

# Metody chromatograficzne w chemii i biotechnologii, **wykład 2**

Łukasz Berlicki  
Monika Szefczyk

# Rozdział chromatograficzny

---

- ▶ Cel: rozdział mieszaniny na poszczególne składniki.
- ▶ Elementy układu chromatograficznego:
  - mieszanina podlegająca rozdzieleniu na składniki,
  - faza stacjonarna (złoże),
  - faza ruchoma (eluent).

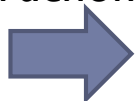


# Rozdział chromatograficzny

---

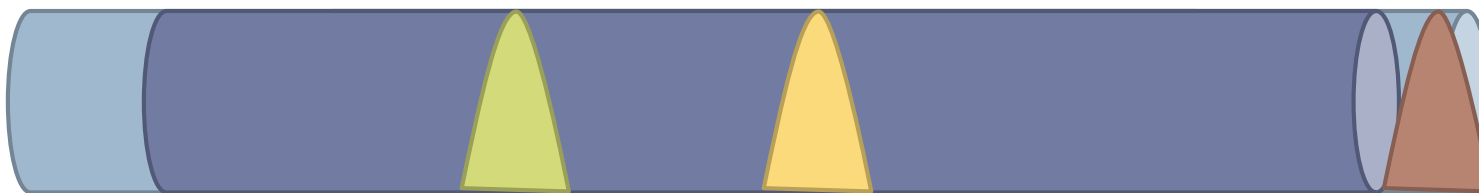
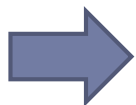
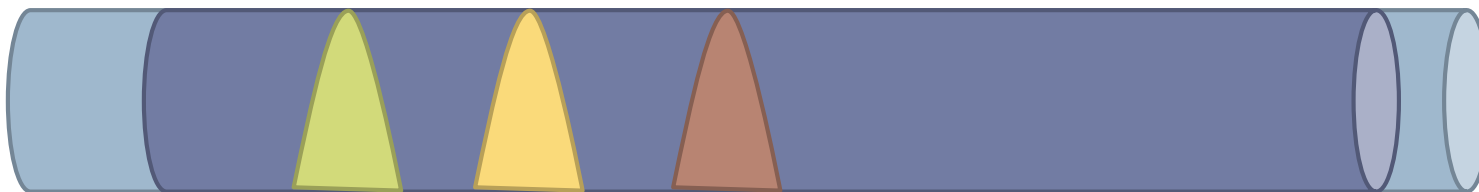
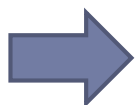
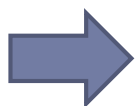
Przepływ

Faza ruchoma



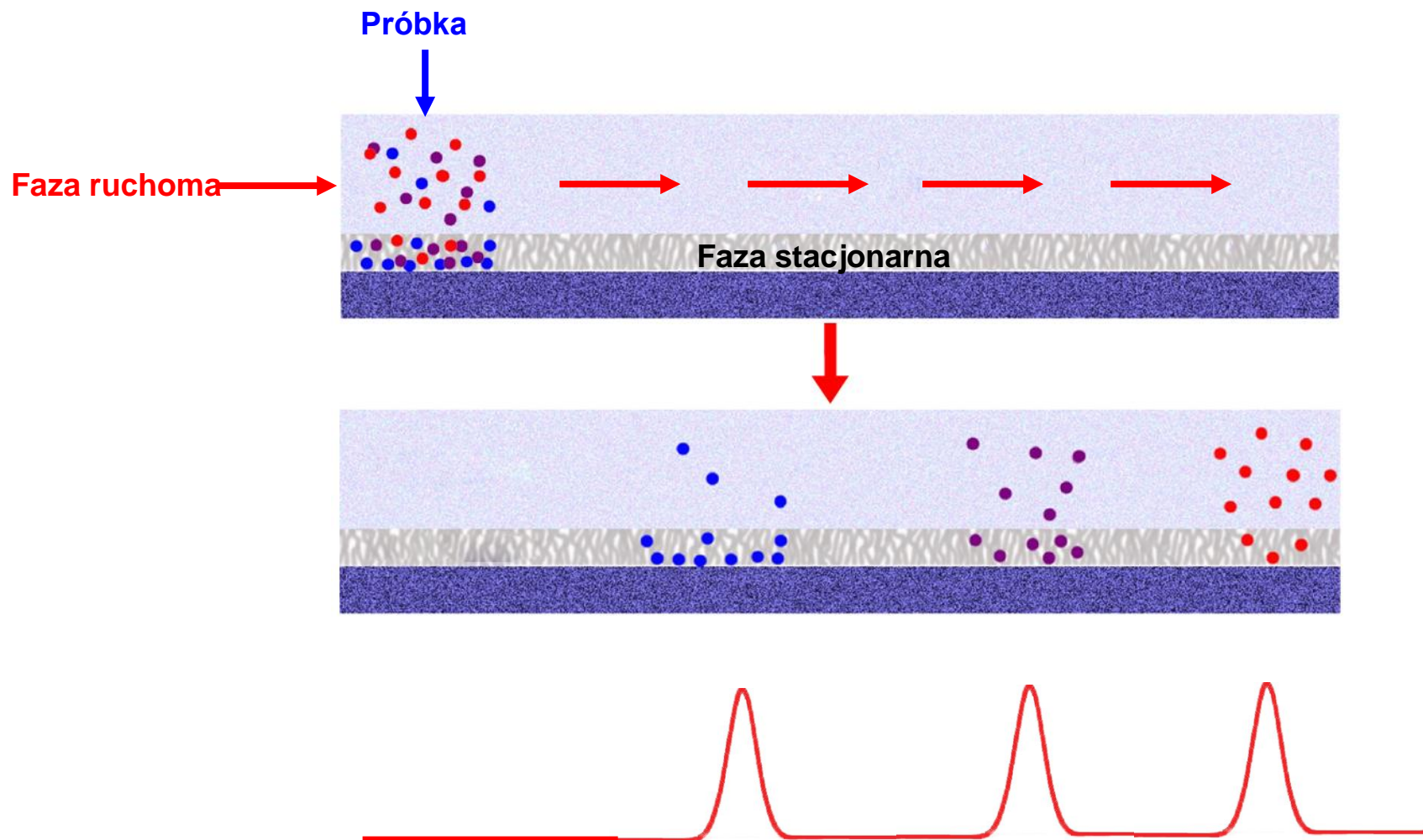
mieszanina

Faza stacjonarna



# Rozdział chromatograficzny

---



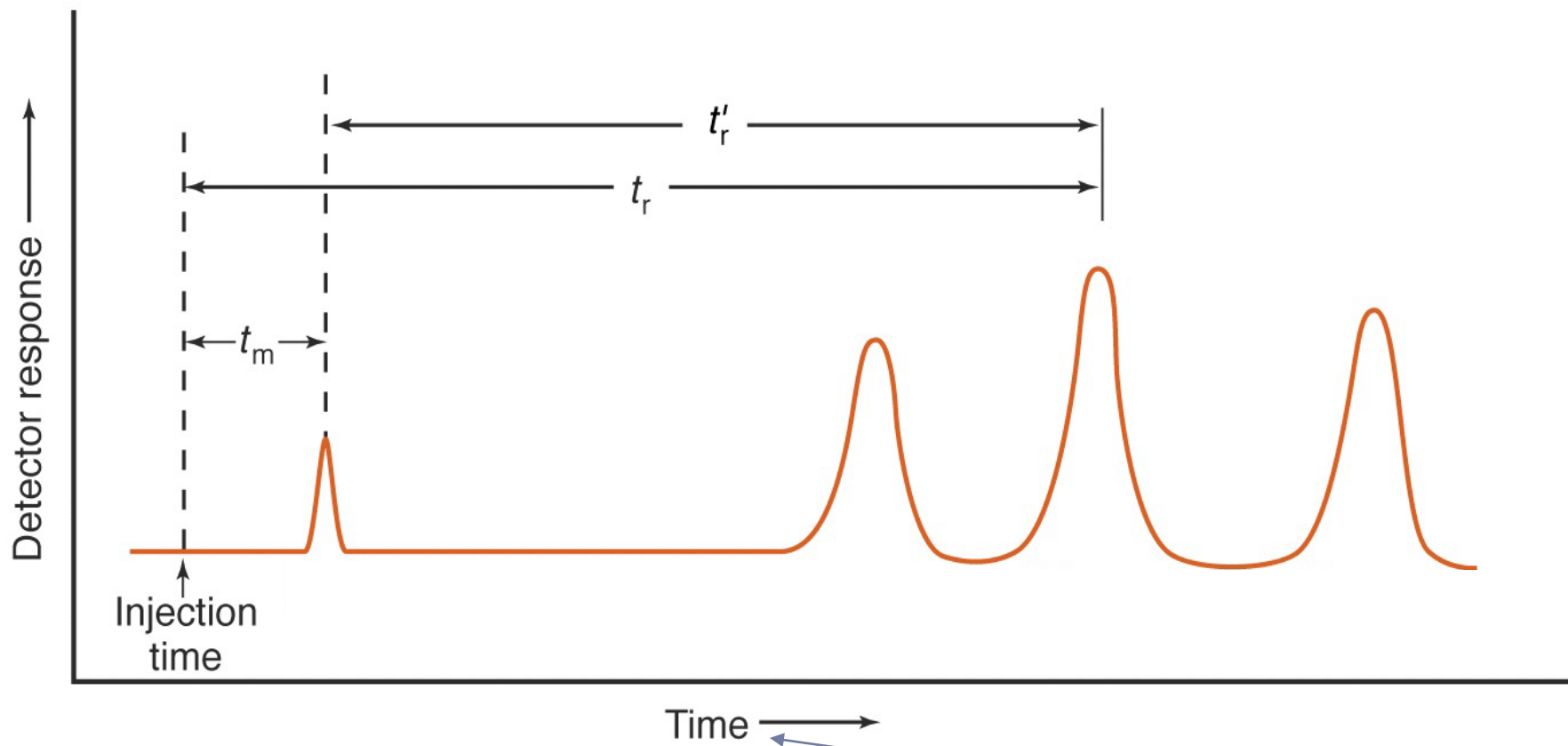
# Retencja

---

- ▶ Retencja (łac. *retentio*) – zatrzymanie, powstrzymanie.
- ▶ W metodach chromatograficznych rozdział i analiza mieszanin wynika z faktu, że każdy związek chemiczny wykazuje zazwyczaj inne powinowactwo chemiczne lub inny stopień oddziaływań fizycznych z fazą stacjonarną. Czym to powinowactwo jest silniejsze tym dłuższy jest czas retencji (*składnik dłużej pozostaje na kolumnie*).
- ▶ Czas retencji – ilości czasu potrzebnego do przejścia przez całą długość fazy stacjonarnej określonego składnika analizowanej mieszaniny (*od momentu nastrzyknięcia mieszaniny na kolumnę, do pojawienia się maksimum piku odpowiadającego danemu analitowi*).



# Chromatogram



$t_m$  – zerowy (martwy) czas retencji

$t_r$  – całkowity czas retencji

$t'_r$  – zredukowany czas retencji

Zamiast czasu może być objętość



# Retencja

---

$$t_R' = t_R - t_M$$

$$V_R = t_R \times F$$

$t_R'$  – **zredukowany czas retencji**

$t_R$  – całkowity czas retencji

$t_M$  – czas retencji substancji niezatrzymywanej (*czas martwy*)

$V_R$  – **objętość retencji**

$F$  – przepływ

---



# Retencja

---

- ▶ **Współczynnik retencji (k)** – stosunek ilości czasu przebywania substancji w fazie stacjonarnej i fazie ruchomej.

$$k = \frac{\text{czas w fazie stacjonarnej}}{\text{czas w fazie ruchomej}} = \frac{\text{liczba moli w fazie stacjonarnej}}{\text{liczba moli w fazie ruchomej}}$$

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

$$k' = \frac{C_S V_S}{C_r V_r}$$

$$K = \frac{C_S}{C_r} \quad \text{Stała podziału substancji między dwie fazy}$$

$$k' = K \frac{V_S}{V_r} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

---





# Retencja

---

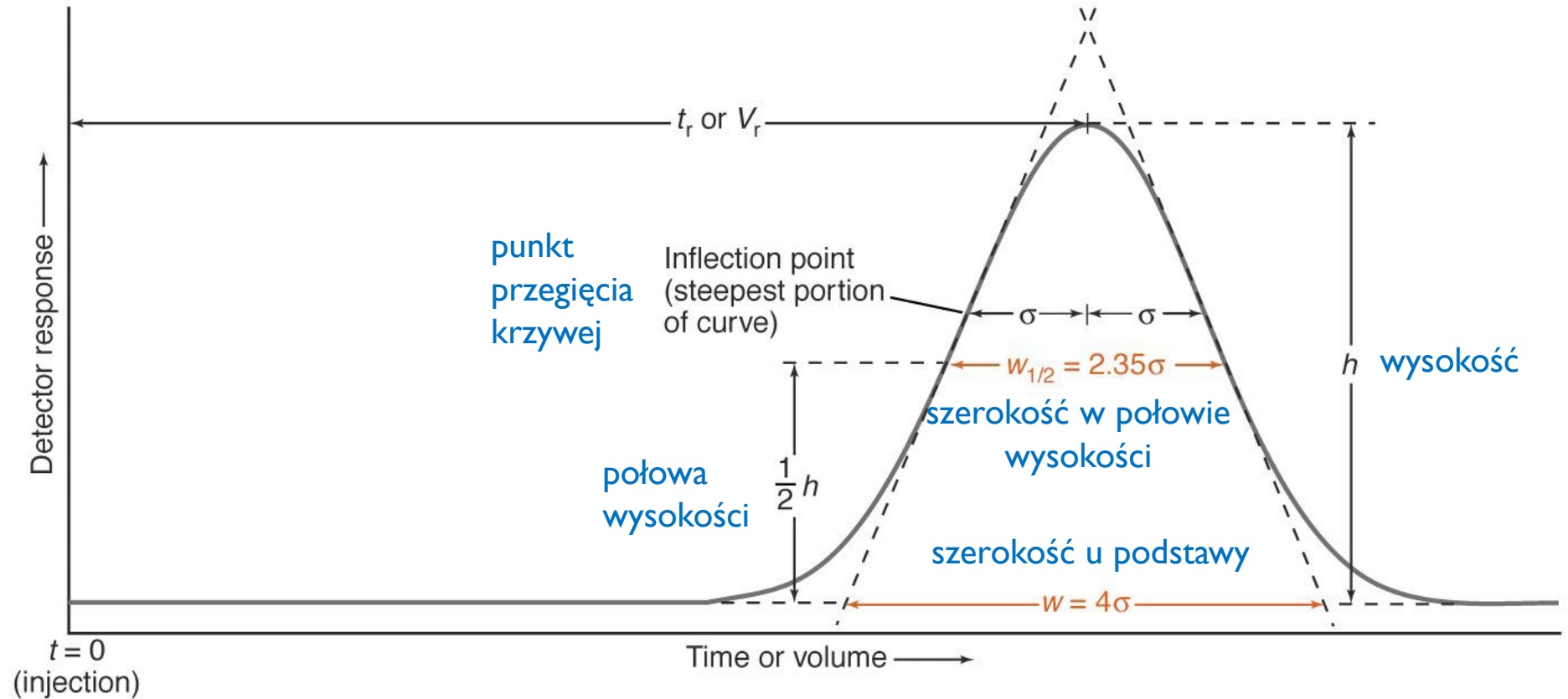
- ▶ Gdy każdy składnik mieszaniny wykazuje zróżnicowaną retencję, układ chromatograficzny jest selektywny wobec składników rozdzielanej mieszaniny. Selektowność układu chromatograficznego jest opisywana z zastosowaniem stosunku współczynników retencji sąsiednich stref rozdzielanych substancji o większej i mniejszej retencji i nosi nazwę **współczynnika rozdzielania ( $\alpha$ )**.

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{K_2}{K_1}$$

- ▶ Im bardziej  $\alpha$  jest różne od 1 tym lepiej substancje się rozdzielają.
  - ▶ Współczynnik rozdzielania wyznaczony względem wzorca nazywamy **retencją względną**.
- 



# Pik chromatograficzny



Idealny pik chromatograficzny jest opisany krzywą Gaussa. 
$$y = Ae^{\frac{-(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$



# Rozdzielczość

---

$$R_s = \frac{\Delta t_R}{w_{av}} = \frac{\Delta V_R}{w_{av}} = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} = \frac{0.589\Delta t_R}{w_{1/2av}}$$

**$R_s$  – rozdzielczość**

$\Delta t_R$  – różnica czasów retencji dwóch substancji

$w_{av}$  – średnia szerokość pików

$\Delta V_R$  – różnica objętości retencji dwóch substancji

$w_b$  – szerokość pików przy podstawie

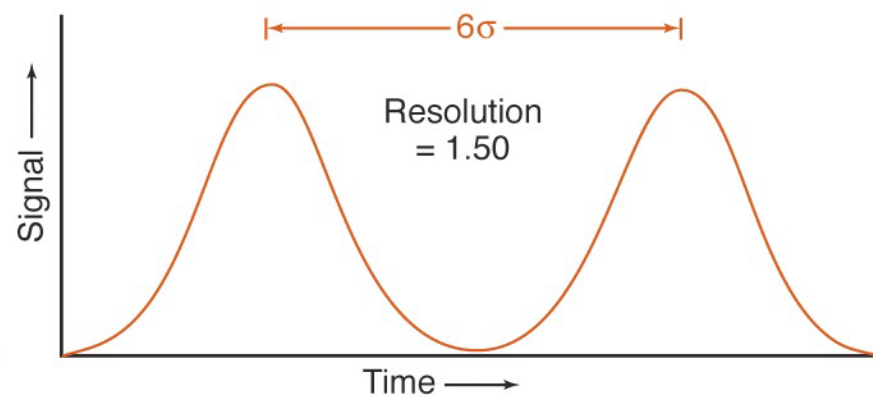
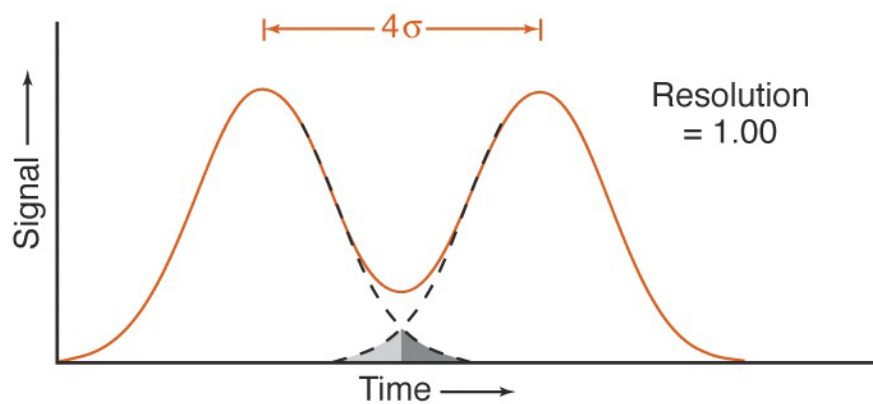
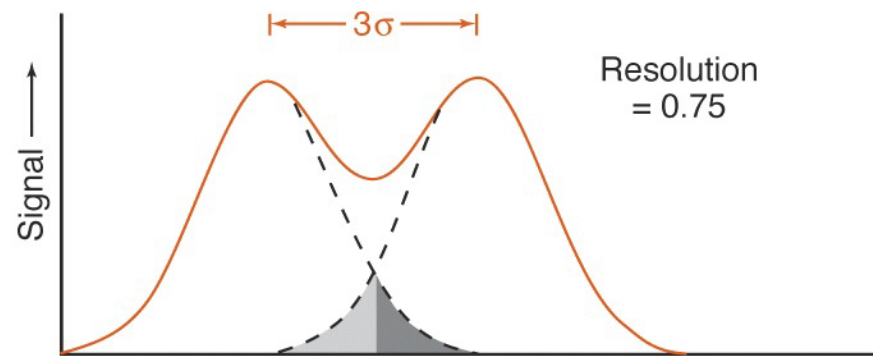
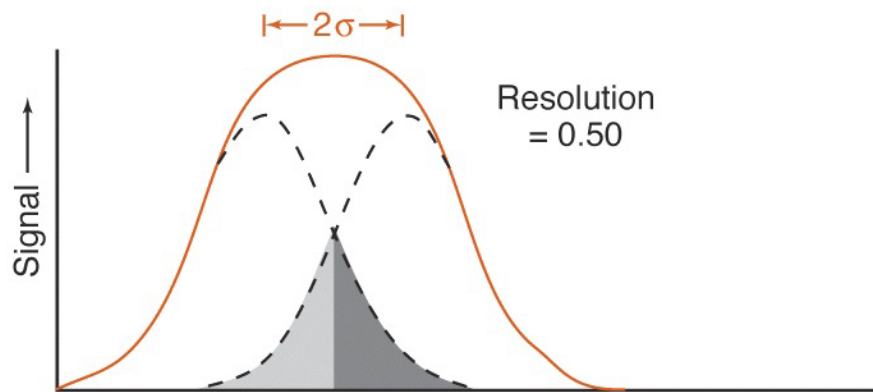
$w_{1/2av}$  – średnia z szerokości połówkowych pików

---



# Rozdzielczość

---

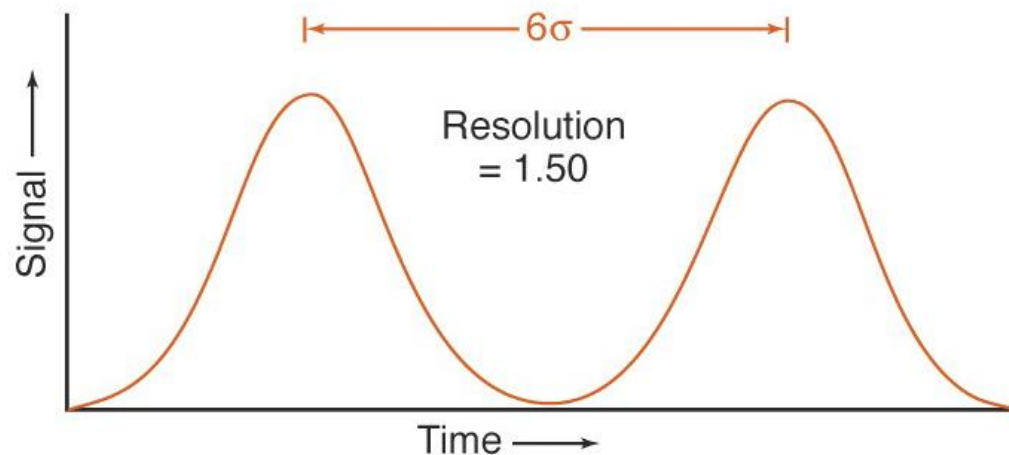


# Rozdzielczość

---

**Rozdział** substancji zależy od:

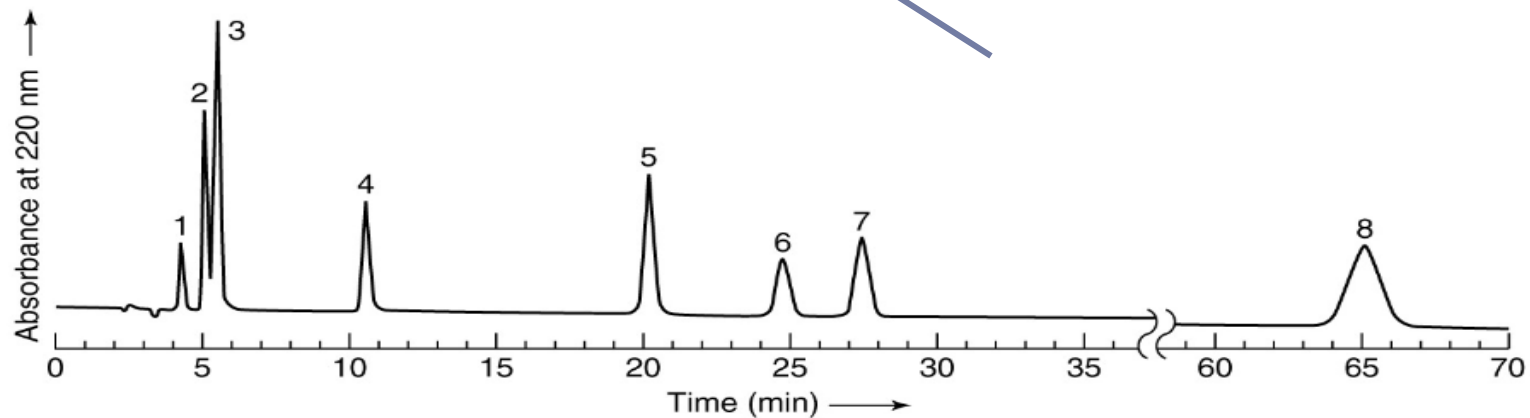
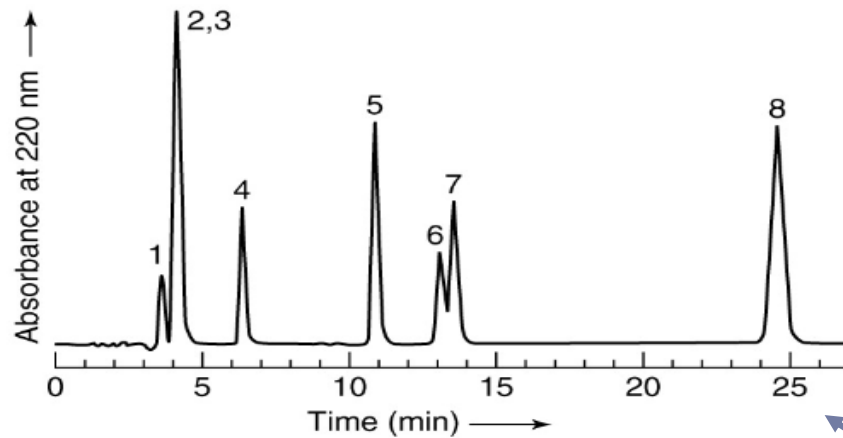
- Szerokości pików – efektywność (*nie za szerokie*)
- Odległości pików – selektywność (*co najmniej rozdzielone do podstawy*)



# Rozdzielczość

Przykład:

Czy piki na poniższych chromatogramach mają poprawną rozdzielczość?

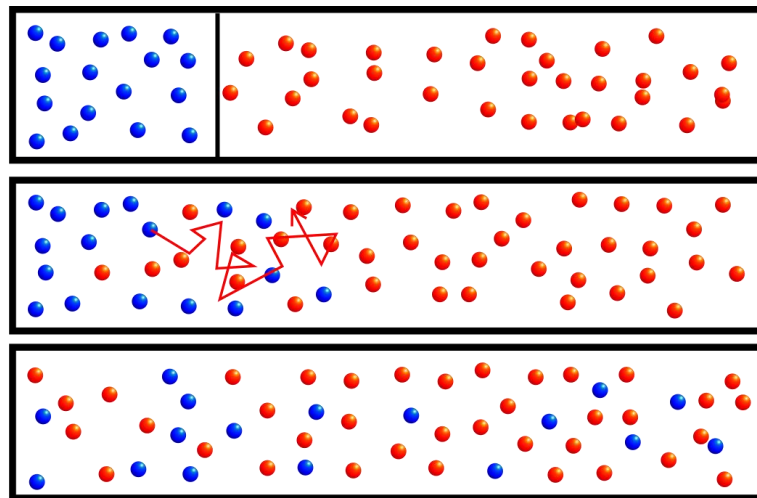


# Dyfuzja

---

**Dyfuzja** (łac. *diffusio* 'rozprzestrzenianie') – proces samorzutnego rozprzestrzeniania i przenikania się cząsteczek lub energii w każdym ośrodku, wynikający z chaotycznych zderzeń cząsteczek dyfundującej substancji między sobą lub z cząsteczkami otaczającego ją ośrodka.

Proces dyfuzji chemicznej jest opisywany równaniem dyfuzji i prowadzi do wyrównywania stężenia (lub temperatury) każdej z dyfundujących substancji w całym układzie.

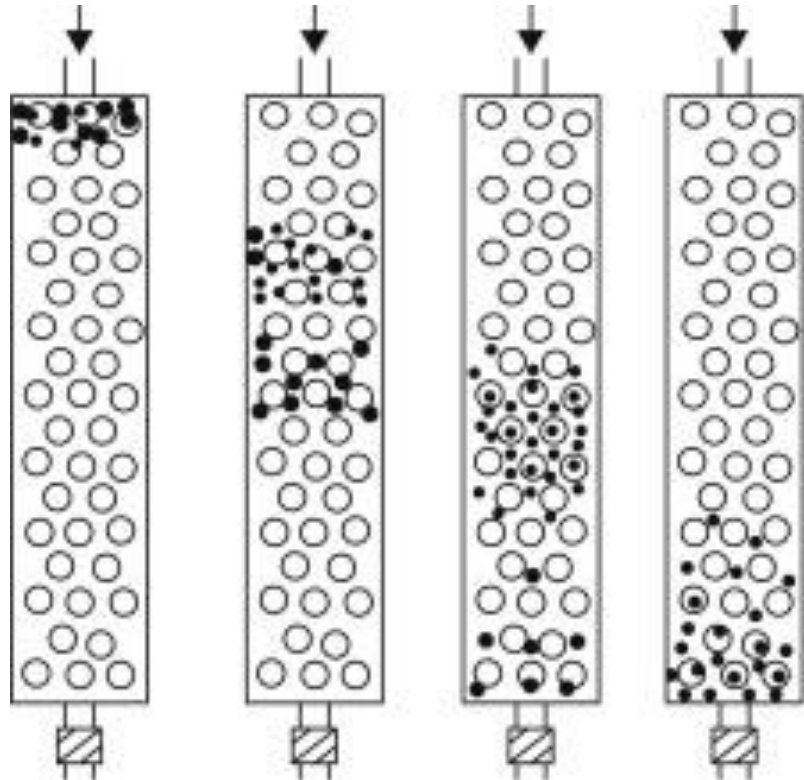


# Dyfuzja

- ▶ **Strumień (J)** to liczba moli substancji przepływająca przez 1 m<sup>2</sup> powierzchni w czasie 1 s.
- ▶ Strumień jest proporcjonalny do gradientu stężenia (dc/dx)

$$J = -D \frac{dc}{dx} \left( \frac{\text{mol}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}} \right)$$

D – współczynnik dyfuzji

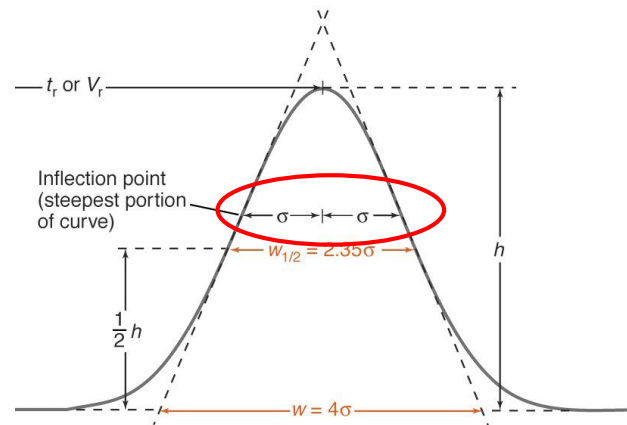




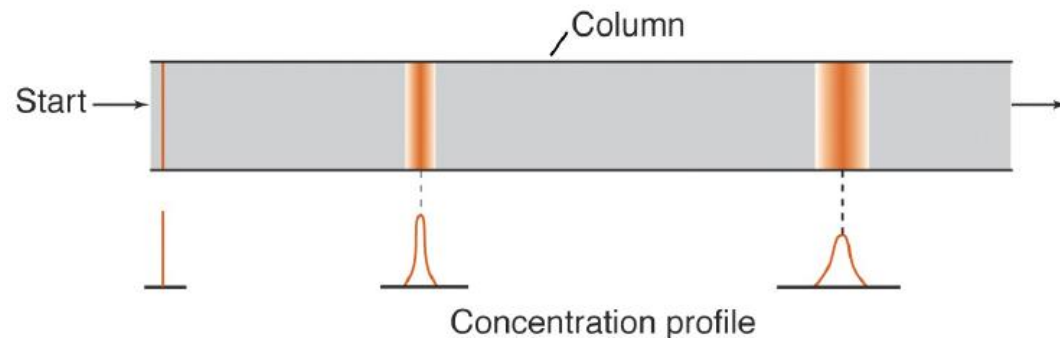
# Dyfuzja

- ▶ Od współczynnika dyfuzji ( $D$ ) zależne jest **odchylenie standardowe** ( $\sigma$ ) definiujące kształt krzywej Gaussa opisujące pik chromatograficzny.

$$\sigma = \sqrt{2Dt}$$



*Dyfuzja powoduje rozmycie pików*

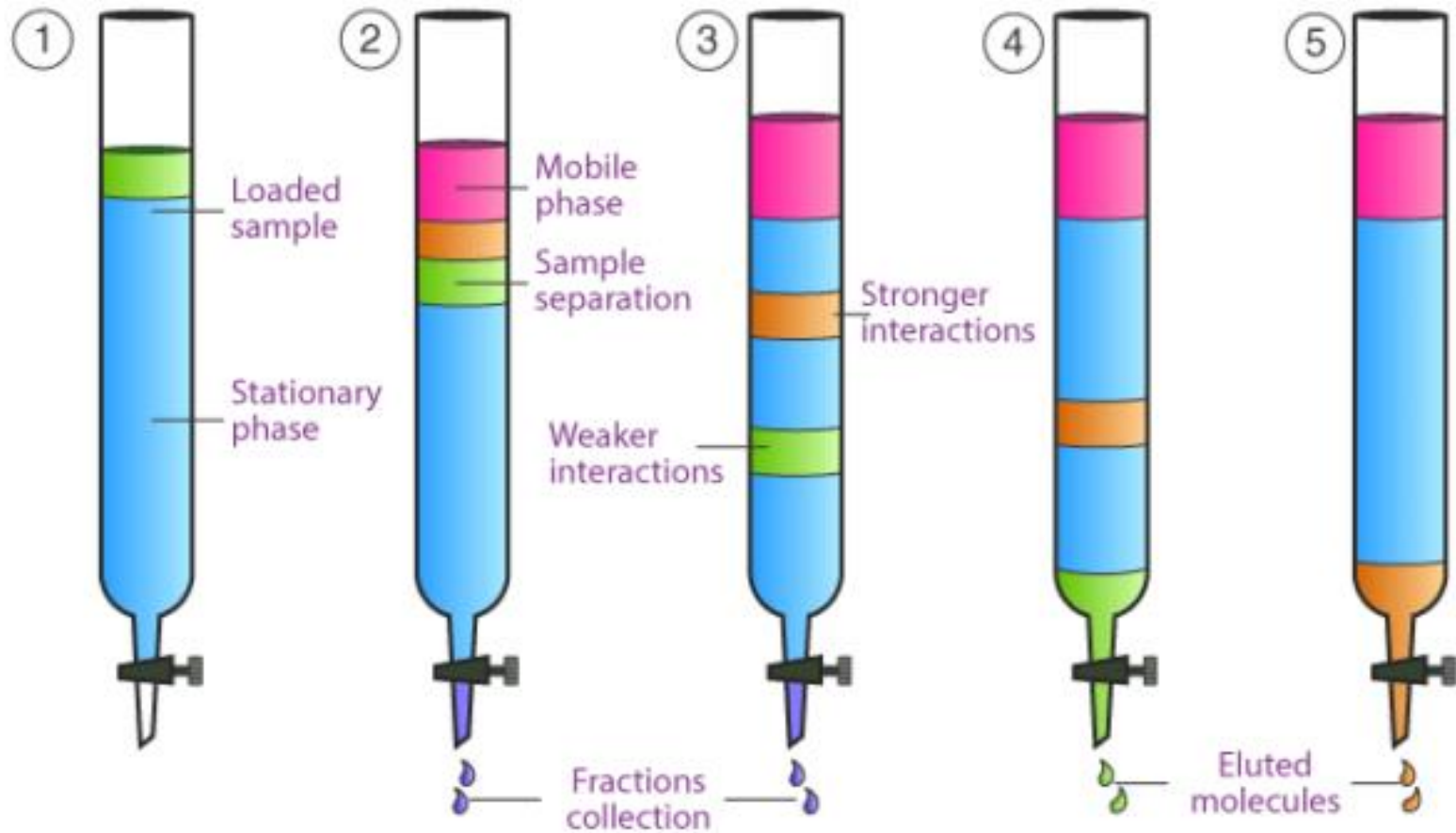


# Dyfuzja

---



# Dyfuzja



# Dyfuzja

Substancja	Rozpuszczalnik	D [m <sup>2</sup> /s]
H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	$2.3 \times 10^{-9}$
Sucrose	H <sub>2</sub> O	$0.52 \times 10^{-9}$
Glycine	H <sub>2</sub> O	$1.1 \times 10^{-9}$
CH <sub>3</sub> OH	H <sub>2</sub> O	$1.6 \times 10^{-9}$
Ribonuclease (FM 13 700)	H <sub>2</sub> O (293 K)	$0.12 \times 10^{-9}$
Serum albumin (FM 65 000)	H <sub>2</sub> O (293 K)	$0.059 \times 10^{-9}$
I <sub>2</sub>	Hexane	$4.0 \times 10^{-9}$
CCl <sub>4</sub>	Heptane	$3.2 \times 10^{-9}$
N <sub>2</sub>	CCl <sub>4</sub>	$3.4 \times 10^{-9}$
CS <sub>2</sub> (g)	Air (293 K)	$1.0 \times 10^{-5}$
O <sub>2</sub> (g)	Air (273 K)	$1.8 \times 10^{-5}$
H <sup>+</sup>	H <sub>2</sub> O	$9.3 \times 10^{-9}$
OH <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O	$5.3 \times 10^{-9}$
Li <sup>+</sup>	H <sub>2</sub> O	$1.0 \times 10^{-9}$
Na <sup>+</sup>	H <sub>2</sub> O	$1.3 \times 10^{-9}$
K <sup>+</sup>	H <sub>2</sub> O	$2.0 \times 10^{-9}$
Cl <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O	$2.0 \times 10^{-9}$
I <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O	$2.0 \times 10^{-9}$



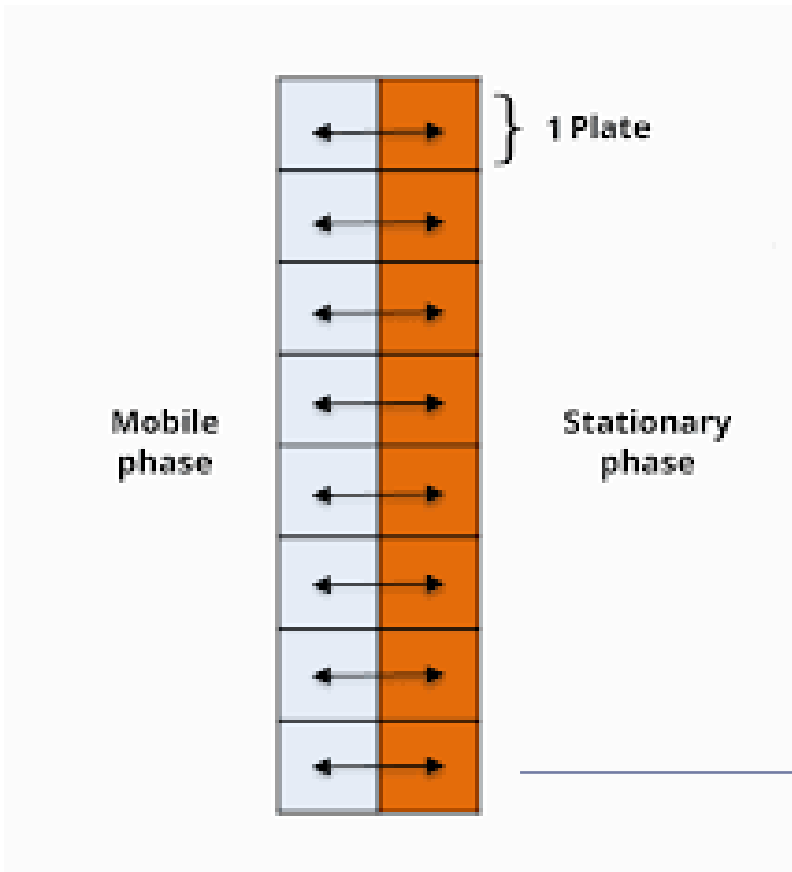
# Efektywność kolumny

---

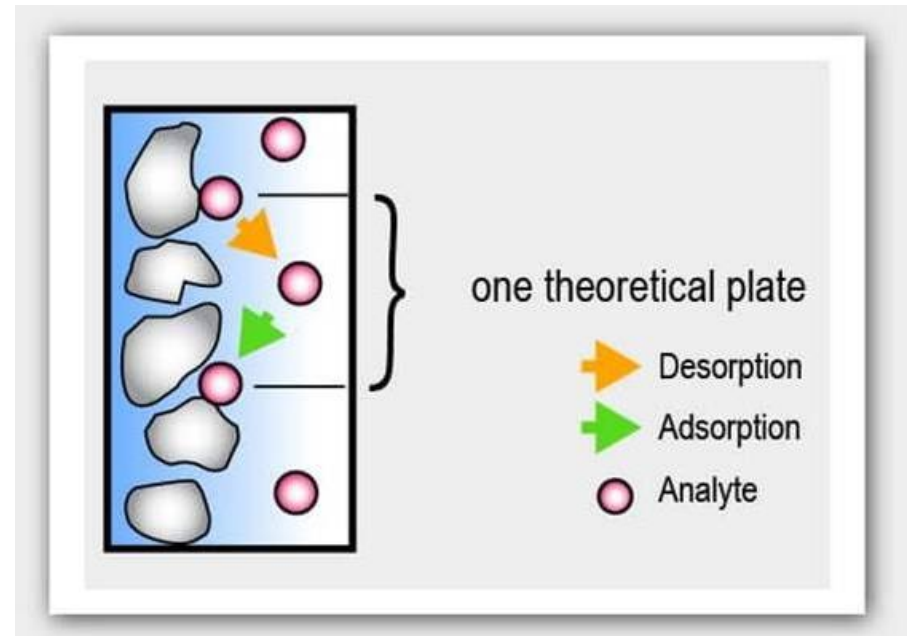
- ▶ Kolumna jest podzielona na  $N$  przylegających segmentów, które nazywamy **pólkami teoretycznymi**.
- ▶ Twórcy **teorii póltek**, Archer Martin i Richard Synge, zostali nagrodzeni Nagrodą Nobla w 1952 r. za ich wkład w rozwój chromatografii.



# Efektywność kolumny



W każdej półce teoretycznej zachodzi **pełna równowaga** analitu pomiędzy fazą ruchomą a stacjonarną.



# Półki teoretyczne

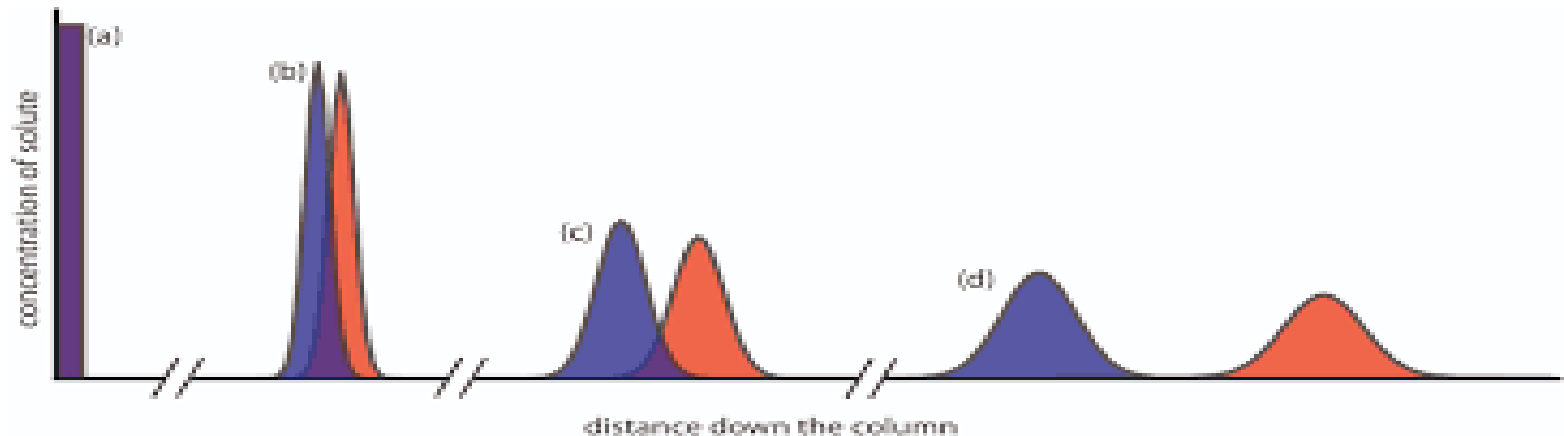
- ▶ Lepsza separacja analitów następuje wtedy, gdy:
  - ▶ jest większa liczba półek teoretycznych
  - ▶ półki teoretyczne są niższe

$$L = N \times H$$

L – długość kolumny

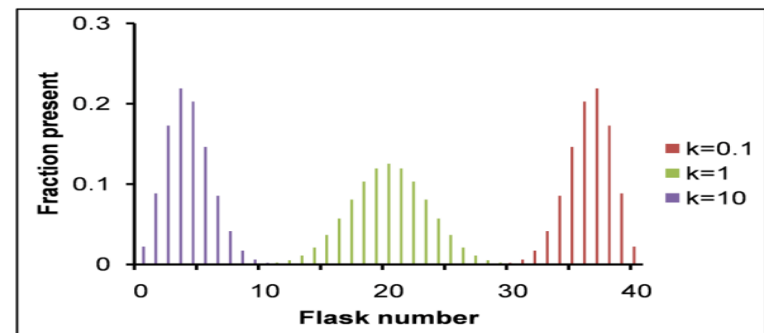
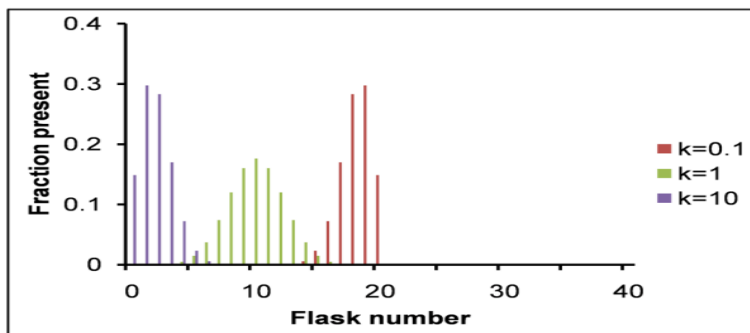
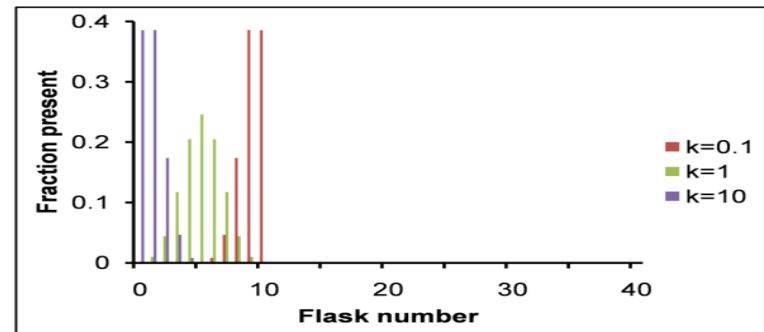
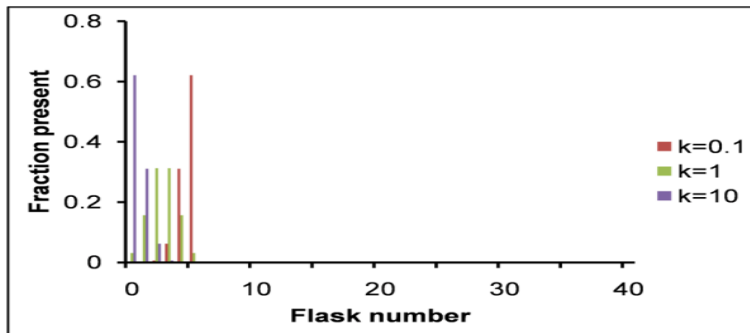
N – liczba półek

H – wysokość półki



# Półki teoretyczne

- ▶ Szerokość pików zwiększa się wraz z zwiększającym się czasem retencji (*konsekwencja dyfuzji*).
- ▶ Im mniejsza wysokość półki teoretycznej, tym węższy pik.





# Półki teoretyczne

---

- ▶ Kolumny mogą mieć bardzo dużą liczbę półek teoretycznych (miliony).
- ▶ Kolumny mogą zachowywać się tak jakby miały różne liczby półek teoretycznych dla różnych rozpuszczalników.
- ▶ **Liczbę półek (N)** można wyznaczyć eksperymentalnie:

$$N = 16 \left( \frac{V_R}{w_b} \right)^2$$

$$N = 5.54 \left( \frac{V_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

$V_R$  – objętość retencji

$w_b$  – szerokość piku u podstawy

$w_{1/2}$  – szerokość połówkowa piku

---



# Półki teoretyczne

---

## ▶ Wysokość półki teoretycznej (H)

$$H = \frac{L}{N} = \frac{L}{16} \left( \frac{w_b}{V_R} \right)^2 = \frac{L}{16} \left( \frac{w_b}{t_R} \right)^2$$

## ▶ Efektywna liczba półek teoretycznych (N)

$$N = 16 \left( \frac{V'_R}{w_b} \right)^2 = 16 \left( \frac{t'_R}{w_b} \right)^2$$

L – długość kolumny

$w_b$  – szerokość piku przy podstawie

$V'_R$  – (zredukowana) objętość retencji

$t'_R$  – (zredukowany) czas retencji

---



# Równanie Van Deemter'a

**Równanie Van Deemtera** wyraża wpływy różnych czynników na szerokość piku i wysokość równoważną półce teoretycznej.

$$H = A + B/u_x + C \times u_x$$

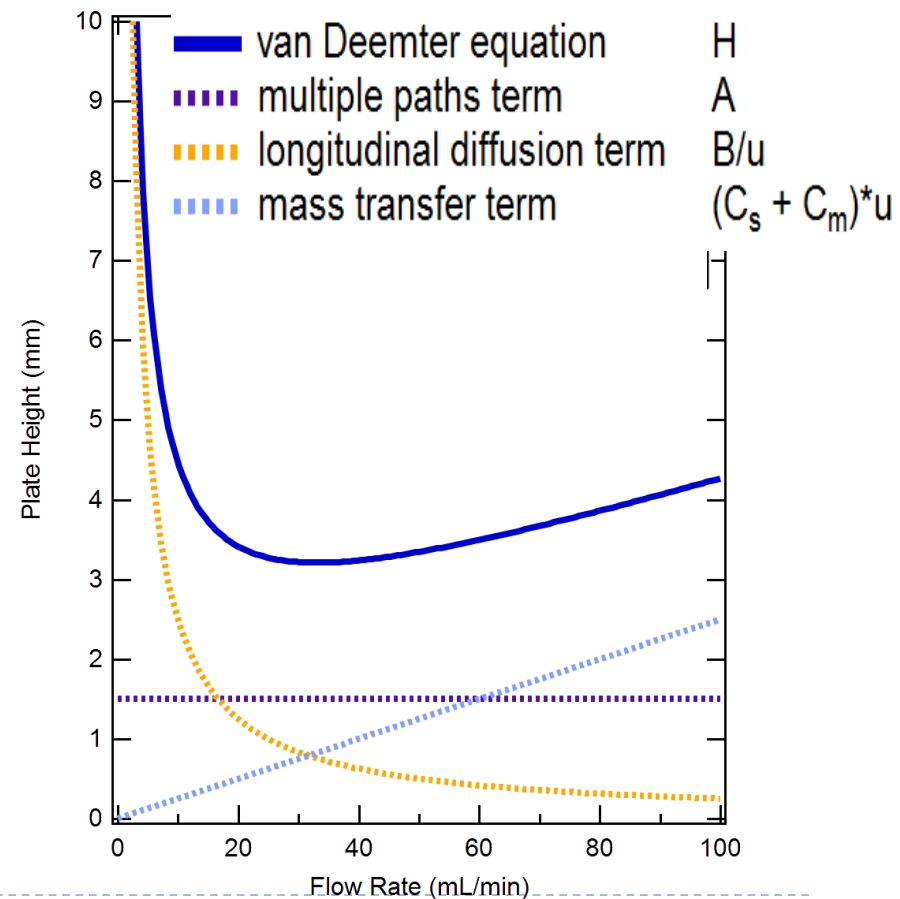
$H$  – wysokość półki teoretycznej

$A$  – dyfuzja wirowa

$B/u_x$  – dyfuzja podłużna

$C \times u_x$  – opór przenikania masy

$u_x$  – prędkość przepływu



# Równanie Van Deemter'a

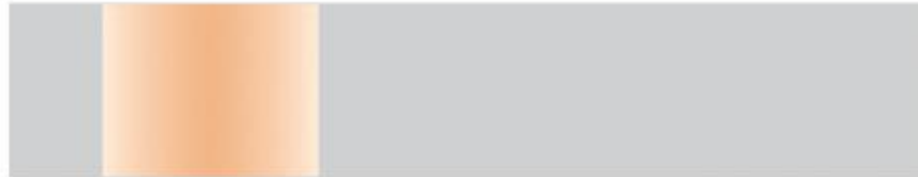
---

- Czynniki  $B/u_x$  opisuje dyfuzję podłużną.
- Dyfuzja podłużna w fazie ruchomej spowodowana jest przypadkowym ruchem cząsteczek rozdzielanej substancji w fazie ruchomej.
- $B/u_x$  zależy od szybkości przepływu fazy ruchomej. Im większa jest szybkość przepływu fazy ruchomej, tym krótszy czas wędrówki substancji z tą fazą i mniejsze rozmycie.
- Substancja ciągle dyfunduje w kierunku od najwyższego stężenia powodując rozmywanie piku.
- Im krócej substancja jest na kolumnie tym rozmycie jest mniejsze.



# Równanie Van Deemter'a

---



Zone of solute after short  
time on column

↓ Longitudinal  
diffusion ( $B/u_x$ )



Zone of solute after longer  
time on column



Direction of travel

Ponieważ dyfuzja w gazie jest znacznie szybsza niż w cieczy, w chromatografii gazowej przepływy powinny być większe niż w chromatografii ciekłowej.



# Równanie Van Deemter'a

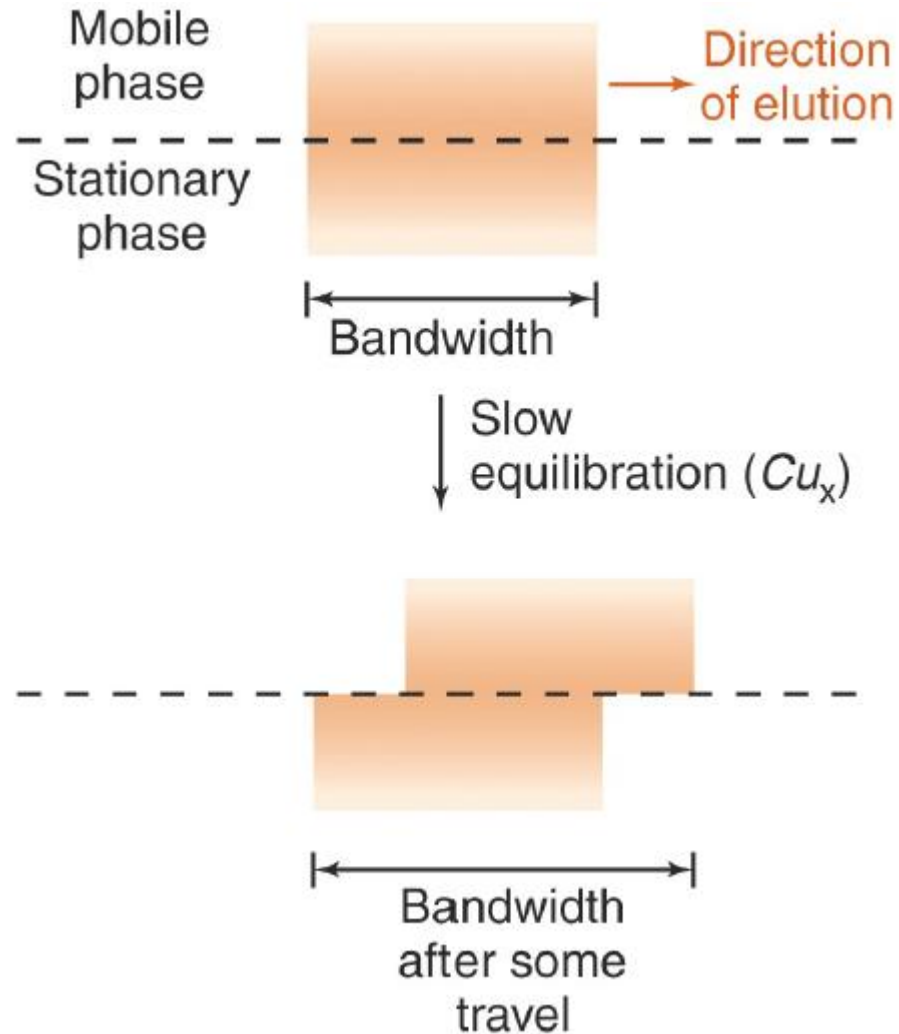
---

- Parametr  $C \times u_x$  zależny jest od oporów powstających przy przemieszczaniu się rozdzielanych substancji do i od fazy stacjonarnej.
- Czynniki te wynikają z czasu potrzebnego do równoważenia pomiędzy fazą ruchomą i stacjonarną.
- Niższy przepływ daje szansę na lepsze zrównoważenie, a to powoduje węższy pik.



# Równanie Van Deemter'a

---



# Równanie Van Deemter'a

---

- ▶ Współczynnik  $A$  opisuje możliwość przemieszczania się pojedynczej cząsteczki przez kolumnę różnymi drogami.

$$A = 2\lambda d_p$$

$\lambda$  – stała charakteryzująca upakowanie

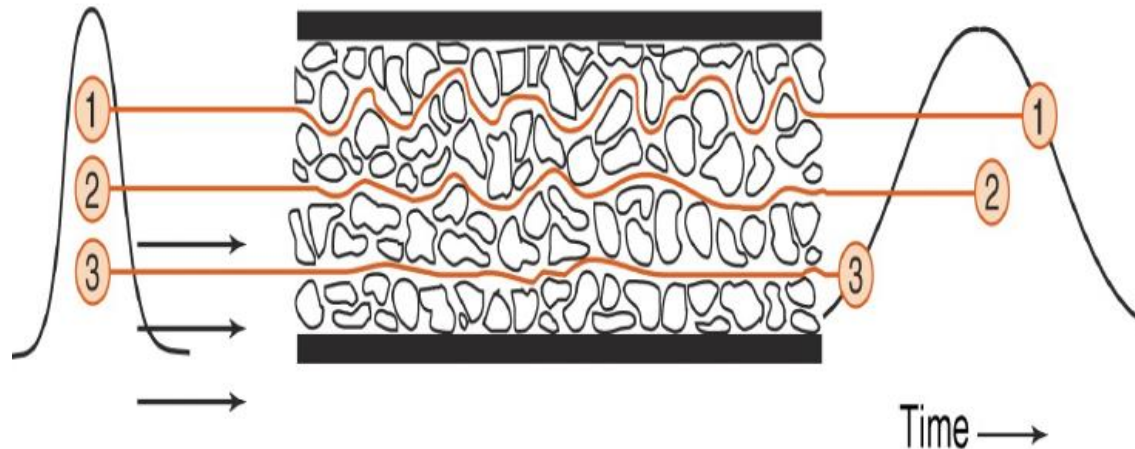
$d_p$  – wielkość ziarna





# Równanie Van Deemter'a

- ▶ Dyfuzja wirowa A zależy od fazy stacjonarnej kolumny i jest spowodowana wielokanałowością przepływu fazy ruchomej.
- ▶ W każdej kolumnie cząsteczki rozdzielanej substancji poruszają się różnymi drogami, w związku z tym ich czasy przebywania w kolumnie są różne.
- ▶ Rozmycie piku zależy od wymiaru ziaren fazy stacjonarnej, ich kształtu, porowatości, upakowania w kolumnie oraz średnicy kolumny.



# Wielkość ziarna

---

- ▶ Zmniejszenie wielkości ziarna znacząco (liniowo) zwiększa liczbę pól teoretycznych.
- ▶ Znacząco zwiększa także wymagane ciśnienie.

Particle size $d_p$ ( $\mu\text{m}$ )	Retention time (min)	Plate number ( $N$ )	Required pressure (bar)
5.0	30	25 000	19
3.0	18	42 000	87
1.5	9	83 000	700
1.0	6	125 000	2 300

---

Theoretical performance of 33- $\mu\text{m}$ -diameter  $\times$  25-cm-long capillary for minimum plate height for solute with capacity factor  $k' = 2$  and diffusion coefficient =  $6.7 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  in water-acetonitrile eluent.

SOURCE: J. E. MacNair, K. D. Patel, and J. W. Jorgenson, "Ultra-high-Pressure Reversed-Phase Capillary Liquid Chromatography with 1.0- $\mu\text{m}$  Particles," *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 700.



# Rozdzielczość – równanie Purnella

---

- ▶ Rozdzielczość ( $R_S$ ) jest zależna od
  - ▶ Efektywności kolumny
  - ▶ Selektywności rozdziału
  - ▶ Retencji względnej

$$R_S = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'}{k' + 1} \right)$$

efektywność      selektywność      retencja

$N$  – liczba póltek teoretycznych

$\alpha$  – współczynnik rozdzielania

$k'$  – retencja względna



# Rozdzielczość

---

- ▶ Wymagana liczba pól teoretycznych

$$N_{req} = 16R_s^2 \left( \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left( \frac{k' + 1}{k'} \right)^2$$

$R_s$  – rozdzielczość powinna być ustalona na poziomie co najmniej 1.5



# Rozdzielczość

---

- ▶ Wymagana długość kolumny

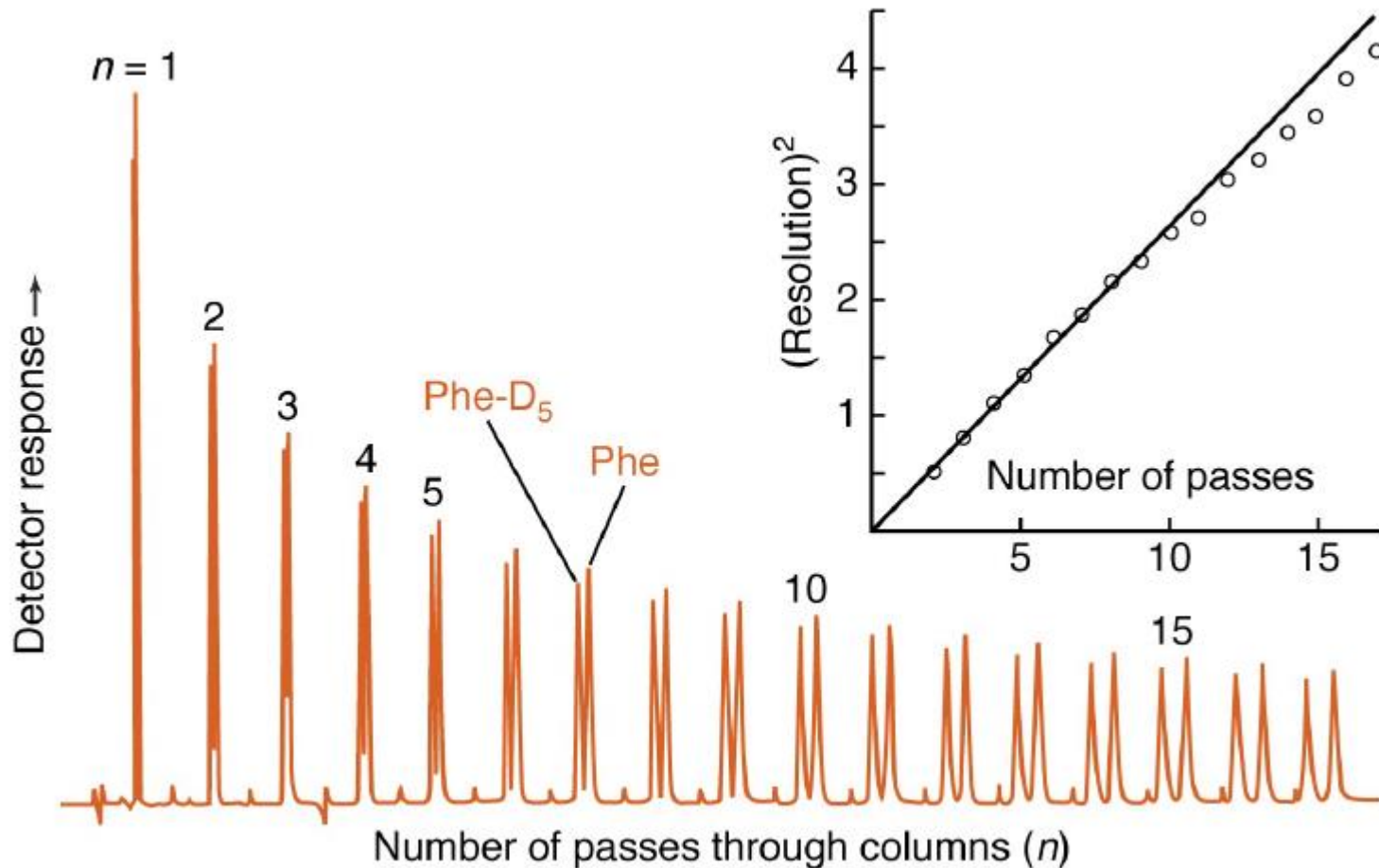
$$L_{req} = 16R_s^2 H \left( \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left( \frac{k' + 1}{k'} \right)^2$$

$R_s$  – rozdzielczość powinna być ustalona na poziomie co najmniej 1.5

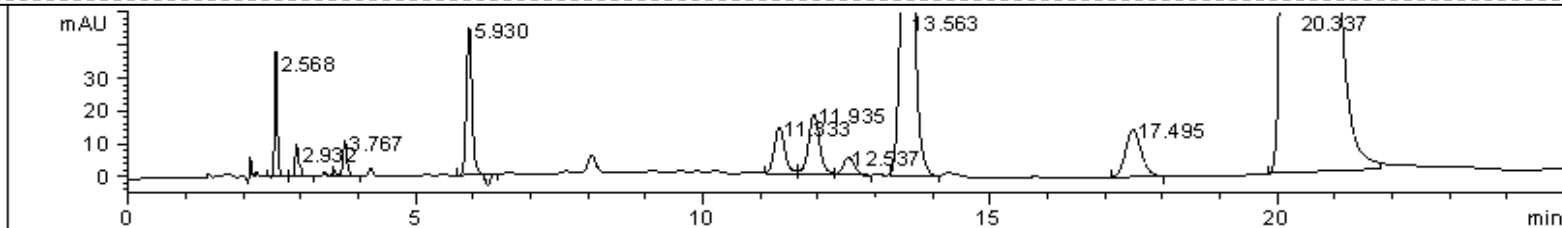


# Rozdzielczość

- ▶ Rozdzielczość zwiększa się z długością kolumny



# Parametry chromatograficzne



=====  
 Area Percent Report with Performance  
 =====

Multiplier: : 1.0000  
 Dilution: : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=240,10 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ivity
2.568	0.71	126.47984	33.98885	1.04	0.0533	12841	-	-
2.932	0.95	47.18009	6.90884	0.82	0.0842	6724	3.12	1.34
3.767	1.51	60.61774	9.94395	1.14	0.0750	13978	6.16	1.58
5.930	2.95	294.72192	43.82387	1.06	0.1050	17670	14.12	1.95
11.333	6.56	178.28558	13.84133	0.87	0.1917	19368	11.40	2.22

$t_R$

$k'$

$h$

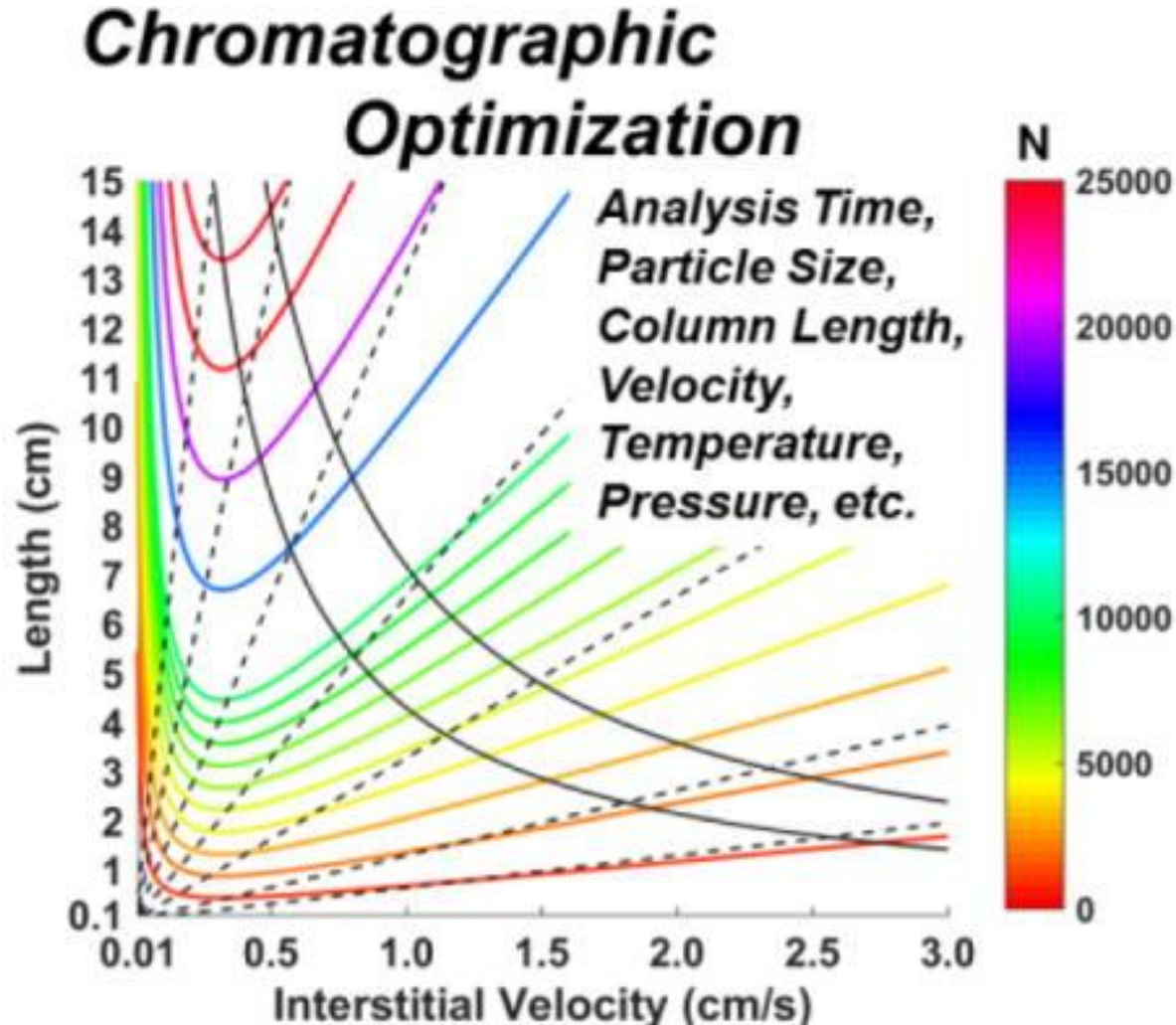
$w$

$N$

$\alpha$



# Optymalizacja chromatografii





# Optymalizacja chromatografii

---

- ▶ Najkrótszy możliwy czas chromatografowania dla uzyskania żądanego rozdziału:
  - Zmniejszenie wysokości półki teoretycznej
  - Zmniejszenie rozmiaru ziarna
  - Zmniejszenie średnicy kolumny
  - Optymalizacja przepływu i temperatury



# Optymalizacja chromatografii - HPLC

---

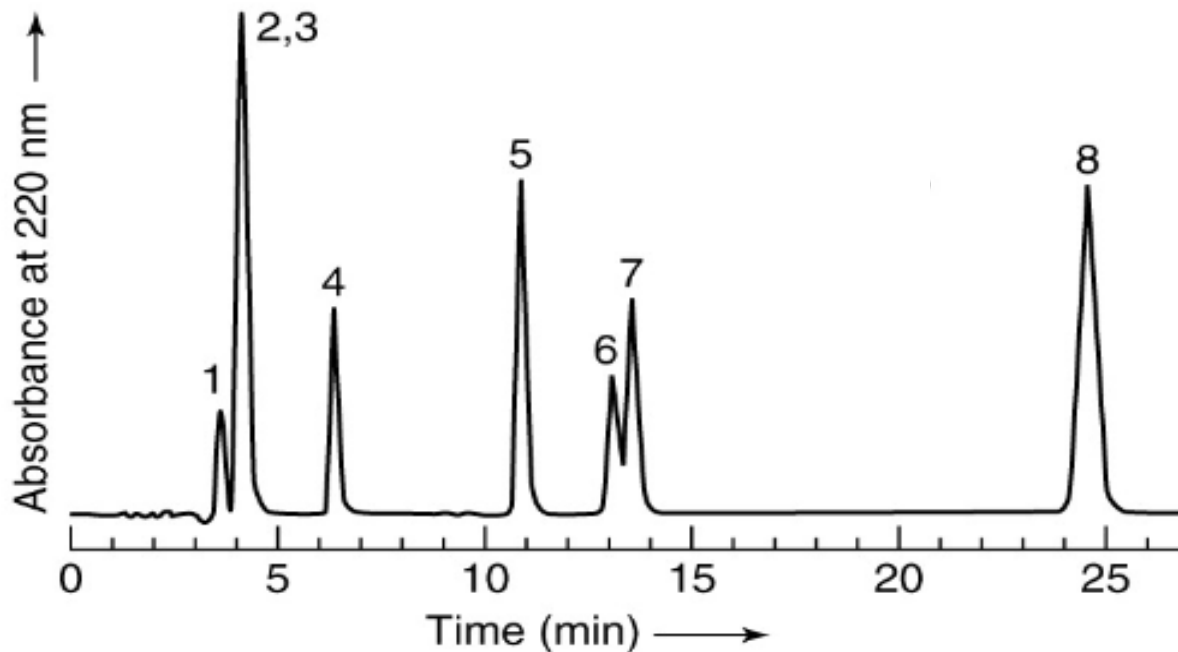
- Optymalizacja elucji
  - skład eluentu ( $H_2O$ , ACN, MeOH, THF)
  - stosunek % rozpuszczalników w eluencie
  - rodzaj elucji (izokratyczna, gradientowa, skokowa)
- Optymalizacja czasu chromatografowania
- Optymalizacja przepływu



# Ocena chromatogramu

---

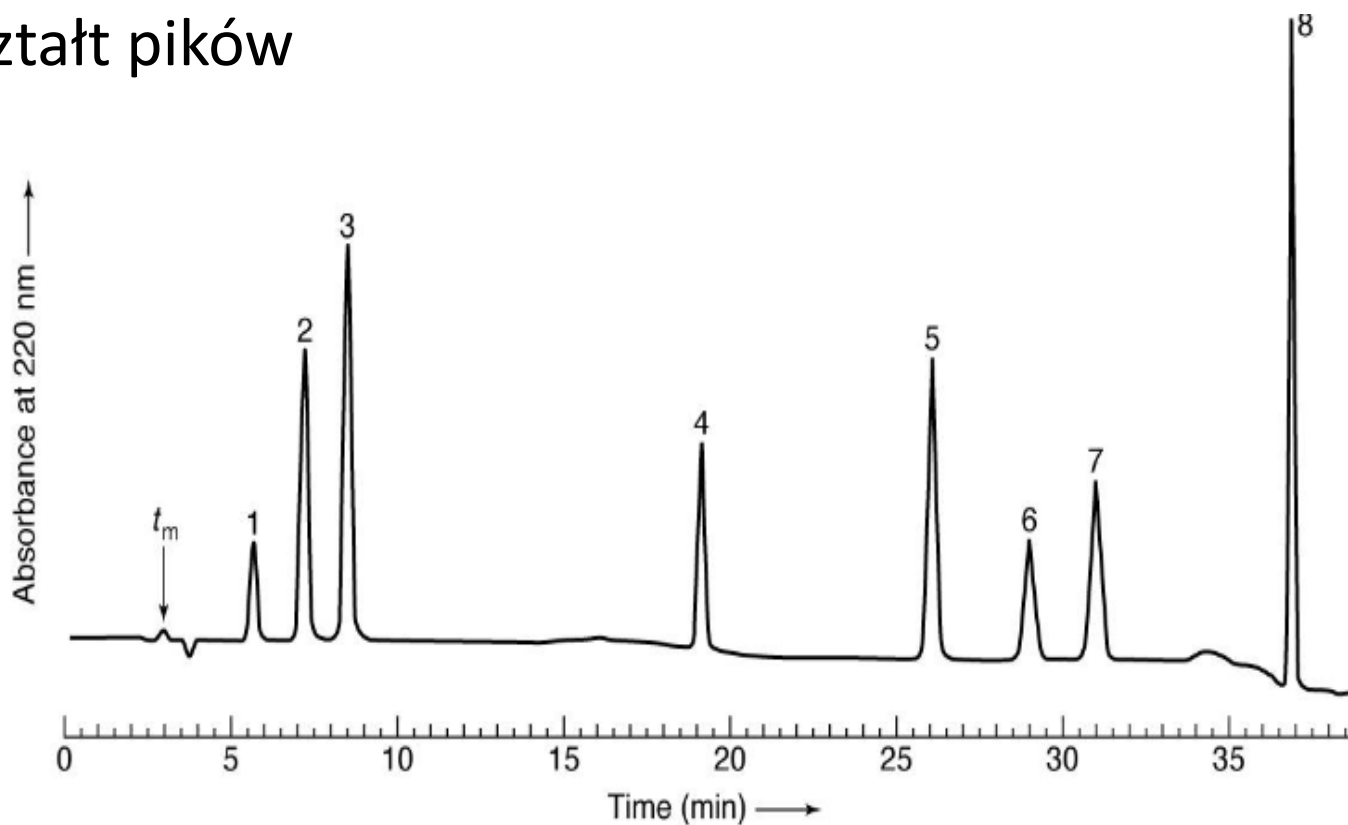
1. Odpowiednia rozdzielczość
2. Krótki czas analizy/rozdziatu
3. Kształt pików



# Ocena chromatogramu

---

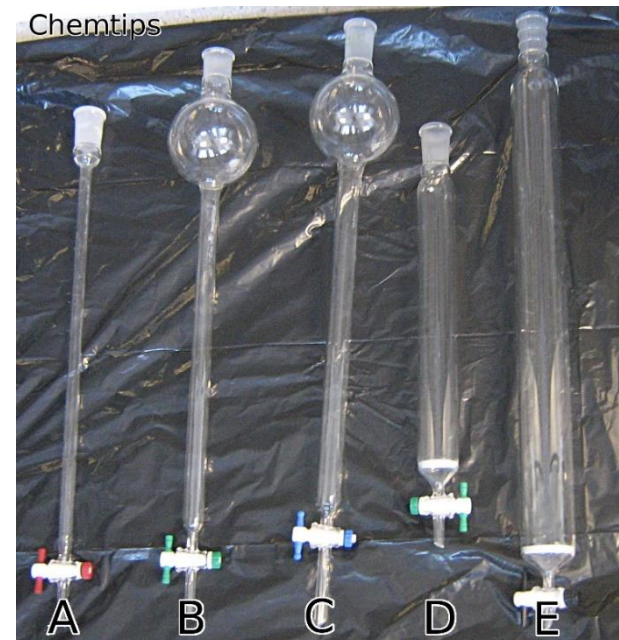
1. Odpowiednia rozdzielczość
2. Krótki czas analizy/rozdziatu
3. Kształt pików



# Optymalizacja chromatografii-kolumnowa grawitacyjna

---

- Optymalizacja elucji
  - skład eluentu ( $H_2O$ , ACN, MeOH, THF)
  - stosunek % rozpuszczalników w eluencie
  - rodzaj elucji (izokratyczna, gradientowa, skokowa)
  
- Optymalizacja wielkości kolumny



# Podsumowanie

---

- ▶ Rozdział chromatograficzny jest dobrze opisany w miarę prostymi teoriami.
- ▶ Opisywane zależności ułatwiają optymalizację procesu chromatografii.

