

The background features a light blue gradient with faint, white chemical structures and chromatogram-like patterns. The chemical structures include various rings and functional groups, while the chromatogram patterns consist of diagonal lines and peaks. In the center, there is a bright yellow rectangular box containing the title text.

KOLUMNOWA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA

KLASYCZNA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA KOLUMNOWA

faza ruchoma



ciecz

faza stacjonarna



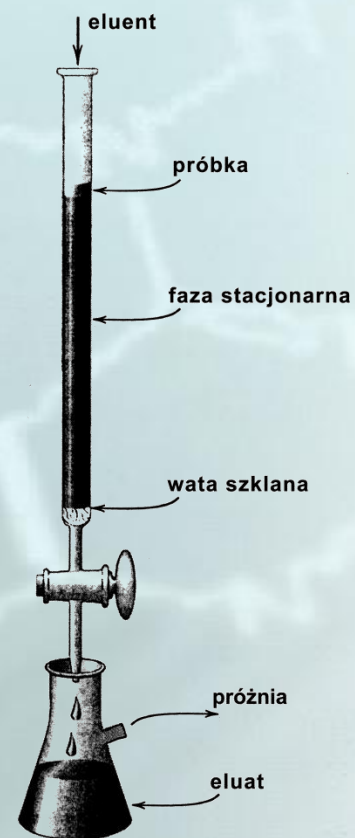
ciało stałe

Klasyczna chromatografia kolumnowa jest obecnie rzadko stosowana.

Najczęściej wykorzystuje się ją w preparatyce organicznej do oczyszczania związków i rozdzielania składników mieszanin.

W technice tej stosowana jest kolumna pionowa o dł. 10-100 cm i średnicy 1-5 cm. wypełniona sorbentem.

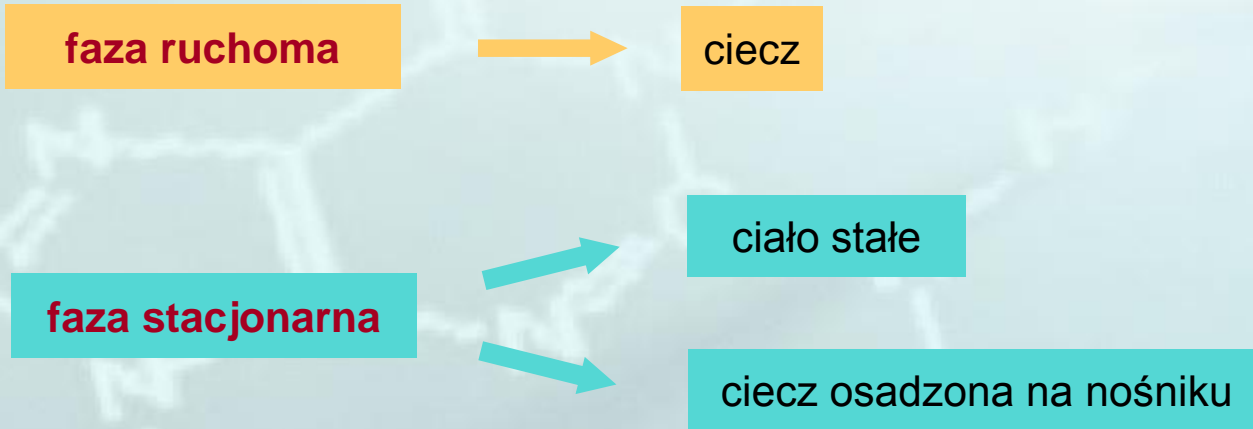
Klasyczna kolumna chromatograficzna



WYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA

HPLC - High Performance Liquid Chromatography
(High Pressure Liquid Chromatography)

WYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA



1. Chromatografia adsorpcyjna

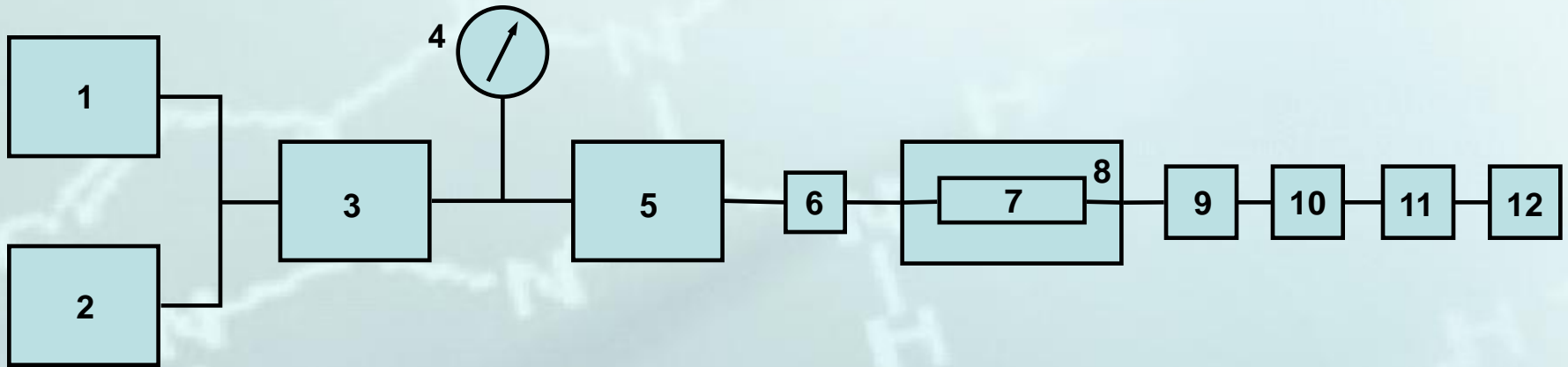
2. Chromatografia podziałowa

3. Chromatografia żelowa (chromatografia wykluczania, chromatografia sitowa, sączenie molekularne)

4. Chromatografia jonowa

- ♦ chromatografia jonowymienna
- ♦ chromatografia par jonowych
- ♦ chromatografia jonowykluczająca (wykluczania jonów)

SCHEMAT BLOKOWY CHROMATOGRAFU CIECZOWEGO



1, 2 - zbiorniki eluentu, 3 - pompa, 4 - manometr, 5 - dozownik, 6 - przedkolumna, 7 - kolumna,
8 - termostat, 9 - przepływomierz, 10 - detektor, 11 - kolektor frakcji, 12 - komputer

Ze zbiornika fazy ruchomej za pomocą pompy jest zasysany eluent, który poprzez dozownik jest dalej tłoczony do kolumny chromatograficznej. Przepływ fazy ruchomej w układzie jest kontrolowany za pomocą manometru i przepływomierza. Za pomocą dozownika w strumień eluentu wprowadza się próbkę badaną. Składniki próbki ulegają rozdzielaniu na kolumnie chromatograficznej, a następnie są wykrywane przez detektor. Sygnał z detektora jest rejestrowany i otrzymujemy chromatogram. Niektóre aparaty są dodatkowo wyposażone w kolektor frakcji, który umożliwia zbieranie rozdzielonych składników badanej mieszaniny.

CHROMATOGRAF CIECZOWY



KOLUMNA jest częścią układu chromatograficznego, w którym zachodzi rozdzielanie mieszaniny na poszczególne składniki.



Wybór kolumny jest uwarunkowany:

- ♦ składem próbki,
- ♦ ilością próbki,
- ♦ celem rozdzielania.

Biorąc pod uwagę powyższe kryteria kolumny można podzielić:

- ♦ kolumny preparatywne,
- ♦ kolumny analityczne,
- ♦ mikrokolumny.

KOLUMNY

Parametry charakteryzujące kolumnę

parametr	kolumna preparatywna	analityczna	mikrokolumna
rozmiary cząsteczek sorbentu [μm]	5	5	5
długość kolumny [cm]	25	25	15
średnica wewnętrzna [mm]	20	4.6	1.0
liniowa prędkość fazy ruchomej [cm/min.]	10	15	15
natężenie przepływu fazy ruchomej [cm ³ /min.]	30	1,5	0,1
ciśnienie na wlocie kolumny [MPa]	5-20	5-20	5-15
czas cyklu rozdzielania (k=5) [min.]	15	10	6
ilość pól teoretycznych [N x 1000]	15	15	6

KOLUMNY

Wybór kolumny uwarunkowany jest zadaniem analitycznym, które mamy rozwiązać.

Długość kolumny zależy od średnicy ziaren wypełnienia. Im średnica jest mniejsza tym, kolumna może być krótsza.

Kolumny o małych średnicach pozwalają na wykrycie mniejszych stężeń mimo, że ich pojemność próbkowa mała. Wynika to z tego, że stężenia substancji w objętości fazy ruchomej są większe niż w kolumnie o większej średnicy.

Kolumny o małych średnicach ze względu na możliwość chromatografowania niewielkich próbek nie są przydatne do preparatywnego rozdzielania substancji w celu ich dalszego wykorzystania.

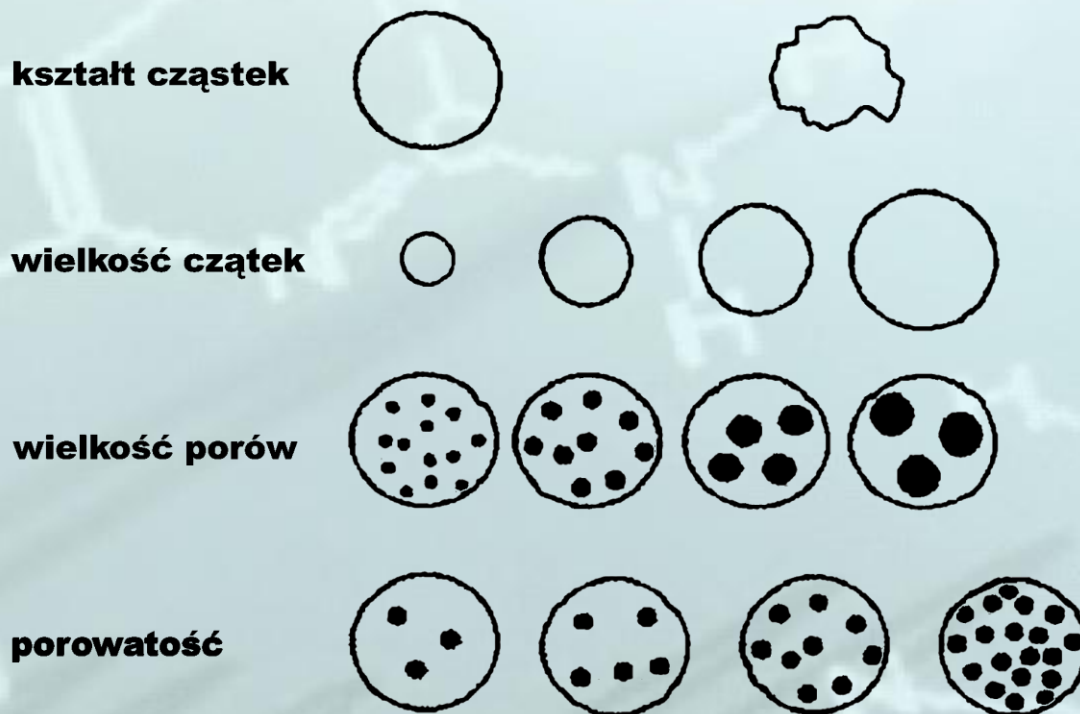
Czasem przed kolumną właściwą montuje się dodatkową kolumnę tzw. przedkolumnę.

Przedkolumna ma na celu chronienie kolumny właściwej przed zanieczyszczeniem. Są one znacznie krótsze niż kolumny (10-30mm), z reguły wypełnione takim samym materiałem jak kolumna właściwa.

WYPEŁNIENIA KOLUMN – FAZA STACJONARNA (SORBENT)

Rodzaj wypełnienia kolumny ma istotny wpływ na przebieg procesu chromatografowania.

Ważne są:



Najczęściej stosuje się ziarna o małej średnicy 5-10 μm . Ziarna o mniejszych średnicach powodują zbyt duże opory przepływu fazy ruchomej.

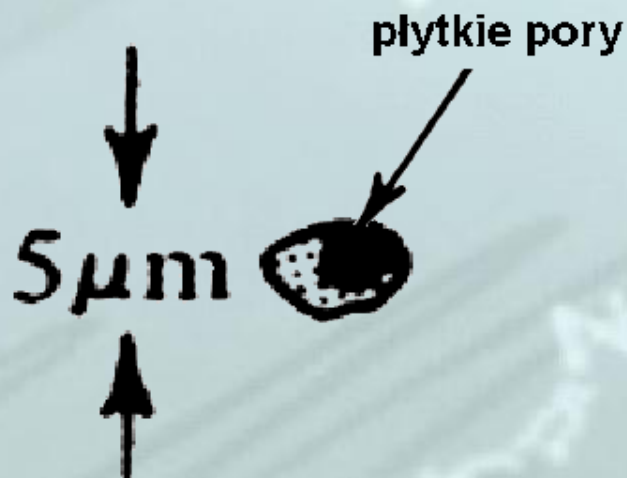
Powierzchnia właściwa sorbentu jest odwrotnie proporcjonalna do średniej średnicy porów. Cząstki krzemionki o dużych porach mają małą powierzchnię właściwą i odwrotnie. Wypełnienie takie stwarza dość duże opory przepływu fazy ruchomej, które są pokonywane za pomocą odpowiednio dobranego ciśnienia przepływu eluentu.

WYPEŁNIENIA KOLUMN – FAZA STACJONARNA (SORBENT) c.d.

Stosuje się dwa podstawowe strukturalne typy wypełnienia kolumn:

- ♦ ziarna objętościowo-porowate,
- ♦ ziarna o porowatej powierzchni.

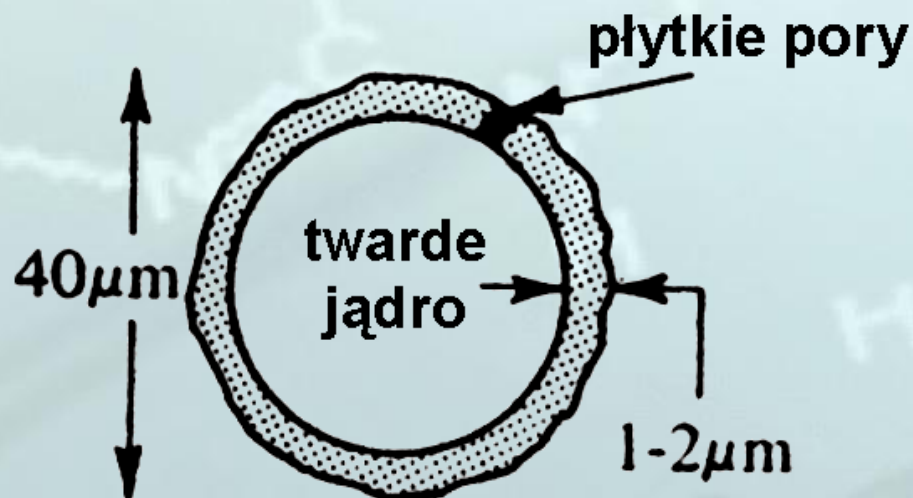
Ziarna objętościowo-porowate



Fazę stanowią całkowicie porowate cząstki np. żelu krzemionkowego o określonej powierzchni. Zaletą sorbetów objętościowo-porowatych jest zapewnienie wysokiej sprawności rozdziału i dużej pojemności sorpcyjnej.

WYPEŁNIENIA KOLUMN – FAZA STACJONARNA (SORBENT) c.d.

Ziarna o porowatej powierzchni

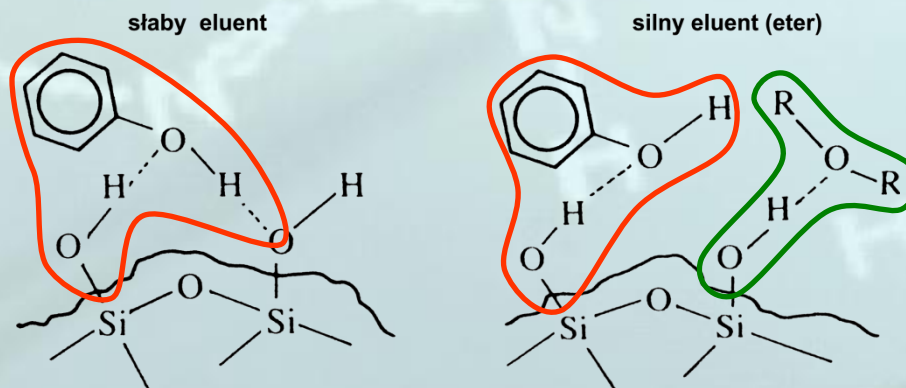


Zewnętrzna porowata warstwa ($1-2\mu\text{m}$) z żelu krzemionkowego lub związanej mono lub polimerowej fazy organicznej otacza sferyczne szklane ziarna ($30-40\mu\text{m}$). Sorbent ten pozwala na łatwe upakowanie kolumny, a ponadto opory przepływu eluentu są małe. Z powodu cienkiej warstwy porowatej pojemność sorpcyjną takiej warstwy jest jednak ograniczona ($1/10-1/20$ pojemności sorpcyjnej kolumny z wypełnieniem porowatym o podobnych rozmiarach). Z tej przyczyny zastosowanie tego sorbentu jest ograniczone.

WYPEŁNIENIA KOLUMN – FAZA STACJONARNA (SORBENT) c.d.

1. Żel krzemionkowy

Żel krzemionkowy jest głównym sorbentem stosowanym w chromatografii adsorpcyjnej w normalnym układzie faz. Czasem używany jest również tlenek glinu lub węgiel aktywny.



Mechanizm rozdzielania opiera się na oddziaływaniach grup hydroksylowych krzemionki z polarnymi grupami funkcyjnymi substancji analizowanych lub eluentu.

Cząsteczki eluentu współzawodniczą z cząsteczkami substancji oznaczanej o wiązanie się z miejscami aktywnymi krzemionki całkowicie wysycając jej miejsca aktywne. Silniejszy zwycięża ;)

Chromatografia adsorpcyjna jest najprawdopodobniejszym wyborem gdy próbka jest rozpuszczalna w niepolarnych lub średnio polarnych rozpuszczalnikach takich jak heksan, dichlorometan, chloroform czy eter.

WYPEŁNIENIA KOLUMN – FAZA STACJONARNA (SORBENT) c.d.

2. Modyfikowany żel krzemionkowy – fazy związane

powstają w wyniku przyłączenia do aktywnych grup hydroksylowych krzemionki łańcuchów alkilowych bądź związków z grupami funkcyjnymi.



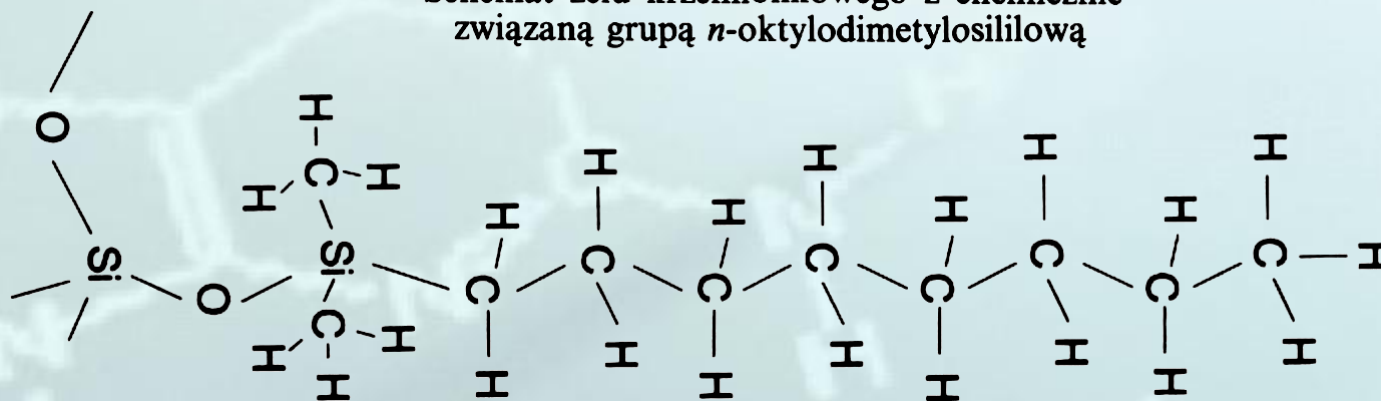
Obecnie fazy związane otrzymane przez modyfikację żelu krzemionkowego mają coraz większe znaczenie. Przyjmuje się że mechanizm ich działania jest podziałowy. Rozdział przebiega jednak w dużym stopniu przy udziale adsorpcji.

♦ **niepolarne**

Stosowane w chromatografii w odwróconym układzie faz (RP) do rozdzielania związków słabo rozpuszczalnych bądź nierozpuszczalnych w wodzie. Największe znaczenie mają fazy modyfikowane łańcuchami alkilowymi posiadającymi 2, 8 lub 18 atomów węgla w cząsteczce. Polarność faz związanych maleje wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego.

SORBENTY STOSOWANE W HPLC

Schemat żelu krzemionkowego z chemicznie związaną grupą *n*-oktylodimetylosililową

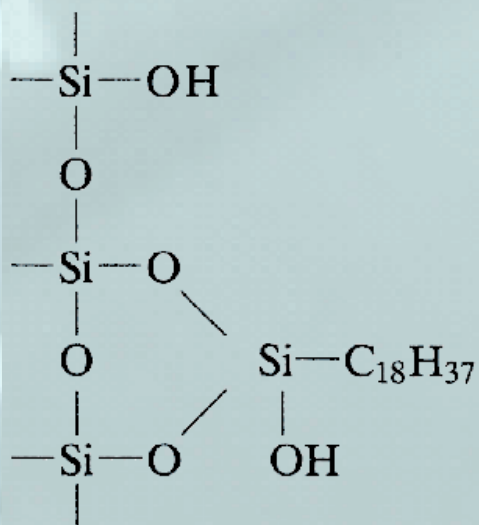


faza	rozdzielanie
C_2	związki polarne, związki wielkocząsteczkowe rozpuszczalne w polarnych rozpuszczalnikach
C_8	związki średnio polarne wstępne rozdzielanie mieszanin o nieznanym składzie
C_{18} grupa oktadecylosilanowa (ODS)	związki słabo polarne i niepolarne np. policykliczne węglowodory
grupa fenylova	zasady organiczne

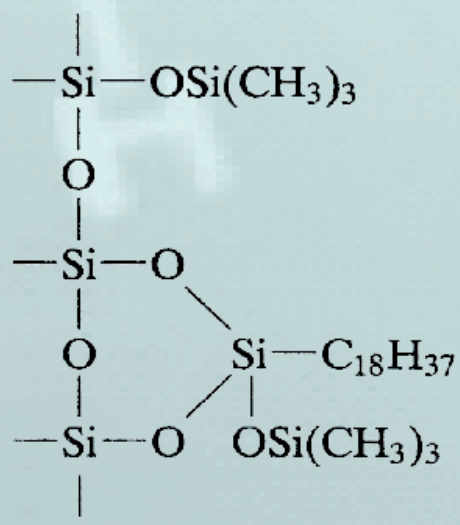
SORBENTY STOSOWANE W HPLC

żel krzemionkowy modyfikowany

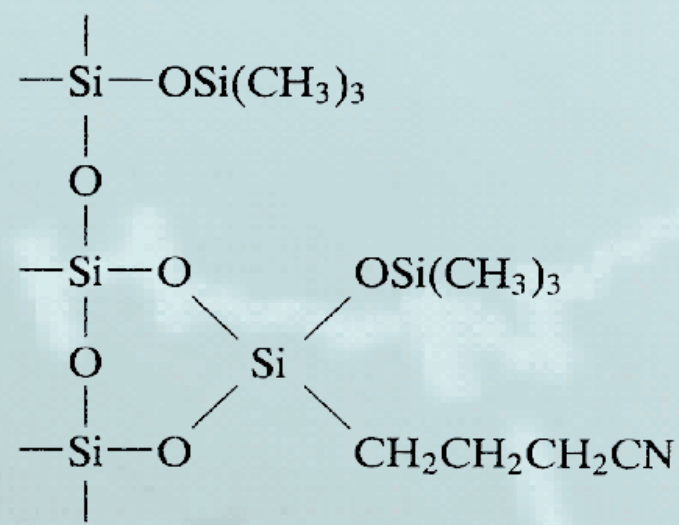
oktadecylosilanem



oktadecylosilanem i trimetylochlorosilanem



grupami cyjanopropylowymi

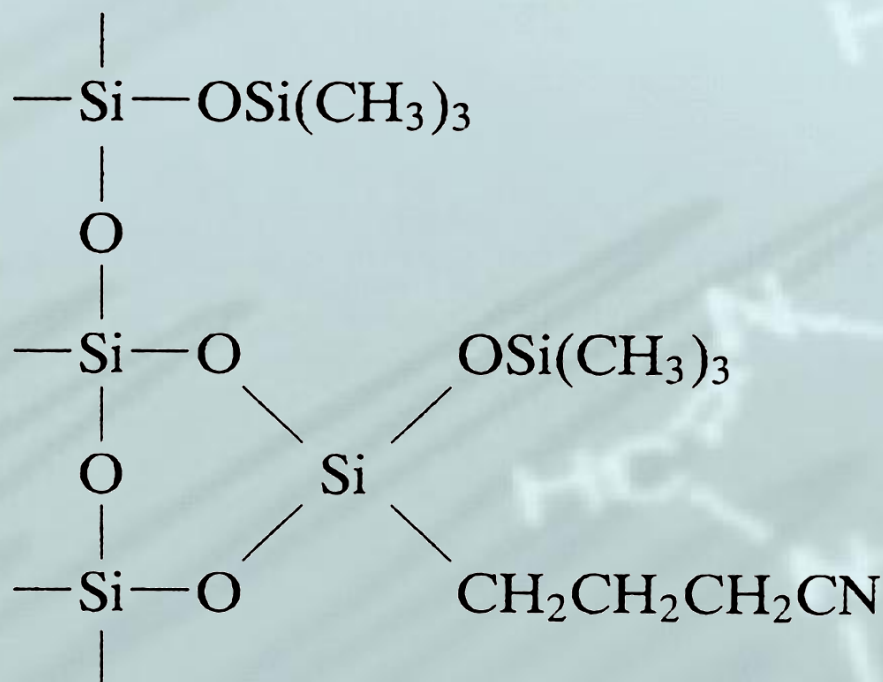


SORBENTY STOSOWANE W HPLC fazy związane c.d.

♦ polarne

Stosowane w chromatografii w normalnym i odwróconym układzie faz. Krzemionkę modyfikuje się w reakcji z organochlorosilanami zawierającymi polarne grupy: nitrową, cyjankową, aminową, hydroksylową.

żel krzemionkowy modyfikowany
grupami cyjanopropylowymi

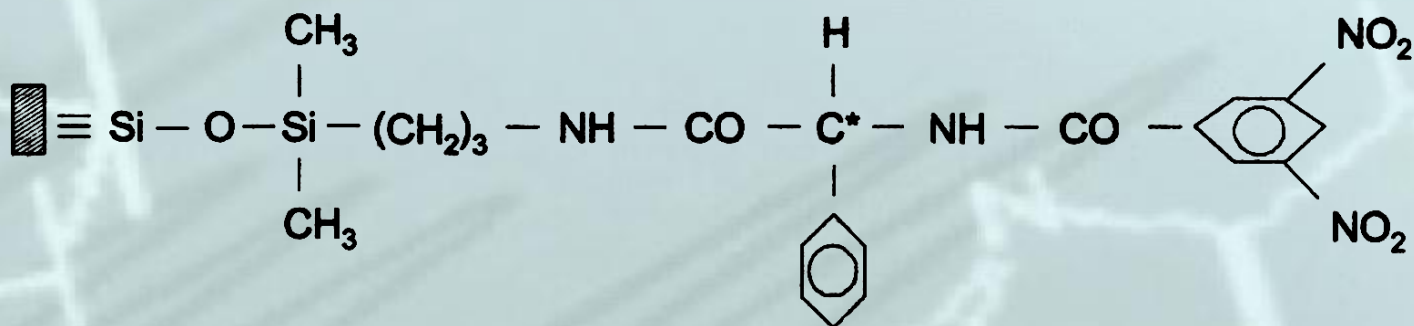


SORBENTY STOSOWANE W HPLC fazy związane c.d.

♦ optycznie czynne

Stosowane do rozdzielania mieszanin racemicznych na enancjomery. Fazę optycznie czynną stanowią żele krzemionkowe modyfikowane grupami chiralnymi np. *N*-(3,5-dinitrobenzoilo)fenyloglicyną. W wyniku różnej konfiguracji enancjomery różnie oddziałują z faza stacjonarną dzięki czemu następuje rozdział mieszaniny racemicznej.

Chiralna faza stacjonarna, *N*-(3,5-dinitrobenzoilo)fenyloglicyna, związana z krzemionką poprzez grupę 3-aminopropylosilanolową

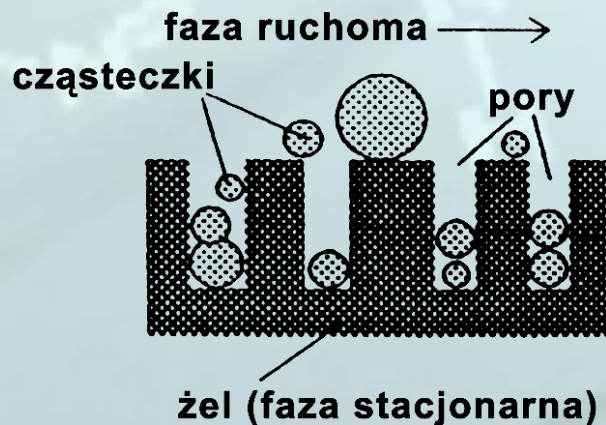


SORBENTY STOSOWANE W HPLC

3. Wypełnienia stosowane w chromatografii wykluczania (żelowej)

Żele o zdefiniowanych rozmiarach porów, zbliżonych do rozmiarów rozdzielanych związków.

Zasada rozdzielania w chromatografii żelowej



- ♦ usieciowane żele dekstranowe (sephadexy),
- ♦ usieciowane żele poli(akryloamidowe),
- ♦ żele krzemionkowe o dużych średnicach porów,
- ♦ szkło o kontrolowanej porowatości,
- ♦ usieciowany polistyren o makroporowatej strukturze.

zele te pęcznią w wodzie dlatego nie stosuje się ich w RP-HPLC

SORBENTY STOSOWANE W HPLC c.d.

3. Wypełnienia stosowane w chromatografii jonowymiennej

W technice tej są stosowane tzw. wymieniacze jonowe (jonity), są zdolne do wymiany własnych jonów na jony obecne w roztworze.

wymieniacze jonowe (jonity)

wymiana kationów – KATIONIT

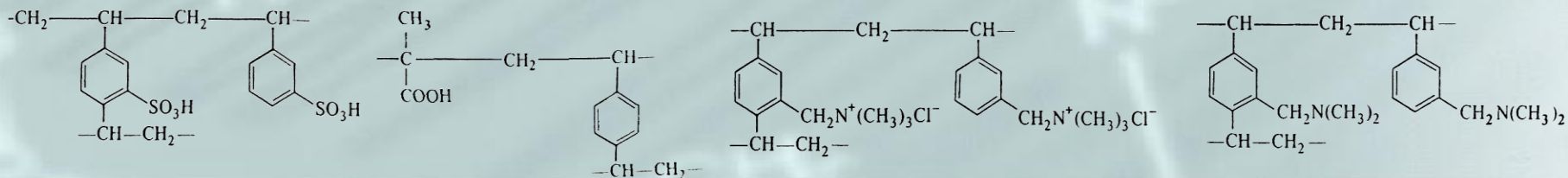
- ♦ grupa sulfonowa $-\text{SO}_3^-\text{H}^+$
jonit silnie kwasowy
- ♦ grupa karboksylowa $-\text{CO}_2^-\text{H}^+$
jonit słabo kwasowy
- ♦ grupa fosfonowa $-\text{PO}_3^-\text{H}^+$
jonit słabo kwasowy

wymiana anionów – ANIONIT

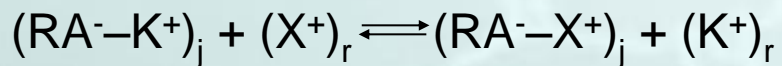
- ♦ IV-rzędowa grupa amoniowa $-\text{NR}_3^+\text{OH}^-$
jonit silnie zasadowy
- ♦ grupa aminowa $-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$
jonit słabo zasadowy

Jonity otrzymuje się poprzez:

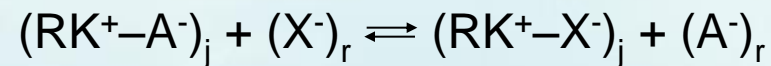
- ♦ modyfikację żelu krzemionkowego
- ♦ przyłączanie jonowych grup funkcyjnych do wolnych grup fenylowych obecnych w łańcuchu polistyrenu usieciowanego diwinylobenzenem.



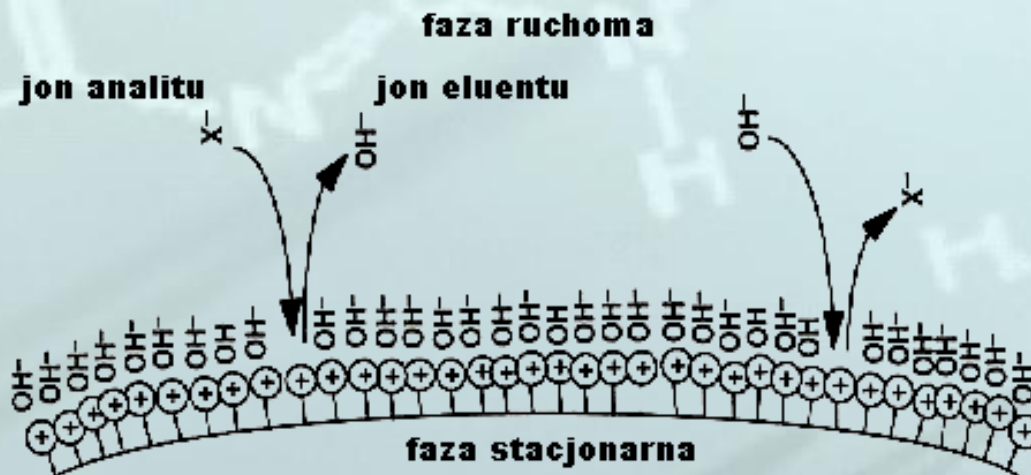
SORBENTY STOSOWANE W HPLC – chromatografia jonowymienna c.d.



kationit



anionit



Na właściwości jonitu znaczny wpływ ma pH.

Silne wymiennicze są całkowicie zdysocjowane co sprawia, że ich właściwości jako wymienniczy nie zależą od pH fazy ruchomej.

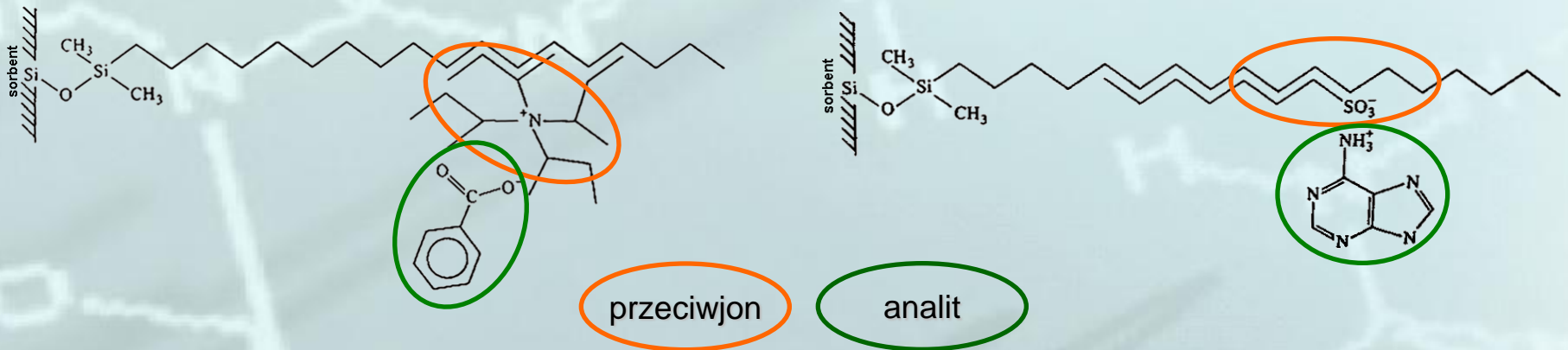
Grupa karboksylowa zachowuje swoje właściwości wymiennicza w środowisku zasadowym, a jon amoniowy w środowisku kwaśnym.

SORBENTY STOSOWANE W HPLC c.d.

4. Wypełnienia stosowane w chromatografii par jonowych (jonowo-asocjacyjnej)

Jako sorbenty stosuje się fazy ODS.

Do eluentu dodaje się hydrofobowy jonowy związek tzw. przeciwjon np. czwartorzędowy kation amoniowy, anion alkilo- lub arylosulfonianowy. Przeciwjon jest wiązany przez obojętną fazę stacjonarną nadając jej ładunek.



Tak powstała faza może wiązać i rozdzielać jony organiczne o przeciwnym ładunku na zasadzie tworzenia odwracalnego kompleksu par jonowych.

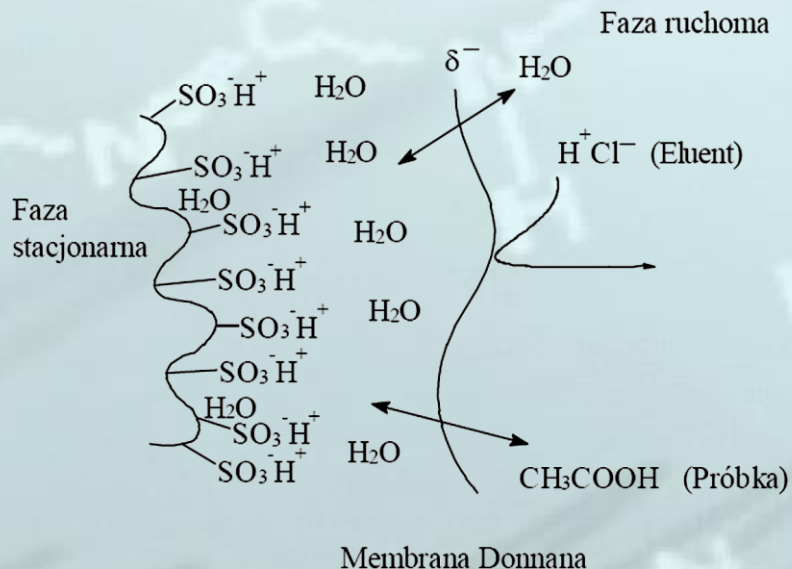
jon oznaczany + przeciwjon \rightleftharpoons para jonowa



SORBENTY STOSOWANE W HPLC c.d.

4. Wypełnienia stosowane w chromatografii jonowykluczającej

Chromatografia jonowykluczająca jest wariantem chromatografii jonowej, w którym wykorzystuje się zjawisko równowagi membranowej Donnana.



Rolę półprzepuszczalnej membrany pełni porowata żywica jonowymienna. Oddziela ona dwie fazy wodne: fazę ruchomą od fazy stacjonarnej, zawartej w porach żywicy. Membrana jest przepuszczalna tylko dla substancji niezjonizowanych lub słabo zjonizowanych, które ulegają podziałowi pomiędzy dwie fazy wodne. Czas przebywania tych substancji w kolumnie wydłuża się. Natomiast substancje zjonizowane, nieprzenikające do wnętrza porów, nie są zatrzymywane w kolumnie i opuszczają ją w pierwszej kolejności.

SORBENTY STOSOWANE W HPLC – chromatografia jonowykluczająca c.d.

Technika ta jest stosowana w celu szybkiej separacji słabych kwasów nieorganicznych, kwasów organicznych, alkoholi, aldehydów, aminokwasów, a także grupowego oddzielania związków nieorganicznych od organicznych.

FAZA RUCHOMA

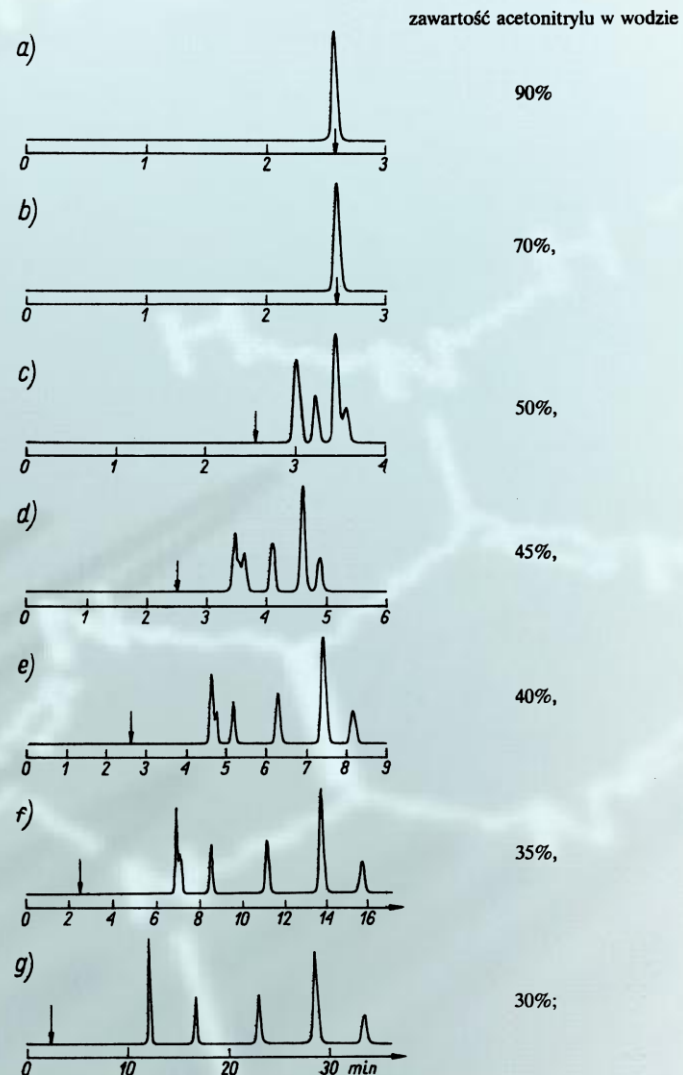
Eluent jest najczęściej mieszaniną dwóch lub trzech rozpuszczalników zmieszanych w proporcjach zapewniających optymalny rozdział badanej mieszaniny.

Skład fazy ruchomej ma znaczący wpływ na rozdział składników mieszanin.

Niewielka zmiana składu eluentu wywiera znaczny wpływ na jakość rozdziału mieszaniny.

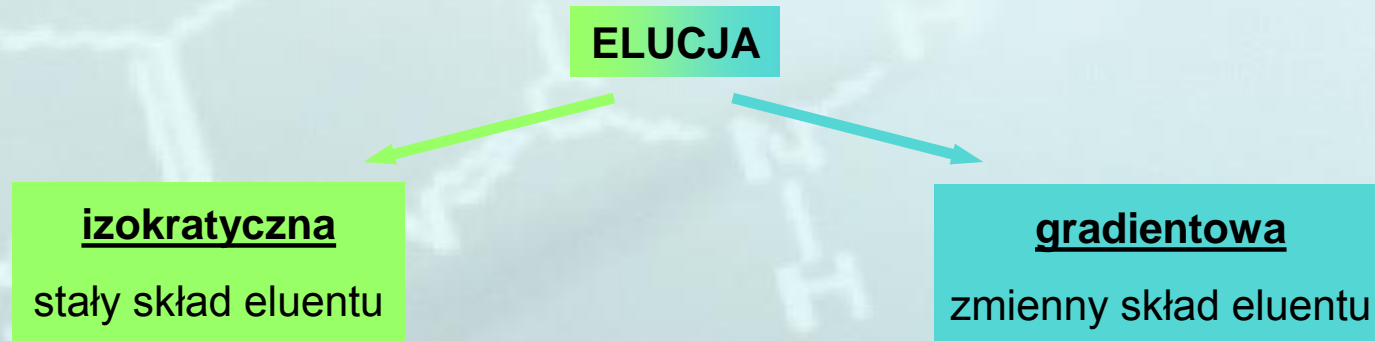
Podobny wpływ mają zanieczyszczenia, które mogą znajdować się w fazie ruchomej.

Chromatogramy mieszaniny obojętnych związków aromatycznych, otrzymane przy użyciu różnych mieszanin acetonitryl-woda;



FAZA RUCHOMA c.d.

Skład eluentu może być stały lub zmieniać się podczas procesu chromatografowania.



Elucję izokratyczną stosuje się gdy składniki rozdzielanej mieszaniny mają podobne właściwości.

Elucję gradientową stosuje się gdy poszczególne składniki mieszaniny znacznie się różnią właściwościami. W przypadku chromatografii w normalnym układzie faz polarność, a w przypadku układu faz odwróconych rozpuszczalnością w fazie ruchomej.

Elucja gradientowa polega na zwiększaniu siły elucyjnej fazy ruchomej w trakcie chromatografowania. Zmiana ta może odbywać się liniowo bądź skokowo.

FAZA RUCHOMA c.d.

Rozpuszczalniki stosowane w HPLC powinny:

- ♦ dobrze rozpuszczają próbkę,
- ♦ nie reagować z fazą stacjonarną,
- ♦ nie reagować ze składnikami próbki,
- ♦ posiadać wysoki stopień czystości,
- ♦ umożliwiać detekcję składników próbki,
- ♦ być trwałe w warunkach chromatografowania.

Dobierając rodzaj i ilość rozpuszczalników wchodzących w skład eluentu należy wziąć pod uwagę:

- ♦ skład analizowanej mieszaniny,
- ♦ rodzaj wypełnienia kolumny,
- ♦ rodzaj detektora.

W detekcji związków przeszkadza rozpuszczony w rozpuszczalnikach tlen. Dlatego też stosuje się odgazowywanie fazy ruchomej najczęściej poprzez przedmuchiwanie gazem obojętnym przeważnie helem. Odgazowanie można przeprowadzić również podgrzewając eluent do temp. zbliżonej do temp. wrzenia, bądź za pomocą ultradźwięków.

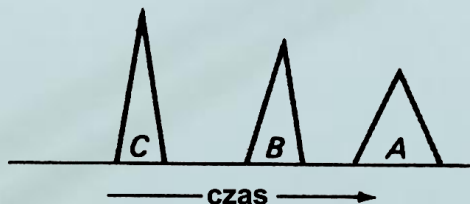
FAZA RUCHOMA – zasady doboru

Chromatografia adsorpcyjna i podziałowa

Zasada doboru fazy ruchomej jest analogiczna jak w GC. Dodatkowym czynnikiem jaki należy wziąć pod uwagę jest lepkość rozpuszczalnika.

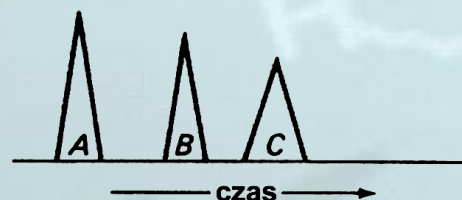
NORMALNY UKŁAD FAZ

niska polarność fazy ruchomej



UKŁAD FAZ ODWRÓCONYCH

wysoka polarność fazy ruchomej



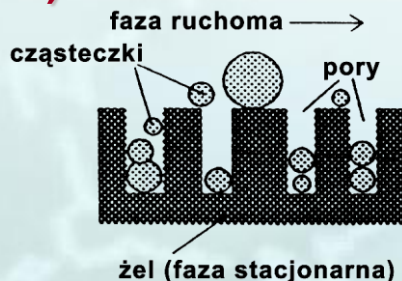
średnio polarna faza ruchoma



polarność substancji rozpuszczonych $A > B > C$

FAZA RUCHOMA – zasady doboru c.d.

Chromatografia żelowa (wykluczania)



Jedyną rolą eluentu jest przenoszenie rozpuszczonych w nim składników chromatografowanej mieszaniny wzdłuż kolumny.

Podstawowym kryterium doboru eluentu jest zdolność do rozpuszczenia substancji badanej.

Eluent powinien być obojętny w stosunku do fazy stacjonarnej i substancji badanej.

Rodzaj eluentu zależy od rodzaju wypełnienia kolumny:

- ♦ usieciowane żele dekstranowe (sephadexy),
- ♦ usieciowane żele poli(akryloamidowe),
- ♦ żele krzemionkowe o dużych średnicach porów,

rozpuszczalniki niepolarne

np. chlorek metylenu, chloroform, toluen, tetrahydrofuran

- ♦ szkło o kontrolowanej porowatości,
- ♦ usieciowany polistyren o makroporowatej strukturze.

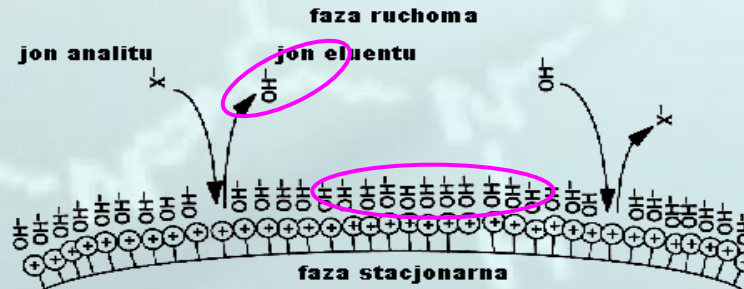
rozpuszczalniki polarne

głównie woda, alkohole

FAZA RUCHOMA – zasady doboru c.d.

Chromatografia jonowymienna

W chromatografii jonowymiennej fazę ruchomą w większości stanowią wodne roztwory buforowe o pH zależnym od składu analizowanej mieszaniny i rodzaju sorbentu.



Najważniejszym parametrem charakteryzującym eluent jest **siła jonowa**, która zależy od:

- ♦ rodzaju jonów o ładunku przeciwnym do ładunku jonów jonitu czyli **przeciwjonów**,
- ♦ stężenia przeciwjonów.

Liczba przeciwjonów decyduje o równowadze jonowej w miejscach aktywnych wymiennicza jonowego oraz oddziaływaniach substancji chromatografowanych z tym jonitem, dlatego też musi być kontrolowana.

Gdy stężenie przeciwjonów w fazie ruchomej jest za duże wówczas jony substancji analizowanej zbyt słabo oddziałują z fazą stacjonarną, a co za tym idzie krócej przebywają w kolumnie (mają krótszy tzw. czasy retencji).

Gdy stężenie przeciwjonów jest zbyt małe wówczas substancje analizowane są zbyt długo zatrzymywane na jonicie co sprawia, że dłużej przebywają w kolumnie (wydłużenie czasu retencji).

FAZA RUCHOMA – zasady doboru – chromatografia jonowymienna c.d.

O doborze składu eluentu, a co za tym idzie i o sile jonowej decyduje w dużej mierze rodzaj próbki.

Jeżeli rozdzielamy próbki składające się z substancji dobrze dysocjujących np. kwasy karboksylowe, aminy organiczne **najlepiej stosować roztwory buforów silnie zdysocjowanych (mocnych eluentów)**.

Substancje jonowe silnie zdysocjowane eluowane o słabym charakterze jonowym (słabym eluentem) silniej oddziałują z jonitem co sprawia, że dłużej przebywają w kolumnie (wydłużenie czasu retencji).

Jeżeli rozdzielamy próbki składające się z substancji słabo dysocjujących np. witaminy, kwasy nukleinowe **najlepiej stosować roztwory słabych eluentów**.

Substancje słabo zdysocjowane eluowane silnym eluentem (o silnym charakterze jonowym) są szybko wypierane z wymiennicza jonowego, a co za tym idzie krócej przebywają w kolumnie (mają krótszy tzw. czasy retencji).

Najczęściej do regulacji siły jonowej stosuje się roztwory buforowe zawierające jony:

- ♦ dla anionów: amonowy, pirydyniowy, sodowy, potasowy;
- ♦ dla kationów: octanowy, cytrynowy, fosforanowy, boranowy, chloranowy (VII), azotanowy (V).

FAZA RUCHOMA – zasady doboru – chromatografia jonowymienna c.d.

Na wymianę jonów na słabych jonitach, a przez to na efekt rozdzielenia i czas retencji składników próbki znaczny **wpływ ma pH fazy ruchomej**.

Obniżenie pH zmniejsza jonizację słabego wymiennicza kationowego np. $-\text{COO}^-\text{H}^+$ co powoduje skrócenie czasu retencji.

Podwyższenie pH zmniejsza jonizację słabego wymiennicza anionowego np. $-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$, skracając czas retencji.

Próbki zawierające składniki nierozpuszczalne w wodzie trudno eluować wodnym eluentem.

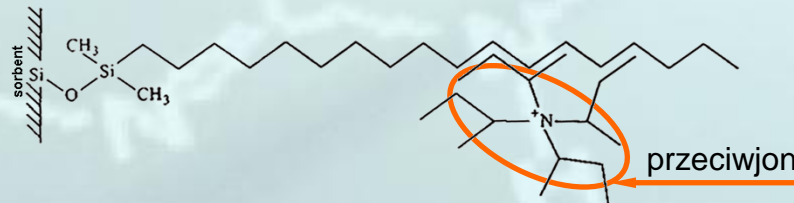
Do fazy ruchomej dodaje się wówczas niewielką ilość tzw. **modyfikatora organicznego** czyli rozpuszczalnika organicznego (acetonitrylu, metanolu, izopropanolu) który zmniejsza polarność fazy ruchomej i przyspiesza elucję.

Może się zdarzyć, że przy ustalonym pH środowiska niektóre z substancji analizowanych np. aminokwasy znajdą się w punkcie izoelektrycznym, a co za tym idzie jako pozbawione ładunku nie będą oddziaływać z jonitem.

FAZA RUCHOMA – zasady doboru c.d.

Chromatografia par jonowych

Fazę ruchomą tworzy mieszanina wody, rozpuszczalnika organicznego i przeciwjonu tworzącego z analitem parę jonową. Rodzaj przeciwjonów uzależniony jest od składu próbki.



jon oznaczany + przeciwjon ⇌ para jonowa

Najważniejszymi cechami eluentu stosowanego w tym rodzaju chromatografii są:

- ♦ rodzaj reagenta tworzącego parę jonową (przeciwjonu),
- ♦ stężenie reagenta tworzącego parę jonową,
- ♦ skład,
- ♦ pH.

Aby rozdział był skuteczny jony reagenta (przeciwjonu) powinny być możliwie małe, tak aby o rozdziale par reagent-analit decydowały w jak największym stopniu indywidualne cechy analitu.

FAZA RUCHOMA – zasady doboru – chromatografia par jonowych c.d.

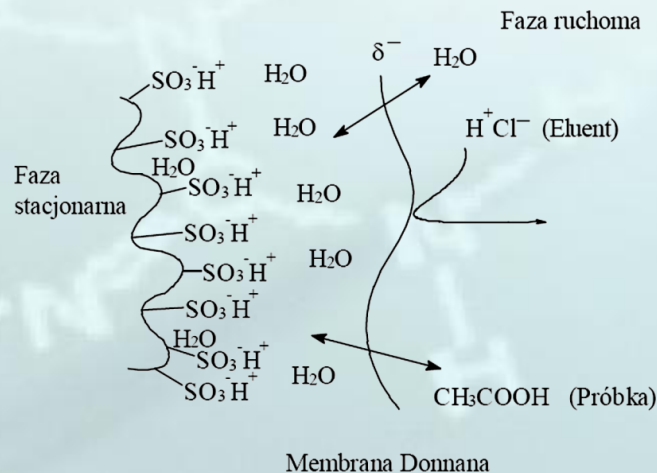
Ogólnie:

Próbki kwasowe chromatografuje się eluentem o pH 7-8, stosując jako przeciwjony fosforany: tetrabutylamoniowy, tributylaminy lub tridecyloaminy, a także bromek cetylotrimetyloamoniowy (cetramid).

Próbki zasadowe chromatografuje się w środowisku o pH 3, stosując jako przeciwjony sole sodowe alkilosulfonianów.

W wielu przypadkach długi czas retencji może być skrócony przez dodanie do eluentu modyfikatora organicznego.

Chromatografia jonowykluczająca



Najprostszym eluentem stosowanym w chromatografii wykluczania jonów jest czysta, dejonizowana woda.

Wadą wody jako eluentu jest to, że w pH bliskim obojętnego spora część słabych kwasów i zasad jest całkiem dobrze zdysocjowana a przez to słabo zatrzymywana w mechanizmie jonowykluczającym.

Woda w pH zbliżonym do obojętnego obecnie jest stosowana głównie w oznaczaniu węglanów.

FAZA RUCHOMA – zasady doboru – chromatografia jonowycluczająca c.d.

Ogólnie do rozdziału:

- ♦ **słabych kwasów** stosuje się jako eluenty roztwory kwaśne - rozcieńczone roztwory kwasów mineralnych solnego, siarkowego, a także perfluoroheptanowego i oktanosulfonowego,
- ♦ **słabych zasad** stosuje się eluenty zasadowe.

W wielu przypadkach długi czas retencji alifatycznych monokwasów i kwasów aromatycznych może być skrócony przez dodanie do eluentu niewielkich ilości modyfikatora organicznego który blokując centra adsorpcyjne na powierzchni fazy stacjonarnej przyspieszając elucję.

FAZA STACJONARNA I FAZA RUCHOMA – zasady doboru c.d.

Ogólny schemat wyboru rodzaju fazy ruchomej i nieruchomej w zależności od rodzaju chromatografowanej substancji

Próbka			Rodzaj chromatografii	Faza stacjonarna	Faza ruchoma
rozpuszczalność	polarność lub odczyn				
nierozpuszczalna w wodzie	niepolarna		podziałowa (na fazach związanych); w odwróconym układzie faz	związana C ₁₈	metanol lub woda-acetonitryl (70:30)
				związana C ₈	woda-acetonitryl (50:50)
	średnio polarna		adsorpcyjna; w normalnym układzie faz	żel krzemionkowy	n-heptan-chloroform (95:5)
				związana C ₈	woda-acetonitryl (70:30)
polarna		podziałowa (na fazach związanych)	w odwróconym układzie faz	związana CN	n-heptan-izopropanol (98:2)
			w normalnym układzie faz		
rozpuszczalna w wodzie	zasadowa	silnie	jonowymienna	kationit	0,01–0,1 mol/l Na ₂ HPO ₄
		słabo	podziałowa (na fazach związanych); w odwróconym układzie faz	związana C ₁₈	woda (zawierająca 0,005 mol/l kwasu heksanosulfonowego)-metanol
	kwaśna	silnie	jonowymienna	anionit	0,01–0,1 mol/l Na ₂ HPO ₄
		słabo	podziałowa (na fazach związanych); w odwróconym układzie faz	związana C ₁₈	woda-metanol (z dodatkiem 0,005 mol/l wodorotlenku tetrabutylamoniowego)

FAZA STACJONARNA I FAZA RUCHOMA – zasady doboru c.d.

Przykłady zestawień faz stacjonarnych i ruchomych

Faza stacjonarna	Struktura chemiczna fazy stacjonarnej	Faza ruchoma	Chromatografowane substancje
Chromatografia adsorpcyjna			
Żel krzemionkowy	$\begin{array}{c} \text{—Si—O—Si—} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	heksan, chloroform, izopropanol	etery, estry, porfiryny, mykotoksyny, witaminy rozpuszczalne w oleju
Chromatografia podziałowa w normalnym układzie faz			
Związana faza aminowa	—NH ₂	heksan, chloroform, izopropanol	cukry, steroidy, nitrozwiazki
Związana faza cyjanowa	—CN	heksan, chloroform, izopropanol	nitrozwiazki, aminokwasy
Chromatografia podziałowa w odwróconym układzie faz			
Związana faza metylowa (RP-2)	dimetylosilan	woda, metanol, acetonitryl	aminy, fenole, witaminy rozpuszczalne w wodzie
Związana faza oktylowa (RP-8)	oktylosilan	jw.	katecholaminy, steroidy, olejki eteryczne
Związana faza oktadecylowa (RP-18, ODS)	oktadecylosilan	jw.	węglowodory poliaromatyczne
Chromatografia jonowymienna			
Silny wymiennicz kationowy	kwas sulfonowy	0,01–0,1 mol/l Na ₂ HPO ₄	witaminy rozpuszczalne w wodzie, puryny, aminokwasy, nukleozydy
Silny wymiennicz anionowy	amina czwartorzędowa	jw.	nukleotydy
Słaby wymiennicz anionowy	—NH ₂	jw. jw.	barwniki, węglowodany
Chromatografia sitowa			
Żel wodny	sulfonowany diwinylobenzen	woda	protony, peptydy, cukry
Żel organiczny	diwinylobenzen	chloroform, tetrahydrofuran	polimery
Żel krzemionkowy o określonych rozmiarach porów	żel krzemionkowy	tetrahydrofuran, alkohole, woda	polimery, związki biologiczne
Szkło o określonych rozmiarach porów	szkło porowate	jw.	związki biologiczne

POMPA odpowiada za przepływ przez układ fazy ruchomej w sposób ciągły, odtwarzalny i z optymalną prędkością.



Parametry charakteryzujące pompę:

- ♦ zakres wydatku objętościowego,
- ♦ maksymalne ciśnienie robocze,
- ♦ odtwarzalność wydatku objętościowego,
- ♦ zakres pulsacji rozpuszczalnika.

Dobra pompa powinna się charakteryzować:

- ♦ odpornością chemiczną materiału pompy na skład fazy ruchomej,
- ♦ małą objętością wewnętrzną,
- ♦ bezpulsacyjnym przepływem fazy ruchomej,
- ♦ możliwością uzyskania ciśnień rzędu 35 Mpa,
- ♦ stałym przepływem fazy ruchomej z możliwością jego regulacji w zakresie 0.5-10 cm³/min.

POMPY WADY I ZALETY

ZALETY

pompy stałościennieniowe

- ♦ brak pulsacji ciśnienia dzięki czemu otrzymuje się dobrą linię podstawową,
- ♦ prosta konstrukcja,
- ♦ możliwość pracy przez długi czas pompy tłokowej,
- ♦ łatwość obsługi.

WADY

- ♦ występowanie niepożądanych zmian przepływu fazy ruchomej na skutek zmian lepkości cieczy wywołanej zmianą temperatury,
- ♦ słaba odtwarzalność wyników mogąca uniemożliwić analizę jakościową i ilościową,
- ♦ w przypadku wporowych konieczność przerywania chromatografowania w celu napełnienia cylindra pompy eluentem,
- ♦ w przypadku pomp wporowych rozpuszczanie się gazu w rozpuszczalniku co może przeszkadzać w detekcji

pompy stałoprzepływowe

- ♦ utrzymanie stałego przepływu niezależnie od zmian lepkości eluentu i oporu hydraulicznego kolumny,
- ♦ powtarzalność wyników,
- ♦ szeroki zakres wydatku objętościowego pomp tłokowych,
- ♦ możliwość ciągłej pracy pomp tłokowych.
- ♦ w przypadku pomp strzykawkowych konieczność przerywania chromatografowania w celu napełnienia cylindra pompy eluentem,
- ♦ w przypadku pomp tłokowych pulsacja cieczy powodująca spadek czułości detektorów.

Pulsację można zmniejszyć poprzez:

- ♦ zmniejszenie objętości cieczy pompowanej w jednym cyklu tłoka dzięki zastosowaniu cylindrów o małej objętości i zwiększeniu prędkości ruchów tłoka.
- ♦ zastosowanie pomp dwutłokowych współdziałających w cyklu przesuniętym o 180°.

DOZOWNIK umożliwia wprowadzenie próbki pod ciśnieniem atmosferycznym do kolumny, w której panuje ciśnienie rzędu kilkudziesięciu Mpa.

DOZOWNIKI

```
graph TD; A[DOZOWNIKI] --> B[dozowniki strzykawkowe z membraną gumową]; A --> C[zawory dozujące z pętlą]; C --> D[zewnątrzną zmienna objętość 0.01-0.5 ml]; C --> E[wewnętrzną stała objętość];
```

dozowniki strzykawkowe
z membraną gumową

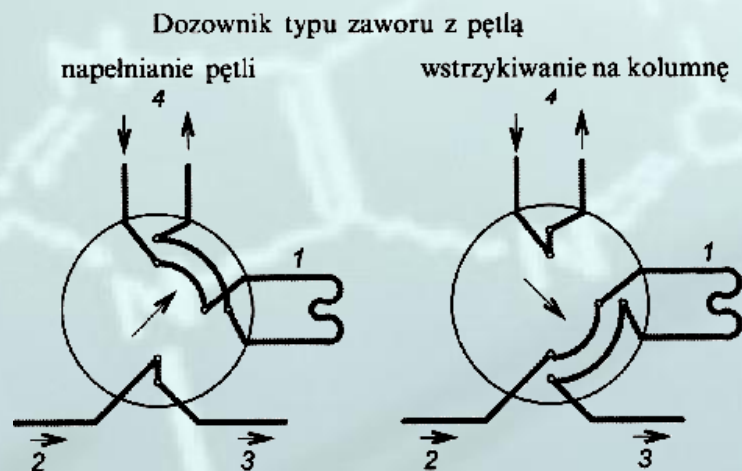
zawory dozujące z pętlą

zewnątrzną
zmienna objętość 0.01-0.5 ml

wewnętrzną
stała objętość

DOZOWNIKI

♦ zawory dozujące z pętlą

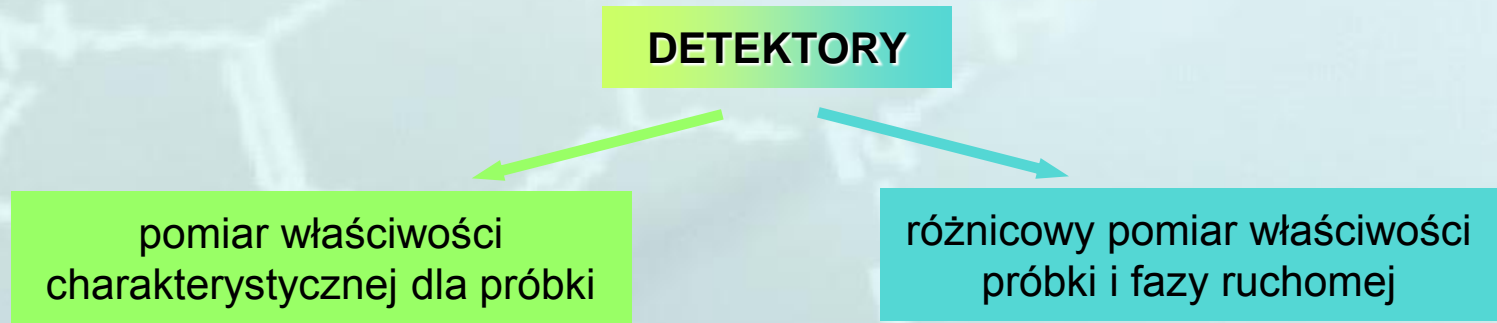


- 1 — pętla,
- 2 — wlot fazy ruchomej,
- 3 — wylot fazy ruchomej do kolumny,
- 4 — wprowadzenie próbki.



Zawór dozujący jest tak zbudowany, że w jednym położeniu dźwigni można pod ciśnieniem atmosferycznym pętlę przepłukać i napełnić roztworem próbki badanej. Próbkę dozuje się zazwyczaj za pomocą strzykawki. W drugim położeniu faza ruchoma może omijać zawór. Najczęściej stosowane są zawory firmy Rheodyne, dlatego też często zawory dozujące z pętlą nazywa się reodyną. W zależności od rodzaju detektora i kolumny pojemność takiej pętli dozowniczej może być różna i wynosić od 10 μ l do 10 ml.

DETEKTOR jest częścią układu chromatograficznego, który wykrywa poszczególne składniki rozdzielonej mieszaniny.

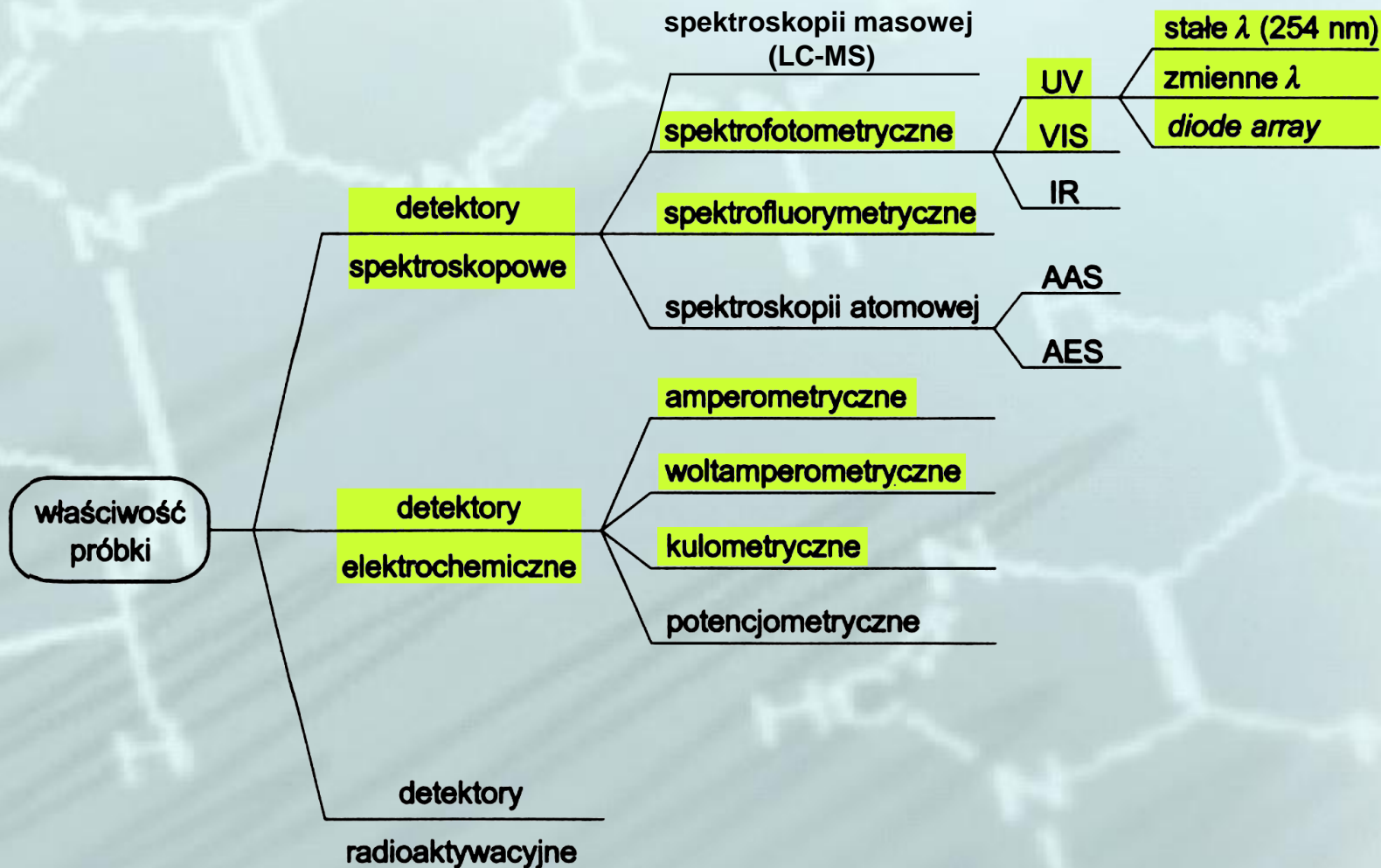


Detektor stosowany w HPLC powinien się charakteryzować:

- ♦ dobrą czułością,
- ♦ niską granicą detekcji,
- ♦ szerokim zakresem liniowości wskazań,
- ♦ małą objętością,
- ♦ niewrażliwością na zmiany temperatury i prędkości przepływu fazy ruchomej,
- ♦ niezawodnością działania.

DETEKTORY

1. Detektory działające na zasadzie pomiaru właściwości charakterystycznej dla próbki



DETEKTORY c.d.

Detektory UV

- ♦ **pracujący przy jednej długości fali 254 nm** – wiele substancji absorbuje promieniowanie o tej długości fali,
- ♦ **pracujący w zakresie UV/Vis** – z płynną regulacją długości fali w zakresie 190-600 nm,
- ♦ **diode array (z matrycą diodową)** – rejestrują promieniowanie o długości fali w zakresie 190-600 nm co umożliwia zdjęcie całego widma analizowanej substancji.

Detektory UV nie są wrażliwe na zmiany temperatury i przepływu fazy ruchomej. Granica detekcji wynosi średnio 1 ng/próbkę.



DETEKTORY c.d.

Detektor spektrofluorymetryczny

Istota detekcji polega na pomiarze intensywności światła o określonej dł. fali emitowanego przez analizowany związek w wyniku jego pobudzenia. Jest to detektor selektywny, posiadający dużą czułość względem substancji wykazujących fluorescencję.

Granica detekcji w tym typie detektora jest ok. 100-krotnie niższa niż w detektorze UV.



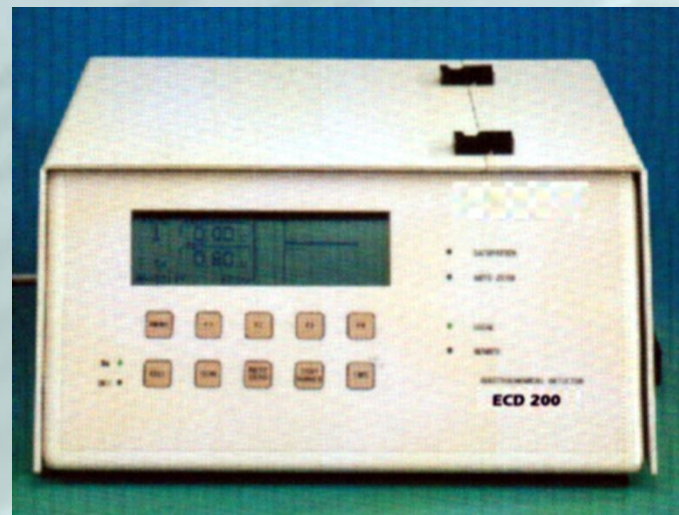
DETEKTORY c.d.

Detektory elektrochemiczne

Najczęściej stosuje się detektory amperometryczne i kulometryczne do wykrywania substancji organicznych i nieorganicznych. Są one stosowane głównie do analizy związków biologicznie czynnych.

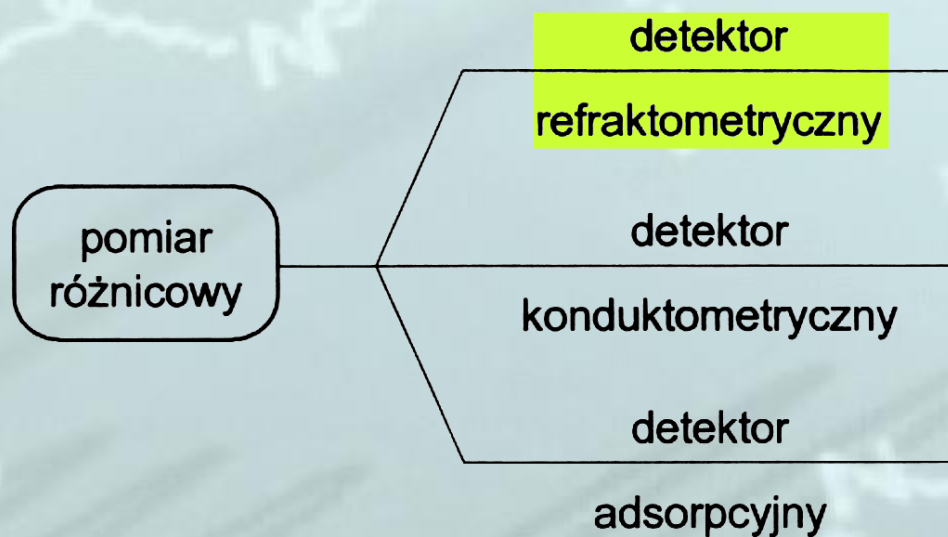
Charakteryzują się one dużą selektywnością i czułością względem niektórych związków.

Ograniczeniem ich stosowania jest to, że faza ruchoma musi przewodzić prąd co wymusza stosowanie eluentów zawierających wodę. Nie można ich zatem używać w chromatografii w normalnym układzie faz.



DETEKTORY c.d.

2. Detektory działające na zasadzie pomiaru różnicowego właściwości próbki i fazy ruchomej



DETEKTORY c.d.

Detektor refraktometryczny

Jest to detektor najbardziej uniwersalny. Mierzy on w sposób ciągły różnice we współczynnikach załamania czystego eluentu i eluatu wypływającego z kolumny.

Czułość tego detektora jest tym większa, im większa jest różnica współczynników załamania eluentu i eluatu. Jest to detektor najbardziej uniwersalny.

Czułość jego jest mniejsza niż detektora UV, jest też bardziej czuły na zmiany temperatury i ciśnienia. Stąd też konieczność termostatowania z dużą dokładnością temperatury. Wskazania tego typu detektora zmieniają się wraz ze zmianą składu fazy ruchomej. Z tego powodu nie można go stosować w przypadku elucji gradientowej.

Stosuje się je do wykrywania węglowodanów, alkoholi i kwasów alifatycznych.



DETEKTORY c.d.

Detektor konduktometryczny

Detekcja konduktometryczna (przewodnictwa jonowego) jest najbardziej uniwersalną metodą stosowaną w chromatografii jonowej. Metodą konduktometryczną mogą być oznaczane anality, które po przejściu przez kolumnę analityczną są w stanie dotrzeć do detektora w postaci jonowej.

W detektorze konduktometrycznym wykorzystuje się zdolność roztworów elektrolitów umieszczonych w polu elektrycznym powstającym pomiędzy dwoma elektrodami przepływowego naczynka konduktometrycznego do przewodzenia prądu na skutek transportu jonów.

