

Chromatografické metody

Představení kapitoly

Chromatografie je jednou z nejvýznamnějších separačních metod moderní analytické chemie a biochemie. Umožňuje účinné oddělení, identifikaci a kvantifikaci složek složitých směsí na základě rozdílné interakce složek s mobilní a stacionární fází. V klinické biochemii a laboratorní diagnostice má chromatografie zásadní význam – používá se ke stanovení aminokyselin, vitaminů, hormonů, léčiv, metabolitů a také ke sledování markerů onemocnění.

Obsah

1	Úvod do chromatografických metod	2
1.1	Úvod: Proč vlastně chromatografie?	2
1.1.1	Kde se můžeme s chromatografií setkat?	2
1.2	Jak chromatografie funguje.....	2
1.2.1	Chromatografie – separace na normální a reverzní fázi.....	4
2	Příklady rozdělení separačních technik podle interakce analytu s mobilní a stacionární fází	4
2.1	Adsorpční chromatografie.....	4
2.2	Rozdělovací chromatografie	5
2.3	Ionexová chromatografie	5
2.4	Bioafinitní chromatografie	5
2.5	Gelová permeační chromatografie (GPC, SEC – Size Exclusion Chromatography)	6
3	Vybrané chromatografické techniky (GC a HPLC)	6
3.1	Plynová chromatografie (GC)	6
3.2	Kapalinová chromatografie (HPLC).....	7
4	Detekce v chromatografii	7
4.1	UV/VIS detektor – princip a význam	7
4.2	Hmotnostní detektor – princip a význam	8
4.3	Chromatogram	8
5	Využití chromatografických separačních technik v medicíně	10
5.1	Terapeutické monitorování léčiv	10
5.2	Toxikologický screening.....	10
5.3	Chromatografie v každodenním životě	10
5.4	Plynová chromatografie v klinické praxi.....	10

1 Úvod do chromatografických metod

1.1 Úvod: Proč vlastně chromatografie?

Představte si, že dostanete do ruky sklenici ovocné šťávy a někdo se vás zeptá:

„Co všechno v ní je?“

Na první pohled vidíte jen oranžovou tekutinu. Ale víte, že ve skutečnosti obsahuje desítky různých látek – cukry, kyseliny, vitamíny, barviva, aromatické sloučeniny. A kdyby to byla krevní plazma, počet složek by narostl na stovky, možná tisíce. Jak se v tak složité směsi vyznat?

Právě tady vstupuje na scénu **chromatografie**. Jejím smyslem je udělat z jedné složité, komplexní směsi **přehledný záznam jednotlivých složek**. Díky tomu se dozvíme, **co všechno tam je a kolik toho je**.

1.1.1 Kde se můžeme s chromatografií setkat?

Chromatografické metody se využívají v mnoha oblastech:

- v **klinických laboratořích** pomáhají odhalit přítomnost léčiv, metabolitů nebo toxických látek v krvi,
- ve **farmacii** slouží ke kontrole čistoty léků,
- v **potravinářství** a při sledování **životního prostředí** ukazují, zda se v potravinách nebo vodě neobjevují nežádoucí látky,
- ve **vědě** umožňují vědcům lépe porozumět složitým biologickým a chemickým procesům.

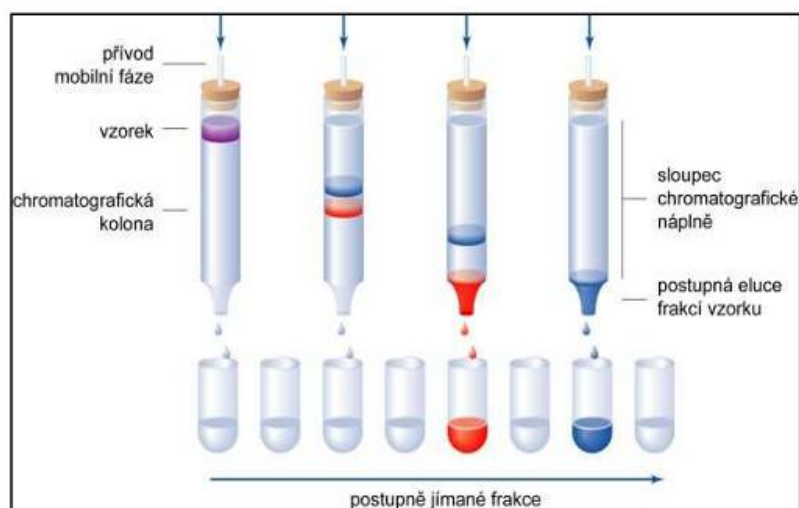
Ať už jde o ovocný džus, krevní vzorek nebo léčivo, princip je vždy stejný: oddělit složky, aby je bylo možné jednotlivě **identifikovat a kvantifikovat**.

1.2 Jak chromatografie funguje

Základní myšlenka je přitom překvapivě jednoduchá. Vzorek rozdělíme mezi dvě prostředí – tzv. **mobilní fázi** a **stacionární fázi**.

- **Mobilní fáze** proudí a unáší s sebou vzorek.
- **Stacionární fáze** zůstává na místě a některé látky se k ní více či méně „přichytávají“.

Každá látka v sobě nese jistou „povahu“ – jedny se stacionární fází interagují silněji, jiné slaběji, tedy každá složka směsi interaguje se stacionární a mobilní fází odlišně a pohybují se systémem různou rychlostí. Ty, které se přichytí pevně, vycházejí ze systému později; ty, které projdou rychle, se objeví dříve. Takto se z jediné směsi stává **série oddělených složek**, každá vycházející v jiném čase. Tento okamžik nazýváme **retenční čas**.



(Zdroj: https://is.muni.cz/el/med/jaro2018/BLIT0222p/um/Chromatografie_ucebni_text.pdf)

Obecně platí, že chromatografický systém vždy obsahuje **mobilitní fázi** a **stacionární fázi**.

- **Mobilní fáze** je kapalina (u plynové chromatografie – plyn), která protéká kolonou a unáší s sebou vzorek. Může být tvořena čistou vodou nebo pufrem, organickými rozpouštědly (methanol, acetonitril) nebo jejich směsí v různém poměru. Správnou volbou složení mobilní fáze lze cíleně ovlivňovat retenci a separaci jednotlivých látek.
- **Stacionární fáze** je pevný nosič (nejčastěji částice silikagelu), jehož povrch může být ponechán v původní polární podobě, nebo chemicky modifikován tak, aby nesl nepolární či jinak specifické funkční skupiny (např. C18 řetězce, fenyl, fluorované skupiny). Právě typ stacionární fáze určuje, jakým interakcím budou analyty v koloně podléhat.



(Zdroj: <https://www.chromservis.eu/en/ymc-pack-pro-c18-s-5-m-12nm-analytical-hplc-column-250-x-4-6mm-312947>)

Jaké jevy při separaci probíhají?

Když se směs pohybuje chromatografickým systémem, jednotlivé molekuly se „rozhodují“, zda zůstanou spíše v **mobilitní fázi**, nebo se na chvíli „přichytí“ ve **stacionární fázi**. Tento neustálý proces opakovaného vázání a uvolňování je základem chromatografického dělení.

O výsledku rozhodují hlavně **fyzikálně-chemické interakce** mezi analytem a stacionární fází:

- **hydrofobní/hydrofilní interakce** – látky rozpustné ve vodě (hydrofilní) budou tíhnout spíše k polárním fázím, hydrofobní zase k nepolárním,
- **vodíkové můstky** – určité funkční skupiny mohou vytvářet vazby se stacionární fází, což zvyšuje dobu zadržení,
- **iontové interakce** – nabitě molekuly se mohou poutat k opačně nabitým místům stacionární fáze,

Co rozhoduje o rychlosti průchodu?

Látka, která má **větší afinitu ke stacionární fázi**, bude v koloně zadržena déle → vyjde později. Naopak látka, která je **více „spokojená“ v mobilní fázi**, se téměř nezastaví a projde kolonou rychle → vyjde dříve.

Je to tedy neustálý „souboj“ mezi dvěma prostředími:

- mobilní fáze láká molekuly k pohybu vpřed,
- stacionární fáze je zadržuje podle síly vzájemných interakcí.

Právě rozdíly v těchto interakcích jsou klíčem k separaci.

1.2.1 Chromatografie – separace na normální a reverzní fázi

Kapalinovou chromatografii lze dělit dle mnoha kritérií. Podle **fyzikálně-chemické povahy separace** se nejčastěji používá rozdělení na **separaci na normální fázi (NP – normal phase)** a **reverzní fázi (RP – reverse phase)**.

V počátcích chromatografie se využívalo zejména **NP separace**, kde byla stacionární fáze polární (většinou silikagel) a mobilní fáze tvořená nepolárními rozpouštědly nebo jejich směsí, jako je hexan, dichlormethan, chloroform či ethylacetát. V dnešní době však převládá využití kolon s **reverzní fází (RP)**. Tyto kolony využívají **nepolární stacionární fáze** na bázi silikagelu, jehož povrch je upraven modifikátorem – nejčastěji oktadecyl (C18), fenylhexyl, pentafluorofenyl nebo oktyl. Jako mobilní fáze se ve většině případů používá směs polárních rozpouštědel acetonitrilu nebo methanolu s vodou či pufrů.

2 Příklady rozdělení separačních technik podle interakce analytu s mobilní a stacionární fází

2.1 Adsorpční chromatografie

Tato metoda využívá toho, že některé látky mají tendenci se **více přichytit na povrch sorbentu**, který tvoří stacionární fázi. Tyto látky se pak „zdrží“ déle, protože se musí opakovaně uvolňovat a znovu vázat, zatímco jiné látky projdou rychleji.

- **Obrazně řečeno:** je to podobné, jako když jdete po cestě – kdo se často zastavuje a přilne k zajímavým detailům okolo, dorazí později než ten, kdo jde rovnou.
- **Využití:** tenkovrstvá chromatografie (TLC), kde se například kontroluje čistota léčiv.

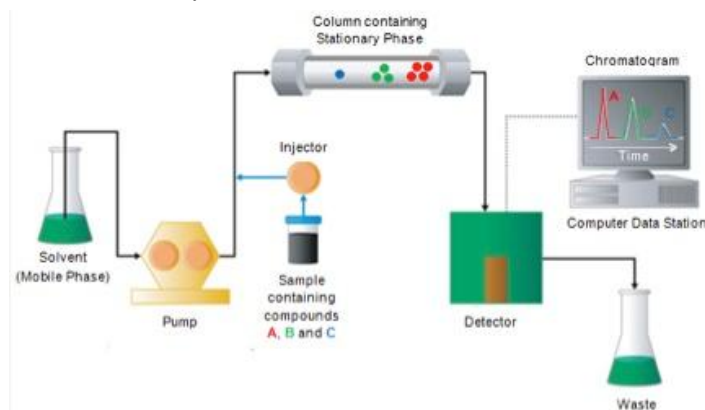


(Zdroj: <https://chemistryhall.com/thin-layer-chromatography/>)

2.2 Rozdělovací chromatografie

Základem je **rozdělení látek mezi dvě kapaliny**, které se nemísí. Jedna je mobilní fáze (protéká kolonou), druhá je zakotvená jako stacionární fáze. Jednotlivé látky se pak dělí podle toho, **s kterou fází více interagují**.

- **Pokud se látka lépe rozpouští v mobilní fázi**, projde kolonou rychleji.
- **Pokud se lépe rozpouští ve stacionární fázi**, zdrží se déle.
- **Příklad z praxe:** kapalinová chromatografie (HPLC) používaná v klinické chemii pro stanovení léčiv, hormonů nebo aminokyselin.



(Zdroj: https://theory.labster.com/niche_hplc/)

2.3 Ionexová chromatografie

Tady hraje roli **elektrický náboj molekul**. Stacionární fáze nese na svém povrchu náboj (kladný nebo záporný). Pokud do ní vstoupí ionty opačného náboje, jsou elektrostaticky přitahovány a dočasně zadrženy. Teprve změnou podmínek (např. složení elučního roztoku nebo pH) je můžeme z kolony „vytěsnit“.

- **Představa:** funguje to podobně jako magnet – stacionární fáze přitahuje jen částice opačné polarity, částice se stejným nábojem jsou odpuzovány a bez náboje projdou bez povšimnutí.
- **Využití v medicíně:** analýza elektrolytů, separace proteinů podle náboje, někdy i při purifikaci biomolekul pro výzkum.

2.4 Bioafinitní chromatografie

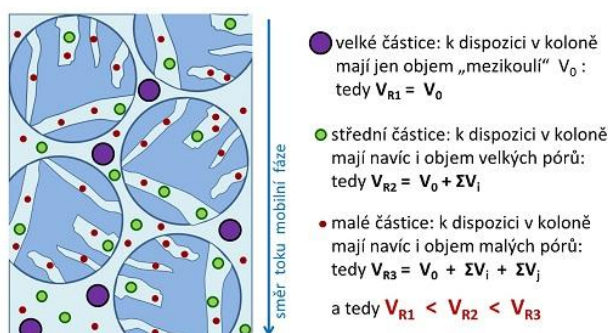
Tento typ chromatografie je unikátní tím, že využívá **specifické biologické interakce**, tedy přirozenou schopnost některých molekul se k sobě vázat. Na stacionární fázi je navázána „návnada“, která umí rozpoznat jen určitou cílovou molekulu ze vzorku – například protilátku rozpoznávající konkrétní antigen, enzym svůj substrát nebo receptor svůj hormon. Díky tomu se cílová molekula zachytí, zatímco ostatní látky odečou.

- **Představa:** je to jako klíč a zámek – pasuje jen správná kombinace.
- **Využití v medicíně:** imunoafinitní chromatografie pro izolaci specifických proteinů, protilátek nebo biomarkerů, těhotenské testy, testy na okultní krvácení, aj (viz kapitola 5.3)

2.5 Gelová permeační chromatografie (GPC, SEC – Size Exclusion Chromatography)

Na rozdíl od předchozích metod zde nerozhoduje chemická povaha látky, ale její **velikost (molekulová hmotnost)**. Stacionární fází tvoří speciální porézní gel:

- **Menší molekuly** se dostanou do pórů gelu a musí jimi „cestovat“, takže jsou zadrženy déle.
- **Velké molekuly** se do pórů nevejdou a projdou kolonou rychleji.
- **Příklad:** separace proteinů, polysacharidů nebo stanovení velikosti a molekulové hmotnosti biologických makromolekul.



3 Vybrané chromatografické techniky

V praxi se nejčastěji používají dvě hlavní varianty: **plynová chromatografie (GC – Gas Chromatography)** a **kapalinová chromatografie (LC – Liquid Chromatography)**. Obě metody pracují na stejném principu – směs látek je přenášena mobilní fází kolonou se stacionární fází a jednotlivé složky se oddělují podle rozdílných interakcí s těmito fázemi. Liší se však typem mobilní fáze a tím, pro jaké látky jsou vhodné.

3.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie využívá jako mobilní fází **inertní plyn** (helium, dusík nebo vodík). Analyzovaná směs se nejprve v injektoru odpaří a poté je proudem plynu unášena kolonou, jejíž stěny jsou potažené tenkou vrstvou kapalné stacionární fáze. Každá složka vzorku se chová jinak – těkavější molekuly kolonou projdou rychle, méně těkavé nebo silněji interagující se stacionární fází se zdrží déle. Díky tomu vzniká chromatogram, kde má každá látka svůj charakteristický **retenční čas**.

GC se uplatňuje hlavně pro **těkavé a teplotně stabilní látky**. Patří sem těkavé organické sloučeniny, rozpouštědla, toxiny, ale i některá léčiva. Pokud látka těkavá není, je často nutné ji předem chemicky upravit (derivatizovat), aby byla pro GC vhodná.

Výhodou GC je **vysoké rozlišení a rychlost separace**. Když se navíc spojí s hmotnostním spektrometrem (GC-MS), získáváme nástroj s mimořádnou selektivitou a citlivostí. GC-MS nachází své uplatnění například v **toxikologii (např. stanovení ethanolu v krvi)**, **forenzní analýze a dopingových kontrolách**, protože umožňuje spolehlivě identifikovat i stopová množství látek v biologických vzorcích.

3.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie používá jako mobilní fázi **kapalinu**, která je pumpována přes kolonu pod vysokým tlakem. Na rozdíl od GC se zde analyty neodpařují, a proto je metoda vhodná pro **netěkavé nebo teplotně citlivé molekuly**. Typicky se jedná o aminokyseliny, peptidy, vitaminy, hormony či metabolity léčiv.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) je široce využívaným typem kapalinové chromatografie, jenž nachází své uplatnění od **klinické biochemie**, kde pomáhá analyzovat biologické vzorky, až po **farmaceutickou kontrolu kvality**, kde ověřuje čistotu a složení léčiv. Její univerzálnost spočívá i v tom, že lze volit různé typy stacionárních fází (reverzní fáze, ionexová, gelová permeační), čímž je možné pokrýt velkou škálu analytů.

4 Detekce v chromatografii

Po rozdělení složitěho vzorku na jednotlivé složky opouštějí tyto složky v různých časech chromatografickou kolonu. Tento fakt by nám sám o sobě mnoho nepomohl – potřebujeme zjistit, **která složka kolonu opouští a v jakém čase a v jakém množství**. K tomu slouží **detektor**, zapojený za kolonou do toku mobilní fáze. V současné době se v kapalinové chromatografii používá celá řada detektorů: UV/VIS, fluorescenční, elektrochemické, refraktometrické, ELS (Evaporative Light Scattering), vodivostní a z nichž asi nejdůležitější – **hmotnostní detektor (MS)**.

V následujících kapitolách si blíže specifikujeme dva způsoby detekce, a to pomocí UV/VIS detektoru a hmotnostního spektrometru.

4.1 UV/VIS detektor – princip a význam

UV/VIS spektrofotometrie patří historicky k nejčastěji používaným detektorům v chromatografii. Je oblíbená díky své jednoduchosti, spolehlivosti a širokému využití. Princip je založen na měření **absorbance světla v ultrafialové a viditelné oblasti spektra** (obvykle 200–700 nm). Každá látka, která má ve své struktuře tzv. chromofor (například aromatický kruh nebo dvojnou vazbu), dokáže toto světlo pohlcovat, a tím je možné ji detekovat.

V chromatografickém systému prochází eluát z kolony detektorem, kde je kontinuálně ozařován světlem určité vlnové délky. Pokud analyzovaná látka záření absorbuje, sníží se intenzita světla dopadajícího na detektor. Tento pokles je zaznamenán a projeví se jako **chromatografický pík**, jehož výška odpovídá koncentraci látky. Vztah mezi absorbancí a koncentrací popisuje Lambert-Beerův zákon, který umožňuje kvantitativní vyhodnocení vzorku.

Velkou předností UV/VIS detektoru je jeho **univerzálnost** – lze s ním měřit velké množství organických sloučenin, metoda je rychlá a nevyžaduje složité přípravy. Na druhou stranu má tato technika i své limity. **Selektivita je relativně nízká**, protože pokud ve vzorku absorbují při stejné vlnové délce i jiné látky, jejich signály se mohou překrývat. Zároveň platí, že metoda je použitelná pouze pro molekuly, které skutečně obsahují chromofor – látky bez této struktury zůstávají „neviditelné“.

V praxi se UV/VIS detektory uplatňují zejména při **stanovení léčiv s aromatickými strukturami**, pro **sledování čistoty farmaceutických preparátů** nebo při **rutinní kvantifikaci látek pomocí HPLC**, například u vitaminů, barviv či některých metabolitů.

4.2 Hmotnostní detektor – princip a význam

Hmotnostní spektrometrie je v současnosti jedním z nejvýznamnějších detekčních systémů používaných v kombinaci se separačními metodami, zejména chromatografií. Její síla spočívá nejen ve vysoké **citlivosti**, ale především ve výjimečné **selektivitě**, tedy schopnosti spolehlivě odlišit hledaný analyt od ostatních složek složité směsi.

Na rozdíl od ostatních detektorů, jako je například UV/VIS nebo fluorescenční, které zaznamenávají pouze intenzitu signálu, hmotnostní detektor poskytuje i další informaci – měří **poměr hmotnosti a náboje (m/z)** vytvořených iontů. Z této hodnoty lze odvodit **molekulovou hmotnost** látky, a v některých případech i její **strukturu**. Jednoduše si to lze představit tak, že MS dokáže molekuly „zvážit“.

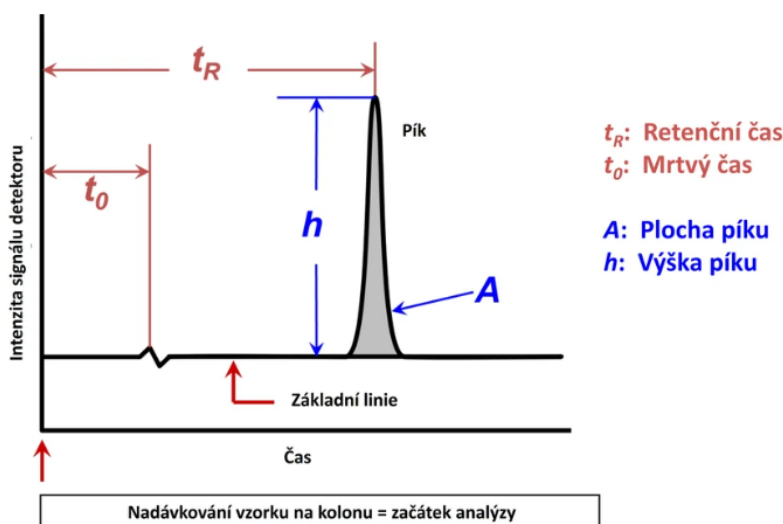
Největší předností je vysoká **selektivita**. Umožňuje analyzovat jednotlivé složky i v komplexním biologickém vzorku, kde by se signály v klasickém UV/VIS detektoru překrývaly a ztrácely. Další výhodou je možnost **identifikace látek**. Moderní přístroje nejen že přesně určují hodnotu m/z , ale dokáží molekulu i fragmentovat a tím odhalit její strukturu. Přesnost měření m/z je dnes tak vysoká, že z ní lze odvodit i molekulový vzorec látky. Třetí velkou výhodou je mimořádná **citlivost** – MS umožňuje detekci látek ve stopových množstvích. Například u léčiva fluticasonu lze stanovit koncentrace až na úrovni 5 pg/mL, což je tisíckrát méně, než kdybychom rozpustili čajovou lžičku soli v bazénu o objemu 100 m³.

Díky těmto vlastnostem se MS detektory uplatňují při **stanovení velmi nízkých koncentrací léčiv nebo metabolitů v plazmě**, i ve **výzkumu metabolických procesů a identifikaci neznámých sloučenin**.

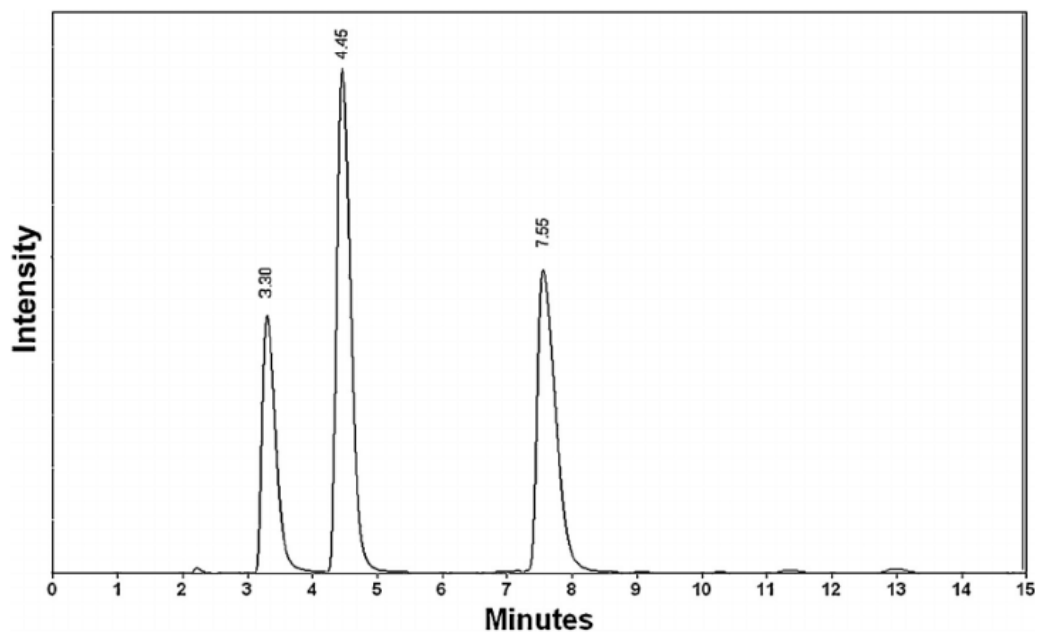
4.3 Chromatogram

Výsledným výstupem je tzv. **chromatogram** – záznam signálu ve formě píků. Každý pík představuje jednu látku.

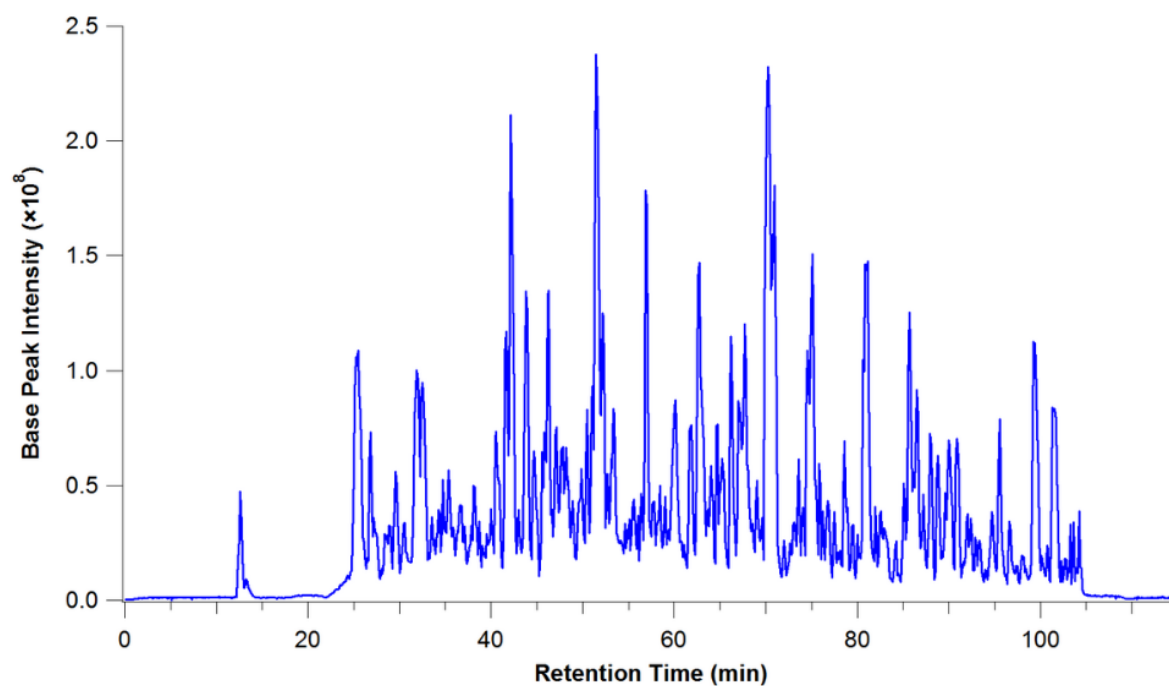
- **Čas, kdy se objeví**, napovídá, co to je za látku (Retenční čas – t_R).
- **Plocha (výška) píku** říká, kolik té látky ve vzorku bylo.



Najednou tak místo nepřehledné směsi vidíme jasný „otisk“ vzorku, složený z jednotlivých komponent.



Anebo také ne: 😊



5 Využití chromatografických separačních technik v medicíně

Chromatografické metody mají v klinických laboratořích své nezastupitelné místo. Nejsou primárně určeny pro rutinní stanovení běžných biochemických markerů (např. glukóza, ionty), které se provádí na automatických analyzátořech. Jejich význam spočívá spíše ve **stanovení specifických látek**, které vyžadují vysokou citlivost a selektivitu.

5.1 Terapeutické monitorování léčiv

Hlavní oblastí využití je tzv. **terapeutické monitorování léčiv (TDM – Therapeutic Drug Monitoring)** – sledování hladin léčiv v krvi. Týká se zejména látek s **úzkým terapeutickým oknem**, kde je třeba udržet plazmatickou koncentraci v optimálním rozmezí. Při jeho překročení hrozí toxické účinky, při poddávkování zase ztráta účinnosti.

- **Příklady:** cytostatika, imunosupresiva, ale i antihypertenziva, antipsychotika, sedativa či antidepressiva.

5.2 Toxikologický screening

Další zásadní oblastí je **toxikologická analýza**, kde se často využívá kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS). Tato metoda dokáže současně stanovit obrovské množství látek.

- **Příklad:** ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové se takto rutinně sleduje více než 1200 různých léčiv, drog a jejich metabolitů.
- Mezi nejčastěji vyšetřované látky patří barbituráty, benzodiazepiny, salicyláty, amfetaminy, kanabinoidy či opiáty.

5.3 Chromatografie v každodenním životě

S chromatografií se setkáváme i mimo laboratoř – například u **jednorázových testů**:

- **těhotenský test** pro detekci hCG v moči,
- **test na okulní krvácení.**

Tyto testy využívají princip **tenkovrstvé imunoafinitní chromatografie**, kde je na sorbentu navázána protilátka specifická pro sledovanou látku.

5.4 Plynová chromatografie v klinické praxi

Plynová chromatografie má v medicíně menší význam než LC-MS, přesto se využívá, zejména v toxikologických laboratořích. Je ideální pro stanovení **těkavých organických látek** – například methanolu, ethanolu, acetonu, isopropanolu nebo toluenu.

Shrnutí

Chromatografie je univerzální separační metoda, která umožňuje účinné oddělení složek složitých směsí na základě jejich rozdílných interakcí se stacionární a mobilní fází. Existuje mnoho typů chromatografických technik, které se liší principem separace (adsorpční, iontoměničová, gelová, afinitní) a provedením (PC, TLC, kolonová, GC, HPLC). Detekce látek probíhá pomocí různých detektorů, v moderních metodách často spojených s hmotnostní spektrometrií. Klinické aplikace chromatografie zahrnují široké spektrum – od diagnostiky metabolických poruch, přes sledování léčiv, až po detekci drog. Chromatografie, ve spojení s vhodným detektorem, je citlivá, univerzální a přesná metoda, jejíž limitem je technická a finanční náročnost.

Kontrolní otázky

1. Jaký je princip chromatografie?
2. Jaký je rozdíl mezi retenčním časem a retenčním faktorem?
3. Jak se liší iontoměničová a gelová chromatografie?
4. V čem spočívá výhoda HPLC oproti klasické kolonové chromatografii?
5. Jaké typy detektorů se používají v chromatografii a kdy je vhodné použít fluorescenční detektor?
6. Jaké klinické vyšetření využívá HPLC k monitorování diabetu?
7. Jaké chyby mohou nastat při chromatografické analýze?