

Metody chromatograficzne w chemii i biotechnologii

Wykład 4

Chromatografia cieczowa adsorbcyjna

- ▶ 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

- ▶ Układ faz odwróconych (*reverse phase*):

- ▶ Faza stacjonarna jest mniej polarna niż faza ruchoma



ABsorption



ADsorption



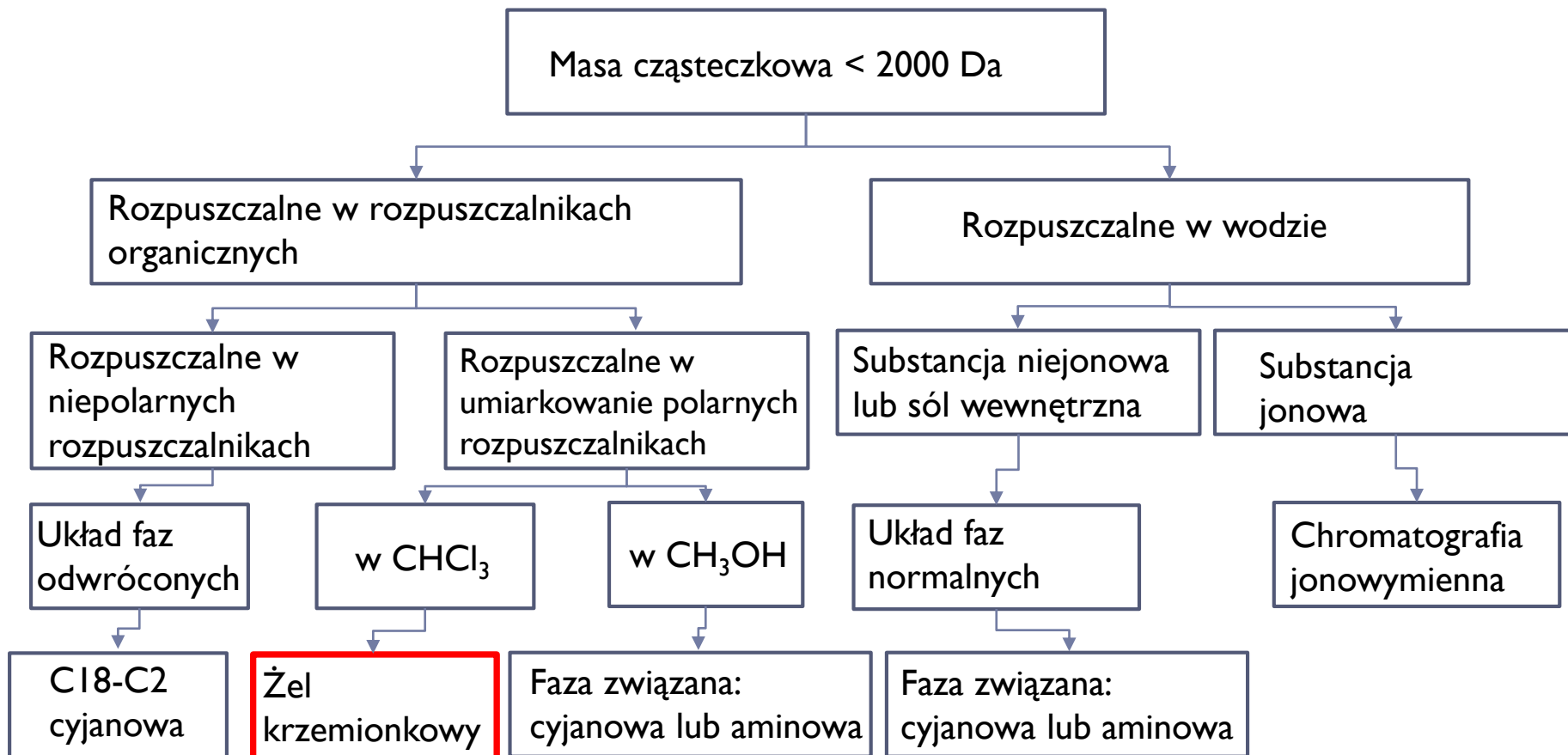
Układy chromatograficzne

wypełnienie	polarność	Mechanizm retencji	Uwagi
C18, C8, C4	niepolarne	Van der Waals	RP
fenyłowe	niepolarne	Hydrofobowe i pi-pi	RP
cyjanowe	pośrednie	Hydrofobowe, dipol-dipol	NP lub RP
aminowe	Polarne lub jonowe	Dipol-dipol, wiązania wodorowe	NP lub jonowymienna
Żel krzemionkowy	b. polarne	Wiązania wodorowe	NP

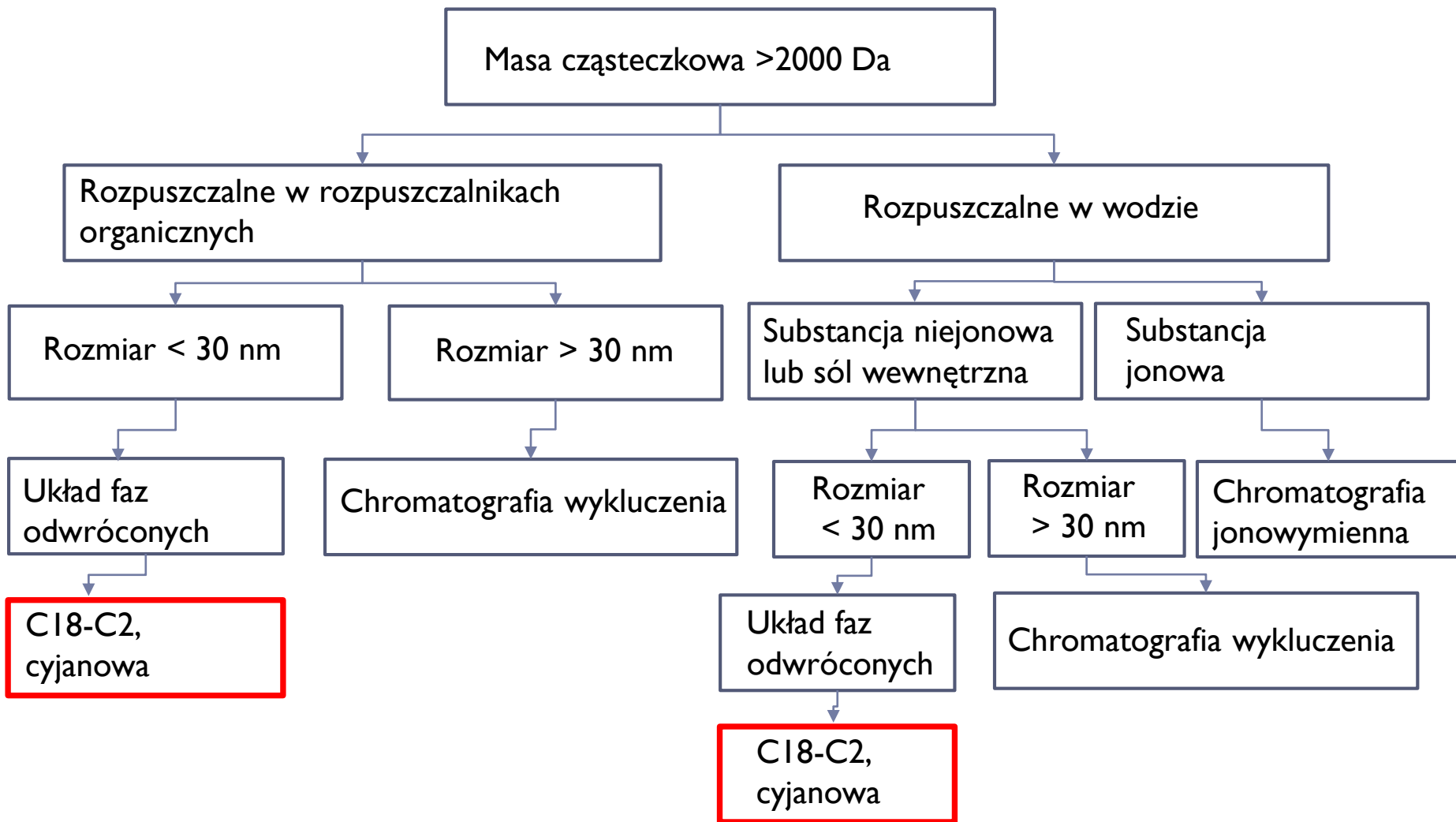
Optymalny rozdział w optymalnym czasie uzyskuje się, gdy polarność substancji chromatografowanej jest zbliżona do polarności fazy ruchomej i fazy stacjonarnej



Jak dobrać fazę stacjonarną?



Jak dobrać fazę stacjonarną?




Rozpuszczalniki NP

Rozpuszczalnik	ϵ^0	lokalizacja	UV [nm]
Pentan, heksan	0.00	Nie	201
Chloroform	0.26	Nie	247
Eter dietylowy	0.38	Tak	219
Octan etylu	0.48	Tak	258
Dioksan	0.51	Tak	215
Acetonitryl	0.52	Tak	192
Metanol	0.70	Tak	210

Dla nieznaney mieszaniny zaczynamy od eluentu o średniej mocy elucji.

Faza ruchoma musi być mniej polarna od składników substancji chromatografowanej!



Rozpuszczalniki RP

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

Faza ruchoma: mieszanina wody (bufor, wodny r-r kwasu) oraz składnika organicznego.

Wzrost udziału wody (%) – wzrost czasu retencji analitów.



Sposoby elucji

Gdy jeden rozpuszczalnik nie wystarcza ?

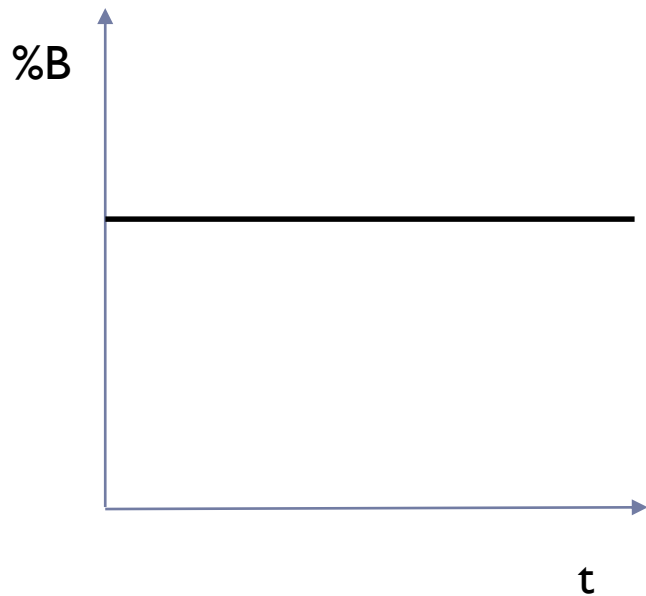


- ▶ **Elucja izokratyczna** – wykonana z użyciem eluentu o stałym składzie (np. mieszanina metanolu i wody w stosunku 6/4)
- ▶ **Elucja gradientowa** – ciągła zmiana składu eluentu w celu zwiększania siły elucji np. skład fazy ruchomej w trakcie rozdzielania zmienia się od 10% metanolu w wodzie do 90% metanolu w wodzie)

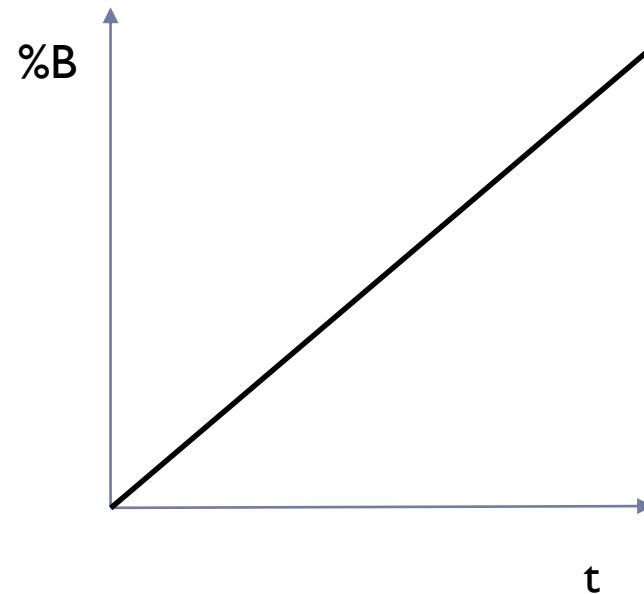


Sposoby elucji

Elucja izokratyczna



Elucja gradientowa

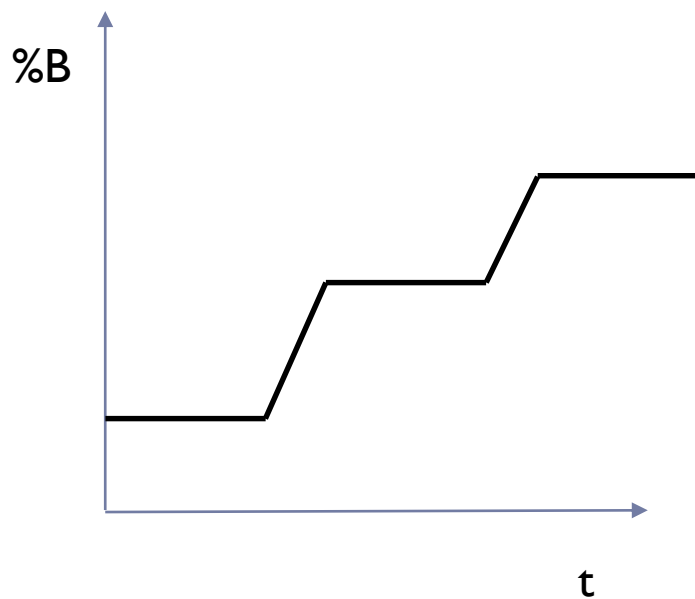


Elucja gradientowa stosowana jest wtedy, gdy rozdzielana mieszanina składa się z substancji znacznie różniących się retencją.

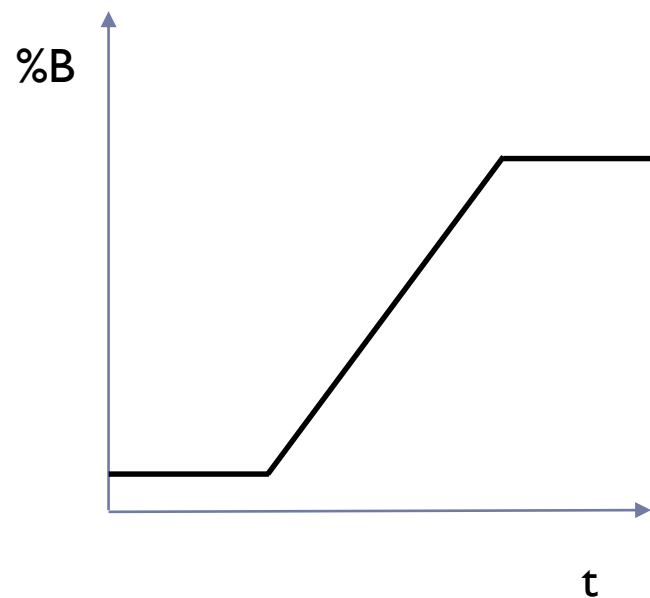


Sposoby elucji

Elucja skokowa/krokowa



Elucja gradientowa



- ▶ Siła elucji może się zmieniać w sposób krokowy lub ciągły ale nie może maleć!



Gradient

- ▶ Wartość gradientu opisuje zmiana zawartości składnika B w czasie gradientu:

$$G = \Delta\%B / t_G$$

- ▶ Najczęściej wartość gradientu powinna być stała, co oznacza gradient liniowy.
- ▶ Końcowy skład gradientu powinien gwarantować wymycie wszystkich analitów w czasie chromatografii.
- ▶ Od wartości gradientu zależy efektywność rozdzielania!

G
G
G
G
G



Szerokość piku,
odległość między pikami,
czas rozdzielania.



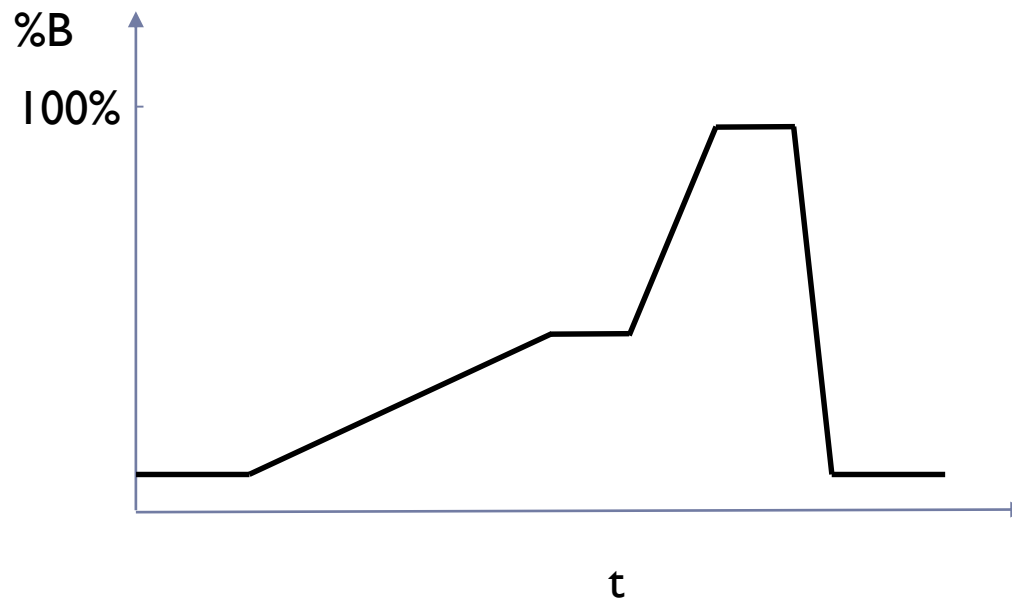
Czyli detekcja ↑ rozdzielczość ↓



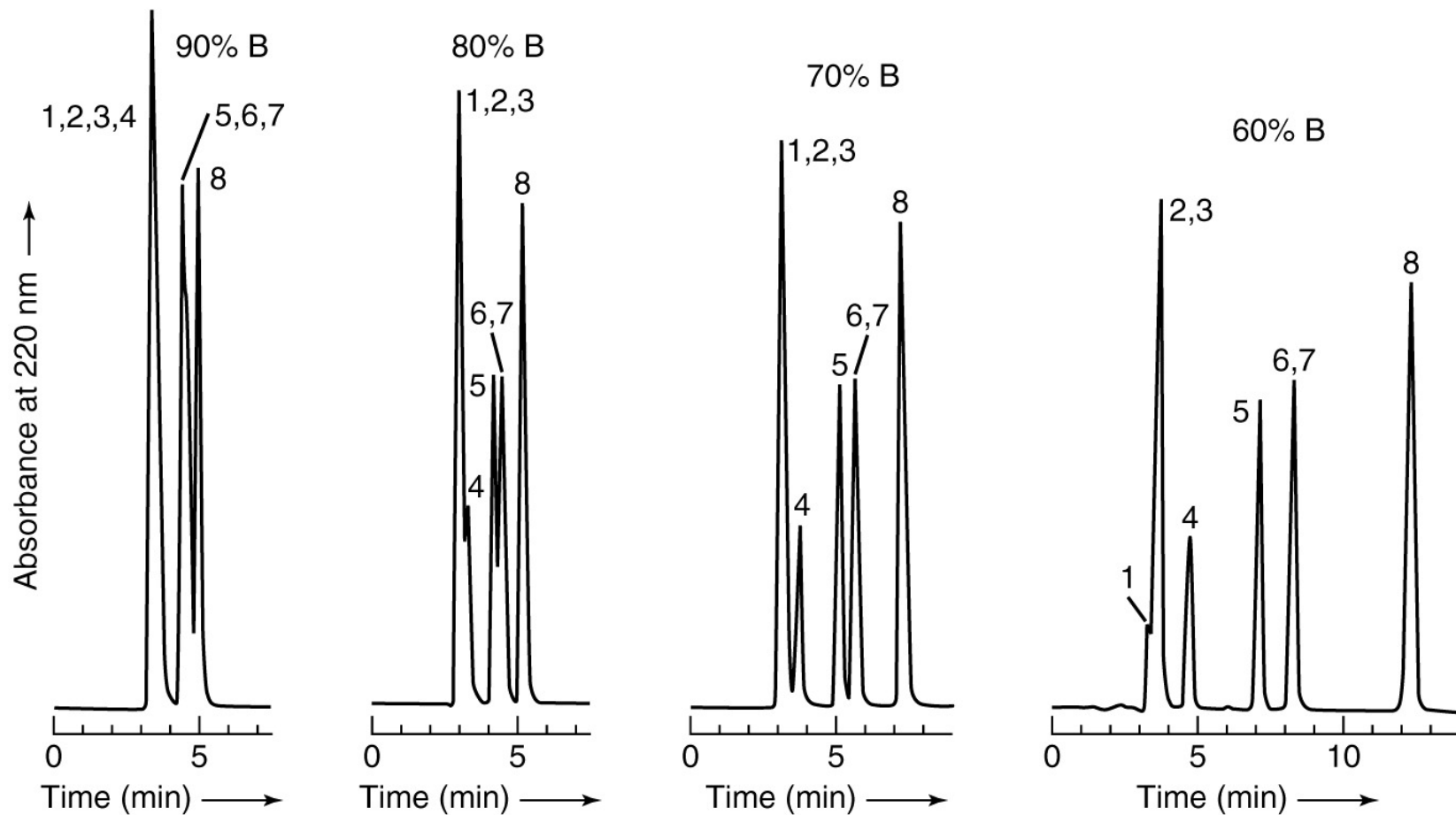
Gradient

- ▶ Aby wyniki rozdzielania były powtarzalne należy przeprowadzić regenerację kolumny i doprowadzić ją do stanu początkowego

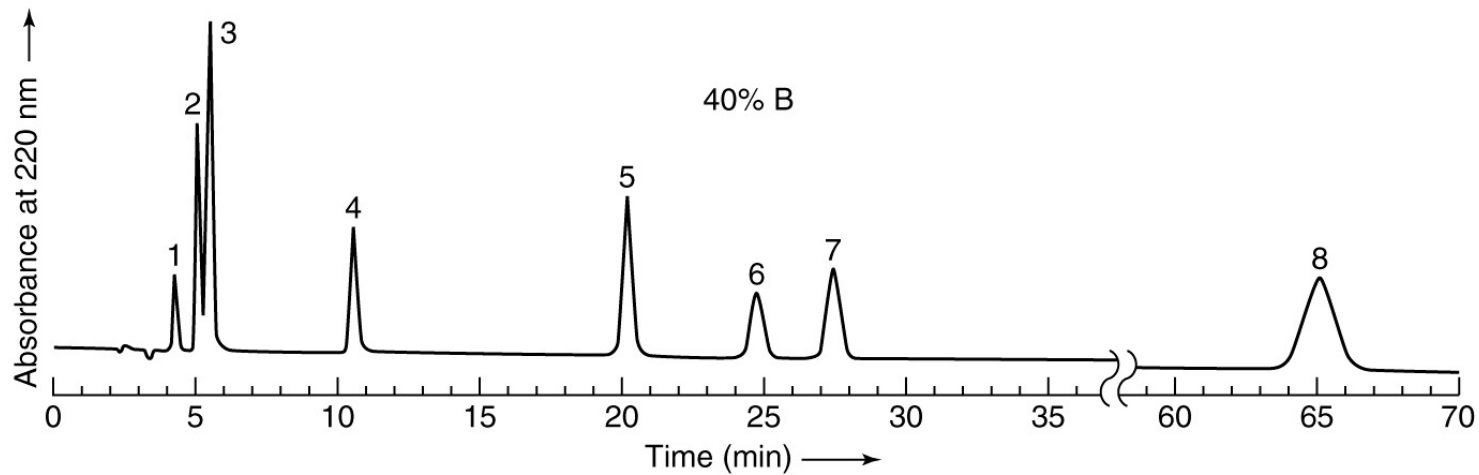
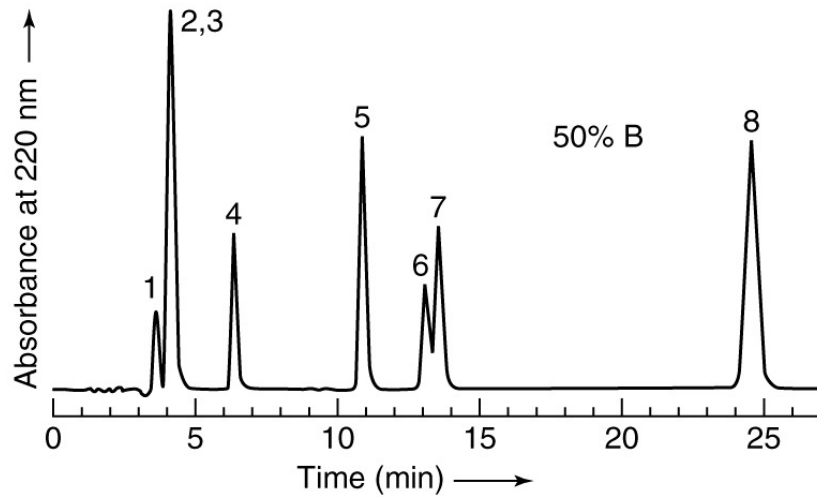
Elucja gradientowa z regeneracją kolumny



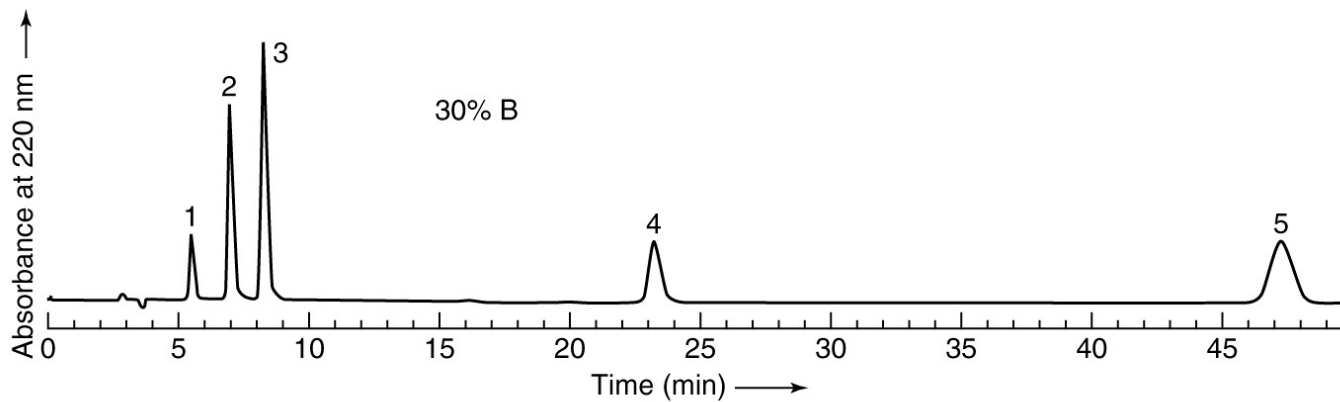
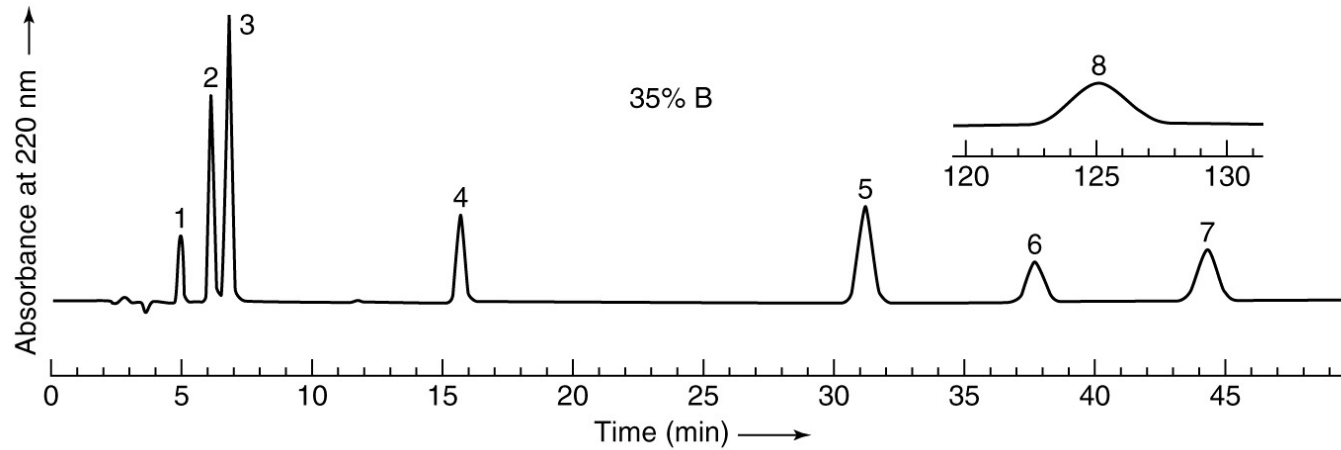
Elucja izokratyczna



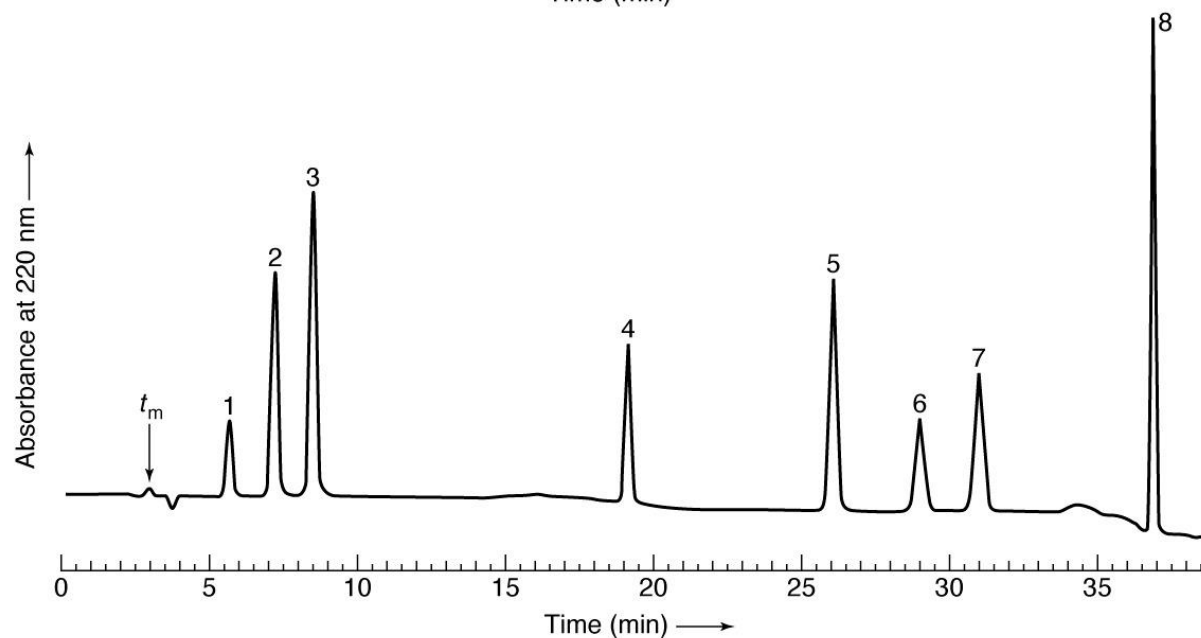
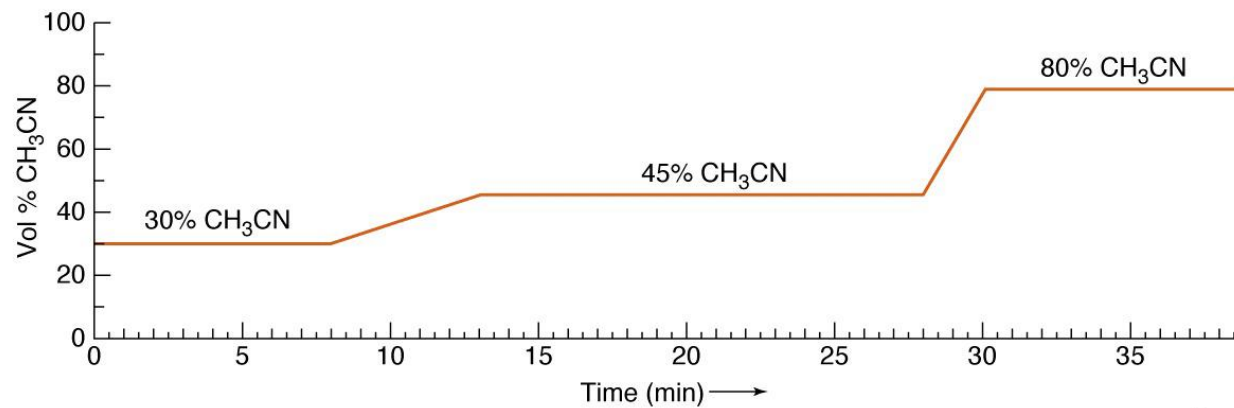
Elucja izokratyczna



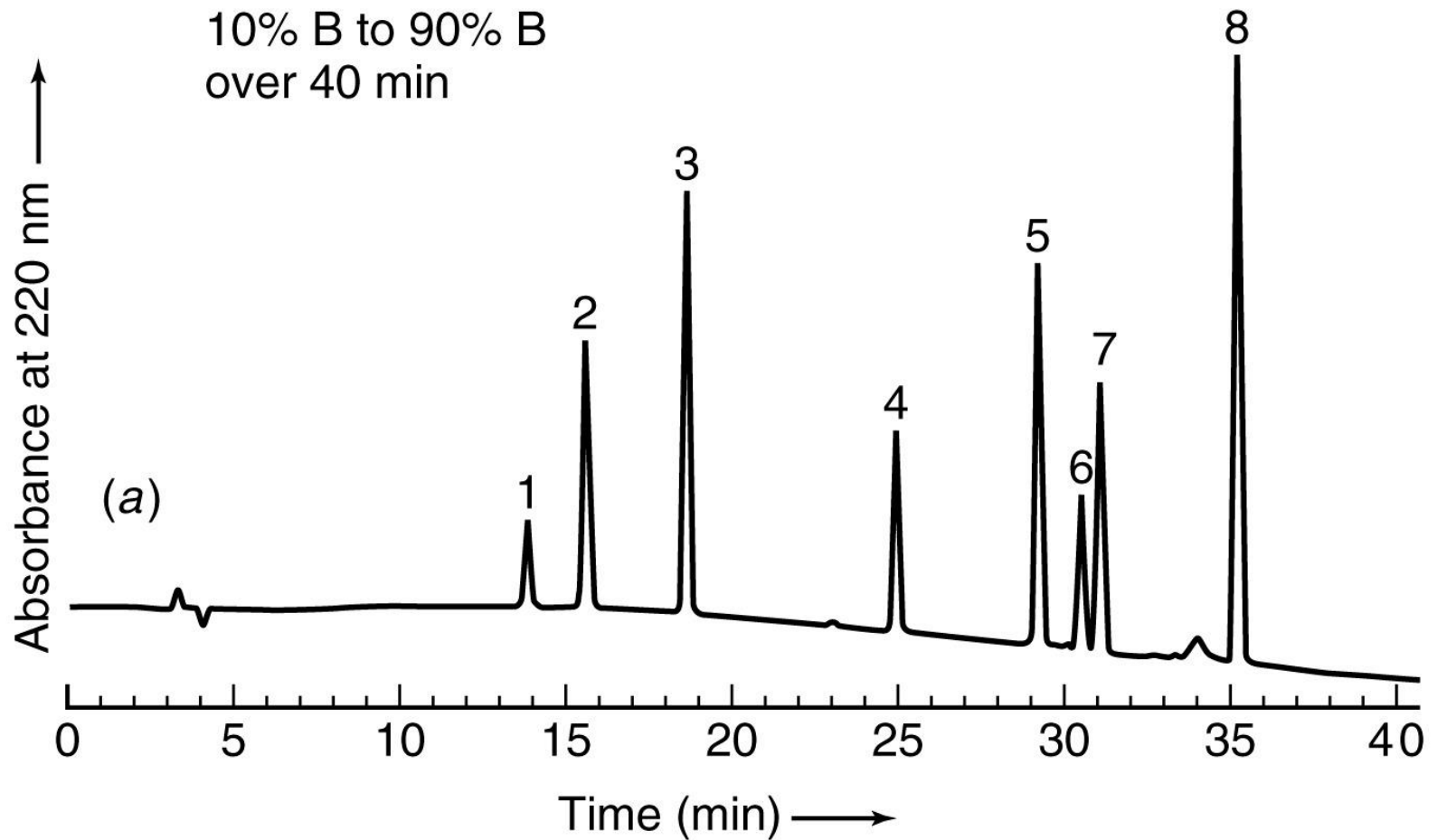
Elucja izokratyczna



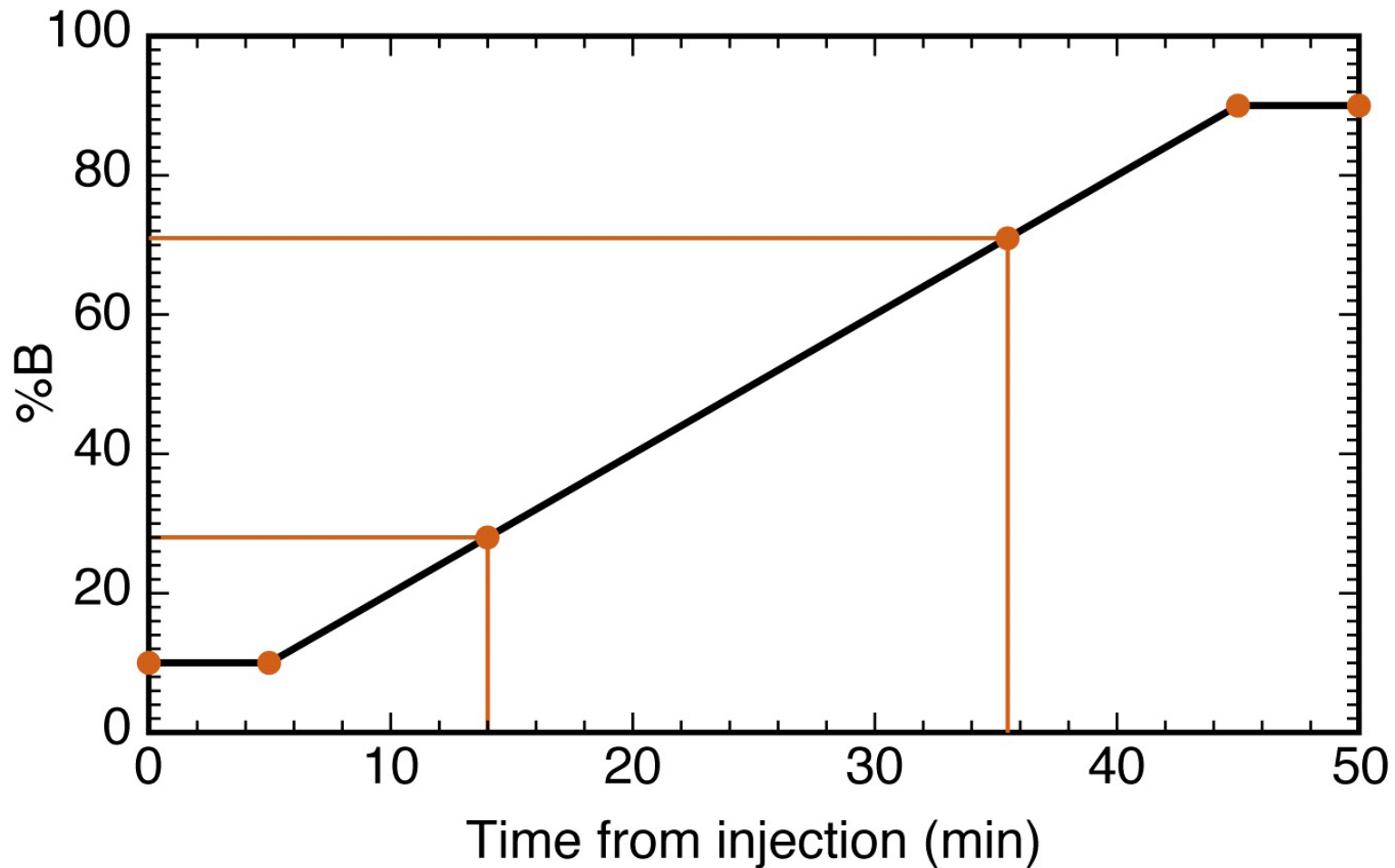
Elucja krokowa



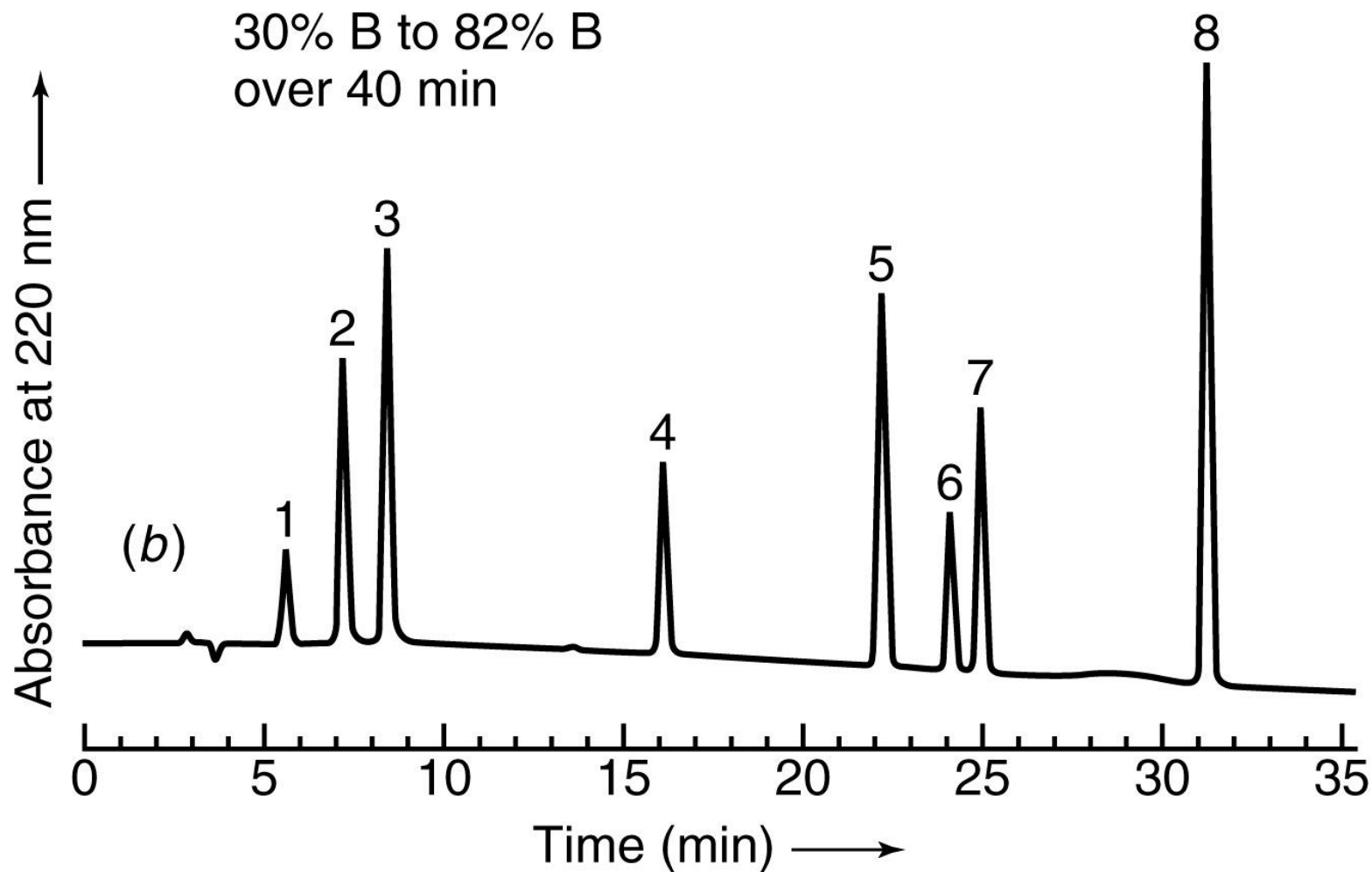
Elucja gradientowa



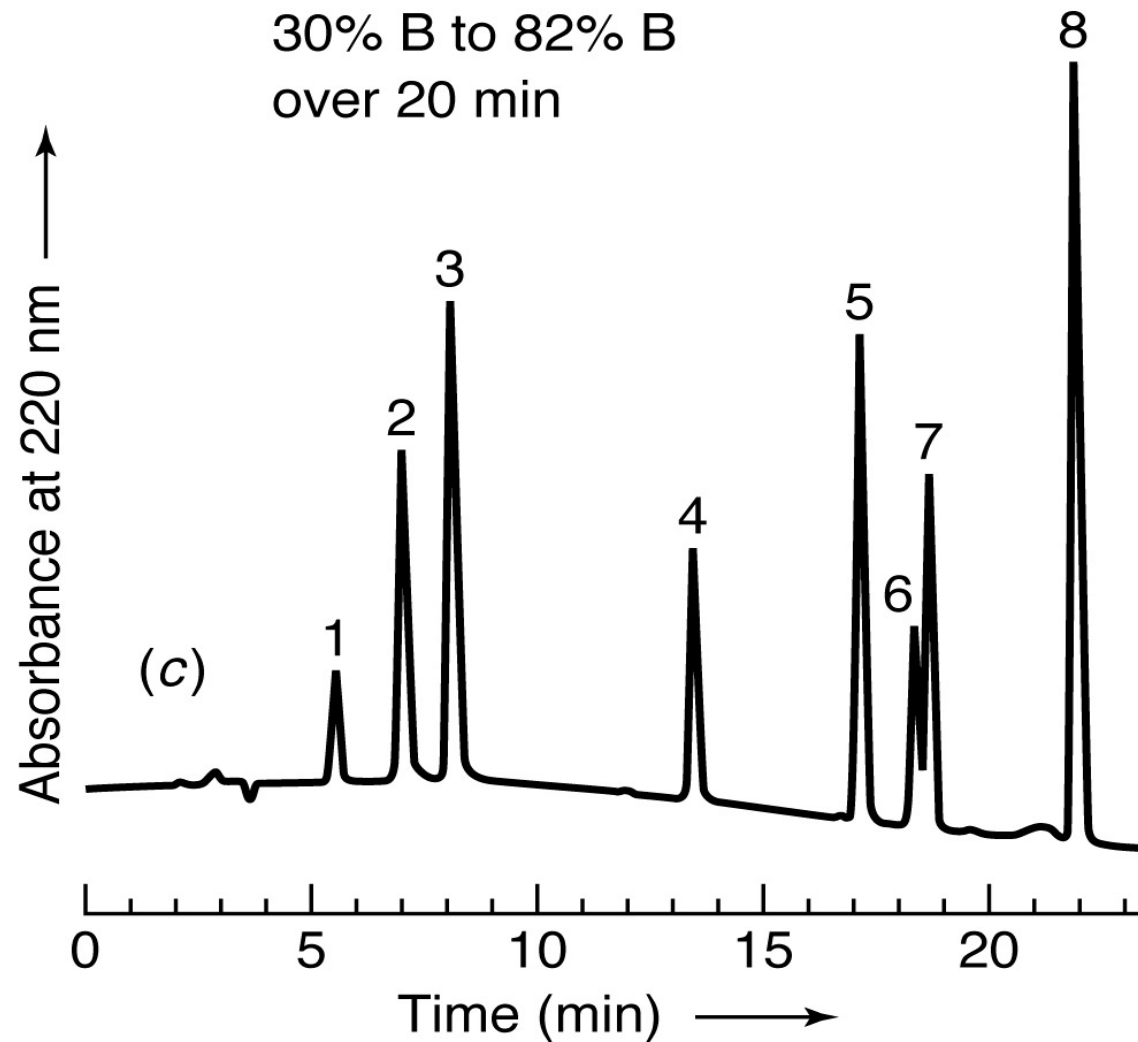
Elucja gradientowa



Elucja gradientowa



Elucja gradientowa



Elucja gradientowa

- ▶ Optymalizacja gradientu:
- ▶ Wykonaj chromatografię w szerokim zakresie gradientu (np. 5-90% B) o długości 40-60 min.
- ▶ Usuń fragmenty gradientu przed pierwszym pikiem i po ostatnim pikie.
- ▶ Spróbuj skrócić czas gradientu.
- ▶ Jeżeli rozdział nie jest akceptowalny, to spróbuj gradientu krokowego.



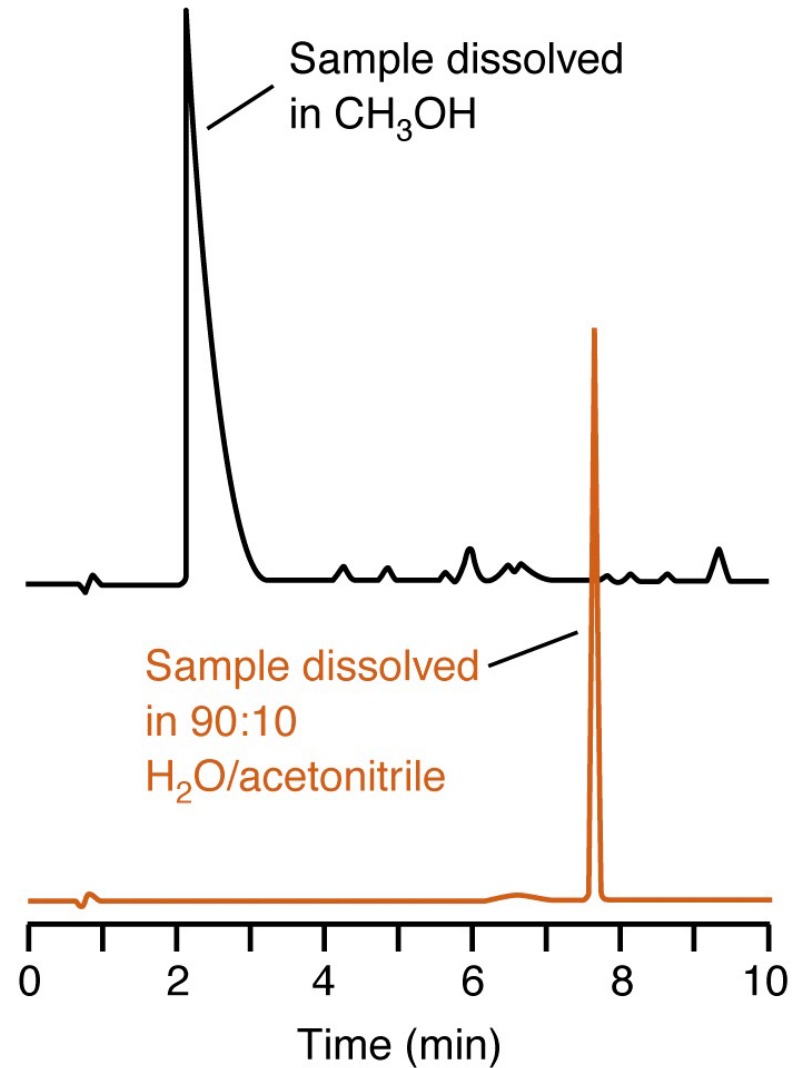
Optymalizacja chromatografii

- ▶ **Wybór parametrów początkowych**
 - ▶ **Faza stacjonarna C18** z ziarnem 5 μm .
 - ▶ **Kolumna** 0.46 * 15 cm
 - ▶ **Przepływ** 2.0 mL /min
 - ▶ **Faza ruchoma ?**
 - ▶ **Gradient** 5% B do 95%B
 - ▶ **Próbka** 25-50 μL , zawierająca 25-50 μg każdego z analitów



Próbka

- ▶ Próbka powinna być rozpuszczona w rozpuszczalniku o sile elucji mniejszej niż stosowany eluent.



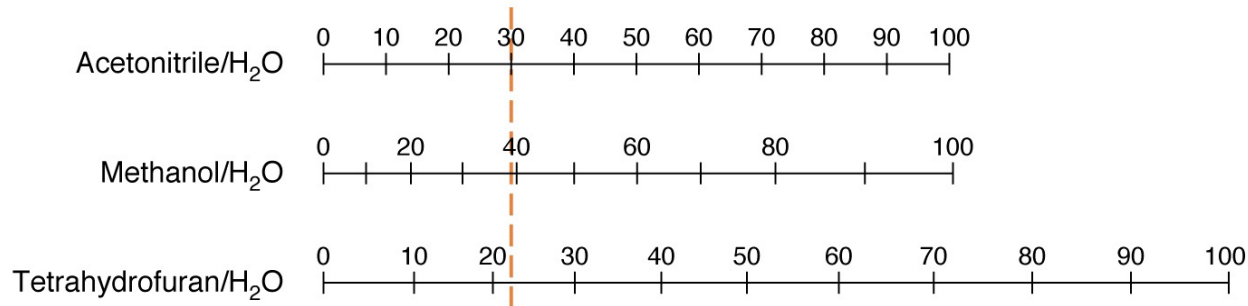
Optymalizacja chromatografii

- ▶ Wybór rozpuszczalnika organicznego
- ▶ 1. Acetonitryl (niska lepkość, szeroki zakres UV)
- ▶ 2. Metanol (wyższa lepkość i gorszy zakres UV)
- ▶ 3. Tetrahydrofuran (węższy zakres UV, wolne równoważenie z fazą stacjonarną)



Dobór rozpuszczalników

- ▶ Skład mieszanin elucyjnych o podobnej sile elucji (eluenty izoeluoropowe) można określić za pomocą nomogramu:

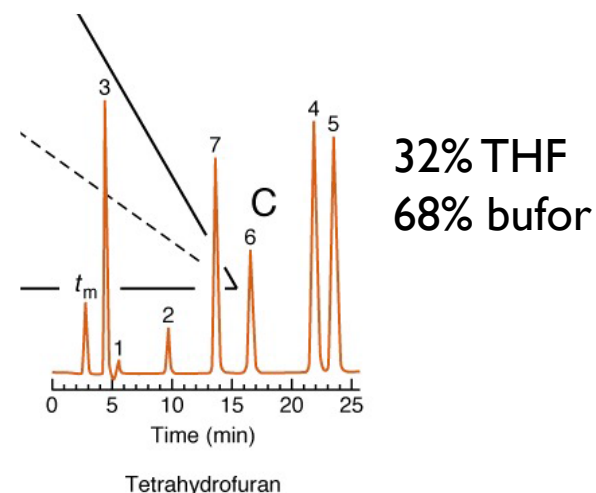
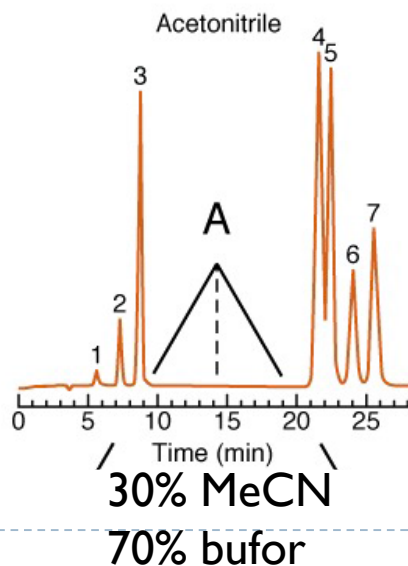
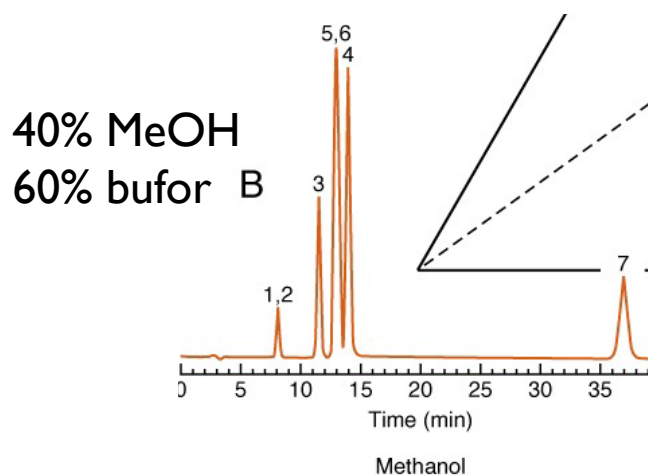


Lepszy rozdział składników bez zmiany czasu chromatografowania.



Optymalizacja chromatografii

- ▶ Optymalizacja dla układu woda/acetonitryl (chromatogram A)
- ▶ Optymalizacja dla układu woda/metanol (chromatogram B)
- ▶ Optymalizacja dla układu woda/tetrahydrofuran (chromatogram C)

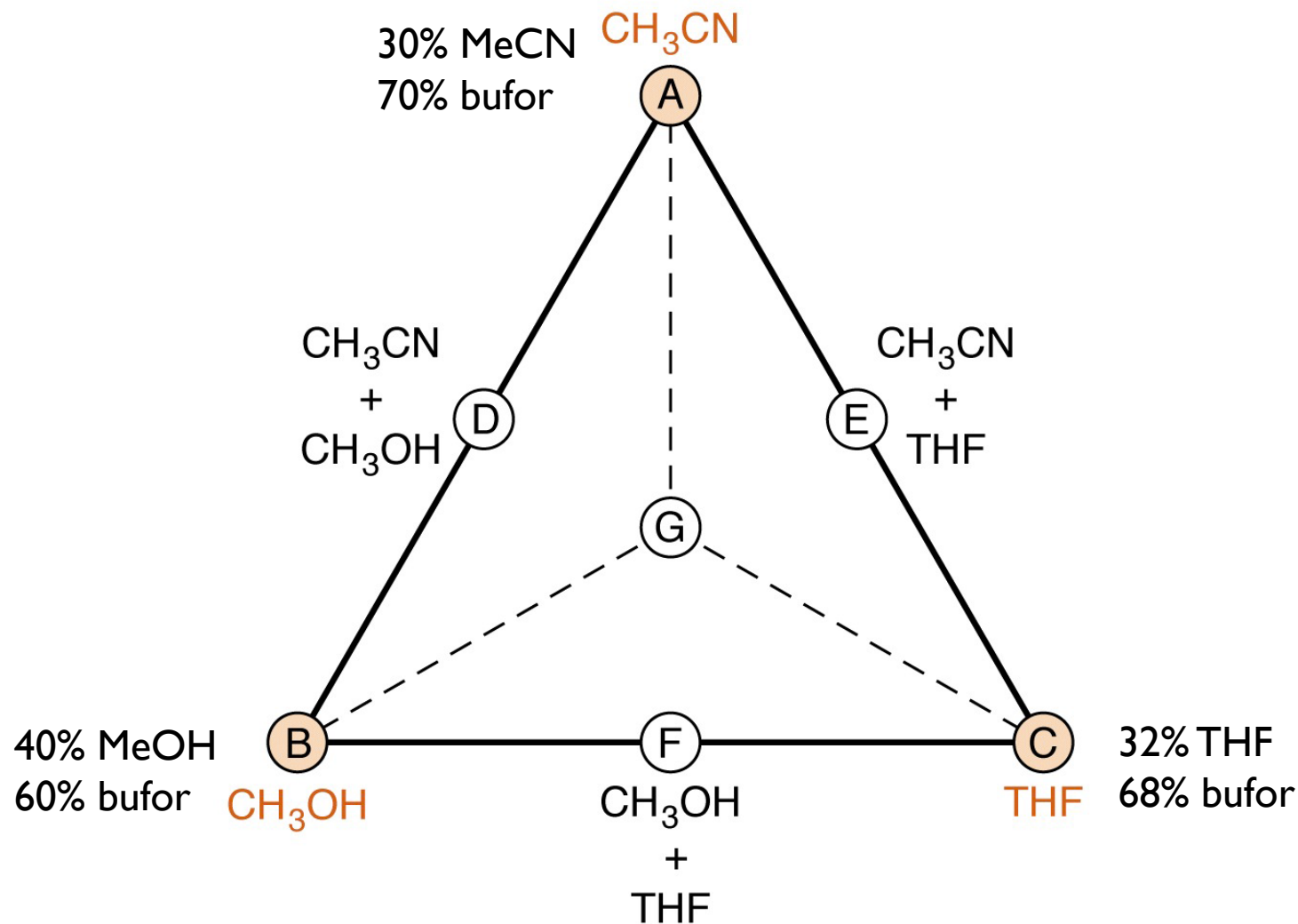


Optymalizacja chromatografii

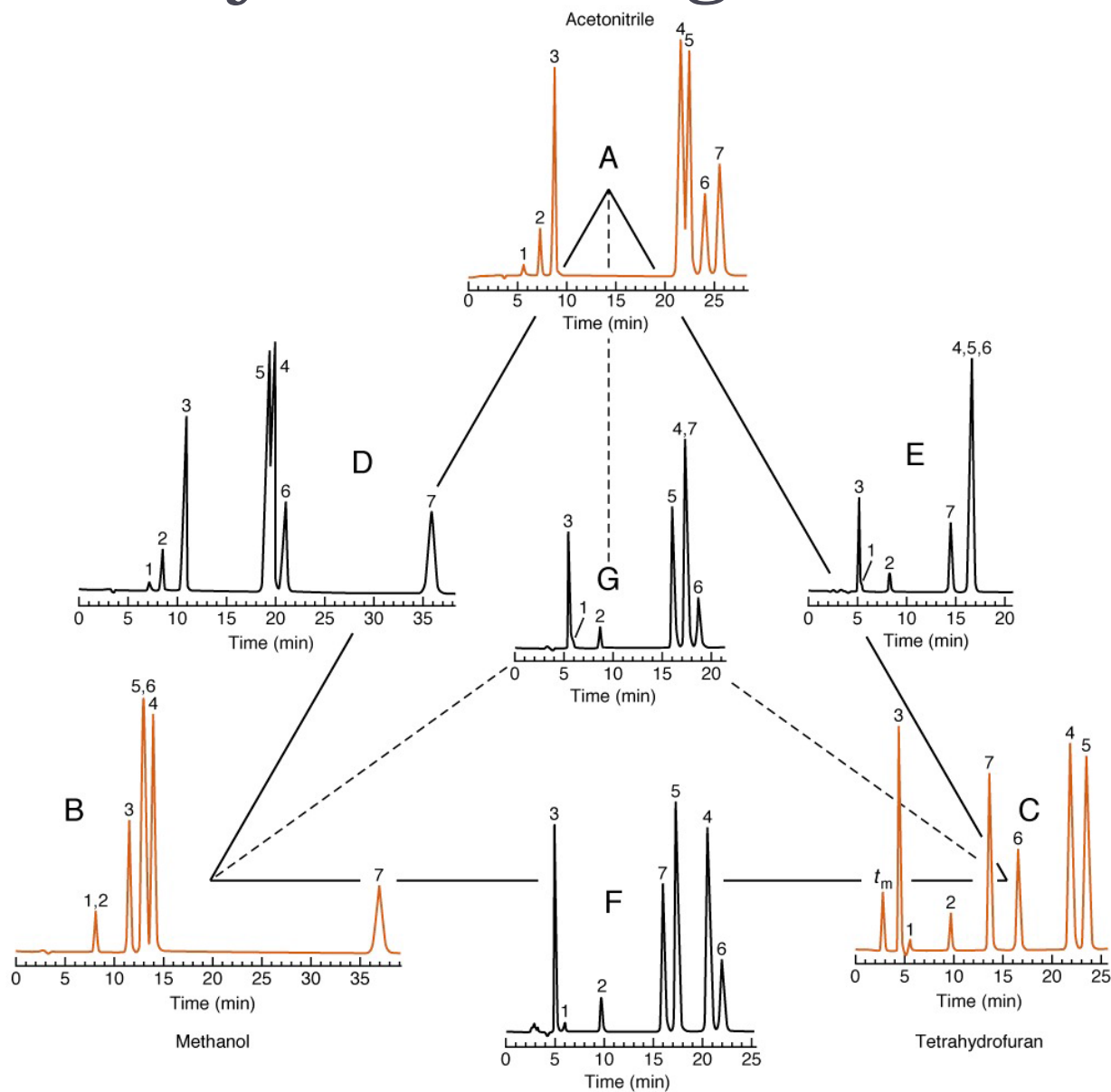
- ▶ Chromatogramy dla mieszanin eluentów z punktów A, B i C w stosunku 1:1, czyli:
- ▶ A:B, chromatogram D
- ▶ B:C, chromatogram E
- ▶ A:C, chromatogram F
- ▶ Chromatogram dla mieszaniny:
- ▶ A:B:C (1:1:1), chromatogram G



Optymalizacja chromatografii



Optymalizacja chromatografii



Optymalizacja chromatografii

- ▶ **Strategia procesu:**
 - ▶ Wybór metody LC
 - ▶ Wybór kolumny chromatograficznej
 - ▶ Dobór wstępnych warunków rozdziału
 - ▶ Wykonanie eksperymentu
 - ▶ Analiza otrzymanych wyników i ocena jakich zmian należy dokonać w celu optymalizacji procesu



Optymalizacja chromatografii

▶ Cel:

- ▶ Odpowiednia rozdzielczość
- ▶ Krótki czas analizy/rozdzielania
- ▶ Ostre piki (wysoka efektywność kolumny)

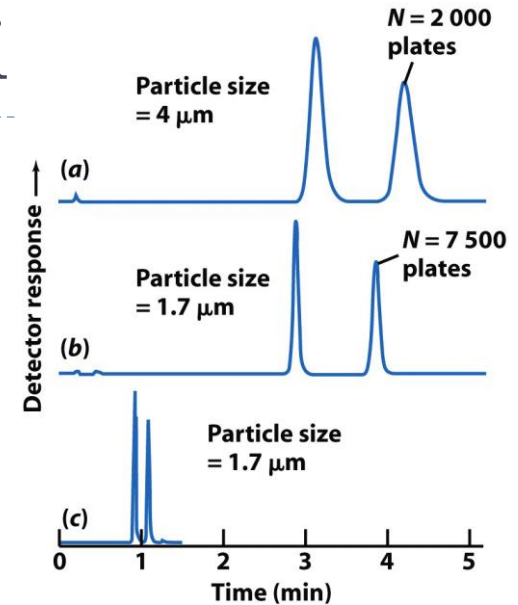
▶ Parametry:

- ▶ Współczynnik retencji $0.5 \leq k' \leq 20$
- ▶ Rozdzielczość $R_s \geq 2$
- ▶ Ciśnienie $p \leq 15 \text{ MPa}$ (150 bar)



Optymalizacja chromatografii

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



▶ Efektywność

- ▶ Długość kolumny
- ▶ Prędkość przepływu
- ▶ Wielkości ziarna

▶ Selektywność

- ▶ Zmiana fazy ruchomej
- ▶ Zmiana pH fazy ruchomej
- ▶ Zmiana fazy stacjonarnej
- ▶ Zmiana temperatury

▶ Retencja

- ▶ **Zmiana siły elucji fazy ruchomej**

Chromatografia nadkrytyczna

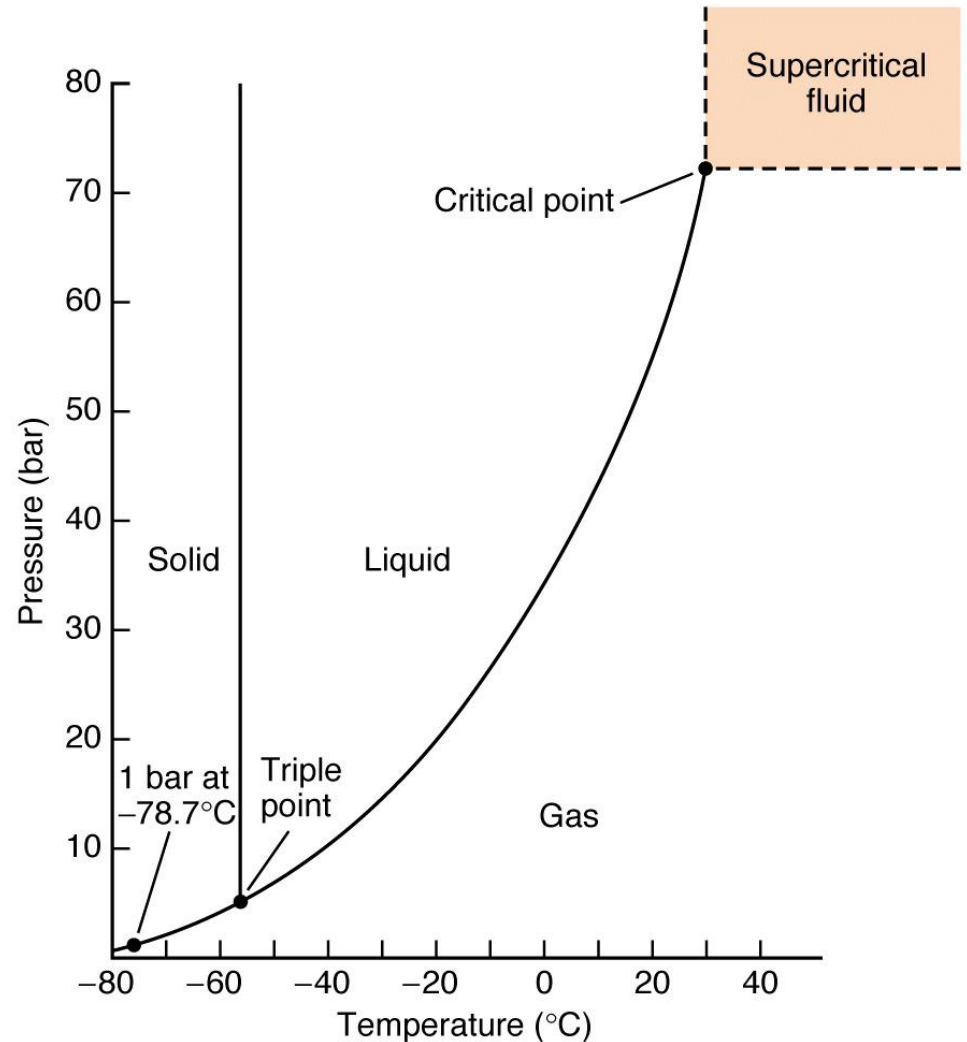
- ▶ Połączenie technik Chromatografii Cieczowej Chromatografii Gazowej
- ▶ Zastosowanie:
 - ▶ Związki o małej lotności i dużych masach cząsteczkowych,
 - ▶ Związki o małej trwałości termicznej,
 - ▶ Związki o bardzo dużej polarności,
 - ▶ Związki chiralne.

Możliwość zastosowania szerokiej gamy detektorów



Chromatografia nadkrytyczna

- ▶ W chromatografii nadkrytycznej faza ruchoma jest płynem w stanie nadkrytycznym
- ▶ Utrzymanie płynu w stanie nadkrytycznym wymaga odpowiedniej temperatury i ciśnienia



Chromatografia nadkrytyczna

- ▶ Płyn w stanie nadkrytycznym ma właściwości korzystne dla chromatografii:
 - ▶ Niską lepkość
 - ▶ Umiarkowany współczynnik dyfuzji (nie ma problemów z wymianą masy)
 - ▶ Odparowuje przy ciśnieniu normalnym
 - ▶ Gęstość porównywalna do cieczy (dobre właściwości jako rozpuszczalnik)

parametr	gaz	ciecz	Płyn w stanie nadkrytycznym
Współczynnik dyfuzji [cm ² /s]	0.01 – 1.0	(0.5-2.0)10 ⁻⁵	(0.5-3.3) 10 ⁻⁴
Lepkość [g/s cm]	(2.0-9.9) 10 ⁻⁴	(0.3-2.4) 10 ⁻²	(0.5-3.5) 10 ⁻⁴
Gęstość [g/cm ³]	(0.6-2.0) 10 ⁻³	0.8-1.5	0.2-0.9



Chromatografia nadkrytyczna

▶ Dytlenek węgla:

- ▶ Punkt krytyczny 31.3 °C
- ▶ Ciśnienie krytyczne 72.9 bar
- ▶ Gęstość 0.448 g/cm³
- ▶ Zdolność do tworzenia wiązań wodorowych (zasada Lewisa)
- ▶ Niska polarność (podobna do heksanu)
- ▶ Możliwość dodatku rozpuszczalników polarnych: alkohole, aminy, woda



Chromatografia nadkrytyczna

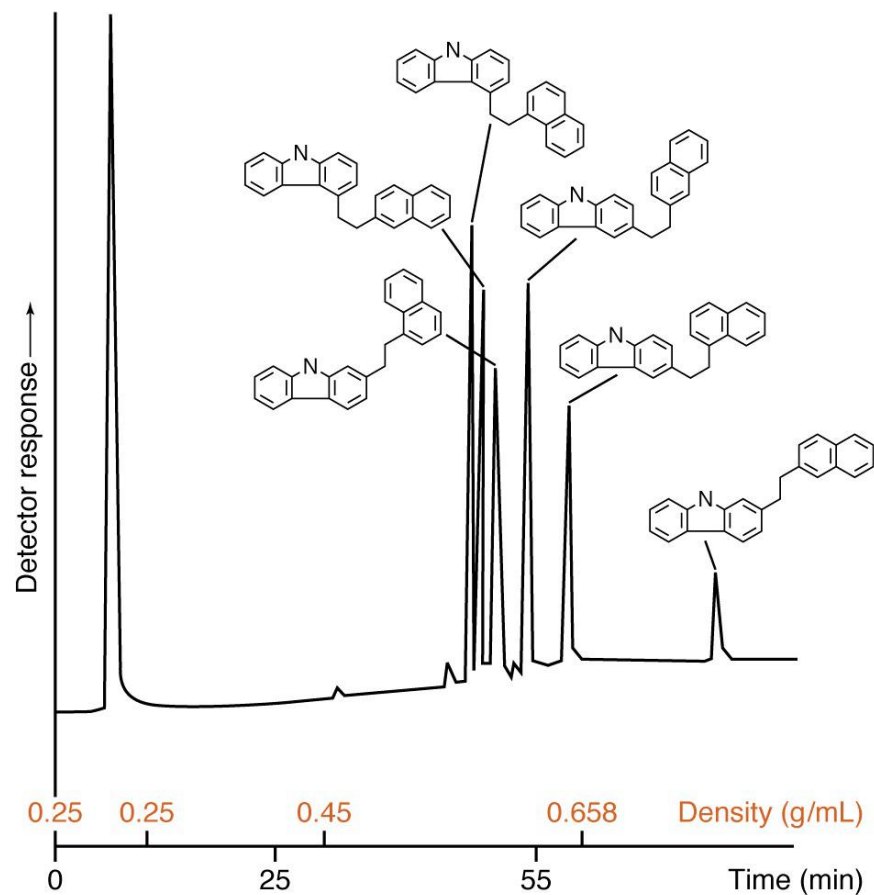
- ▶ Optymalizacja parametrów:
 - ▶ Temperatura
 - ▶ Ciśnienie
 - ▶ Gęstość fazy ruchomej
 - ▶ Dodatki polarne
- ▶ Współczynnik retencji wzrasta wraz z wzrostem temperatury (dla niskich temperatur) a następnie maleje.

(W chromatografii nadkrytycznej na rozdział ma wpływ więcej czynników niż w jakimkolwiek innym rodzaju chromatografii!)



Chromatografia nadkrytyczna

- ▶ Podział **gradientowy** można zrealizować poprzez zmianę ciśnienia/temperatury.
- ▶ Zmiana ciśnienia powoduje zmianę gęstości CO_2 .
- ▶ Zwiększanie gęstości CO_2 powoduje zwiększenie polarności (od heksanu do dichlorometanu).



Podsumowanie

- ▶ Optymalizacja gradientu pozwala na szybkie i efektywne rozdzielenie mieszaniny substancji.
- ▶ Chromatografia nadkrytyczna posiada wiele zalet:
 - ▶ Dobra rozdzielczość,
 - ▶ Wysoka sprawność,
 - ▶ Krótki czas analizy (dzięki obniżeniu oporów wymiany masy)
 - ▶ Mały udział rozpuszczalników organicznych.

