

Obsah

Kap. 1	ZÁKLADNÍ TYPY CHROMATOGRAFIE	15
	<i>O. Mikeš</i>	
1.1	Úvod	15
1.1.1	Význam separačních metod	15
1.1.2	Stručná historie separačních metod	16
1.2	Klasické dělení chromatografických metod podle podstaty separačního procesu	22
1.2.1	Adsorpční chromatografie	24
1.2.2	Rozdělovací chromatografie	24
1.2.3	Iontové výměnná chromatografie (chromatografie na měničích iontů)	25
1.2.4	Gelová chromatografie	26
1.2.5	Afinitní chromatografie	26
1.2.6	Jiné typy chromatografie	28
1.3	Metodická klasifikace chromatografických metod podle pracovní techniky	28
1.3.1	Frontální chromatografie	28
1.3.2	Vytěšňovací chromatografie	29
1.3.3	Eluční chromatografie	30
1.3.4	Jiná metodická klasifikace	32
1.4	Moderní klasifikace chromatografických metod podle fází, mezi nimiž dochází k separaci	33
1.4.1	Kapalinová chromatografie	34
1.4.2	Plynová chromatografie	34
1.5	Jiné způsoby klasifikace chromatografických metod	34
	Literatura	36
Kap. 2	TEORIE CHROMATOGRAFIE	37
	<i>J. Novák</i>	
	Seznam použitých symbolů	37
2.1	Úvod	40
2.2	Obecný popis chromatografického děje	41
2.2.1	Látková bilance chromatografované látky v chromatografickém systému	41
2.2.2	Model ideální lineární chromatografie	45
2.2.3	Retenční rovnice	45
2.3	Racionální popis modelu neideální lineární chromatografie	46
2.3.1	Rozmývání chromatografické zóny	46
2.3.2	Představa teoretického patra	49
2.4	Tok mobilní fáze	49
2.5	Sorpční rovnováha a distribuční konstanta	50
2.6	Chromatografické rozlišení	53
	Literatura	54

Kap. 3	PAPÍROVÁ CHROMATOGRAFIE	55
	<i>Ž. Procházka, M. Hejtmánek, K. Šebesta a V. Tomášek</i>	
3.1	Úvod (<i>Ž. Procházka</i>)	55
3.1.1	Chromatografické papíry	56
3.1.2	Zařízení pro papírovou chromatografii	58
3.1.3	Výběr rozpouštědel	65
3.1.4	Definice R_F , R_M , jejich měření a použití	70
3.2	Metodika práce (<i>Ž. Procházka</i>)	78
3.2.1	Příprava vzorku	78
3.2.2	Nanášení vzorku	80
3.2.3	Manipulace s chromatogramy a jejich vyvíjení	80
3.2.4	Sušení	83
3.2.5	Detekce	84
3.2.6	Eluce skvrn	85
3.2.7	Uchovávání a záznamy	85
3.3	Preparativní papírová chromatografie (<i>Ž. Procházka</i>)	86
3.4	Kvantitativní papírová chromatografie (<i>Ž. Procházka</i>)	86
3.5	Papírová chromatografie organických kyslíkatých látek (<i>Ž. Procházka</i>)	88
3.5.1	Alkoholy	89
3.5.2	Cukry	91
3.5.3	Aldehydy a ketony	95
3.5.4	Kyseliny	96
3.5.5	Fenoly, flavonoidy, kumariny	99
3.5.6	Steroidy a terpeny	101
3.5.7	Jiné kyslíkaté látky	103
3.6	Papírová chromatografie organických dusíkatých látek (<i>Ž. Procházka</i>)	103
3.6.1	Aminokyseliny a peptidy (<i>V. Tomášek</i>)	103
3.6.2	Složky nukleových kyselin (<i>K. Šebesta</i>)	108
3.6.3	Alkaloidy	109
3.6.4	Indoly	112
3.6.5	Aminy	113
3.6.6	Nitrosloučeniny	114
3.7	Papírová chromatografie látek obsahujících jiné heteroatomy (<i>Ž. Procházka</i>)	114
3.7.1	Sírné látky	114
3.7.2	Organické sloučeniny fosforu	116
3.8	Vitamíny (<i>Ž. Procházka</i>)	116
3.9	Antibiotika (<i>Ž. Procházka</i>)	117
3.10	Jiné organické látky (<i>Ž. Procházka</i>)	119
3.11	Papírová chromatografie anorganických látek (<i>M. Hejtmánek</i>)	120
3.11.1	Příklady dělení a detekce kationtů	121
3.11.2	Příklady dělení a detekce aniontů	122
	Literatura	124
Kap. 4	ADSORPČNÍ A ROZDĚLOVACÍ KOLONOVÁ CHROMATOGRAFIE	128
	<i>O. Motl a L. Novotný</i>	
4.1	Úvod	128
4.2	Adsorpční kolonová chromatografie (LSC)	129
4.2.1	Adsorbenty a jejich obecné vlastnosti	129
4.2.1.1	Silikagel	134
4.2.1.2	Kysličník hlinitý	139
4.2.1.3	Křemičitan hořečnatý, Florisil	142
4.2.1.4	Kysličník hořečnatý	142
4.2.1.5	Hydroxylapatit	143

4.2.1.6	Uhlí	143
4.2.1.7	Polyamidy	144
4.2.1.8	Polystyrenové adsorbenty	147
4.2.2	Mobilní fáze	148
4.2.3	Technika klasické chromatografie (LSC)	152
4.2.4	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	156
4.3	Rozdělovací kolonová chromatografie (LLC)	167
4.3.1	Stacionární fáze	167
4.3.2	Mobilní fáze	169
4.3.3	Technika chromatografie kapalina–kapalina (LLC)	171
4.4	Příklady kolonové adsorpce chromatografie organických látek	171
4.4.1	Dělení seskviterpenických látek petroletherového extraktu oddenků Senecio nemorensis, subsp. fuchsii	171
4.4.2	Extrakce a chromatografické dělení látek v inertní atmosféře	172
4.4.3	Argentační chromatografie na iontové výměnné koloně v cyklu Ag ⁺	174
4.4.4	Dělení glykosidů karotenoidů na kysličníku hořečnatém	177
4.4.5	Dělení korinoidů elucí chromatografií na nepolárním adsorbentu Amberlite XAD-2	180
4.4.6	Vysokotlaká chromatografie kapalina–pevná látka na klasických a pe- likulárních sorbentech	180
4.4.7	Preparativní tlaková chromatografie	183
4.4.8	Vysokotlaká chromatografie kapalina–kapalina	185
	Literatura	189
Kap. 5	IONTOVÉ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRAPHIE	192
	<i>O. Mikeš, J. Štamberg, M. Hejtmánek a K. Šebesta</i>	
5.1	Úvod (<i>O. Mikeš</i>)	192
5.1.1	Podstata měničů iontů	192
5.1.2	Rozdělení měničů iontů podle jejich původu a podle chemického složení matrice	192
5.1.3	Rozdělení měničů iontů podle ionogenních skupin	193
5.1.4	Rozdělení měničů iontů podle tvaru a skupenství	196
5.2	Struktura měničů iontů (<i>J. Štamberg</i>)	196
5.2.1	Anorganické ionexy	196
5.2.2	Ionexové pryskyřice	199
5.2.3	Ionexové celulosy	202
5.2.4	Ionexové deriváty polydextranu a aragosy	202
5.2.5	Jiné typy ionexových materiálů	203
5.2.6	Fyzikální struktura zrnitých ionexů	203
5.3	Povaha sorpčních pochodů (<i>J. Štamberg</i>)	205
5.3.1	Výměna iontů	205
5.3.2	Pochody doprovázející výměnu iontů	207
5.3.3	Sorpce obojetných iontů (<i>O. Mikeš</i>)	207
5.4	Podstata iontové výměnné chromatografie (<i>J. Štamberg</i>)	208
5.4.1	Chromatografie nízkomolekulárních látek	208
5.4.2	Chromatografie bílkovin (<i>O. Mikeš</i>)	210
5.5	Základní charakterizace měničů iontů (<i>J. Štamberg</i>)	211
5.5.1	Kapacita	211
5.5.2	Titrační křivky	212
5.5.3	Hustota a botnavost	212
5.5.4	Velikost a tvar zrn	214
5.6	Příprava měničů iontů, jejich regenerace a skladování (<i>O. Mikeš</i>)	214
5.6.1	Výběr vhodného měniče	215
5.6.2	Dekantace a botnáni	229
5.6.3	Možnosti laboratorní frakcionace zrn podle velikosti	229

5.6.4	Cyklování	230
5.6.5	Výběr pufru a pufrování ionexů	231
5.6.6	Regenerace a skladování	232
5.7	Vlastní chromatografie (<i>O. Mikeš</i>)	234
5.7.1	Chromatografické kolony a jejich kapacita	234
5.7.2	Plnění kolon a kontrola ekvilibrace	235
5.7.3	Nanášení vzorku	237
5.7.4	Způsoby eluce a její rychlost	237
5.7.5	Velikost a kontrola složení frakcí	240
5.7.6	Přepočet parametrů při použití různých kolon	241
5.8	Příklady použití měničů iontů k dělení směsí anorganických látek (<i>M. Hejtmánek</i>)	241
5.8.1	Nechromatografická aplikace	241
5.8.2	Chromatografie kationtů	244
5.8.3	Chromatografie aniontů	245
5.8.4	Výměna iontů z roztoků komplexních solí a směsných rozpouštědel	247
5.9	Příklady dělení organických látek (<i>J. Štamberg</i>)	250
5.9.1	Chromatografie na silně disociovaných ionexech	251
5.9.2	Chromatografie na ionexech s modifikovanou strukturou	256
5.9.3	Chromatografie na polymerních sorbentech	260
5.10	Příklady použití měničů iontů v biochemii (<i>O. Mikeš a K. Šebesta</i>)	261
5.10.1	Aminokyseliny	262
5.10.2	Peptidy	268
5.10.3	Bílkoviny	271
5.10.4	Fragmenty mikrobiálních buněčných stěn	277
5.10.5	Antibiotika	277
5.10.6	Vitamíny	280
5.10.7	Báze, nukleosidy, nukleotidy a nukleové kyseliny	282
	Literatura	287
Kap. 6	GELOVÁ CHROMATOGRAFIE	294
	<i>V. Tomášek</i>	
6.1	Úvod	294
6.1.1	Princip gelové chromatografie	294
6.1.2	Definice a základní veličiny	295
6.2	Gely pro chromatografii	298
6.2.1	Požadavky na gely	298
6.2.2	Dextranové gely	299
6.2.3	Polyakrylamidové gely	302
6.2.4	Hydroxyalkylmethakrylátové gely	303
6.2.5	Agarosové gely	306
6.2.6	Jiné gely	308
6.3	Experimentální technika gelové chromatografie	312
6.3.1	Zařízení, kolony, spoje a regulace toku	312
6.3.2	Volba gelu	315
6.3.3	Přípravné práce	316
6.3.4	Velikost kolon, množství vzorku a rychlost toku	319
6.3.5	Aplikace vzorku	320
6.3.6	Vstupné uspořádání gelové chromatografie	321
6.3.7	Regenerace náplně	322
6.3.8	Přechovávání gelů	322
6.3.9	Ochrana proti mikrobiální infekci	323
6.4	Zvýšení efektivní výšky kolon	324
6.4.1	Spojování kolon	324
6.4.2	Recirkulační chromatografie	324

6.4.3	Diskontinuální recirkulační chromatografie	325
6.5	Zpracování experimentálních výsledků	325
6.6	Aplikace gelové chromatografie	327
6.6.1	Odsolování a skupinové dělení	327
6.6.2	Frakcionace směsí	329
6.6.3	Stanovení relativní molekulové hmotnosti	332
	Literatura	334
Kap. 7	AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE	337
	<i>J. Turková</i>	
7.1	Úvod	337
7.1.1	Volba pevného nosiče	339
7.1.2	Volba afinantu a jeho vazba	340
7.1.3	Podmínky pro sorpci a eluci izolovaných látek	343
7.2	Pevné nosiče pro afinitní chromatografii	343
7.2.1	Agarosové nosiče a jejich deriváty	343
7.2.1.1	Přehled derivátů a jejich charakterizace	343
7.2.1.2	Chemický průběh vazby afinantu na nosič	344
7.2.1.3	Stabilita agarosových gelů a zacházení s nimi	345
7.2.2	Předpisy na provedení vazby afinantu na agarosu	346
7.2.2.1	Vazba afinantu na Sepharosu aktivovanou bromkyanem	346
7.2.2.2	Triazinové metody vazby afinantu na agarosu	346
7.2.3	Modifikované deriváty agarosy	347
7.2.3.1	Příprava ω -aminoalkylderivátů agarosy	347
7.2.3.2	Vazba afinantu s volnou karboxylovou skupinou na aminoethylagarosu	348
7.2.4	Polyakrylamidové a hydroxyalkylmethakrylátové gely	349
7.2.4.1	Přehled polyakrylamidových derivátů a jejich charakterizace	349
7.2.4.2	Principy přípravy derivátů akrylamidových gelů a jejich vazby s afinantem	350
7.2.4.3	Stabilita polyakrylamidových gelů a jejich derivátů	353
7.2.4.4	Hydroxyalkylmethakrylátové gely	353
7.2.5	Celulosa a její deriváty	354
7.2.5.1	Chemický průběh vazby afinantů	356
7.2.6	Jiné nosiče	357
7.3	Komerčně vyráběné afinanty vázané na pevný nosič	359
7.4	Příklady aplikací	361
7.4.1	Afinitní chromatografie na derivátech agarosy	361
7.4.1.1	Izolace kuřecího ovoinhibitoru na Sepharose s vázaným chymotrypsinem	361
7.4.1.2	Izolace chymotrypsinu afinitní chromatografií na Sepharose s kovalentně vázaným methylesterem ε -aminokaproyl-D-tryptofanu	362
7.4.1.3	Další příklady použití agarosy a jejích derivátů	363
7.4.2	Afinitní chromatografie buněk na Bio-Gelu P6 s vázaným hapténem	363
7.4.3	Afinitní chromatografie na derivátech celulosy	365
7.4.3.1	Čištění protilátek pomocí imunoabsorbentů připravených za použití bromacetylcelulosy	365
7.4.3.2	Přehled použití celulosových derivátů	366
	Literatura	367
Kap. 8	AUTOMATIZACE A MECHANIZACE KOLONOVÝCH OPERACÍ V KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFII	370
	<i>B. Meloun</i>	
8.1	Úvod	370
8.2	Zásobníky mobilní fáze a hydraulické spoje	371
8.3	Ventily a čerpadla	372
8.3.1	Ventily	372

8.3.2	Čerpadla	374
8.4	Gradientová a programovací zařízení	377
8.4.1	Gradientová zařízení	377
8.4.2	Komplexní programování	384
8.5	Dávkovače vzorků a chromatografické kolony	385
8.5.1	Dávkovače vzorků	385
8.5.2	Typy moderních chromatografických kolon	388
8.5.3	Plnění chromatografických kolon	389
8.6	Detektory	390
8.7	Zaznamenávání a výpočet získaných hodnot	395
8.8	Průtokoměry a jmače frakcí	399
8.9	Komplikovanější soustavy a příklady komplexní automatizace	401
8.10	Seznam a adresy citovaných firem	403
	Literatura	404
Kap. 9	CHROMATOGRRAFIE NA TENKÉ VRSTVĚ	406
	<i>O. Moil a L. Novotný</i>	
9.1	Úvod	406
9.2	Zařízení pro tenkovrstvou chromatografii	407
9.2.1	Podložky, nanášecí zařízení, příprava vrstev	407
9.2.2	Komory pro vyvíjení, stříkací box	412
9.3	Pevné fáze pro tenkovrstvou chromatografii	415
9.3.1	Silikagel	416
9.3.2	Kysličník hlinitý	419
9.3.3	Křemičitan hořečnatý	421
9.3.4	Polyamidy	421
9.3.5	Celulosa	422
9.3.6	Měníče iontů	423
9.3.7	Materiály pro gelovou chromatografii	425
9.3.8	Ostatní sorbenty	426
9.4	Rozpouštědla užívaná při tenkovrstvé chromatografii	426
9.5	Provádění tenkovrstvé chromatografie	428
9.5.1	Nanášení vzorků	428
9.5.2	Volba mobilní fáze a způsoby vyvíjení	429
9.5.3	Detekce	432
9.6	Kvantitativní vyhodnocování	434
9.7	Preparativní tenkovrstvá chromatografie	434
9.7.1	Příprava vrstev	436
9.7.2	Nanášení vzorku	436
9.7.3	Vyvíjení chromatogramů	436
9.7.4	Detekce	437
9.7.5	Izolace látek z vrstvy	438
9.7.6	Přednosti preparativní TLC	438
9.7.7	Suchá sloupcová chromatografie	438
9.7.8	Úprava podmínek pro sloupcovou chromatografii	439
9.8	Příklady použití chromatografie na tenkých vrstvách	440
9.8.1	Dělení olefinů na silikagelu impregnovaném solemi Ag ⁺	440
9.8.2	Dělení a kvantitativní analýza triglyceridů palmového oleje	440
9.8.3	Jednorozměrné rozdělení šestnácti aminokyselin na iontové výměnné fólii	442
9.8.4	Stanovení relativní molekulové hmotnosti pomocí gelové chromatografie	443
9.8.5	Dělení tetracyklinových antibiotik	445
9.8.6	Dělení gestagenních steroidů	445
9.8.7	Dělení anorganických aniontů na kysličníku hlinitém	446

9.8.8	Nedestrukční detekce isoprenoidních chinonů tenkovrstvou chromatografií na obrácených fázích	447
9.8.9	Dělení monosacharidů a oligosacharidů na tenkých vrstvách celulosy	447
9.8.10	Dělení penicilinů velmi blízké struktury rozdělovací chromatografií na tenké vrstvě	448
9.8.11	Kvantitativní mikroanalýza tokoferolů	449
9.8.12	Dělení vincleuoblastinu, leucocristinu, leurosinu a leurosidinu chromatografií na tenké vrstvě	449
9.9	Seznam nejběžnějších detekčních činidel pro papírovou chromatografií a chromatografií v tenké vrstvě	450
9.10	Seznam dodavatelů chromatografických potřeb	457
	Literatura	458
Kap. 10	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE	461
	<i>R. Komers, M. Krejčí</i>	
	Seznam symbolů	461
10.1	Úvod	463
10.1.1	Objevení plynové chromatografie	463
10.1.2	Základy teorie plynové chromatografie	463
10.2	Aparatura	472
10.2.1	Nosný plyn	474
10.2.2	Dávkování	475
10.2.3	Chromatografická kolona	476
10.2.4	Termostat	477
10.2.5	Detektory	477
10.2.6	Chromatografický záznam	485
10.3	Přípravné práce	485
10.3.1	Stacionární fáze	485
10.3.2	Nosiče stacionární fáze	491
10.3.3	Příprava kolony	494
10.3.4	Smáčení kapilárních kolon	494
10.3.5	Úprava vzorku	497
10.4	Kvalitativní analýza	498
10.4.1	Identifikace složek z retenčních charakteristik	498
10.4.2	Relativní retence a retenční indexy	503
10.4.3	Selektivní detektory	506
10.4.4	Přímé spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií a jinými spektrálními metodami	512
10.5	Kvantitativní analýza	514
10.5.1	Možné zdroje chyb	514
10.5.2	Vyhodnocování chromatografických křivek	515
10.5.3	Vyhodnocování neúplně rozdělených píků	516
10.5.4	Pracovní techniky kvantitativní analýzy	517
10.6	Programovaná teplota	520
10.6.1	Důvody použití	520
10.6.2	Technika a použití	521
10.7	Jiné způsoby použití plynové chromatografie	522
10.7.1	Měření sorpčních izoterm	522
10.7.2	Měření sorpčního tepla	523
10.7.3	Měření povrchu adsorbentů	524
10.7.4	Pyrolýzní plynová chromatografie	526
10.7.5	Stopová analýza plynovou chromatografií	529
10.8	Příklady použití	533
10.8.1	Analýza plynů a některých látek významných v životním prostředí	533
10.8.2	Analýza organických a biochemicky významných látek	537
	Literatura	545

Kap. 11	ROZTŘEPÁVÁNÍ	547
	<i>Ž. Procházka</i>	
11.1	Úvod	547
11.1.1	Extrakce z kapaliny do kapaliny	547
11.1.2	Základy roztřepávání	548
11.1.3	Rozdělovací konstanta	549
11.2	Protiproudné diskontinuální roztřepávání (craigování, Craigova metoda)	551
11.2.1	Základní (Craigův) postup	551
11.2.2	Parametry roztřepávání	551
11.2.3	Aparatury	555
11.3	Varianty roztřepávacího postupu	558
11.3.1	Kruhový proces	558
11.3.2	Metoda jednostranného odběru	559
11.3.3	Metoda úplného odběru	559
11.3.4	Metoda oboustranného odběru	560
11.3.5	O'Keefova metoda	562
11.3.6	Metoda Watanabova–Morikawova	564
11.4	Faktory ovlivňující roztřepávání	564
11.5	Analytické použití roztřepávání	566
11.6	Preparativní využití	567
11.7	Kontinuální metody	567
11.8	Příklady roztřepávání	567
11.8.1	Obohacení složité reakční směsi jednou komponentou v aparatuře o 20 členech	567
11.8.2	Izolace čistého [2-O-methyltyrosin]oxytocinu (Methyloxytocinu SPO-FA) pomocí plně automatického přístroje na roztřepávání	569
	Literatura	571
Kap. 12	ELEKTROMIGRAČNÍ METODY	572
	<i>Z. Prusík</i>	
12.1	Úvod	572
12.2	Elektroforéza	575
12.2.1	Teorie pohybu iontů při zónové elektroforéze a elektroforéze s pohyblivým rozhraním	575
12.2.2	Kontinuální beznosičová průtoková zónová elektroforéza	577
12.2.3	Zónová elektroforéza na papíru	579
12.2.4	Zónová elektroforéza na membráně z acetátu celulosy	584
12.2.5	Elektroforéza na tenké vrstvě	587
12.2.6	Elektroforéza v gelech	588
12.2.7	Elektroforéza polyakrylamidového gelu s gradientem hustoty	590
12.2.8	Diskontinuální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu	591
12.3	Izotachoforéza	599
12.3.1	Teorie pohybu iontu při izotachoforéze	599
12.3.2	Kapilární izotachoforéza	602
12.3.3	Preparativní izotachoforéza	606
12.4	Izoelektrická frakcionace (fokusace)	607
12.4.1	Teorie izoelektrické frakcionace	607
12.4.2	Izoelektrická fokusace v kapalném prostředí	609
12.4.3	Izoelektrická fokusace v polyakrylamidovém gelu	611
12.5	Elektrické zdroje	612
12.6	Zásady bezpečné obsluhy elektroforetických zařízení	613
12.7	Příklady použití elektroforézy	616
12.7.1	Zónová elektroforéza anorganických iontů v ligandových puffech	616

12.7.2	Elektroforéza aminokyselin a peptidů	619
12.7.3	Elektroforéza bílkovin	626
12.7.4	Elektroforéza nukleových kyselin a jejich fragmentů	636
	Dvojrozměrná separace nukleotidů	637
	Literatura	639

Kap. 13	PŘEHLED LITERATURY	642
	<i>O. Mikeš</i>	

13.1	Úvod	642
13.2	Časopisy a jiná periodika	643
13.3	Monografie	643
	A. Chromatografie	643
	B. Papírová a rozdělovací chromatografie	646
	C. Kapalinová chromatografie	647
	D. Adsorpční chromatografie	648
	E. Ionově výměnná chromatografie	648
	F. Gelová chromatografie	650
	G. Afinitní chromatografie	650
	H. Chromatografie na tenké vrstvě	651
	I. Plynová chromatografie	652
	J. Extrakční chromatografie a roztřepávání	655
	K. Elektroforéza	655