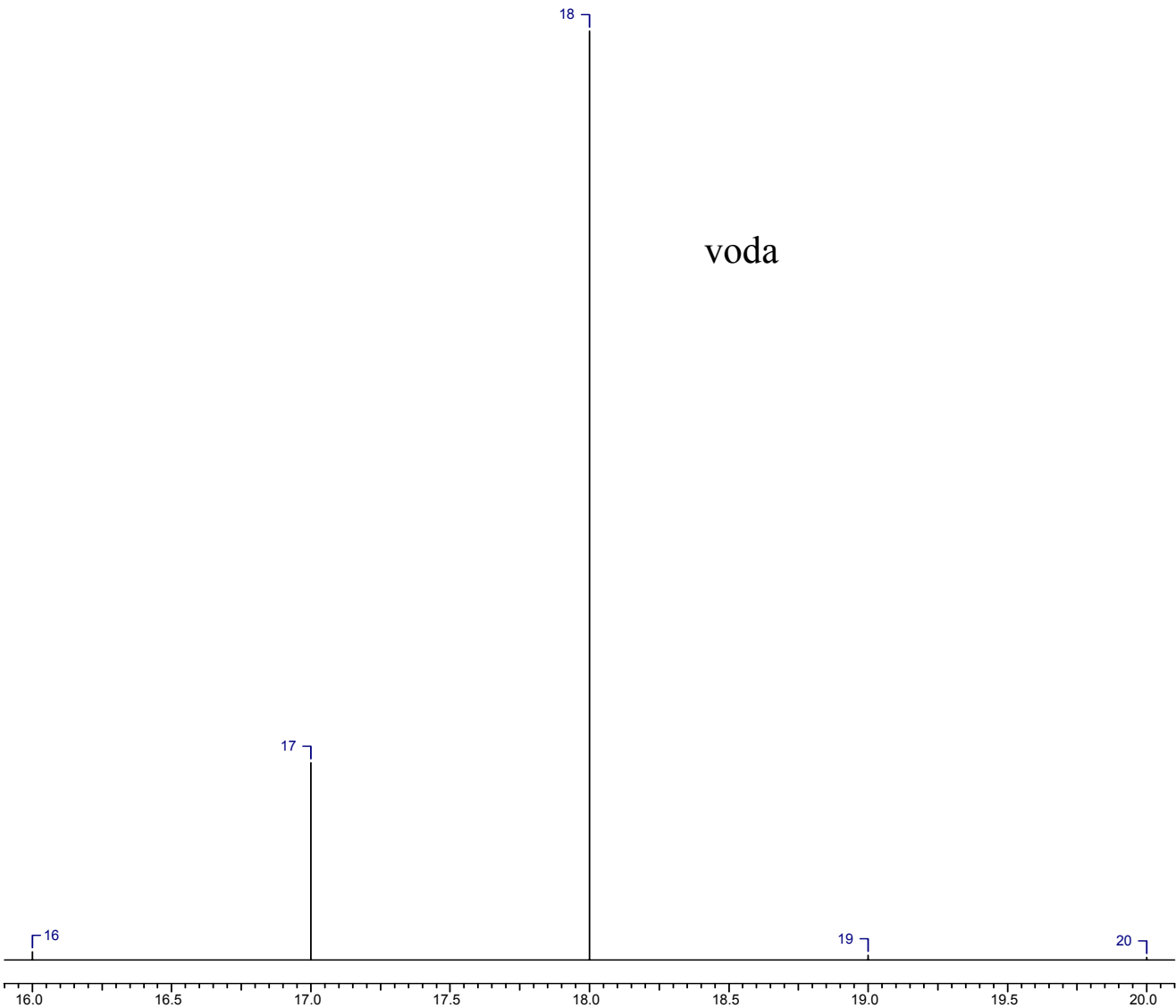


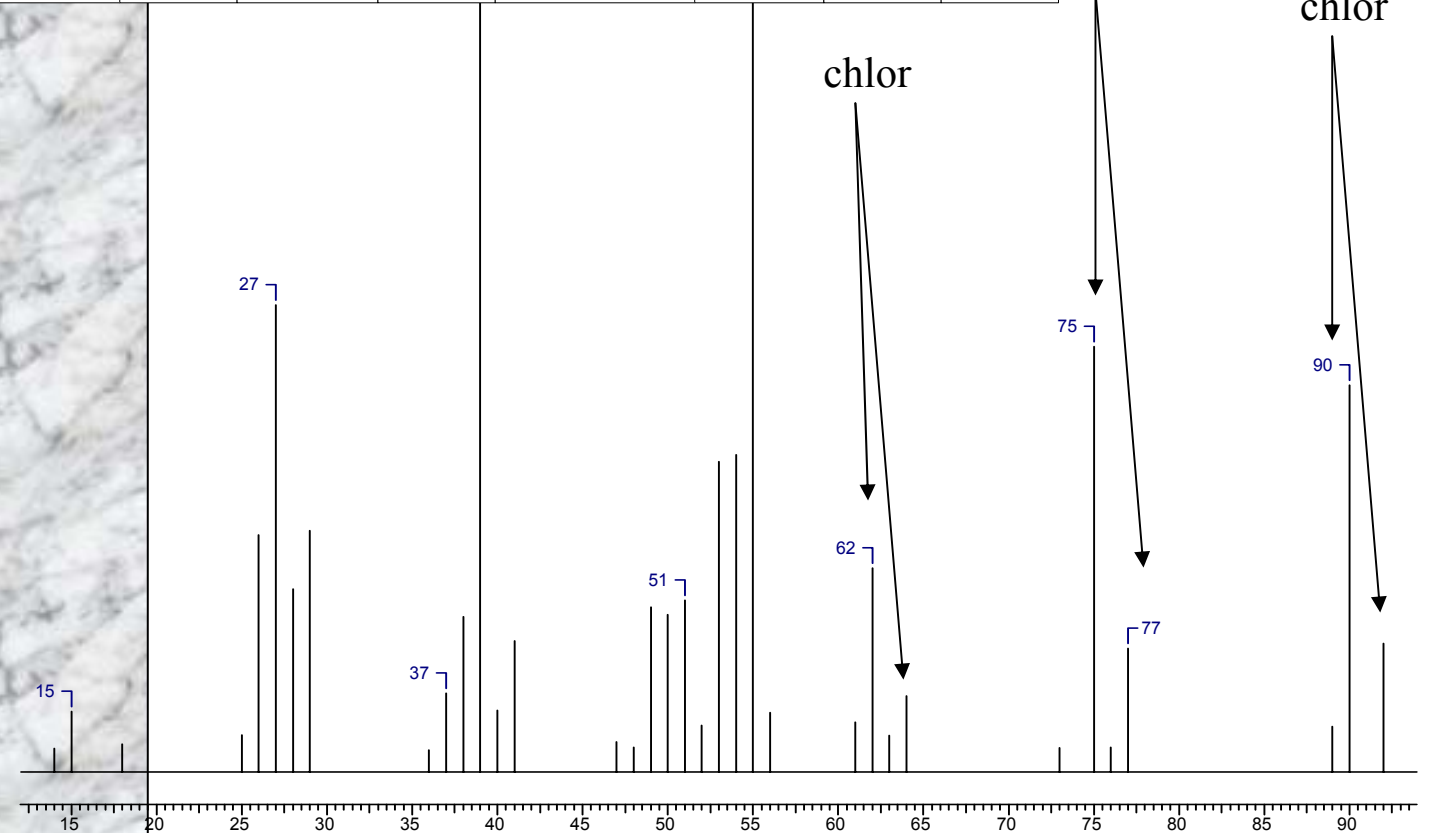
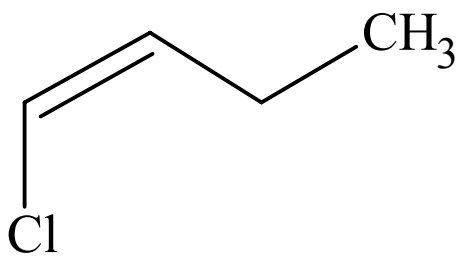
schéma hmotového základního uspořádání hmotového spektrometru



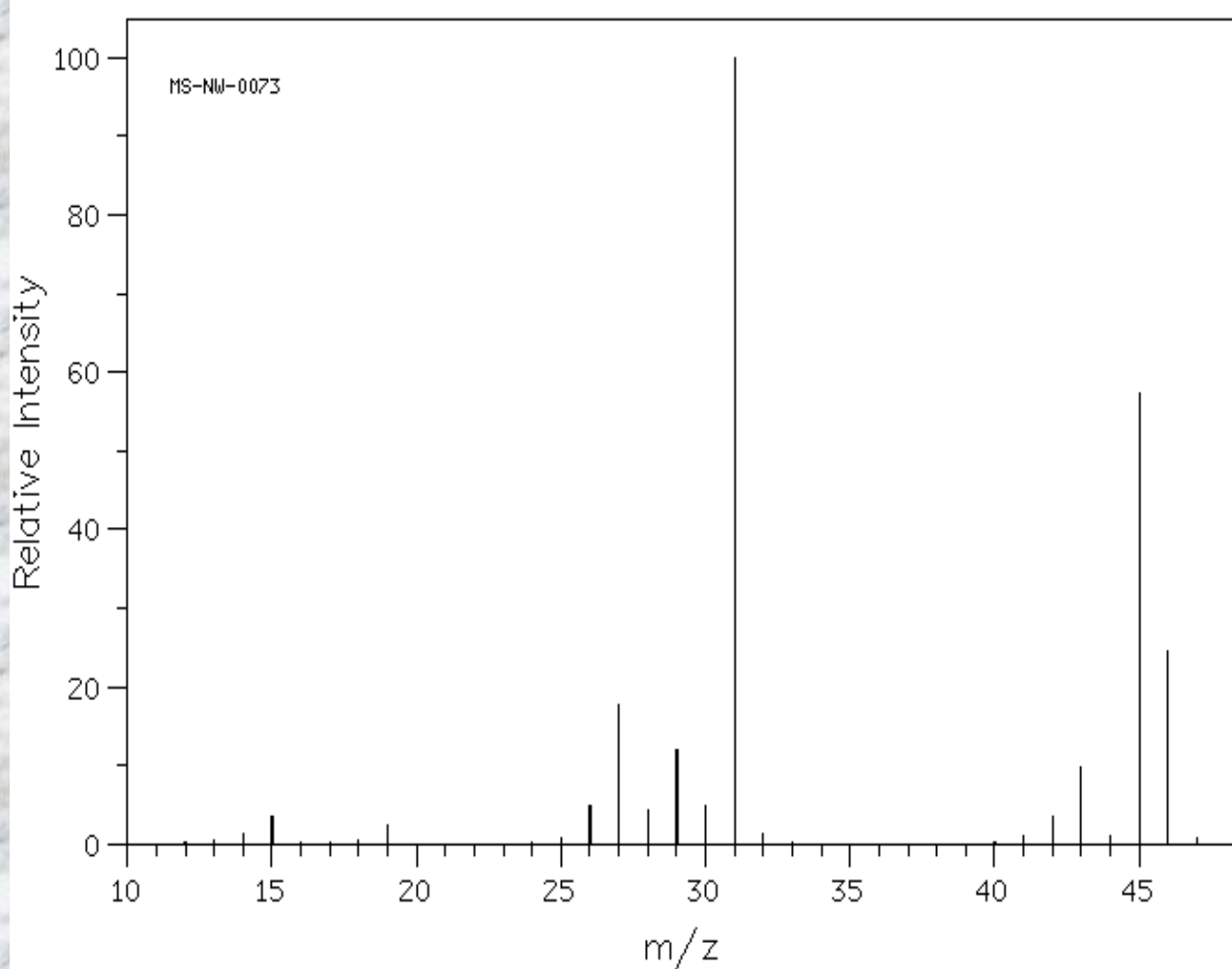
Schema přístroje JEOL LCmate/GCmate s dvojitou fokusací a magneticým sektorem s homogenním magnetickým polem následovaným sektorem s cylindrickým elektrickým polem. Rozlišení 5,000–50,000, i větší. Přístroj umožňuje použití GC/MS s *selected ion monitoring* (SIM), pro kvantitativní vyhodnocení analýz. Ionty urychlené do prvního sektoru polem (2,000–10,000 eV) jsou děleny změnou magnetického pole.



No.	Fragment	Formula	m/z Calc.	TIC(%)	Difference (Da)	m/z Exp.	RI(%)	TIC(%)
1	1-2	CHCl	47.977	0.492	0.023	48.000	1.900	0.369
2	1-2(+H)	CH ₂ Cl	48.985	3.289	0.015	49.000	12.701	2.464
3	1-3	C ₂ H ₂ Cl	60.985	0.998	0.015	61.000	3.810	0.739
4	1-3(+H)	C ₂ H ₃ Cl	61.992	4.115	0.008	62.000	15.712	3.048
5	1-3(+2H)	C ₂ H ₄ Cl	63.000	0.728	-0.000	63.000	2.780	0.539
6	2-4	C ₃ H ₄	40.031	0.953	-0.031	40.000	4.750	0.922
7	1-4(-2H)	C ₃ H ₂ Cl	72.985	0.485	0.015	73.000	1.830	0.355
8	1-4	C ₃ H ₄ Cl	75.000	8.704	-0.000	75.000	32.863	6.376
9	1-4(+H)	C ₃ H ₅ Cl	76.008	0.498	-0.008	76.000	1.880	0.365
10	2-5(-H)	C ₄ H ₆	54.047	4.973	-0.047	54.000	24.502	4.754
11	2-5	C ₄ H ₇	55.055	20.299	-0.055	55.000	100.000	19.401
12	1-5(-H)	C ₄ H ₆ Cl	89.016	0.935	-0.016	89.000	3.490	0.677
13	1-5	C ₄ H ₇ Cl	90.024	8.005	-0.024	90.000	29.883	5.798

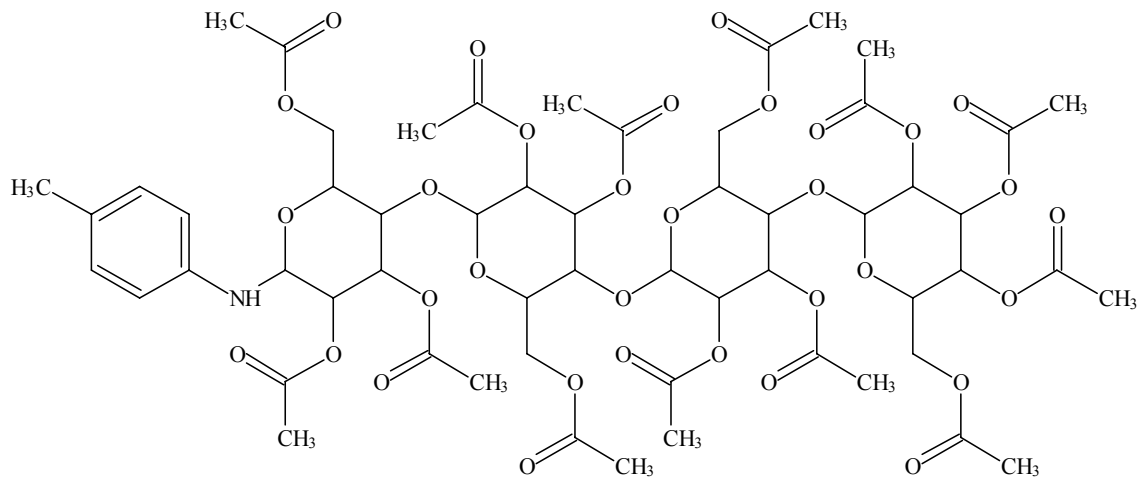
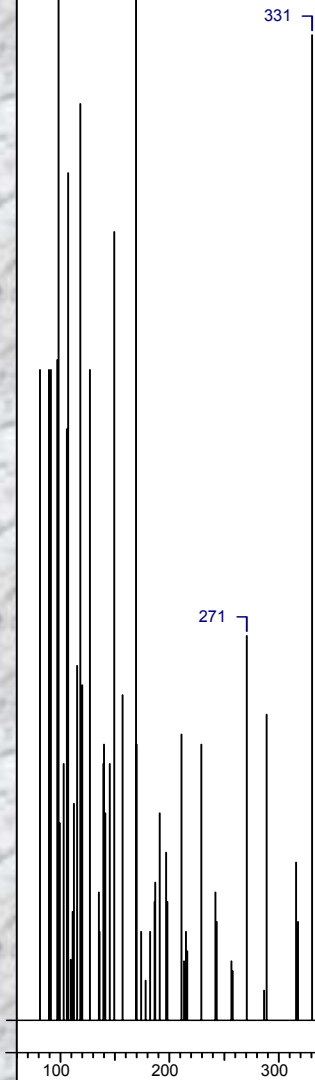


21b-13



ETHYL ALKOHOL
C2H6O
(molek. iont: 46)

14.0	1
15.0	3
19.0	2
26.0	4
27.0	17
28.0	4
29.0	12
30.0	5
31.0	100
32.0	1
41.0	1
42.0	3
43.0	9
44.0	1
45.0	57
46.0	24



Formula $C_{57}H_{75}NO_{33}$

CAS # 35573843

NIST # 40723

NAME .beta.-D-Glucopyranosylamine, O-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-
 -.beta.-D-glucopyranosyl-(1--->4)-O-2,3,6-tri-O-acetyl-
 -.beta.-D-glucopyranosyl-(1--->4)-O-2,3,6-tri-O-acetyl-
 -.beta.-D-glucopyranosyl-(1--->4)-N-(4-methylphenyl)-
 -, 2,3,6-triacetate

MW 1301

CONTRIBUTOR N. K. KOCHETKOV

MH
1301

21b-15

Analyty, které jsou převoditelné do plynné fáze mohou být ionizovány pro MS

elektronovou ionizací (EI - electron ionization, dříve - electron impact),
chemickou ionizací (CI - chemical ionization),
přímá desorpční chemická ionizace (DCI - direct (desorption) chemical ionization),
ionizace rychlými ionty (FAB - fast atom bombardment)
ionizace ionty (FID - fast ion bombardment, SIMS - secondary ion MS)
ionizací polem (FI); *desorpce polem* (FD),
fotoionizací (PI),
či některou z moderních speckálních technik jako je
povrchová ionizace (SI).

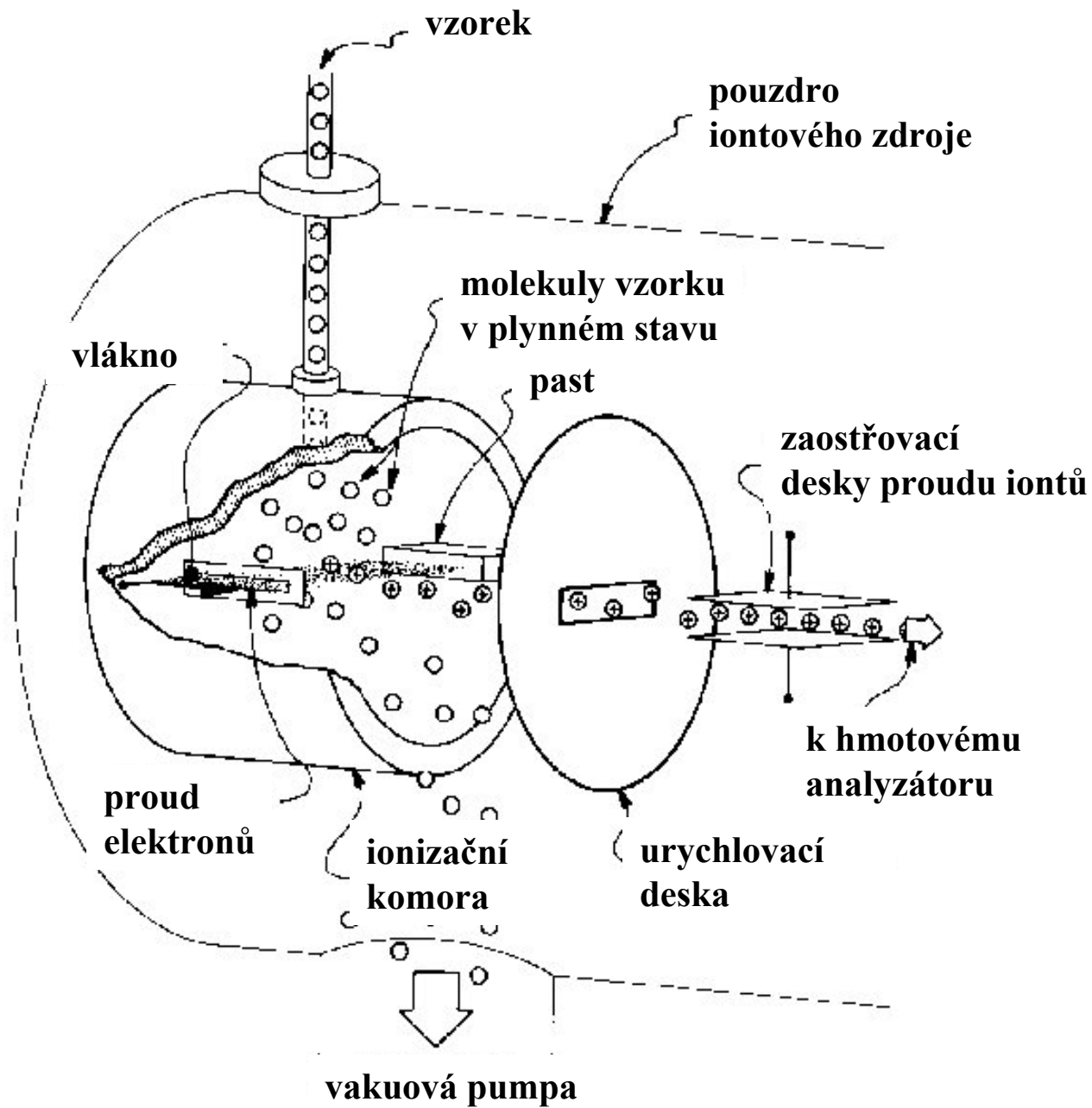
Tyto techniky jsou uvedeny přibližně v pořadí své popularity.

EI je bezesporu nejpoužívanější metoda pro tvorbu iontů v plynné fázi
(dnes existuje cca více než 10 komerčních výrobců takových zařízení (EI GC-MS)

Přestože tyto společnosti nabízejí také CI pro své GC/MS je poměr prodaných přístrojů
50 : 1 ve prospěch EI, naproti tomu jen jedna společnost nabízí FI či PI

k výhodám EI patří obrovské množství validovaných EI spekter i s popisem fragmentací
možnost identifikace sloučeniny za pomoci výše uvedených dat

EI je proces s předáním takové energie, že často molekulární iont nezaznamenáme



Chiroptické metody

chiroptický

termín chiroptický označuje optické měřicí techniky (používající refrakce, absorpce či emise anisotropního záření) pro výzkum chirálních látek

[tj. měření optické rotace při stálé vlnové délce, optická rotační disperse (ORD), cirkulární dichroismus (CD), a cirkulární polarizace luminescence (CPL), aj.]

Schopnost některých organických sloučenin stáčet rovinu procházejícího polarizovaného světla (neboli optická aktivita) je od svého objevení běžně využívána pro charakterizaci a identifikaci těchto látek a pro jejich analýzu v laboratorní i průmyslové praxi. V praxi se používá i pro stanovování koncentrace (např. cukru v řepné šťávě).

Optická aktivita je výrazným rysem většiny nízkomolekulárních složek živé hmoty a je tedy logickým předmětem zájmu chemie přírodních látek. Právě v souvislosti se strukturními studii nízkomolekulárních přírodních látek typu steroidů, alkaloidů, oligopeptidů apod. se vyvinuly fyzikální metody, založené na sledování interakce elektromagnetického záření vhodné vlnové délky a polarizace s opticky aktivními sloučeninami, které se obecně označují jako *chiroptické*.

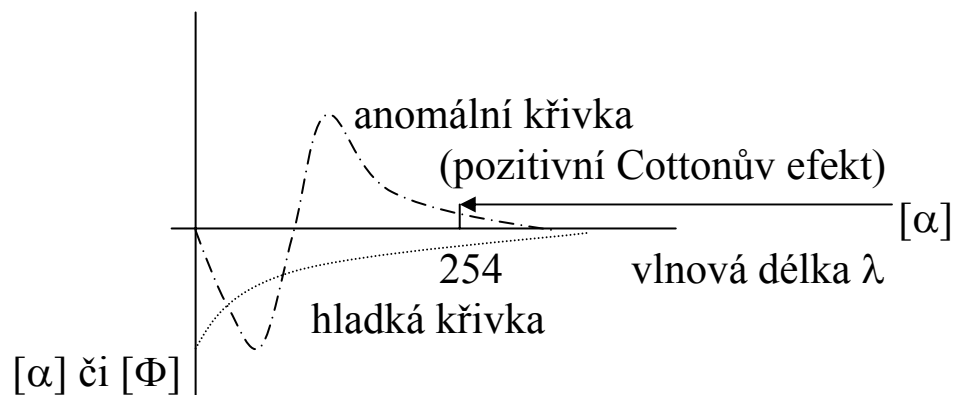
Strukturní podmínky optické aktivity.

Jedinou strukturní podmínku nutnou a postačující k tomu, aby látka vykazovala optickou aktivitu, lze vyjádřit takto: molekula (model) opticky aktivní sloučeniny nesmí být žádným otáčením nebo posunováním převeditelná na svůj zrcadlový obraz. Látky splňující tuto podmínku jsou *chirální*, vlastnost sama se nazývá *chiralita*. Z hlediska teorie symetrie vylučuje chiralitu každý prvek symetrie, který v sobě zahrnuje zrcadlení jako operaci. Molekula chirální látky tedy nemá rovinu symetrie, střed symetrie, rotačně reflexní osu. Přítomnost n-četné jednoduché osy symetrie není naproti tomu zábranou chiralit. Chiralita tedy není totéž co asymetrie ve vztahu k optické aktivitě látky: zatímco každá asymetrická struktura (tj. struktura, která neobsahuje žádný prvek symetrie) je opticky aktivní a je tudíž chirální, nemusí být každá opticky aktivní struktura asymetrická.

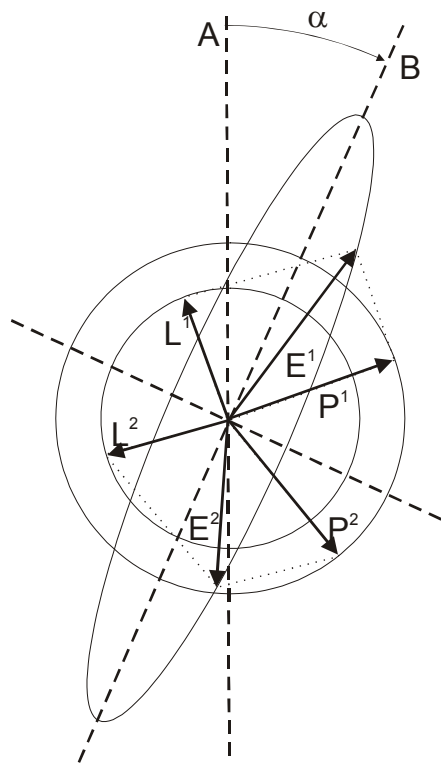
Z definice chiralit vyplývá, že každá chirální struktura může existovat ve dvou formách, nazývaných *enantiomery*, které jsou vzájemnými zrcadlovými obrazy. Enantiomery mají shodné fyzikální i chemické vlastnosti s výjimkou těch, které vyplývají z interakce s jinými chirálními faktory (cirkulárně polarizované světlo, adsorpce na chirálních nosičích, reakce s chirálními činidly, chirální prostředí, chirální indukce). Při všech těchto interakcích se totiž enantiomerní vztah mezi oběma isomery (enantiomery) mění na diastereoisomerní.

Enantiomorfy jsou potom dva chirální objekty, které jsou neztotožnitelné se svým zrcadlovým obrazem, nebo dvě skupiny objektů či modelů, které jsou neztotožnitelné se zrcadlovým obrazem této skupiny.

Zkušební ukázaly, že monotónní křivku závislosti optické otáčivosti na vlnové délce světla vykazují látky, které ve sledované oblasti neabsorbují světelnou energii, tj. nemají v molekule žádné chromofory s elektronovými přechody uskutečňujícími se při těchto vlnových délkách. V opačném případě je průběh křivky narušen zpravidla strmou změnou měřených hodnot $[\alpha]$ nebo $[\Phi]$ k jednomu extrému, velmi strmým přechodem přes nulovou hodnotu k druhému extrému a následným pokračováním této, tzv. *anomální* křivky v poli opačných znamének rotace



Monotónní a extrémní průběh závislosti $[\alpha]$ resp. $[\Phi]$ na λ



Průchod světla absorbujícím chirálním prostředím (elipticky polarizované světlo)

Tento jev se nazývá Cottonův efekt (A. Cotton, 1896, dále CE) a podle toho, zda směrem ke krátkovlnné oblasti křivka napřed stoupá anebo napřed klesá rozeznáváme křivku (a CE) kladnou nebo zápornou. Křivkami závislosti $[\Phi]$ *vers.* λ , jejich studiem a využitím pro strukturní analýzu organických sloučenin se zabývá metoda nazvaná optická rotační disperse (ORD). Jak bylo již výše naznačeno, souvisí CE s absorpcí světla odpovídající přechodu nějakého chromoforu. V analogii s výše uvedeným Fresnelovým výkladem vzniku optické rotace u opticky aktivních látek se v tomto případě uvažuje nejen rozdílná rychlost šíření obou cirkulárně polarizovaných složek prostředím, ale i jejich rozdílná absorpce.

Taková rozdílná absorpce se nazývá diferenciální dichroická absorpce. Vyjadřuje se jako rozdíl pravé a levé složky absorpčního koeficientu $\Delta\varepsilon = \varepsilon_p - \varepsilon_L$, který je na přístrojích nazývaných dichrografy přímo měřenou experimentální veličinou. Rekombinovaný paprsek, vystupující z absorbujícího opticky aktivního prostředí není lineárně polarizovaný, ale elipticky polarizovaný – vrchol jeho vektoru opisuje (v průmětu) protáhlou elipsu. Poměr poloos této elipsy se nazývá *elipticita* a v analogii s optickou rotací se rozlišuje specifická elipticita $[\Psi]$ a běžněji používaná molární elipticita $[\theta]$, mezi nimiž platí analogický vztah

$$[\theta] = [\Psi] \cdot M/100$$

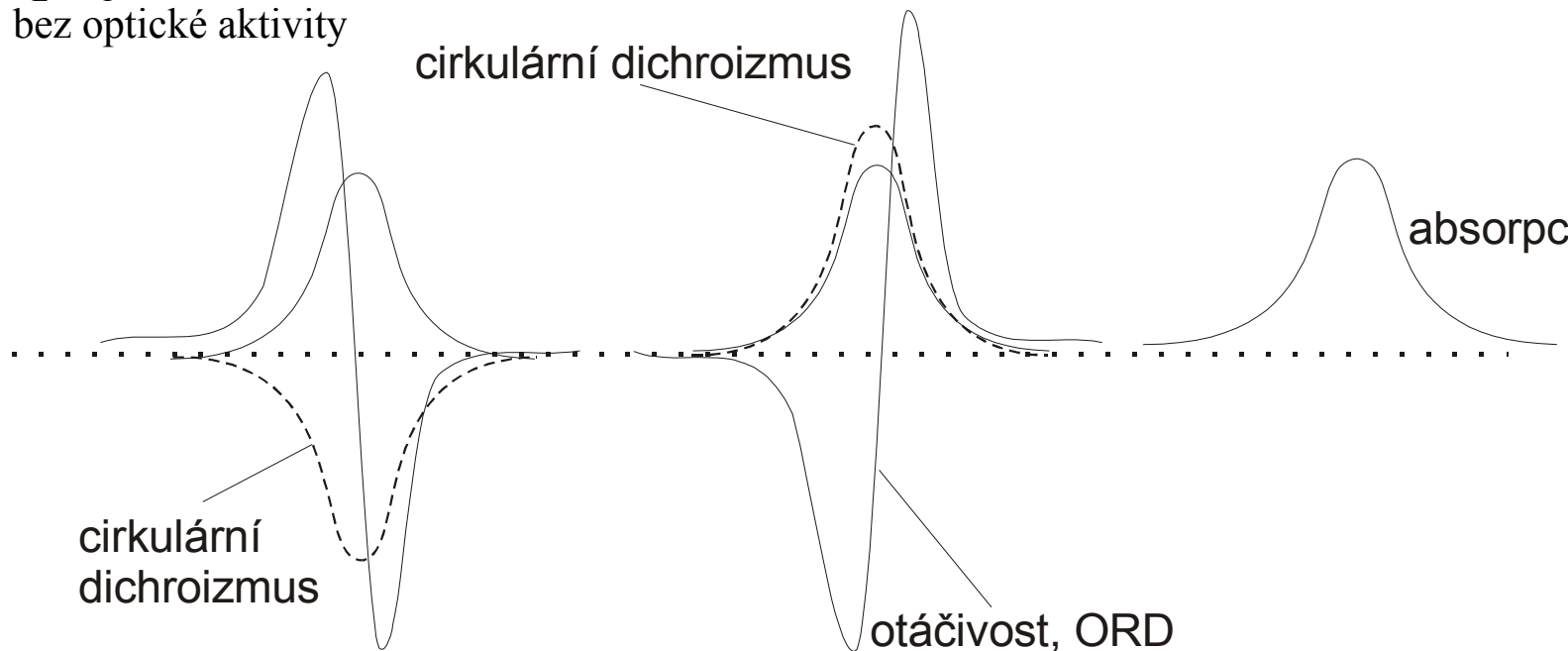
Veličiny $[\theta]$ a $\Delta\varepsilon$ spolu souvisí jednoduchým vztahem

$$[\theta] \approx 3300 \Delta\varepsilon.$$

Také hodnota $\Delta\varepsilon$, resp. $[\theta]$ závisí na vlnové délce. Měřením této závislosti a jejím vyhodnocením pro strukturní analýzu se zabývá metoda nazvaná cirkulární dichroická absorpce, běžněji cirkulární dichroismus (CD).

Rozdíly mezi metodami ORD a CD: Zatímco ORD je měřitelné v celém rozsahu spektra (neboť rozdíly indexů lomu obou cirkulárně polarizovaných paprsků jsou sice řádu 10^{-6} , ale projevují se v celém spektru), měřené CD hodnoty, tj. ε_p a ε_L jsou sice číselně větší (řádu 10^{-2}), ale jsou zaznamatelné jen v oblasti vlnových délek, při kterých chromofor absorbuje elektromagnetické záření.

Vzájemný vztah UV absorpce, ORD a CD křivek v ideálním případě, otáčivost je vyjádřena v jednotkách molekulární rotace $[\Phi]$, absorpce v $[\varepsilon]$ a cirkulárně dichroická křivka v $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_p$ na vodorovné ose je vlnová délka λ , ORD a CD pozitivní a negativní a absorpční pás bez optické aktivity



Měření chiroptických vlastností, přístroje

Křivky optické rotační disperse se měří na *spektropolarimetrech*. Jsou to v podstatě polarimetry se spojitou změnou vlnové délky v oblasti UV-VIS a grafickým nebo digitálním zápisem změřených hodnot. Látky se měří v roztocích a vedle ORD křivky lze zpravidla změřit i elektronové spektrum v dané vlnové oblasti. Většina přístrojů měří v rozmezí 250-750 nm. Dispersní křivku, která s klesající vlnovou délkou nabývá rostoucích kladných hodnot nazýváme pozitivní. Maximum křivky v pozitivní oblasti hodnot $[\phi]$ se označuje jako vrch (peak), minimum v negativní oblasti je důl (trough). U pozitivní křivky hovoříme o pozitivním Cottonově efektu.

Křivky cirkulárního dichroismu (CD) se měří na přístrojích nazývaných dichrograf nebo dichrometr. Přístroj zaznamenává rozdíly v absorbancích cirkulárně polarizovaných paprsků, které jsou vzorkem střídavě propouštěny. Výsledné křivky zaznamenají pozitivní Cottonův efekt jako pás s pozitivním maximem, negativní CE jako pás s negativním maximem. Při překryvu více CD pásů už ovšem nemusí být obraz spektra takto jednoznačný.



Pro úspěšné změření chiroptických vlastností musí být splněno několik podmínek:

optická čistota látky, tj. dostatečně velká převaha jednoho enantiomeru,

látka nesmí v měřené oblasti příliš silně absorbovat; hodnota poměru $\Delta\varepsilon/\varepsilon$ určuje, je-li měření v dané oblasti spektra proveditelné,

dostatečná rozpustnost (0,25 – 1 mg/ml) měřené látky v rozpouštědle, které je dostatečně transparentní; informační hodnota měření vzrůstá s možností uskutečnit je v řadě rozpouštědel odlišné polarity,

spektrum se zpravidla skládá z několika měření v kyvetách různé tloušťky (optické délky), někdy je nutné provést měření v různých koncentracích (vliv asociace), při různých teplotách (konformační změny, asociace) a v různých rozpouštědlech (vliv solvatace, konformační změny, asociace),

požadavek optické homogenity vzorku (prach, nerozpuštěné částičky apod.).

zdrojem světla u polarimetrů bývá Na výbojka, Hg výbojka, wolframová žárovka ale i laser, podobně je tomu i u „elektronických“ chiroptických metod

polarizace záření je umožněna:

rozkladem paprsku na dvě kolmo polarizované komponenty a selektivním odstraněním jedné z nich

a/ selektivní absorpcí (filtry),

b/ odrazem pod tzv „Brewsterovým“ úhlem (mnohonásobná reflexe se používá pro polarizaci laserového paprsku),

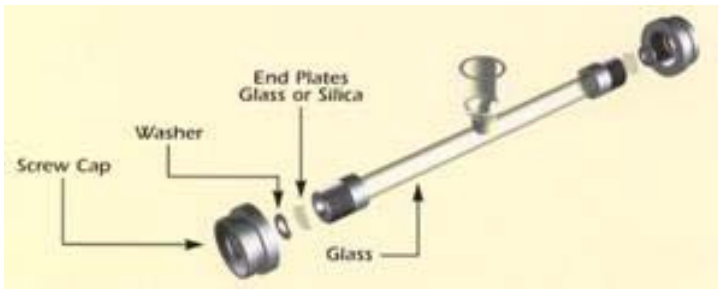
c/ dvojlomem, někdy kombinovaný s odrazem,

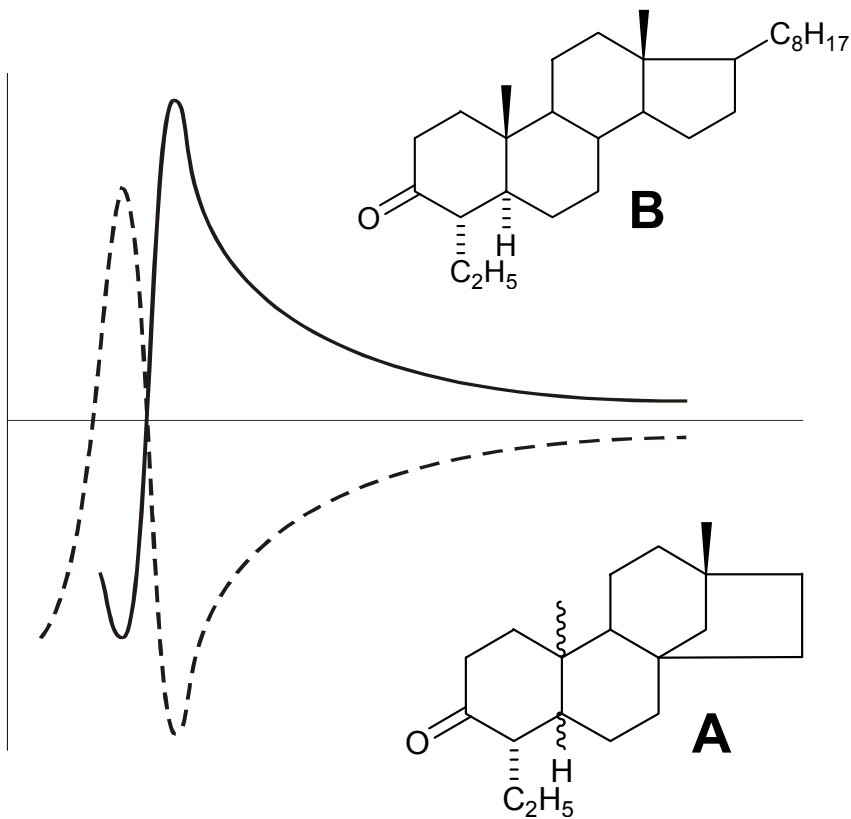
dvojlom může být přirozený, nebo navozený silným elektrickým polem

d/ selektivní rozptyl (světlo přicházející s oblohy je částečně polarizováno)

u konstrukce dichrografů je jednopaprskový spektrofotometr doplněn o polarizátor, spektra se měří v elektronové oblasti ale i v oblasti vibračně rotačních frekvencí

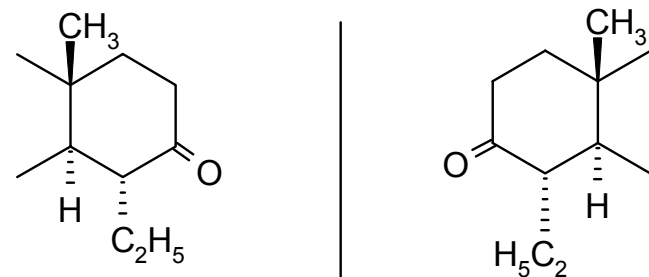
detekční zařízení je nejlépe fotonásobič





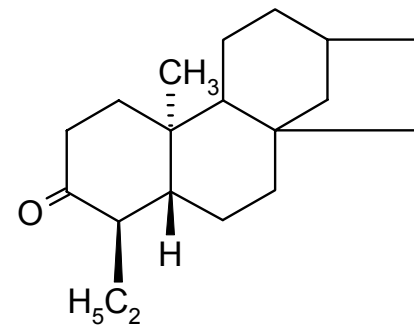
ORD-křivky srovnávaných látek A a B

Srovnávané části molekul látek A a B v zrcadlových obrazech



A

B



A

Ze srovnání křivek látek A a B plyne, že prostorové uspořádání na chirálních atomech v okolí chromoforu bude u látky A pravděpodobně „antipodní“ vůči látce B, neboť obě křivky jsou téměř v zrcadlovém vztahu. Tento stav vystihují vzorce kruhů A (cyklohexanonových částí) obou látek překreslené vůči sobě jako předmět a zrcadlový obraz.

chiroptické metody jsou využívány m.j. k

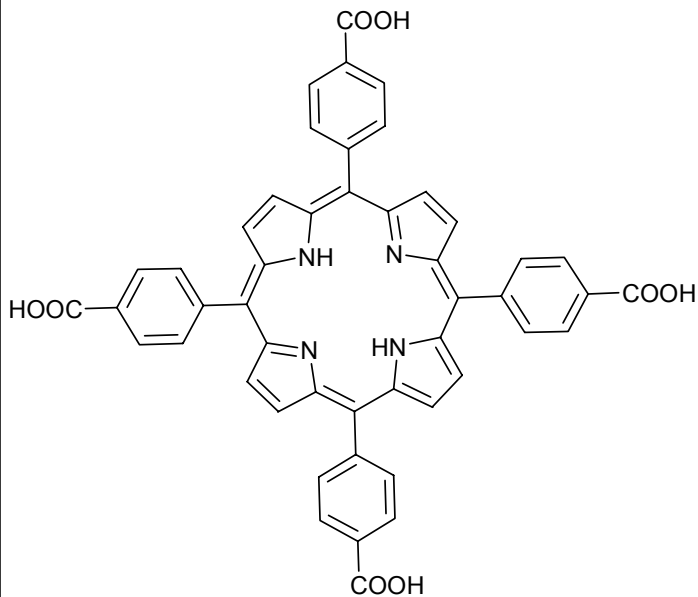
studiu teplotních konformačních závislostí peptidů (konformace peptidické vazby se mění)

studiu konformačních stavů polypeptidů, kdy jednotlivé konformace jako α -helix, skládaný list a podobně mají charakteristická CD spektra

studiu konformací nukleových kyselin

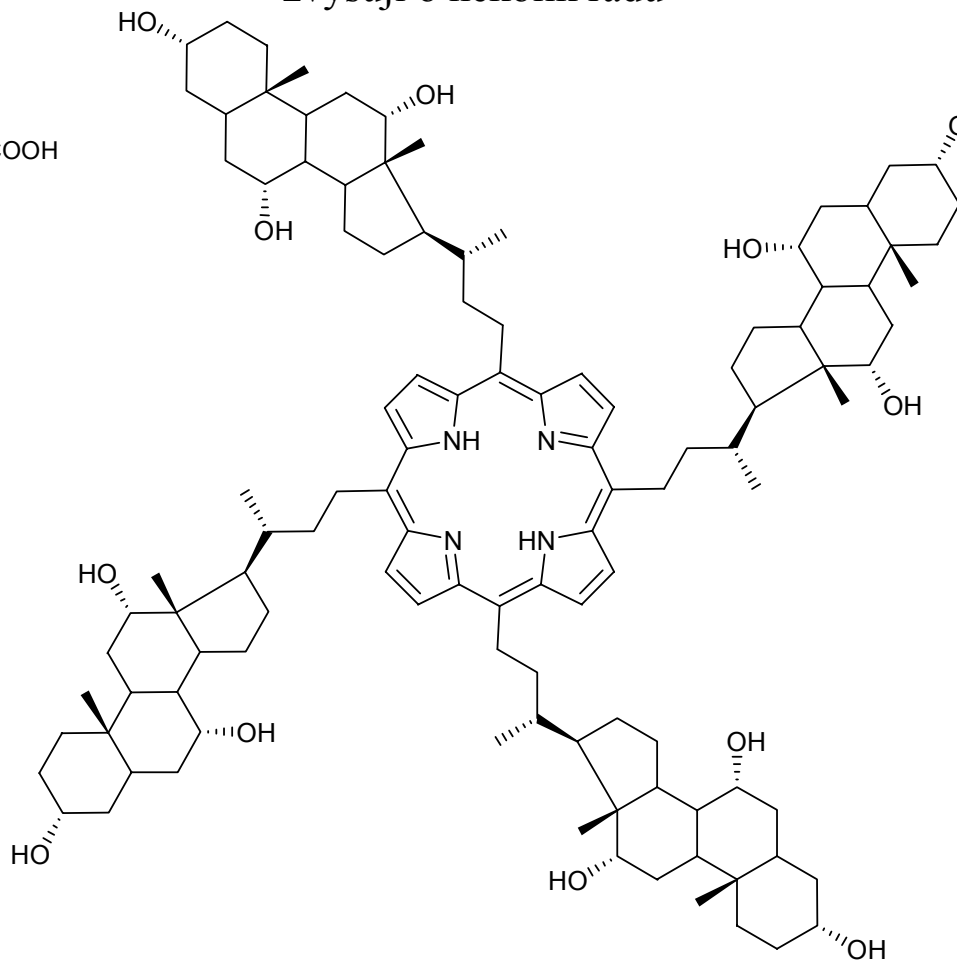
studiu komplexací a vazeb (asociací) achirální molekuly s chromoforem s chirální molekulou založené na indukované chiralitě

studium vytváření nadmolekulárních chirálních struktur se vzrůstající molární chiroptickou vlastností (např. molární otáčivosti, ORD)



achirální molekula
komplexuje chirální
peptid

chirální molekula se skládá do
suprastruktur a maxima ORD se
zvyšují o několik řádů



21b-31



Chromatografické a elektroforetické metody

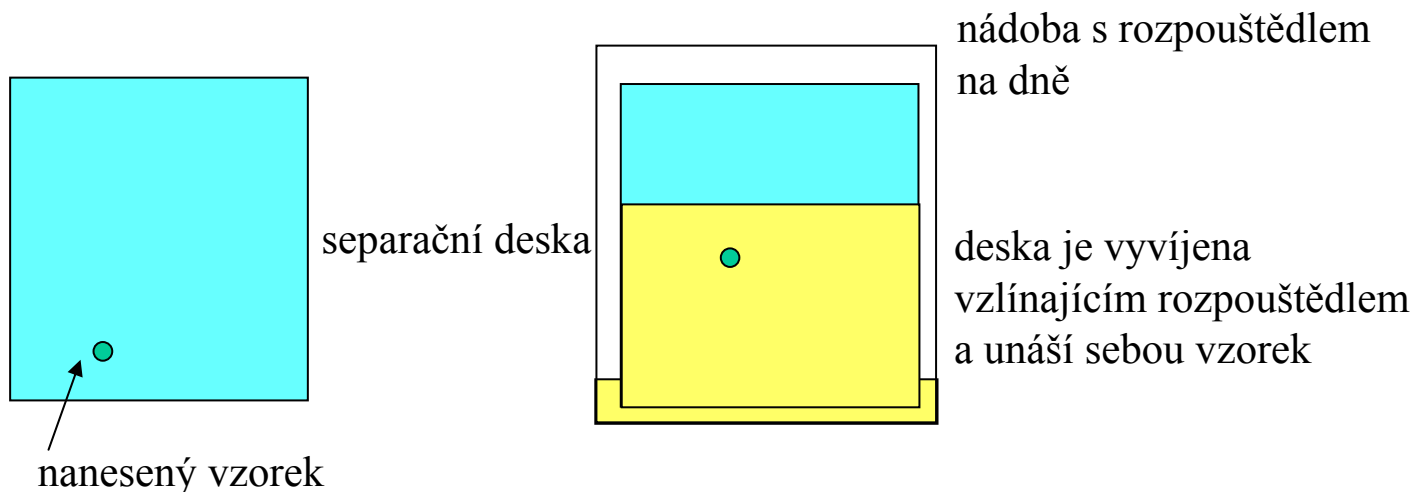
chromatografie χρωματογραφία,

z ΧΡΩΜΑ, BARVA (řec. *chroma*)

psaní barev (rozepisování barev), rozlišení látek dělením a jejich barvou, původní idea přednesená ve Varšavě v roce 1903 ruským biologem a chemikem Michaiilem Semjonovičem Cvětem (Tswet, Tsvet) představila dělení rostlinných barev z listu špenátu na sloupci křídly na zelené, oranžové a žluté substance (pásy), které my známe jako chlorofyl a karoteny .

Dnešní pojetí nejen že nepoužívá pouze křídu, ale jako „barvu“ chápe libovolnou měřitelnou charakteristiku látky. Původně byla „barva“ rozšířena z viditelného spektra na ultrafialovou oblast. Nyní se k detekci používá téměř libovolná analytická metoda.





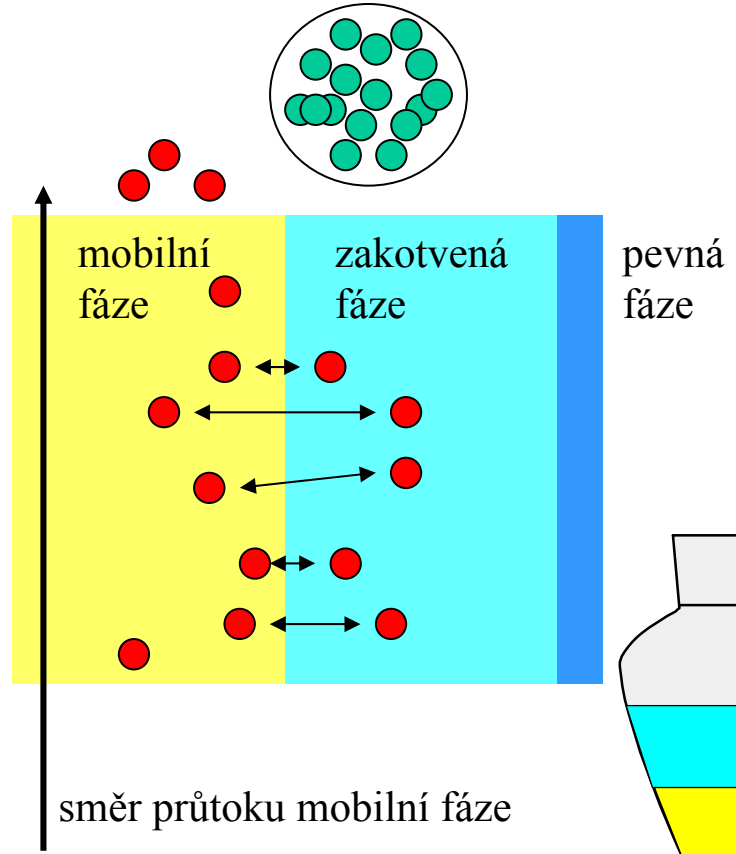
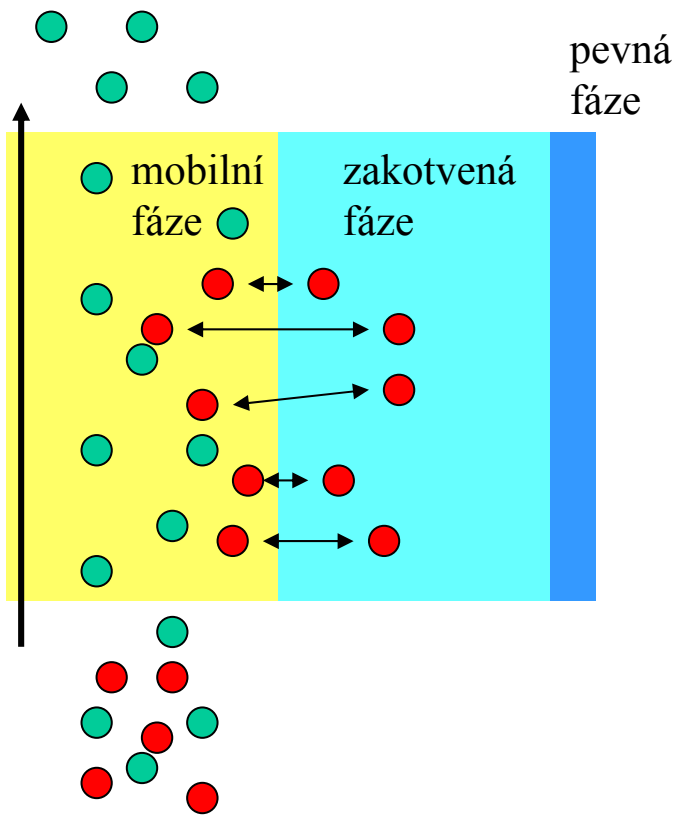
Základem metody je fakt, že pokud je směs látek (rozpuštěná) hnána (gravitací, vzlínáním, čerpáním aj.) prostředím s nímž může interagovat je nejvíce zadržena ta komponenta směsi, která s prostředím nejvíce interaguje.

Zásadně dělíme typ interakce na

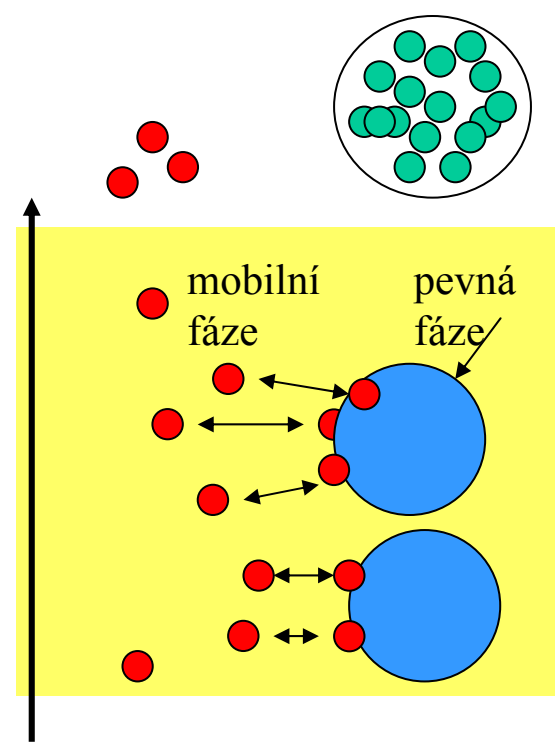
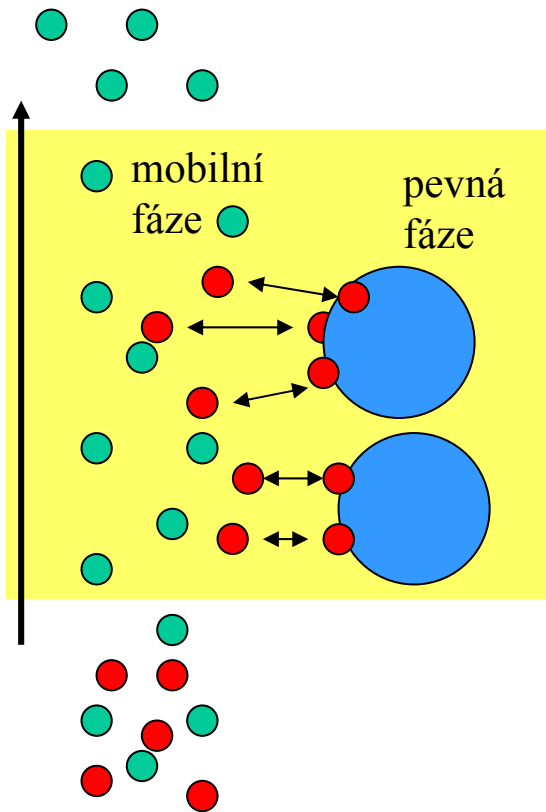
adsorbční – kdy dochází k adsorbci látky na povrchově aktivní částici

rozdělovací – kdy dochází k „rozpuštění“ v kapalině „zakotvené“ na částici; obvykle je tato „zakotvená“ kapalina (fáze) nemísitelná s procházejícím rozpouštědlem, dochází tak ke stálému ustavování rovnováhy (jakoby v dělicí nálevce při roztřepávání) → proto „rozdělovací“

tyto dva „čisté“ principy však v praxi existují obvykle v symbióze

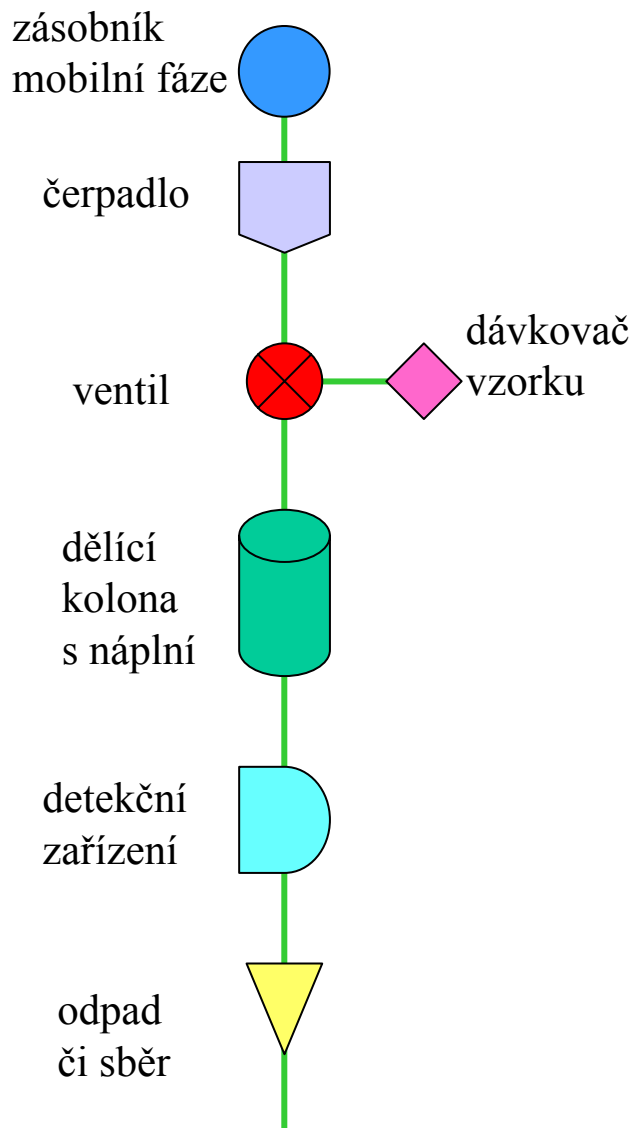


schematické znázornění rozdělovacího principu chromatografie



směr průtoku mobilní fáze

schematické znázornění absorbčního principu chromatografie



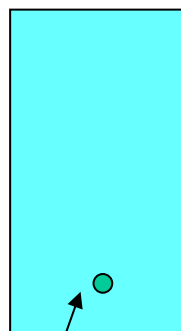
mobilní fáze plynule vstupuje do (obvykle válcové) nádoby s chromatografickou náplní (Cvětova křída) tak dlouho až se ustaví rovnováha všech pochodů

ventilem na kolonu nanese určité množství vzorku, který chceme dělit

vzorek se rozdělí na komponenty o různé schopnosti interakce s náplní a postupně vycházejí

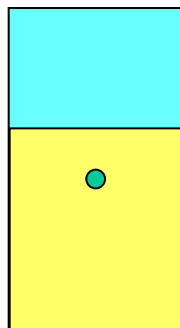
detekční zařízení (u Cvěta oko) deteguje jednotlivé součásti a umožní jejich jímání do různých nádob

odpad a přebytečná mobilní fáze jsou uchovány k recyklaci



separační
deska

nanesený vzorek

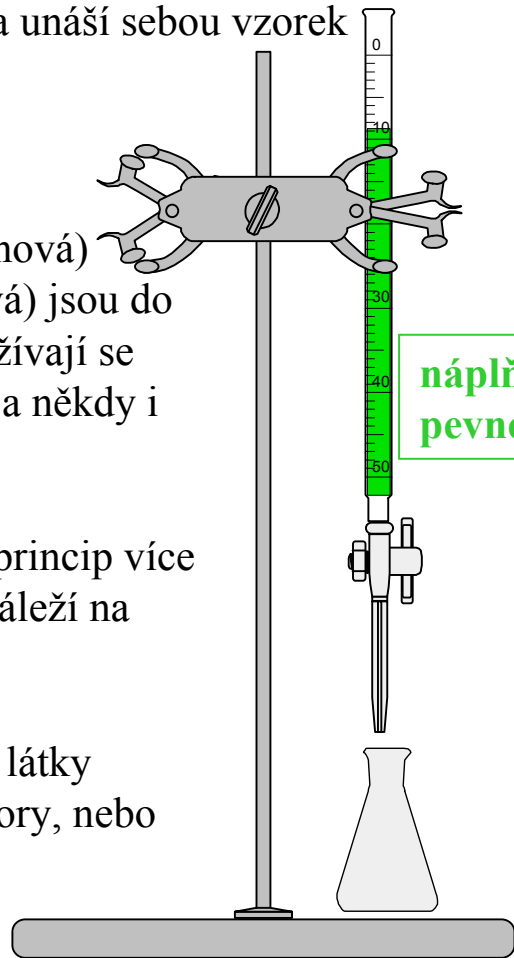


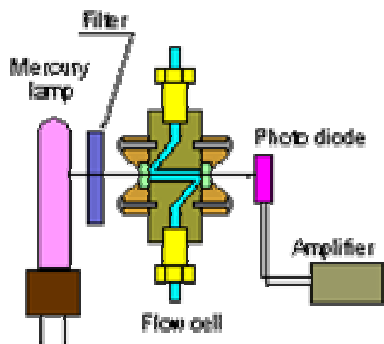
deska je vyvíjena
vzlínajícím rozpouštědlem
a unáší sebou vzorek

tenkovrstevná chromatografie (kapalinová)
a chromatografie kolonová (kapalinová) jsou do
značné míry podobné a příbuzné, používají se
podobné pevné fáze, též rozpouštědla a někdy i
podobné detekční metody

obě jsou metodami, kde se absorpční princip více
nebo méně proplétá s rozdělovacím, záleží na
pevné fázi a rozpouštědle(ch)

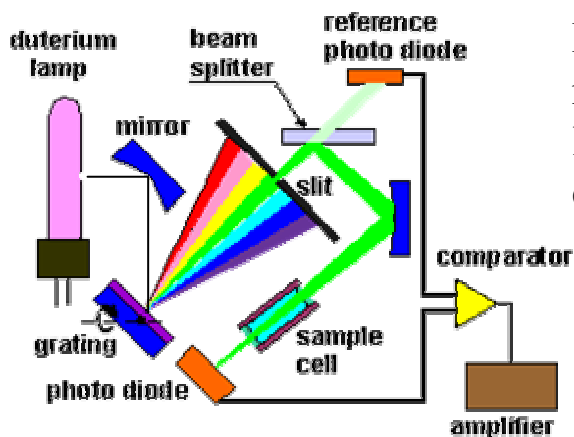
pokud nevidíme skvrnu (pás) barevné látky
zviditelňujeme ji UV světlem, indikátory, nebo
chemickou reakcí





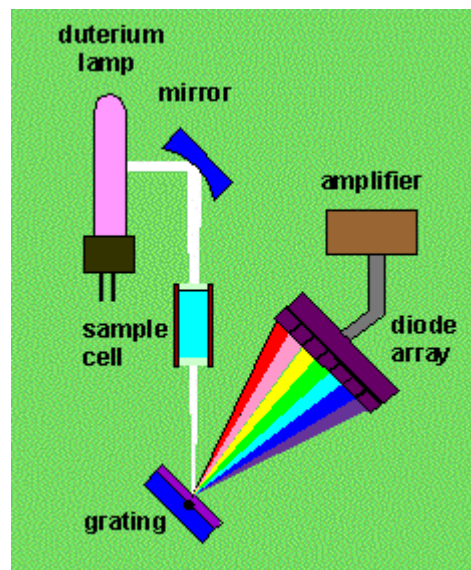
UV-VIS detektory
jsou vlastně upravenými UV-VIS spektrometry s
průtokovou celou o velmi malém obsahu

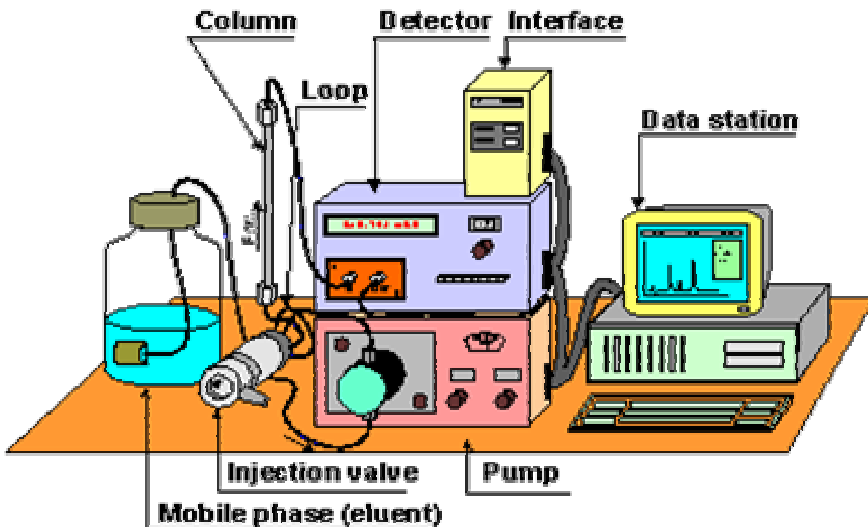
A/ detektor s pevnou vlnovou délkou zajištěnou
filtrem



B/ detektor s proměnnou vlnovou délkou s
monochromátorem
lze jej nastavit na vlnovou délku odpovídající
chromoforu očekávané či analyzované látky

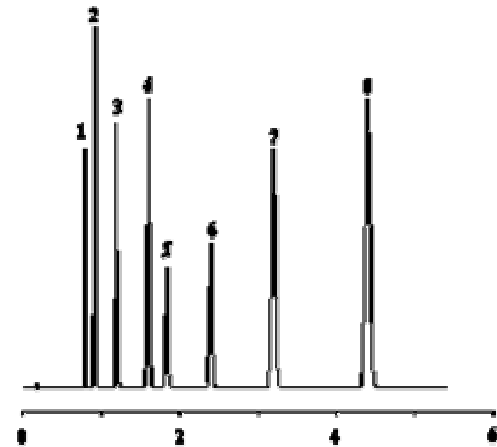
C/ detektor s tzv „diodovým polem“
detegující najednou absorpci vzorku
přes celé proměřované spektrum





chromatografický systém

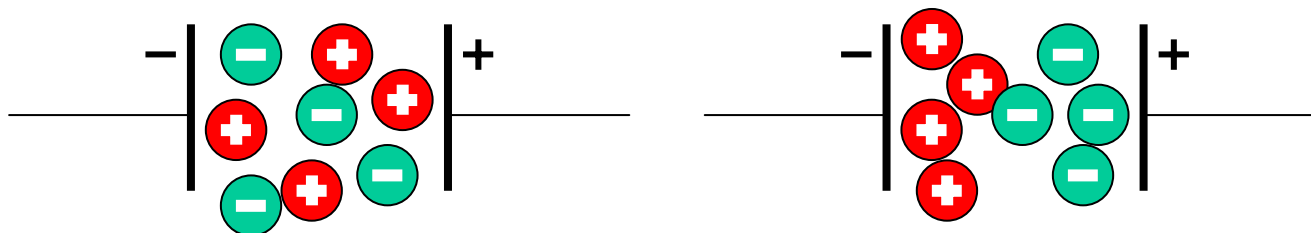
chromatogram
záznam odezvy detekčního zaříze
v časové ose



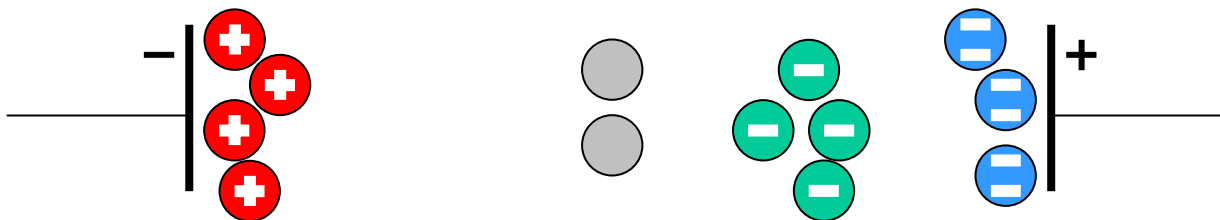
odezva zaznamenaná chromatografem (detektorem) odpovídá intenzitě pohlcení světla u dané vlnové délky roztokem vzorku v mobilní fázi

Elektroforéza

nabité částice v elektrickém poli putují k opačně nabitým elektrodám



v časovém průběhu si lze představit i „rozdělení“ částic podle náboje v médiu



elektroforéza je metoda, která v roztoku dělí takovým způsobem nabité částice (bílkoviny, nukleosidy, sole cukrů aj.)

elektroforézu můžeme provádět v roztoku, ale častěji, aby se dalo pracovat s „rozdělenými“ druhy sloučenin (které se rozdělily podle svého náboje)

jde to například na

- papíře
- gelu
- v tenké kapiláře

hovoříme pak o elektroforéze gelové, papírové, kapilární

v důsledcích získáváme podobná uspořádání jako u HPLC i s možnostmi detekce, vyhodnocení, jímání frakcí a vyhodnocení



Spojované (spřažené) techniky

jde například o spojení dělicí metody (GC, HPLC) a jiné fyzikálně chemické procedury, která pomůže identifikovat analyty

tak může jít o spojení

HPLC - MS

GC - MS

může jít ale o

MS - MS

GC - GC

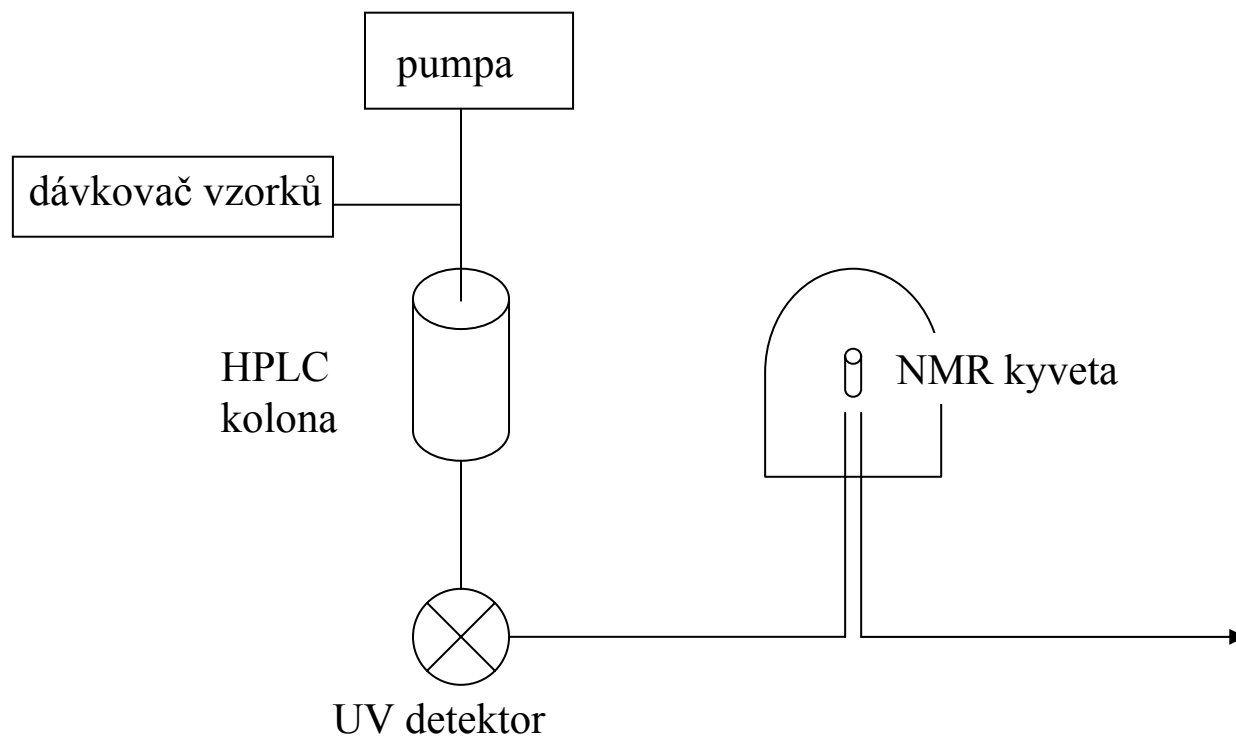
i klasické uspořádání HPLC je vlastně spřaženou technikou

HPLC - UV/VIS

Spojované (spřážené) techniky LC-NMR

Spojení LC s NMR bylo navrženo v r. 1970. Obecně, eluent z HPLC kolony prochází klasickou celou UV detektoru, poté prochází upravenou celou NMR.

Takové přístroje pracují ve třech módech průtokovém (continuous-flow), diskontinuálním (stopped-flow) a frakční (loop collection).



Dělení chirálních sloučenin.

zvláštní kapitolou separačních metod je dělení chirálních sloučenin.

... a to je pro dnešek konec.

