

# Metody chromatograficzne w chemii i biotechnologii, **wykład 3**

Monika Szefczyk  
Łukasz Berlicki

# Chromatografia

---

- ▶ Chromatografia to technika analityczna (oznaczanie ilości związku, określenie czystości analitu, śledzenie postępu reakcji) lub preparatywna (rozdzielanie składników mieszaniny, wyodrębnienie analitu).
- ▶ Dobór odpowiedniej techniki chromatograficznej zależy od zakładanego celu (analiza lub rozdział) oraz właściwości analitu.
- ▶ W zależności od parametrów układu, dana technika może mieć różne zastosowanie.

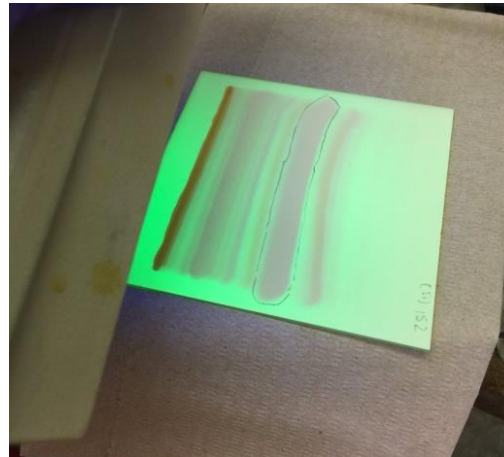
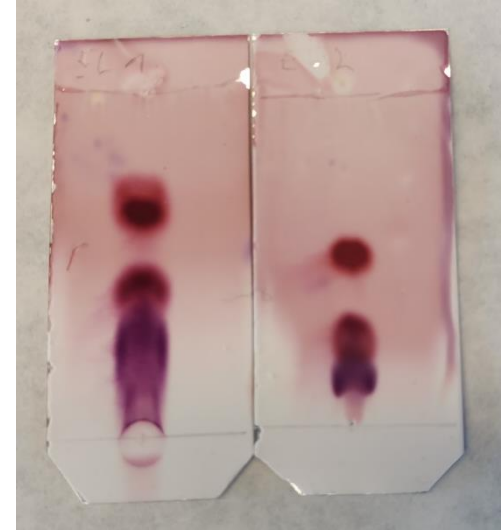


# Chromatografia

- Chromatografia cienkowarstwowa (*thin-layer chromatography, TLC*)

*zastosowanie analityczne*

*zastosowanie preparatywne*



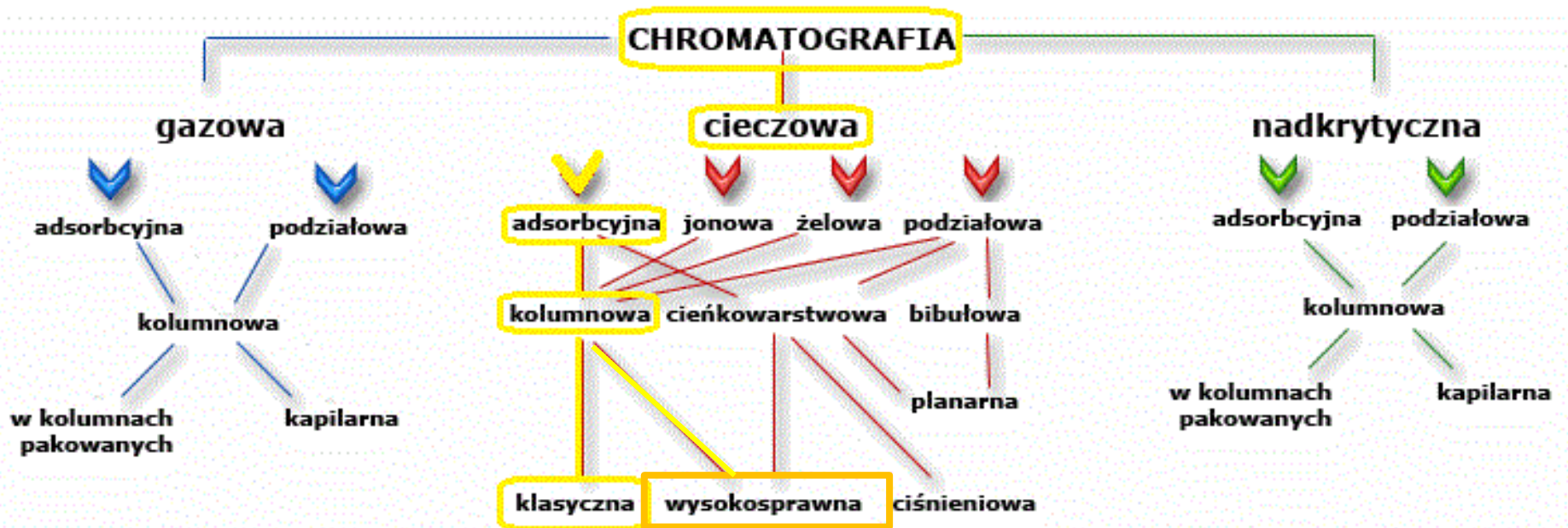
# Rozdział chromatograficzny

---

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



# Chromatografia

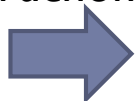


# Rozdział chromatograficzny

---

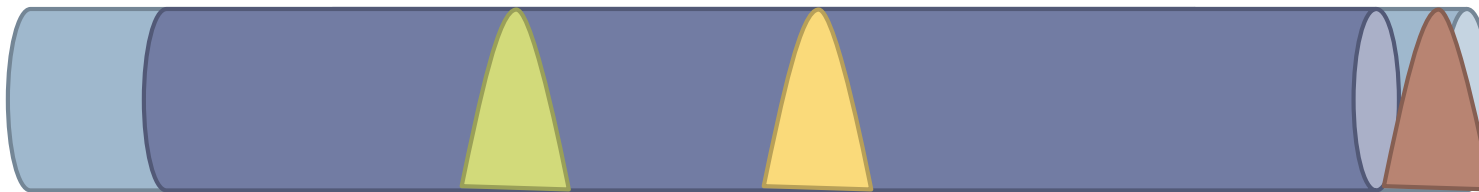
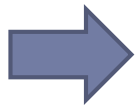
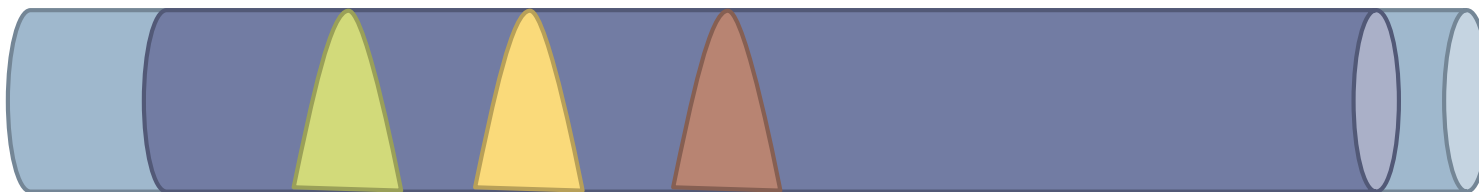
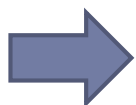
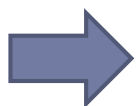
Przepływ

Faza ruchoma



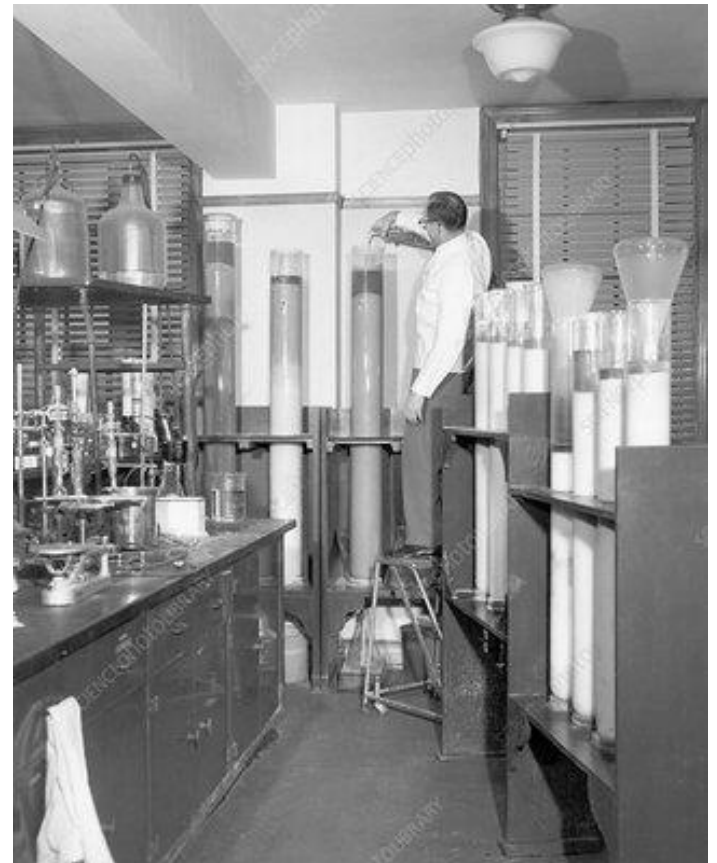
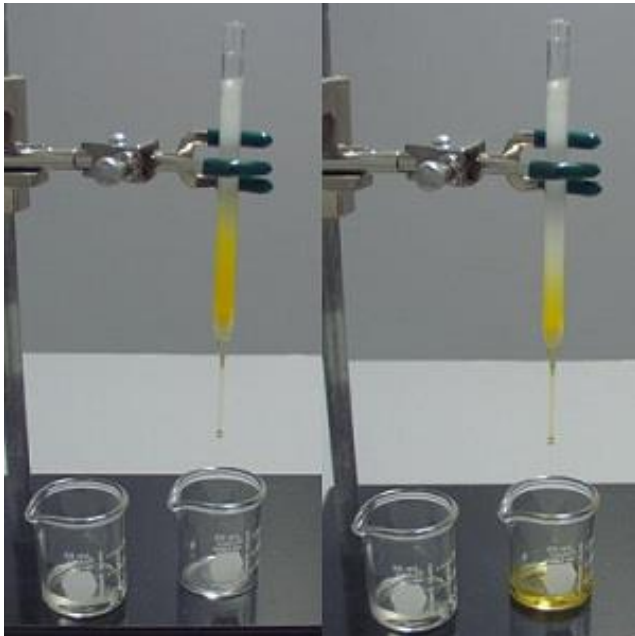
mieszanina

Faza stacjonarna



# Chromatografia cieczowa adsorpcyjną

- ▶ Faza stacjonarna:
  - ▶ Ciało stałe → chromatografia adsorpcyjna
- ▶ Faza ruchoma:
  - ▶ Ciecz → chromatografia cieczowa



# Układy chromatograficzne

---

- ▶ **Układ faz normalnych (*normal phase*):**
  - ▶ Faza stacjonarna jest bardziej polarna niż faza ruchoma
  - ▶ Np. w chromatografii kolumnowej grawitacyjnej lub chromatografii typu flash





# Układy chromatograficzne

---

- ▶ Układ faz odwróconych (*reverse phase*):
  - ▶ Faza stacjonarna jest mniej polarna niż faza ruchoma
  - ▶ Np. w wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami (RP-HPLC)



# Układ faz normalnych

---

- ▶ Faza stacjonarna:
  - ▶ Sole nieorganiczne:
    - ▶ krzemian magnezu,
    - ▶ węglan magnezu,
    - ▶ węglan wapnia
  - ▶ Tlenki nieorganiczne:
    - ▶ **tlenek krzemu - żel krzemionkowy, krzemionka,**
    - ▶ **tlenek glinu – alumina,**
    - ▶ tlenek cyrkonu,
    - ▶ tlenek tytanu,
    - ▶ tlenek magnezu



# Żel krzemionkowy

---

- ▶ Podstawowe cechy żelu krzemionkowego (silica gel):
  - duża porowatość, duża powierzchnia właściwa, silne właściwości adsorpcyjne (właściwości higroskopijne),
  - chemiczna obojętność,
  - wysoka wytrzymałość mechaniczna,
  - wytrzymałość na wysoką temperaturę (nawet do 900 °C).



# Żel krzemionkowy

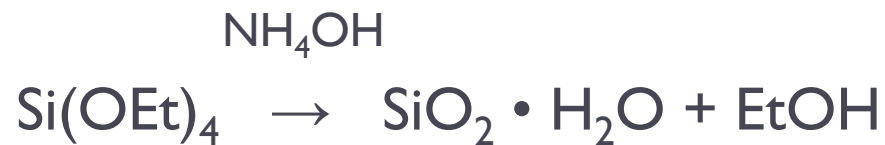
---

- ▶ Otrzymywanie

- ▶ Z wodnego roztworu krzemianu sodu



- ▶ Z alkoholanu krzemu



# Żel krzemionkowy jako złoże

---

## Zalety

- ▶ najtańszy
- ▶ szerokie zastosowanie

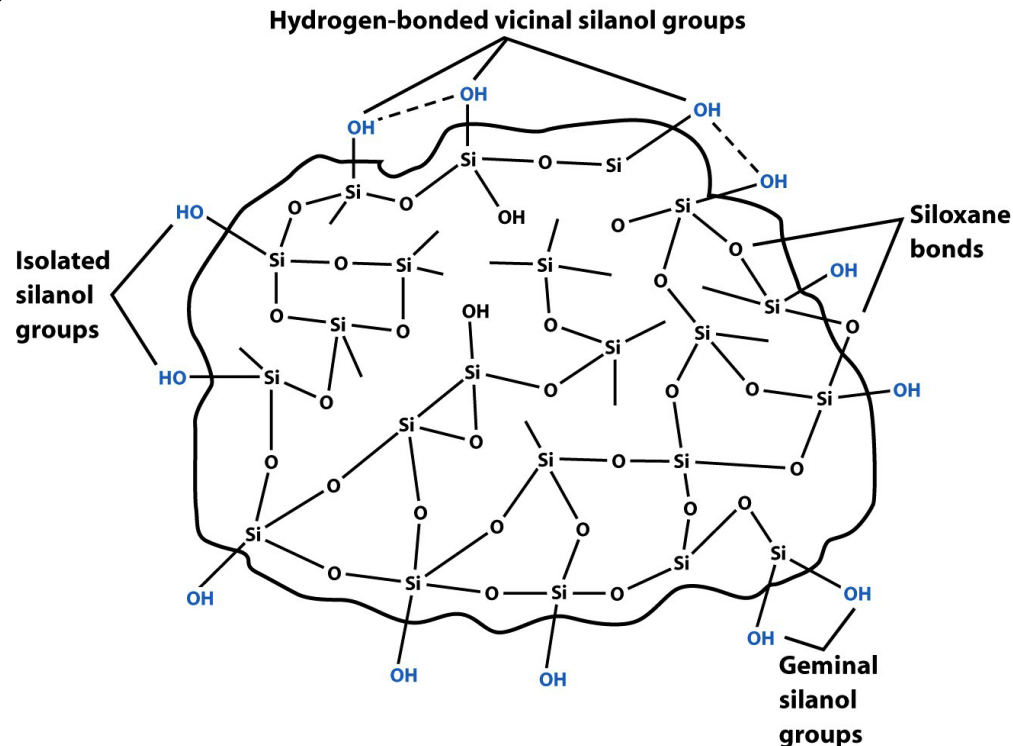
## Wady

- ▶ wrażliwy na wysokie pH ( $\text{pH} > 8$ )
- ▶ wrażliwy na wysokie stężenia alkoholu lub wodę



# Żel krzemionkowy

- ▶ Krzemionka jest polarnym adsorbentem o ogólnym wzorze sumarycznym  $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ . Jest to materiał porowaty i amorficzny o bardzo rozwiniętej powierzchni właściwej od 200 do 800  $\text{m}^2/\text{g}$ .



# Żel krzemionkowy

---

- ▶ Na powierzchni żelu krzemionkowego znajdują się grupy:

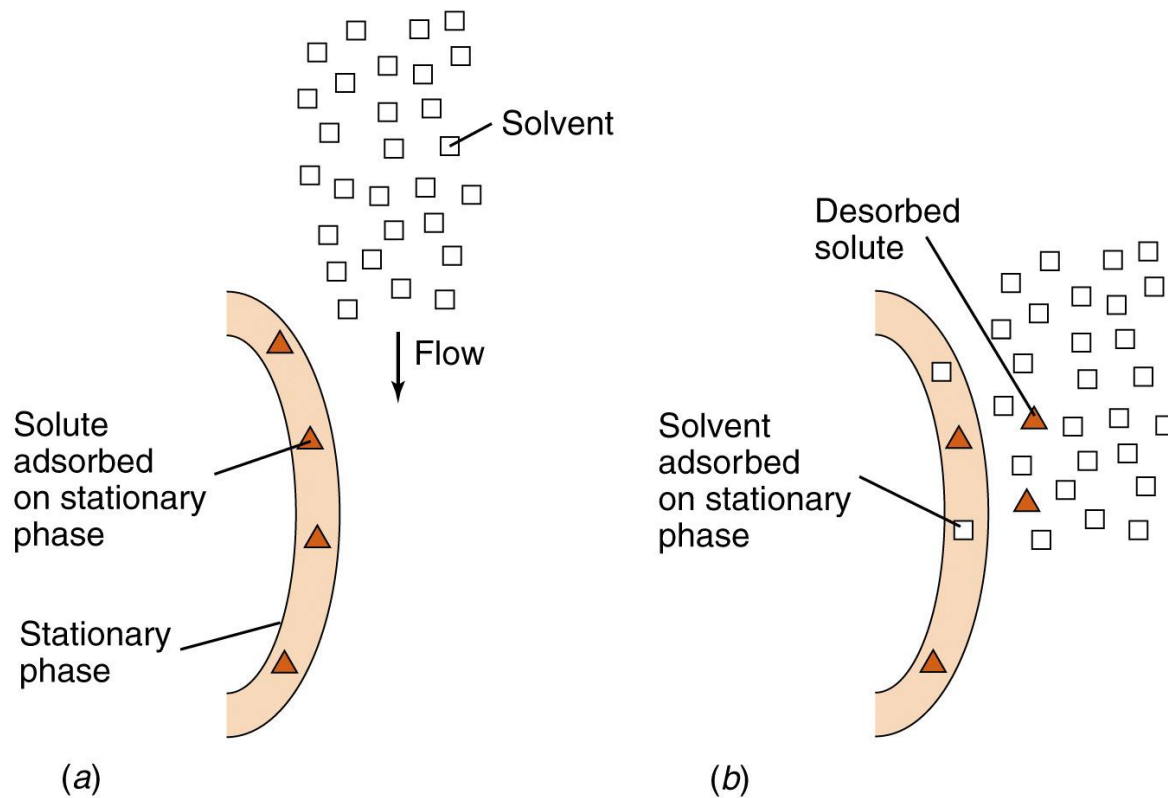


- ▶ Obecność przede wszystkim polarnych grup silanolowych powoduje, że jest on polarną fazą stacjonarną. Właściwości różnych grup silanolowych zależą od wzajemnej odległości i przestrzennego rozmieszczenia.
  - ▶ Żel krzemionkowy można modyfikować odpowiednimi metodami syntezy.
- 



# Żel krzemionkowy

---



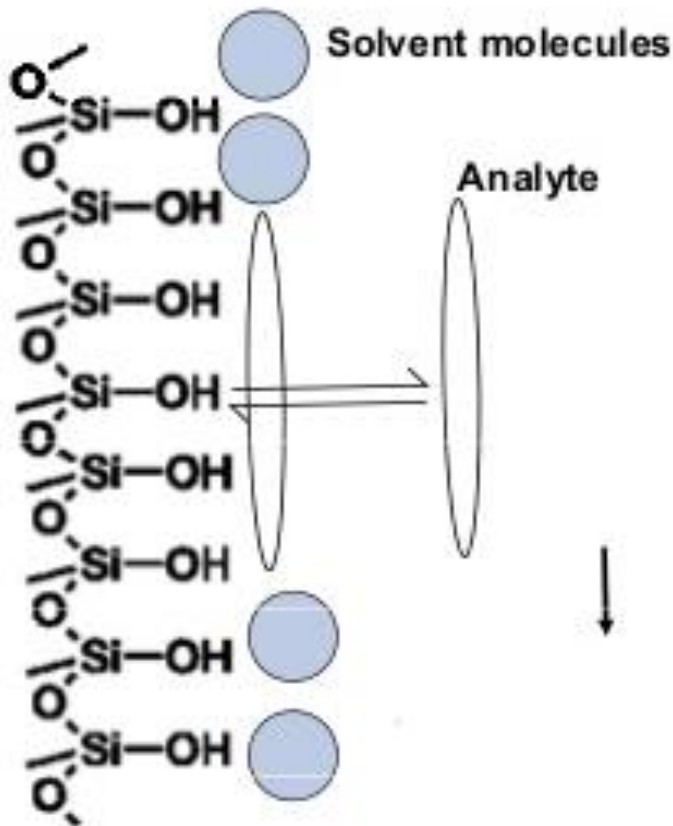
Substancja rozdzielana wymienia cząsteczki rozpuszczalnika na powierzchni krzemionki.





# Żel krzemionkowy

---

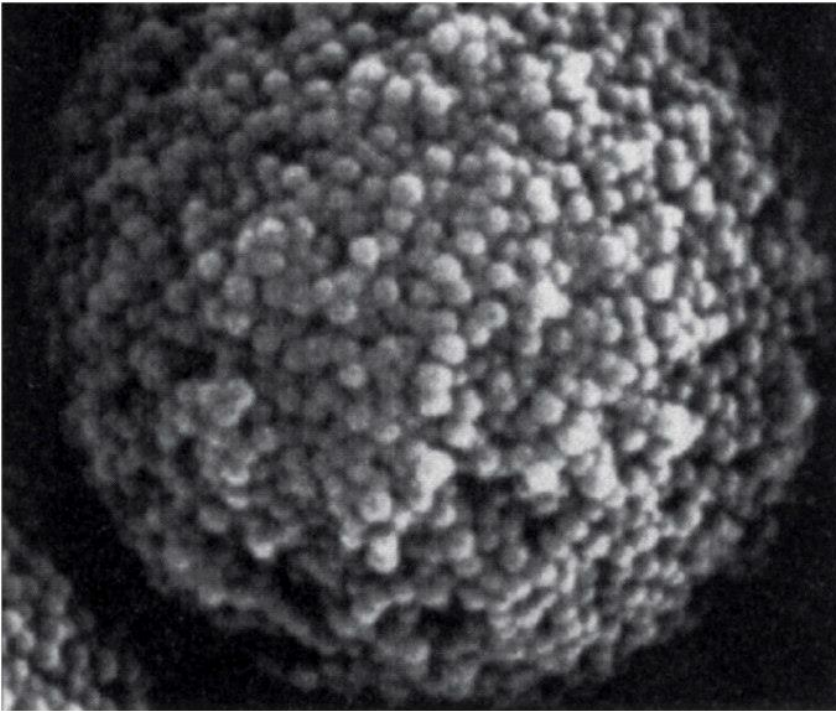


Siła elucji zależy od zdolności rozpuszczalnika do tworzenia wiązań wodorowych z krzemionką.

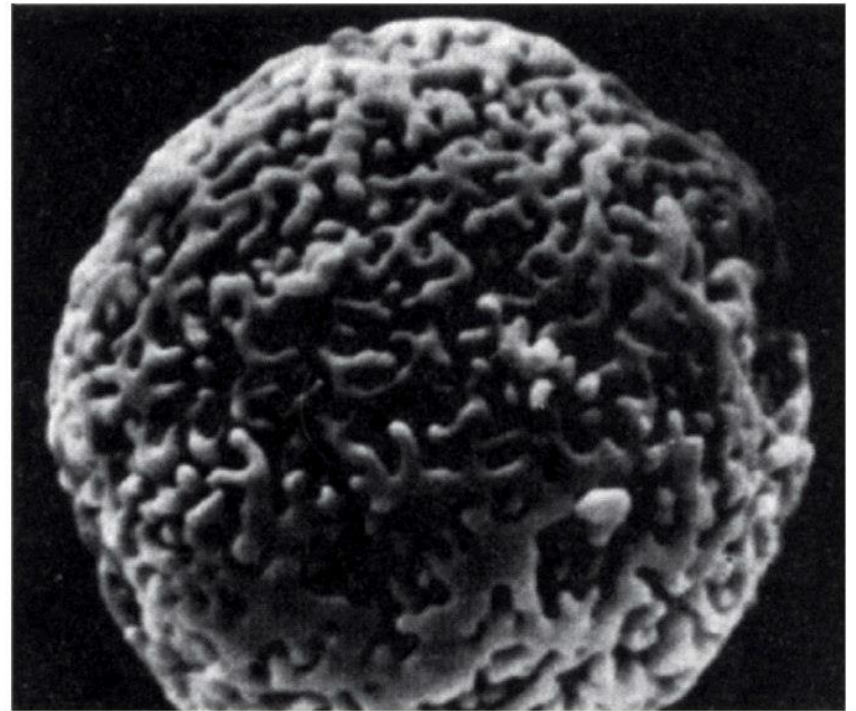


# Żel krzemionkowy

---



porowatość 50 %;  $S = 150 \text{ m}^2/\text{g}$



porowatość 70%;  $S = 300 \text{ m}^2/\text{g}$



# Żel krzemionkowy

60741 SIGMA-ALDRICH

## Silica gel

high-purity grade, pore size 60 Å, 70-230 mesh, 63-200 μm, for column chromatography

❖ KARTA CHARAKTERYSTYKI SUBSTANCJI CHEMICZNEJ

SIMILAR PRODUCTS

CAS Number 112926-00-8

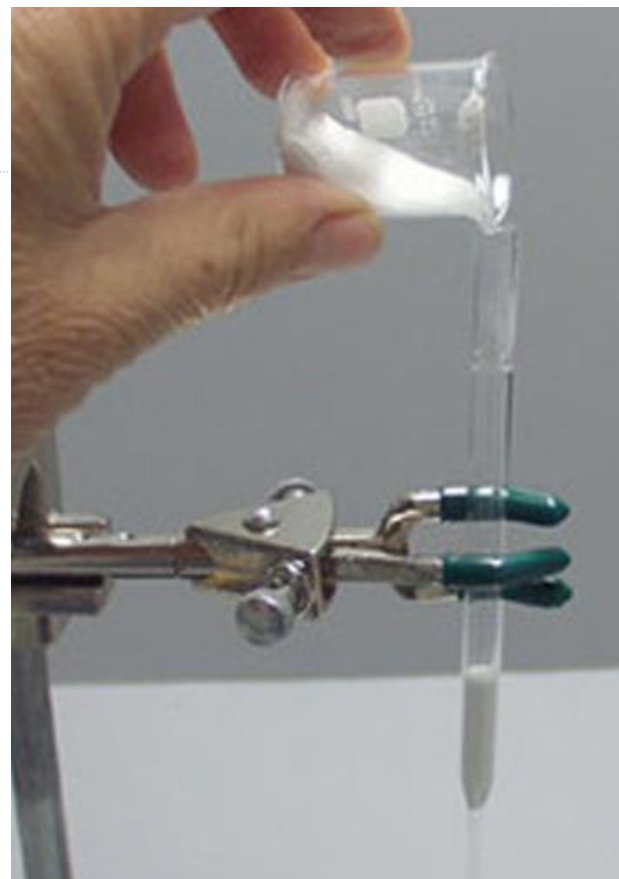
EC Number 231-545-4

MDL number MFCD00011232

PubChem Substance ID 24881958

**Skala mesh** jest powszechnie używana do określania wielkości ziarna materiałów sypkich. Numer ziarna w tej skali oznacza ilość oczek sita na długości jednego cala, przez które materiał się przesypał a zatrzymał na kolejnym sicie o mniejszych oczkach, np.:

| nr ziarna<br>[mesh] | średnia wielkość<br>[μm] |
|---------------------|--------------------------|
| 70                  | 200                      |
| 230                 | 63                       |



# Żel krzemionkowy

## Kolumny do chromatografii Flash

Wielkość ziarna: 15, 30 50  $\mu\text{m}$

Wielkość porów: 60 Å

Powierzchnia: 500  $\text{m}^2/\text{g}$

Stabilność pH: 1.5 – 6.5

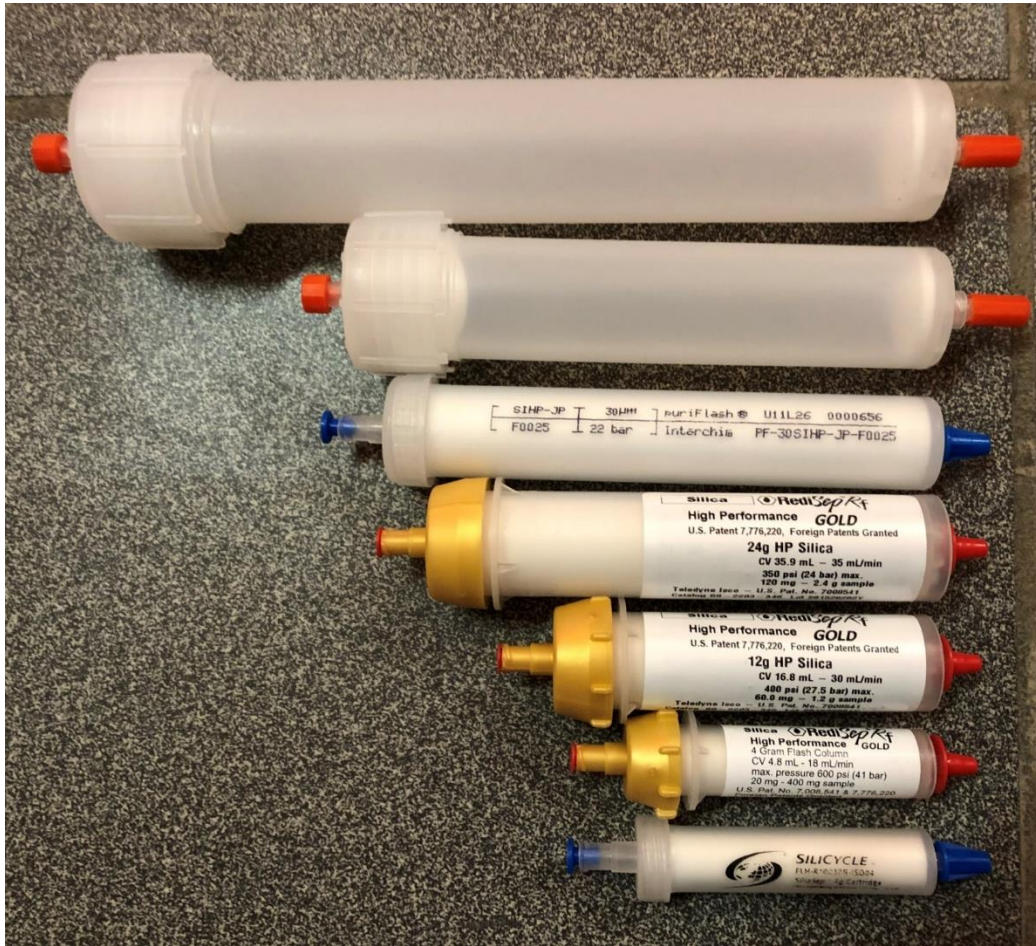
Ciśnienie do 22 bar



| Numer produktu  | Opis   |
|-----------------|--|
| <b>FCISI004</b> | 40-63 $\mu\text{m}$ , matrix active group silica, bed wt. 4 g, for use with Isco and Analogix flash systems  |
| <b>FCISI012</b> | 40-63 $\mu\text{m}$ , matrix active group silica, bed wt. 12 g, for use with Isco and Analogix flash systems |
| <b>FCISI025</b> | 40-63 $\mu\text{m}$ , matrix active group silica, bed wt. 25 g, for use with Isco and Analogix flash systems |
| <b>FCISI040</b> | 40-63 $\mu\text{m}$ , matrix active group silica, bed wt. 40 g, for use with Isco and Analogix flash systems |
| <b>FCISI080</b> | 40-63 $\mu\text{m}$ , matrix active group silica, bed wt. 80 g, for use with Isco and Analogix flash systems |



# Żel krzemionkowy



# Żel krzemionkowy

## Kolumny do HPLC modyfikowana krzemionka



| Nazwa                | Producent         | wielkość ziarna ( $\mu\text{m}$ ) | Wielkość porów ( $\text{\AA}$ ) | Powierzchnia ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) |
|----------------------|-------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--|
| ACE                  | ACT               | 3, 5, 10                          | 100                             | 300                                    |
| Chromolith           | Merck             |                                   |                                 |  |
| Exsil                | Grace Davison     | 3, 5, 10                          | 100                             | 200                                    |
| Genesis              | Thermo Scientific | 4, 7, 15                          | 120                             | 170                                    |
| Hypersil GOLD Silica | Thermo Scientific | 1.9, 3, 5                         | 175                             | 220                                    |
| Kromasil             | Eka Chemicals     | 1 3.5, 5, 7, 10                   | 60, 100                         | 540, 320                               |
| LiChrosorb           | Merck             | 5, 10                             | 60, 100                         | 490, 300                               |
| NUCLEOSIL            | Macherey-Nagel    | 3, 5, 10                          | 100, 120                        | 350, 200                               |



# Żel krzemionkowy

---



# Żel krzemionkowy

---

## ▶ Wielkość ziarna a ciśnienie

$$p = f \frac{u_x \eta L}{\pi r^2 d_p^2}$$

$p$  – **ciśnienie**

$f$  – czynnik opisujący kształt ziaren

$u_x$  – przepływ

$\eta$  – lepkość

$L$  – długość kolumny

$r$  – promień kolumny

$d_p$  – rozmiar ziarna

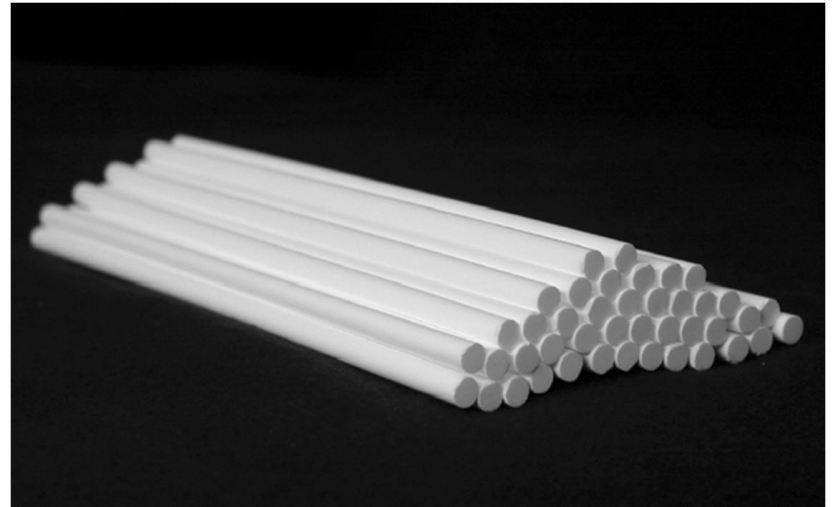




# Kolumny monolityczne

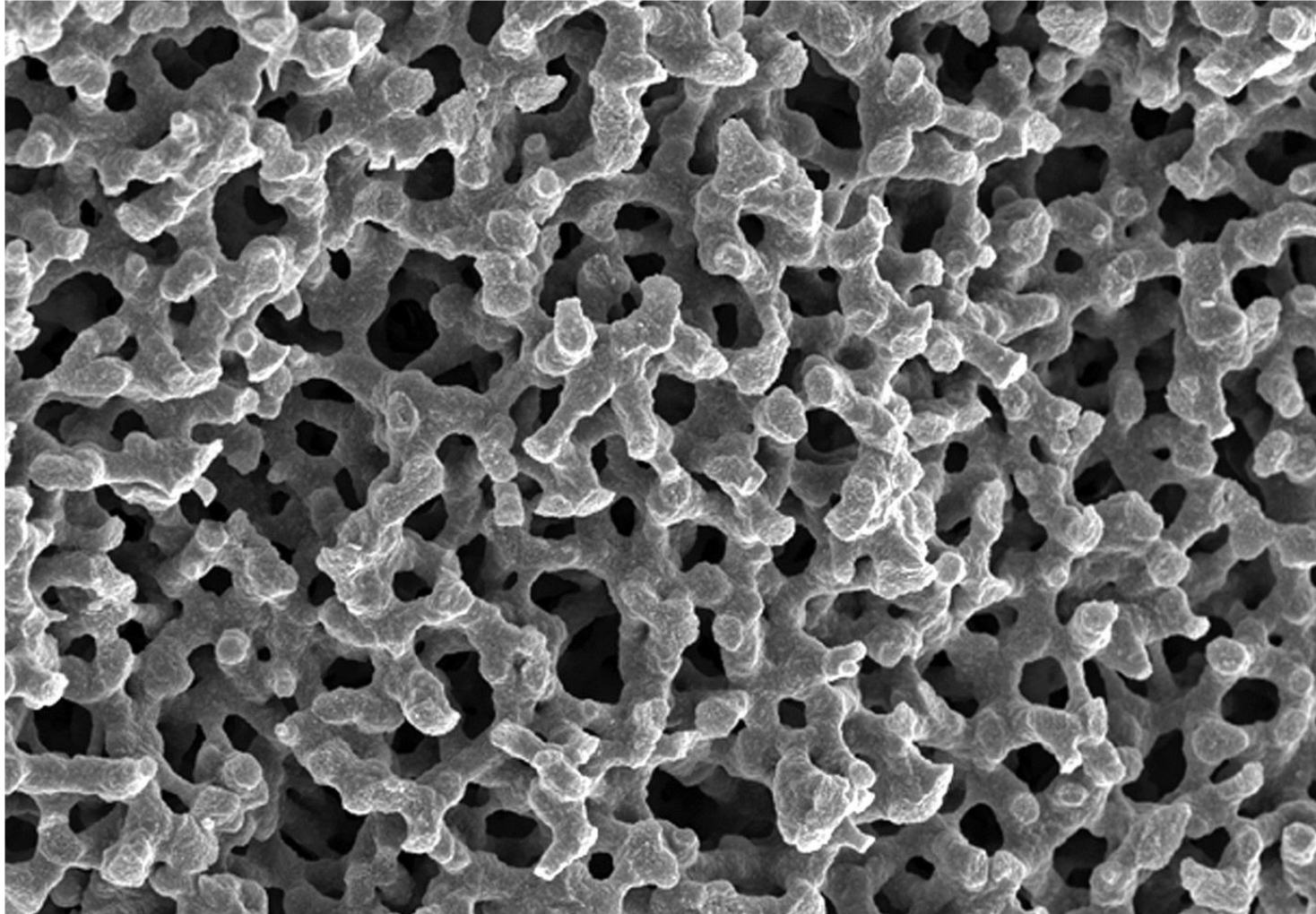
---

- ▶ Złoże monolityczne - ciągła, jednolita struktura porowata, w postaci szkieletu połączeń, sporządzona poprzez polimeryzację lub zespolenie w inny sposób (spieczenie, osadzenie, skompresowanie) materiału wewnątrz kapilary posiadająca własności chromatograficzne.
- ▶ Jednorodne kawałki żelu krzemionkowego
- ▶ Makropory  $2\ \mu\text{m}$
- ▶ Mezopory  $13\ \text{nm}$
- ▶ Powierzchnia ok.  $300\ \text{m}^2/\text{g}$
- ▶ Porowatość 80%



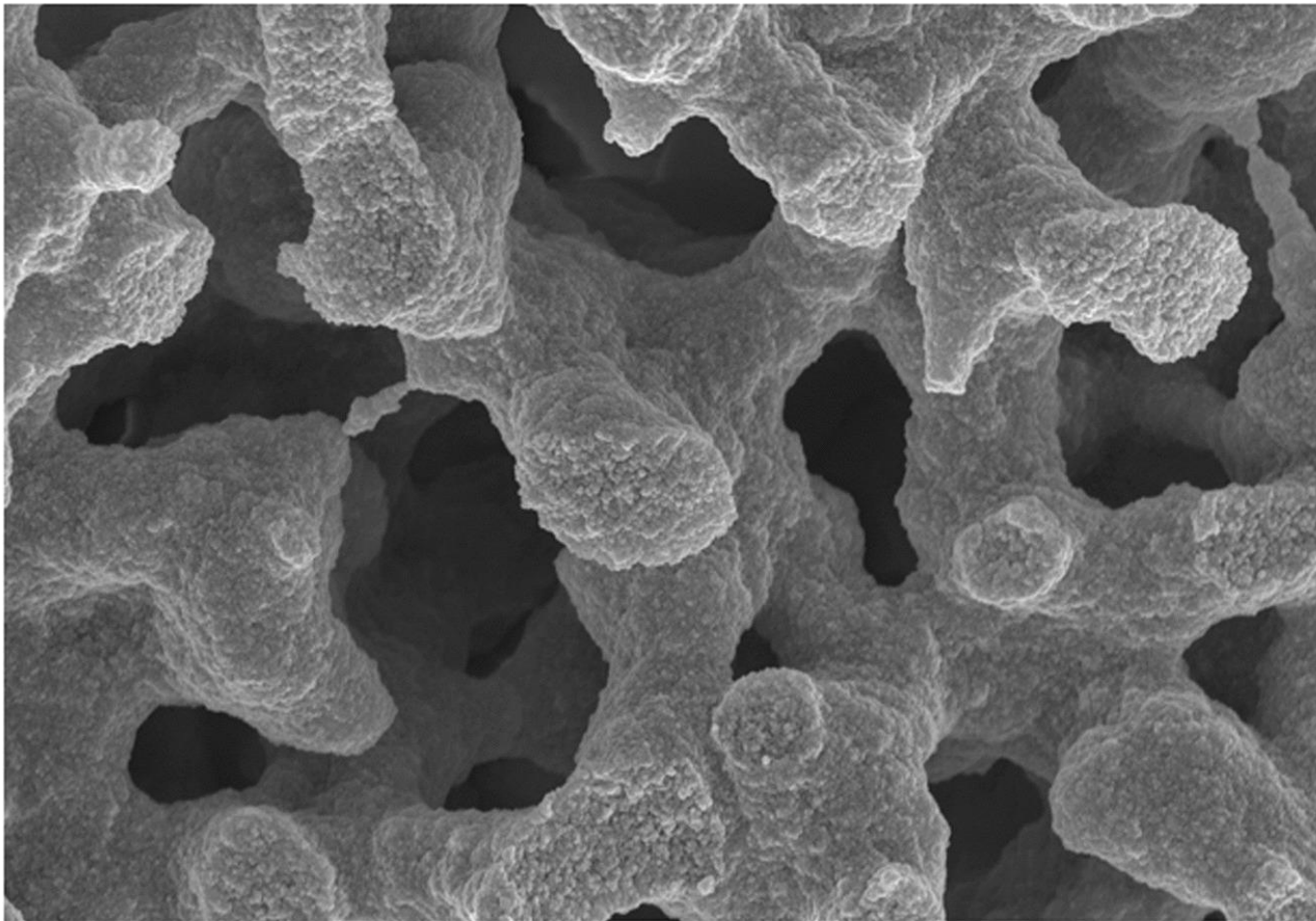
# Kolumny monolityczne

---



# Kolumny monolityczne

---



00019035

— 5 μm



# Kolumny monolityczne

---

## ▶ Zalety:

- ▶ zwiększona przepuszczalność dla rozpuszczalników,
- ▶ mniejsza wysokość półki teoretycznej,
- ▶ selektywność podobna do pakowanych kolumn,
- ▶ możliwe wyższe przepływy.

## ▶ Wady:

- ▶ niska dostępność.



# Kolumny monolityczne

---



## MilliporeSigma™ Chromolith™ SemiPrep Monolithic HPLC Columns

Patented, monolithic silica technology allows ultra-fast and robust separations using standard HPLC systems

**\$2121.00 - \$2465.00**

### Specifications

|                   |                       |
|-------------------|-----------------------|
| Diameter (Metric) | 10 mm                 |
| Length (Metric)   | 100 mm                |
| Porosity          | >80%                  |
| Quantity          | 1/Pk.                 |
| Surface Area      | 300 m <sup>2</sup> /g |

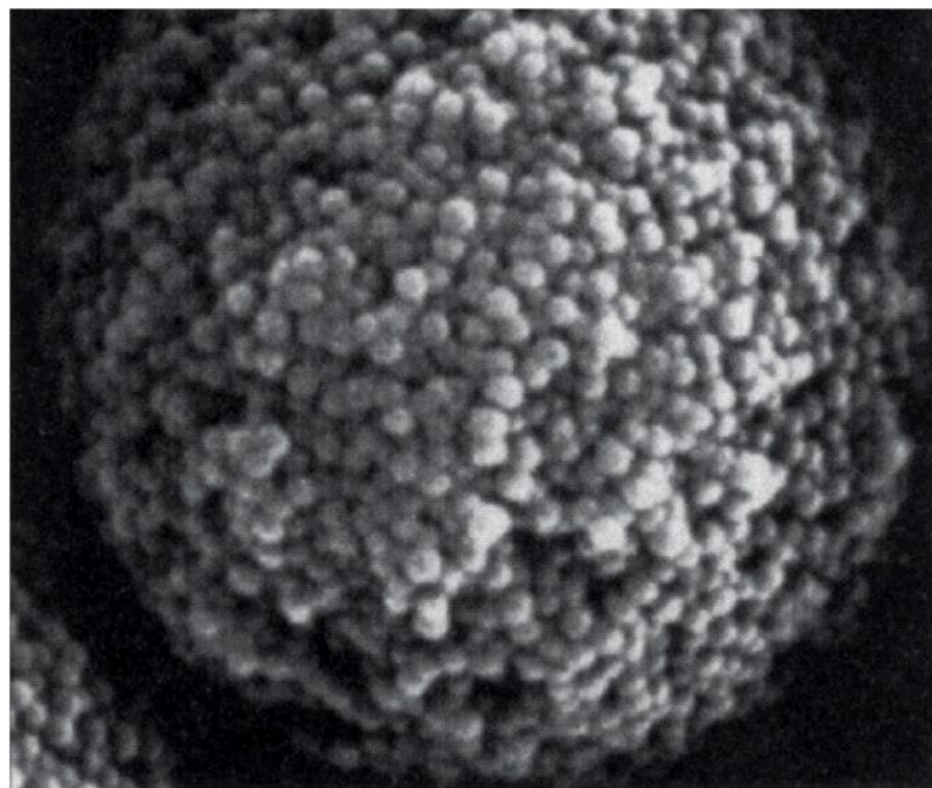
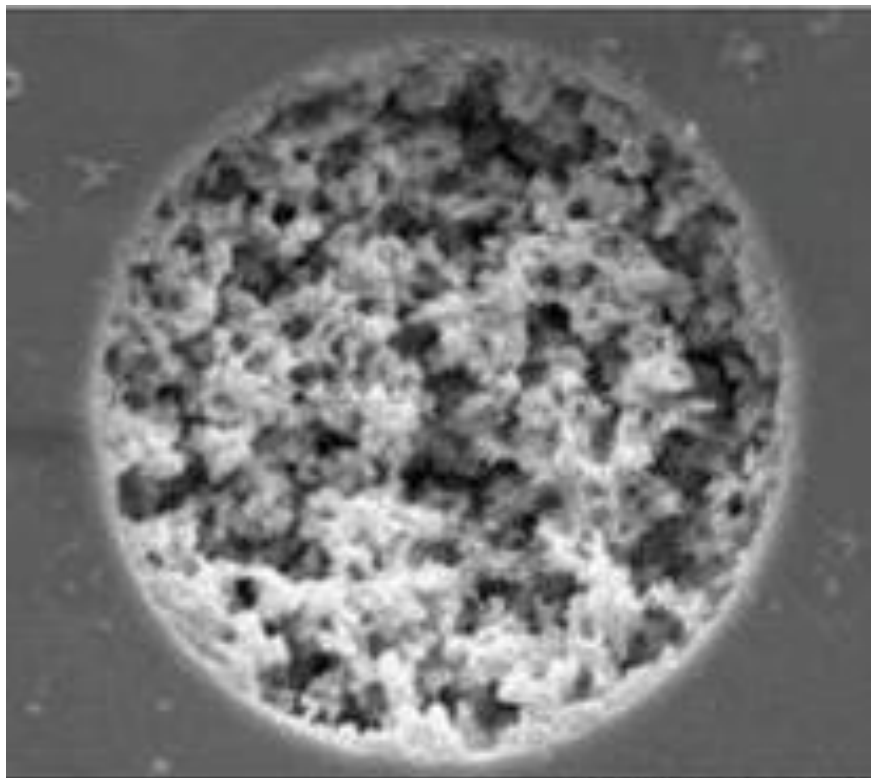
[View More Specs](#)

---



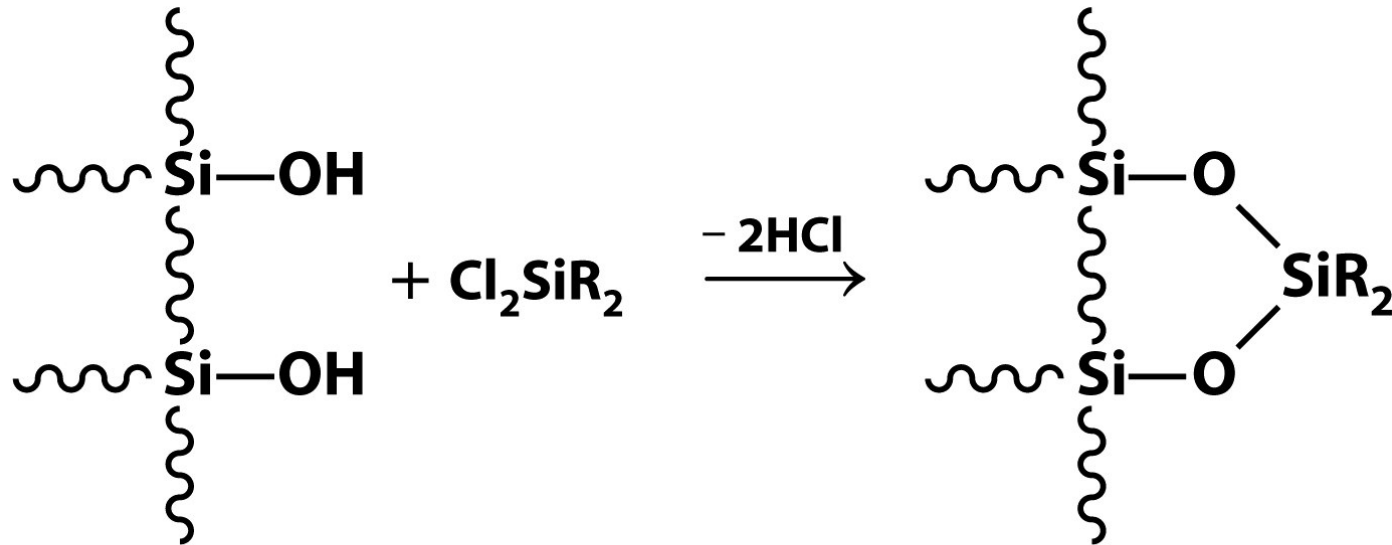
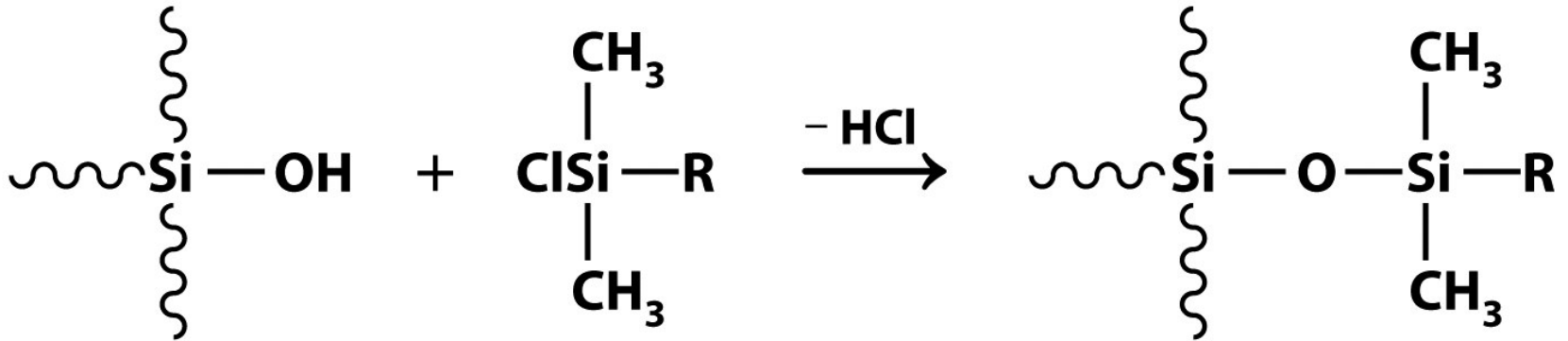
# Monolit *vs* żel krzemionkowy

---



# Modyfikowany żel krzemionkowy

---

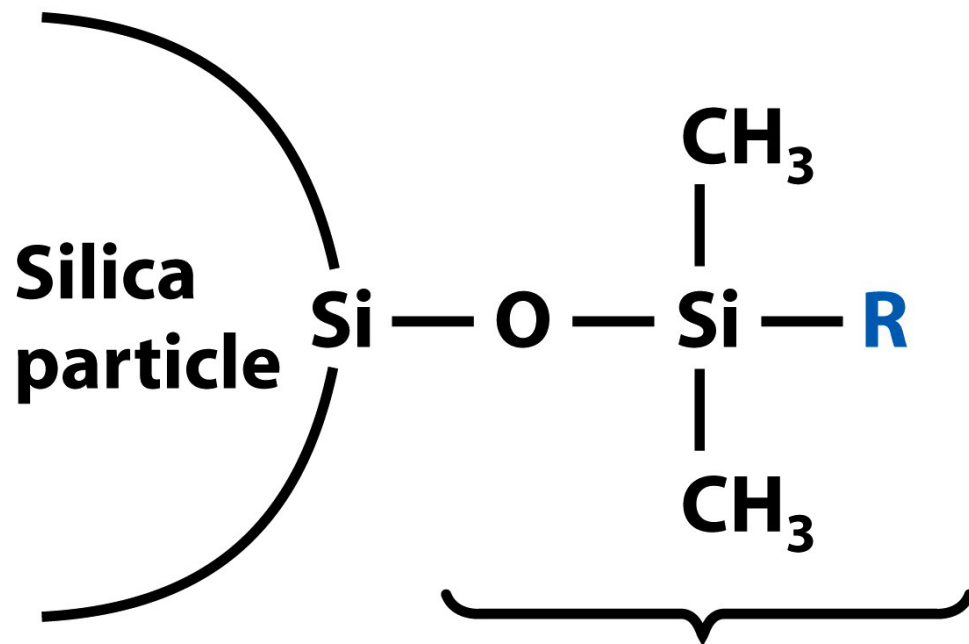


Silica  
surface



# Modyfikowany żel krzemionkowy

---



Związana faza stacjonarna





# Modyfikowany żel krzemionkowy

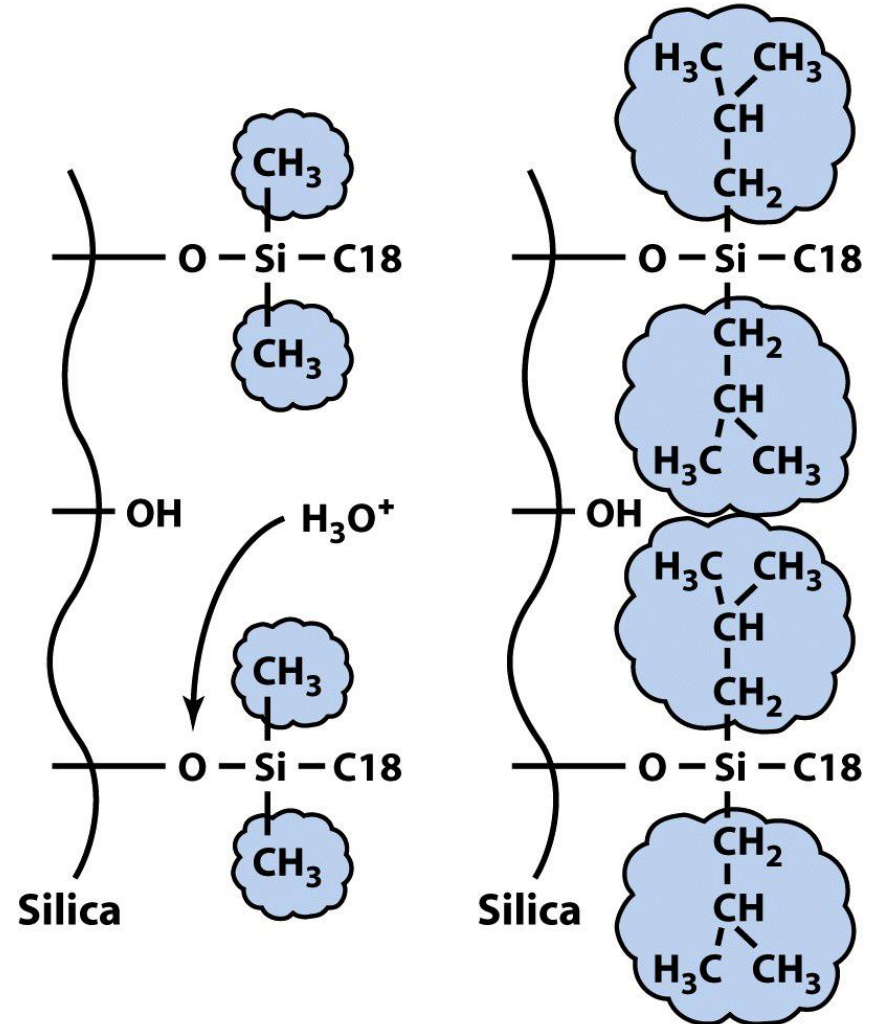
---

| Rodzaj modyfikacji | Grupa funkcyjna  | Skrót    |
|--------------------|--|----------|
| n-alkany           | $-\text{CH}_2\text{CH}_3$  | C2       |
|                    | $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$                           | C4       |
|                    | $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$                           | C8       |
|                    | $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$                        | C18      |
| fenyl              | $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n\text{C}_6\text{H}_5$                  | Fenylowa |
| cyjanopropyl       | $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CN}$                             | cyjanowa |
| perfluoroalkan     | $-\text{CH}_2(\text{CF}_2)_n\text{CF}_3$                           |          |
| amid               | $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ |          |



# Modyfikowany żel krzemionkowy

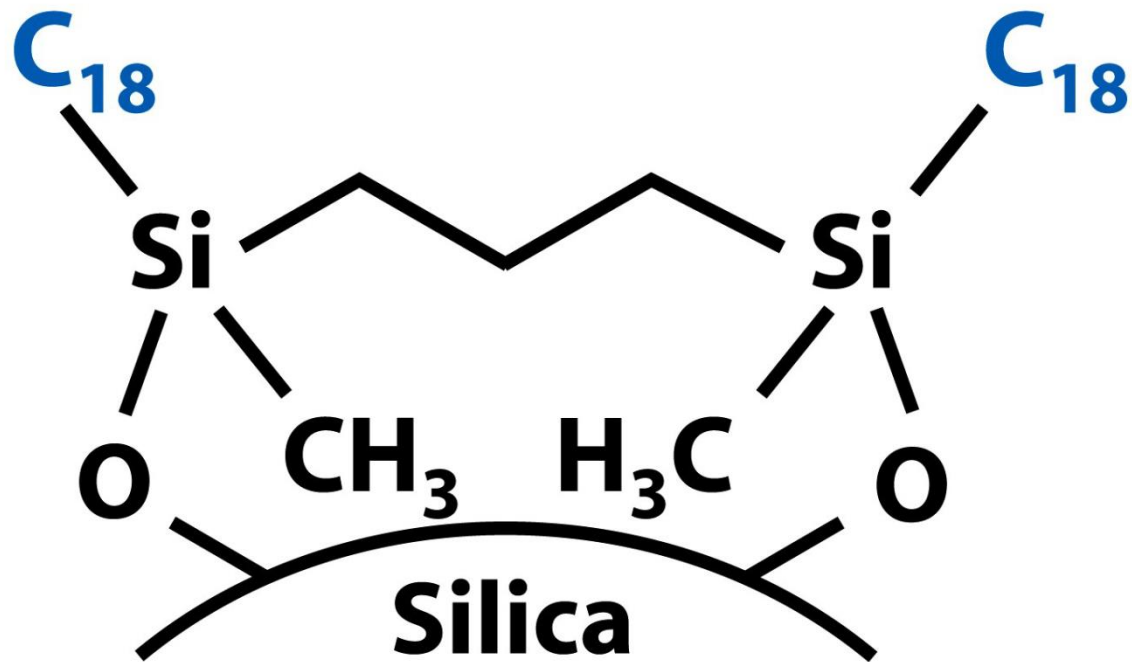
- ▶ Pochodne z grupami metylowymi są wrażliwe na niskie pH.
- ▶ Grupy izobutylowe zwiększają stabilność w niskim pH.



# Modyfikowany żel krzemionkowy

---

- ▶ Podwójne przyłączenie grup siloksanowych powoduje ich stabilność w zakresie pH 2-11.5



# Układ faz odwróconych

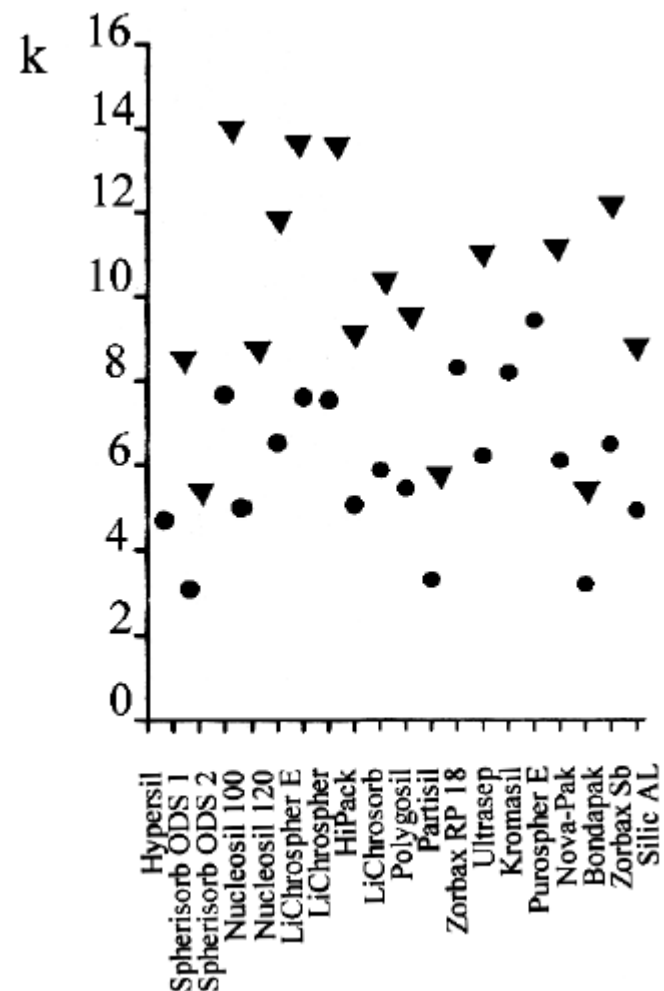
---

- ▶ **W układzie faz odwróconych (RP) faza ruchoma jest bardziej polarna niż faza stacjonarna.**
- ▶ Najbardziej typowym przykładem fazy stacjonarnej jest C18.



# Układ faz odwróconych

- ▶ Sposób otrzymywania modyfikowanego żelu krzemionkowego ma bardzo duży wpływ na retencję.
- ▶ Współczynniki retencji toluenu i etylobenzenu dla różnych faz C18.



# Rozpuszczalniki

---

- ▶ Cechy dobrego eluenta:
  - odpowiednia lepkość,
  - kompatybilność z detektorem,
  - dostępność o czystości wymaganej w chromatografii,
  - mała toksyczność,
  - niski koszt,
  - brak reaktywności z fazą stacjonarną i analitami.

Thermo Scientific™

## Pierce™ Acetonitrile (ACN), LC-MS Grade

Catalog number: 51101

Related applications: [Protein Mass Spectrometry Analysis](#)

[Technical Support](#) | [Customer Service](#)

|   | Catalog Number | Unit Size | Price (PLN)                                     |
|---|----------------|-----------|---|
| ✓ | 51101          | 1 L       | 428,00<br>Your Price: <a href="#">Sign In</a> ⓘ |



# Rozpuszczalniki

---

- ▶ Rozpuszczalniki można uporządkować zgodnie z ich siłą elucji, która wyrażona jest parametrem  $\varepsilon^0$ .
- ▶  $\varepsilon^0 = 0$  przyjęto dla oddziaływania pentanu z adsorbentem.
- ▶ Siła elucji:
  - ▶ charakteryzuje energię oddziaływania rozpuszczalnika z fazą stacjonarną,
  - ▶ jest proporcjonalna do polarności rozpuszczalnika,
  - ▶ zależy od adsorbentu.



# Rozpuszczalniki

---

- ▶ Rozpuszczalniki sklasyfikowane według mocy elucyjnej nazywamy **szeregiem eluotropowym** rozpuszczalników

| Rozpuszczalnik             | $\epsilon^0$ |
|----------------------------|--------------|
| pentan, heksan,oktan       | 0,00         |
| chloroform                 | 0,26         |
| chlerek etylenu            | 0,30         |
| eter di-izo-propylowy      | 0,32         |
| 1,3 dichloroetan           | 0,34         |
| eter di-etylowy            | 0,38         |
| eter metylo-terta butylowy | 0,48         |
| octan etylu                | 0,48         |
| dioksan                    | 0,51         |
| acetonitryl                | 0,52         |
| 1-lub 2- propanol          | 0,60         |
| metanol                    | 0,70         |
| kwas octowy                | duża         |
| woda                       | b. duża      |





# Rozpuszczalniki

---

- ▶ Mieszanki rozpuszczalników o sile elucji  $\varepsilon^0 = 0,4$  na żelu krzemionkowym:
  - ▶ 40 % tetrahydrofuranu w heksanie,
  - ▶ 50 % octanu etylu w heksanie,
  - ▶ 15 % izopropanolu w heksanie,
  - ▶ 50 % octanu etylu dichlorometanie.



# Rozpuszczalniki

---

- ▶ Współczynnik retencji jest zależny od składu fazy ruchomej:

$$\log k = c - n \log (\% B)$$

c, n - stałe

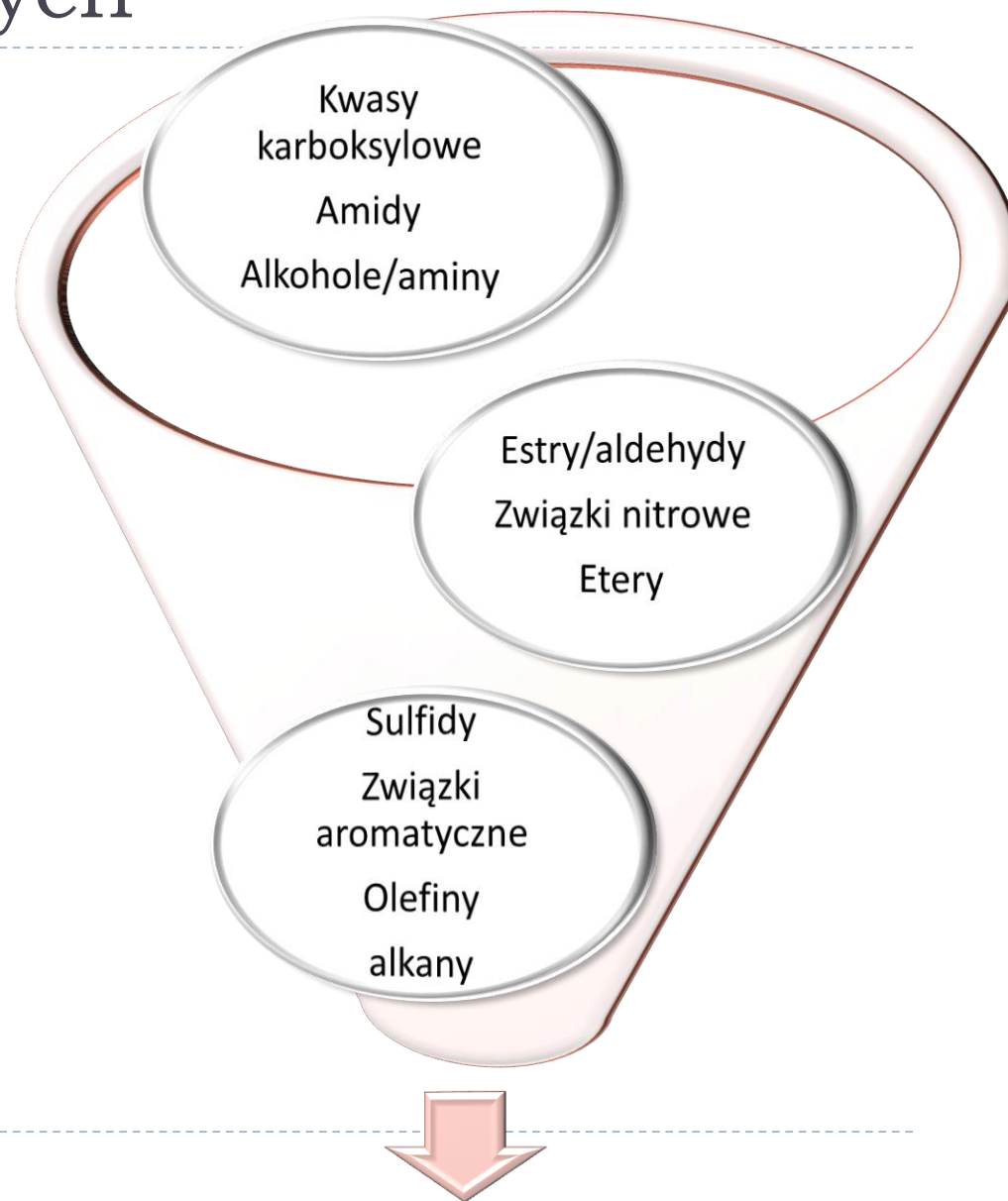
%B – zawartość rozpuszczalnika bardziej polarnego

- ▶ **Im więcej składnika polarnego w fazie ruchomej tym mniejszy współczynnik retencji.**



# Układ faz normalnych

- Kolejność elucji związków z żelu krzemionkowego zależy od ich polarności.
- **Im bardziej polarny związek tym wolniej będzie eluował.**



# Układ faz odwróconych

---

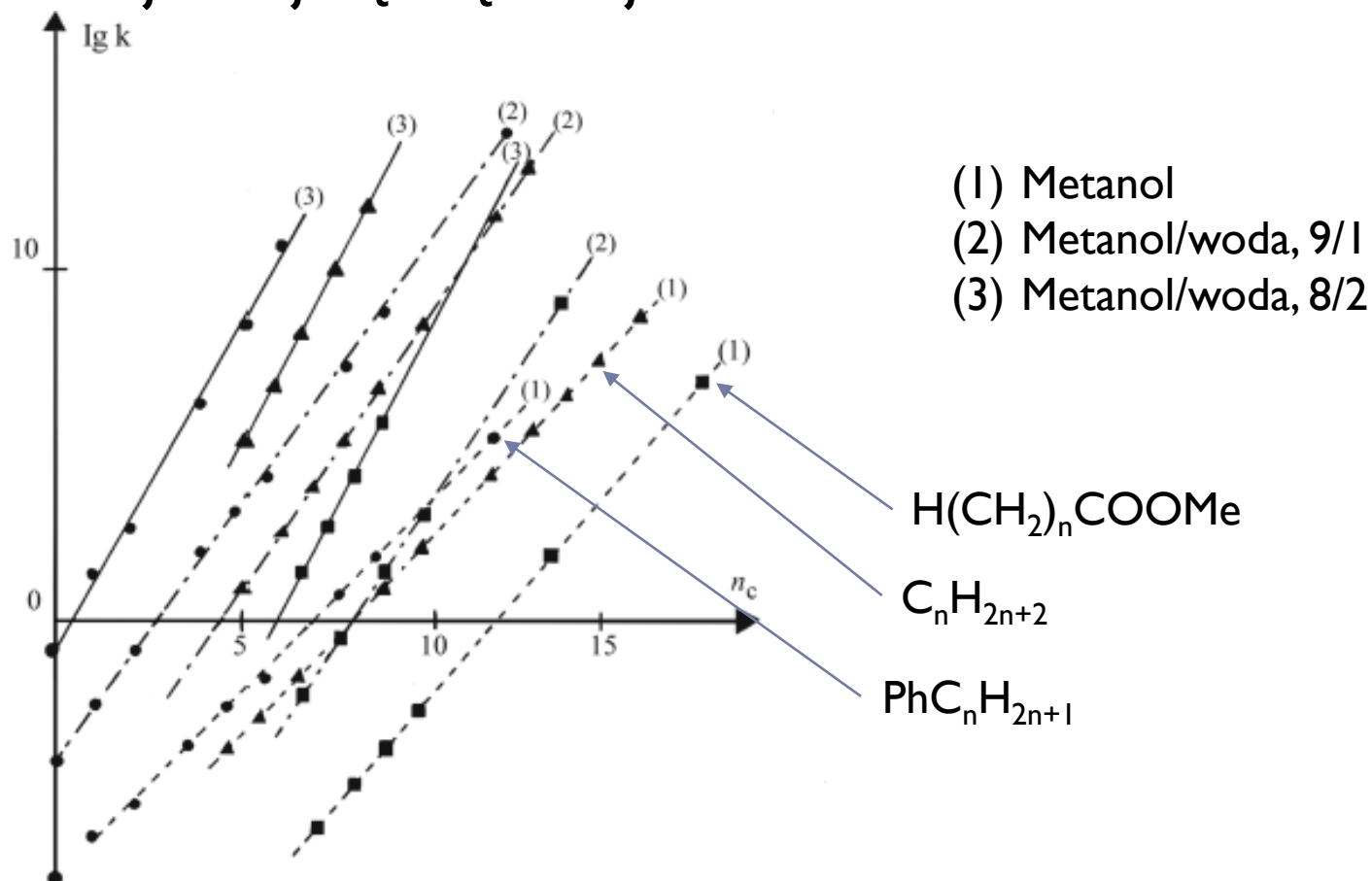
- ▶ Eluent: woda i rozpuszczalnik organiczny mieszający się z wodą.

| Rozpuszczalnik  | Absorbpcja światła [nm] | Współczynnik załamania światła | Lepkość | Temperatura wrzenia [°C] |
|-----------------|-------------------------|--------------------------------|---------|--------------------------|
| Woda            | 190                     | 1.333                          | 1       | 100                      |
| Metanol         | 205                     | 1.3284                         | 0.55    | 64.7                     |
| Acetonitryl     | 190                     | 1.3441                         | 0.38    | 81.6                     |
| Tetrahydrofuran | 212                     | 1.4072                         | 0.55    | 66.0                     |



# Układ faz odwróconych

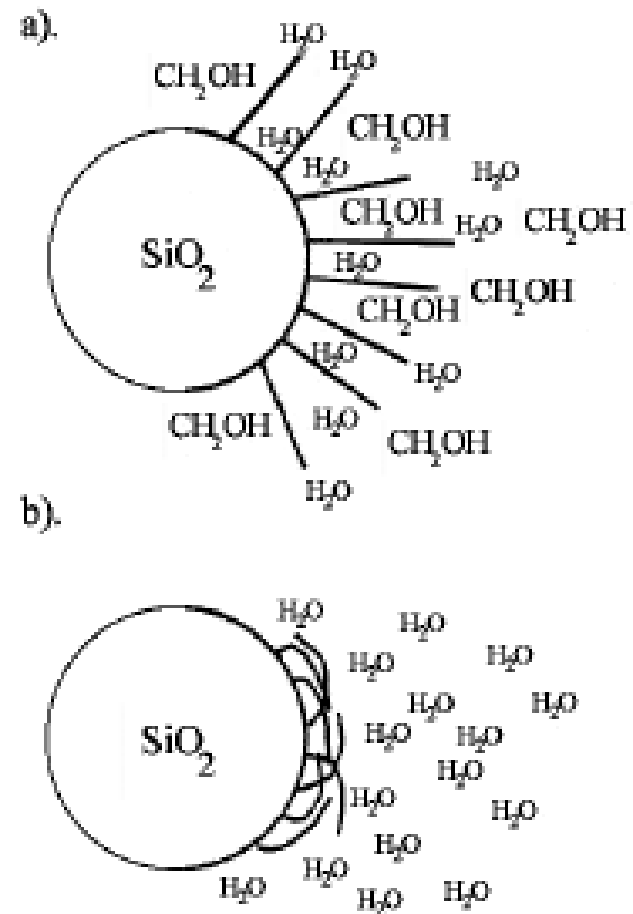
- ▶ Najbardziej polarny rozpuszczalnik – **woda** ma najmniejszą siłę elucji.



# Układ faz odwróconych

---

- ▶ Używanie wody bez dodatku rozpuszczalnika organicznego może zaburzyć strukturę fazy stacjonarnej.
- ▶ Typowo chromatografię prowadzi się od 10% ACN do 90% ACN.



# Układ faz odwróconych

---

- ▶ Równowaga kwasowo-zasadowa (obecność zasad lub kwasów) zaburza proces chromatograficzny

$$k = \frac{k_0 + k_1 \left( \frac{K_a}{[H^+]} \right)}{1 + \left( \frac{K_a}{[H^+]} \right)}$$

$k$  – współczynnik retencji

$k_0$  – współczynnik retencji formy uprotonowanej (neutralnej)

$k_1$  – współczynnik retencji formy zjonizowanej

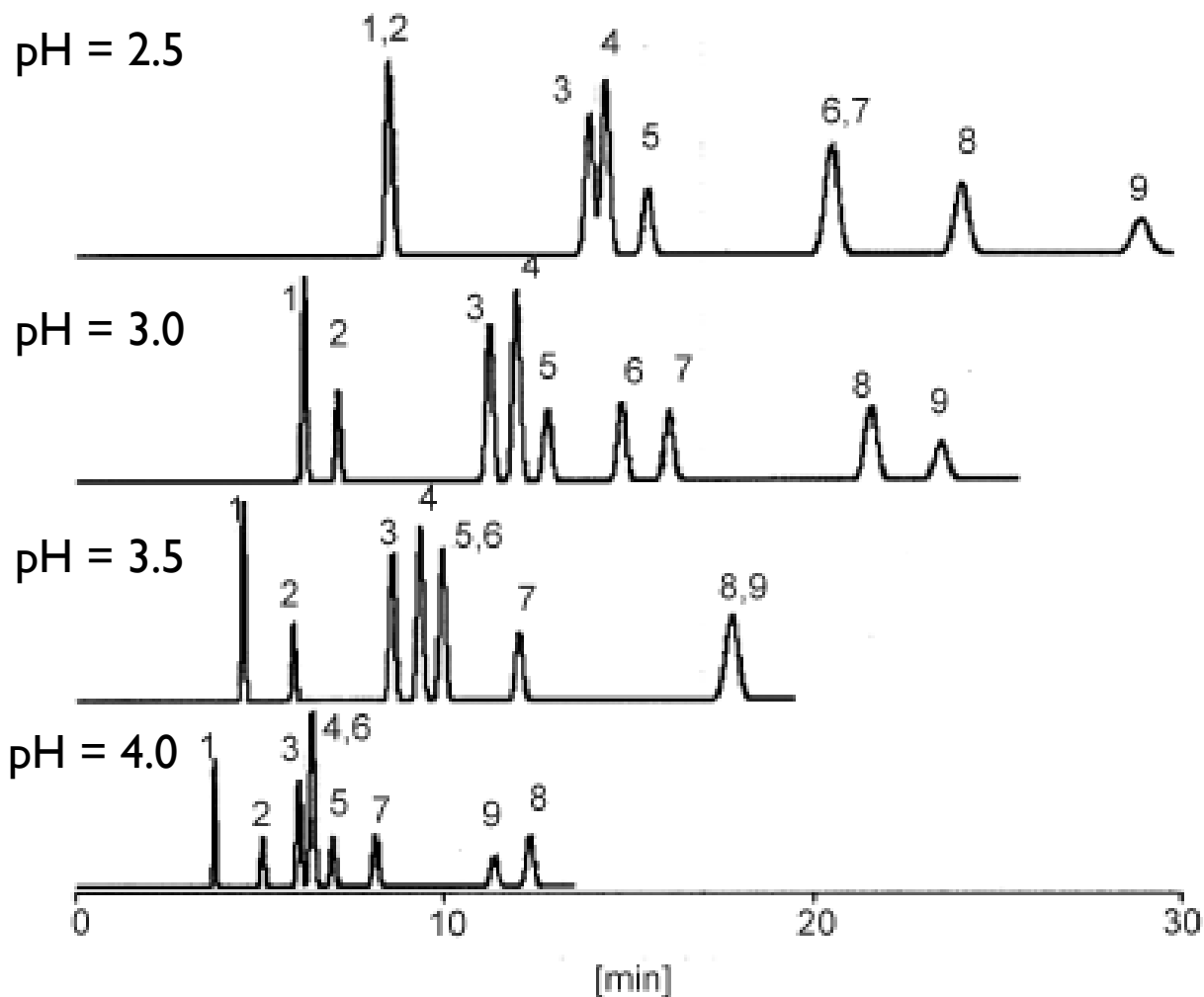
$K_a$  – stała dysocjacji kwasu

- ▶ W układach faz odwróconych ze względu na wykorzystywanie eluentów ze stosunkowo dużą ilością wody, czyli warunków sprzyjających dysocjacji elektrolitycznej, jest szczególnie istotne ustalenie takiej wartości pH eluentu, by równowaga była ustalona „po stronie” niezdisocjowanej postaci kwasu.
- 



# Układ faz odwróconych

- 1- kwas 2-nitrobenzoesowy
- 2 – kwas ftalowy
- 3 – \*
- 4 – kwas 2-fluorobenzoesowy
- 5 – kwas 3-cyjanobenzoesowy
- 6 - kwas 2-chlorobenzoesowy
- 7 – kwas 3-nitrobenzoesowy
- 8 – kwas 3-fluorobenzoesowy
- 9 – kwas 2,6-dimetylobenzoesowy

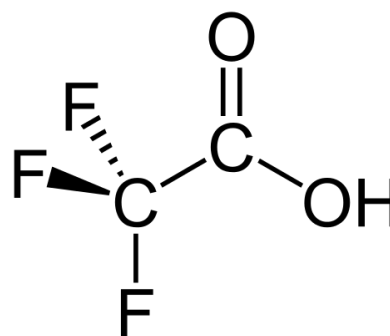




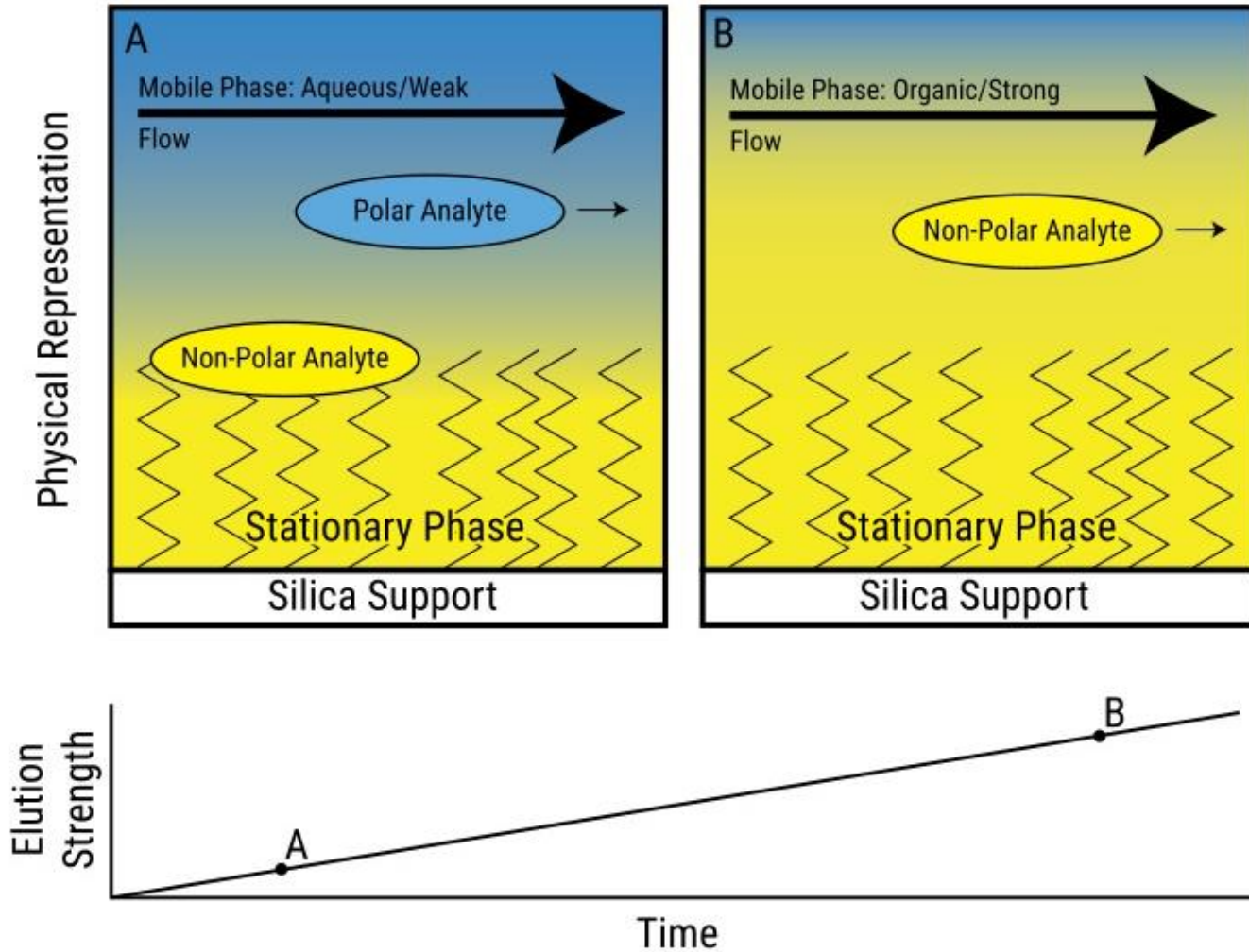
# Układ faz odwróconych

---

- ▶ Aby uniknąć problemów z równowagami kwasowo-zasadowymi do eluentów można dodać silnego kwasu organicznego.
- ▶ Typowo 0.05% kwasu trifluorooctowego (TFA).
- ▶  $pK_a = 0.23$



# Układ faz odwróconych



# Podsumowanie

- ▶ Najczęściej stosowane fazy stacjonarne to: żel krzemionkowy (NP) i C18 (RP).
- ▶ W zależności od rodzaju substancji rozdzielanych można użyć układu faz normalnych lub odwróconych.

