Metody rozdzielcze – podstawy teoretyczne, podział metod. Metody chromatograficzne: TLC, HPTLC, HPLC, GC, SFC

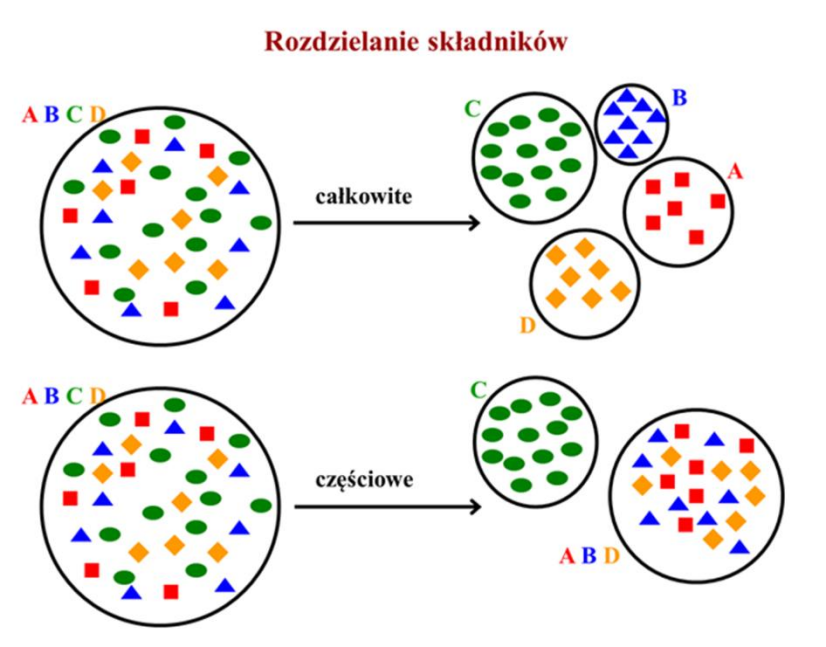
Metody rozdzielcze

- We współczesnej analityce chemicznej są podstawą większości procesów izolacji i identyfikacji związków chemicznych.
- Umożliwiają selektywne rozdzielenie pierwiastków czy substancji chemicznych ze skomplikowanych mieszanin, przy jednoczesnym określeniu ich rodzaju i ilości.

Metody rozdzielcze

Rozdzielenie (ang. *separation*):

- proces, w którym mieszanina jest podzielona przynajmniej na dwie frakcje o zróżnicowanym składzie;



- jest uzyskiwane poprzez wykorzystanie metod fizycznych, jak również reakcji chemicznych;

Metody rozdzielcze

- może dotyczyć bardzo zróżnicowanych mieszanin;
- może być prowadzone w różnym celu (analityczny, preparatywny);
- w różnej skali (laboratoryjnej, przemysłowej).

Metody rozdzielcze

Przesiewanie – rozdział sproszkowanych faz stałych w oparciu o różnice w wielkość cząstek; prowadzone na sucho.

Sączenie (filtracja) – oddzielenie ciał stałych od cieczy.

Odparowywanie – zastosowanie przede wszystkim do rozdzielania mieszanin jednorodnych np. wody z solą.

Destylacja – metoda rozdzielania ciekłych mieszanin.

Krystalizacja – rozdzielanie mieszanin jednorodnych; proces powstawania fazy krystalicznej z fazy stałej, ciekłej lub gazowej.

Sedymentacja – pozwala na rozdzielenie ciał stałych od cieczy.

Dekantacja – polega na zlewaniu cieczy znad osadu, który pod wpływem sił grawitacji opadł na dno.

Metody rozdzielcze

Kiedy stosujemy metody rozdzielania?

- konieczność *oddzielenia* oznaczanych składników od składników matrycowych,
- konieczność *zagęszczenia* oznaczanych składników,
- konieczność *przeprowadzenia* oznaczanego składnika do postaci odpowiedniej dla danej metody analitycznej.

Metody rozdzielcze

Kryteria klasyfikacji:

- cel,
- rodzaj mieszaniny,
- fizyczne i chemiczne zjawiska wykorzystywane w rozdzieleniu.

Metody rozdzielcze

Podstawowe grupy mechanizmów wykorzystywanych w separacji analitycznej:

- **podział**
- **adsorpcja**
- **filtracja**

Metody rozdzielcze

- **Sorpcja** i **podział** oparte na oddziaływaniach fizykochemicznych pomiędzy analitem a medium separacyjnym.
- **Filtracja** - charakter wyłącznie fizyczny, zastosowanie głównie w procesach zatężania i wydzielania analitów z matryc.

Techniki separacyjne

Początki technik separacyjnych:

- odkrycie zjawiska **chromatografii** przez **Michaiła Cwieta**
- **Irving Langmuir** (Nagroda Nobla w 1932) oraz **Archer Martin** i **Richard Synge** (Nagroda Nobla w 1952) - badania nad fizykochemią powierzchni oraz zjawiskami międzyfazowego podziału.

Techniki separacyjne w chemii analitycznej

Obejmują trzy zasadnicze grupy:

- **Techniki ekstrakcyjne**:

  Ekstrakcja gazem

  Ekstrakcja cieczą

  Ekstrakcja do fazy stałej

- **Techniki chromatograficzne**:

  Chromatografia gazowa (chromatografia kolumnowa)

  Chromatografia cieczą w stanie nadkrytycznym (chromatografia kolumnowa)

  Chromatografia cieczowa (chromatografia kolumnowa, planarna)

- **Techniki elektromigracyjne**:

  Elektroforeza żelowa na płaszczyźnie

  Elektroforeza kapilarna

Techniki separacyjne

Ekstrakcja

Stanowi jedną z najczęściej wykorzystywanych *technik izolacji określonych grup związków ze środowiska ich występowania*.

Poprzez dobór odpowiedniego rozpuszczalnika, izolowane są pożądane składniki mieszaniny. Oddzielana jest w ten sposób matryca analityczna. Proces ekstrakcji nazywany jest również ***ługowaniem*** – wymywaniem.

Na **efektywność ekstrakcji** wpływają najważniejsze parametry tego procesu:

1. odpowiednio dobrany rozpuszczalnik,
2. warunki fizyczne procesu,
3. dobór odpowiedniego rodzaju techniki procesu.

Techniki separacyjne

1. Rozpuszczalniki ekstrakcyjne mogą mieć charakter: *gazu, cieczy, płynu w stanie nadkrytycznym*.

Prawidłowo dobrany rozpuszczalnik:

- dobrze rozpuszcza izolowany składnik (wydajna izolacja bez strat),
- równocześnie nie rozpuszcza składników matrycy analitycznej,
- powinien być łatwy do oddzielenia od izolowanego składnika,
- nie powinien przeszkadzać w przeprowadzeniu analizy.

Techniki separacyjne

2. Warunki fizyczne prowadzonej ekstrakcji związane są z temperaturą i ciśnieniem rozpuszczalnika oraz czasem trwania procesu.

- Powinny być tak dobrane, aby zoptymalizować wydajność i selektywność ekstrakcji.
- Powinny być bezpieczne dla składnika izolowanego.
- Są one wyznaczane doświadczalnie i ustalane indywidualnie dla rozdzielanej mieszaniny.

Techniki separacyjne

3. Techniki izolacji.

Ekstrakcja próbek ciekłych

• Ekstrakcja **ciecz-gaz**, np. statyczna/dynamiczna analiza fazy nadpowierzchniowej, wymywanie i wychwytywanie;

• Ekstrakcja **ciecz-ciecz**, np. klasyczna ciecz-ciecz, ekstrakcja ciągła, mikroekstrakcja;

• Ekstrakcja **ciecz-ciało stałe**, np. ekstrakcja/mikroekstrakcja do fazy stałej, mikroekstrakcja poprzez membranę do fazy stacjonarnej, ekstrakcja do fazy stałej w strzykawce.

Techniki separacyjne

Ekstrakcja próbek stałych

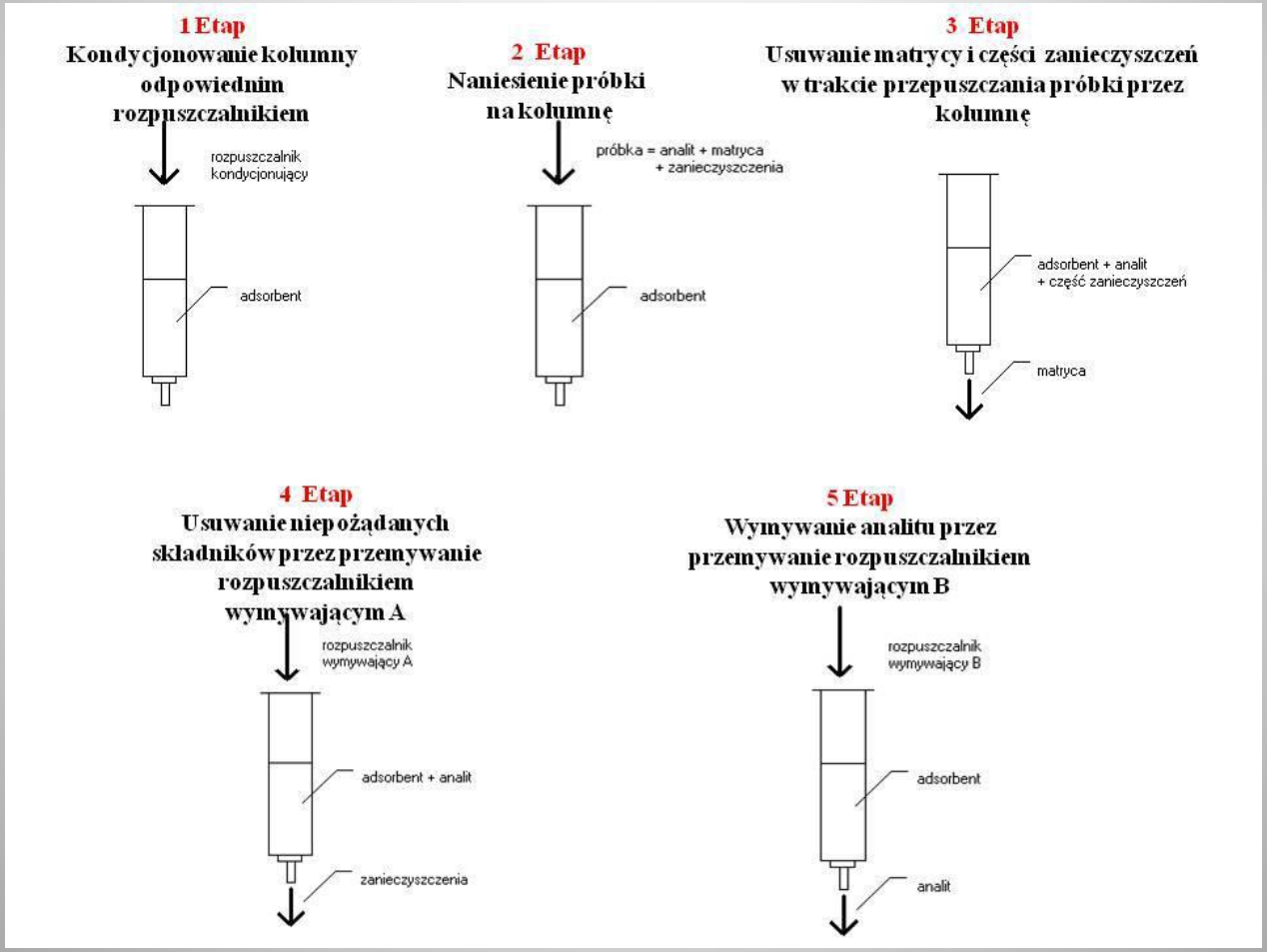
- Ekstrakcja **ciało stałe-gaz**, np. ekstrakcja do fazy stałej w układzie statycznym, ekstrakcja do fazy stałej w układzie dynamicznym;
- Ekstrakcja **ciało stałe-ciecz**, np. rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie w aparacie Soxhleta, ekstrakcja rozpuszczalnikiem pod zwiększonym ciśnieniem, ekstrakcja rozpuszczalnikiem wspomagana promieniowaniem mikrofalowym.

Techniki separacyjne

Ekstrakcja próbek gazowych

- Ekstrakcja **gaz-ciecz**, np. ekstrakcja do fazy ciekłej, ekstrakcja przez błony półprzepuszczalne;
- Ekstrakcja **gaz-ciało stałe**, np. ekstrakcja do fazy stacjonarnej, mikroekstrakcja do fazy stałej, ekstrakcja przez membrany porowate.

Ekstrakcja do fazy stałej (SPE – ang. *Solid Phase Extraction*)



Elektroforeza

- Polega na ***rozdziale mieszaniny makrocząsteczek pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego***.
- Elektroforezę najczęściej prowadzi się na żelach poliakrylamidowych.
- Jest stosowana do rozdziału biopolimerów (np. białek, kwasów nukleinowych) i innych związków biologicznie czynnych (m.in. aminokwasów), a także związków jonowych.

Elektroforeza

Rozdziały elektroforetyczne mogą być prowadzone:

- bezpośrednio w **objętości elektrolitu**, np. w elektroforezie kapilarnej,
- w **nośniku elektroforetycznym** wypełnionym odpowiednim elektrolitem.

Nośnik elektroforetyczny (bibuła, azotan celulozy, agaroza, poliakrylamid i inne) - stabilizuje elektrolit oraz przyczynia się do lepszej separacji makrocząsteczek.

Elektroforeza

Ze względu na sposób umieszczenia **nośnika elektroforetycznego** można wyróżnić:

- **elektroforezę kapilarną** (*ang. capillary electrophoresis),*
- **elektroforezę pionową** *(ang. vertical electrophoresis),*
- **elektroforezę poziomą** *(ang. horizontal electrophoresis).*

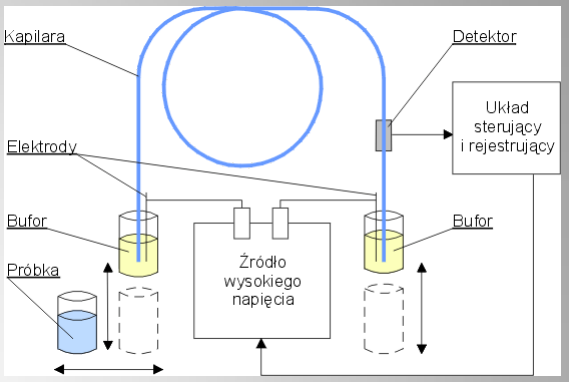
Elektroforeza

Elektroforeza kapilarna (**HPCE**; *ang. high performance capillary electrophoresis*)

- kapilara wypełniona jest swobodnym elektrolitem (**elektroforeza swobodna**) lub porowatym nośnikiem (**elektroforeza na nośniku**);

- Φ 50 - 100 μm; l 20-30 cm;

- końce kapilary zanurzone są w zasobnikach z odpowiednimi elektrolitami;



- do obu końców kapilary przykłada się wysokie napięcie, we wnętrzu kapilary pojawia się pole elektryczne.

Elektroforeza

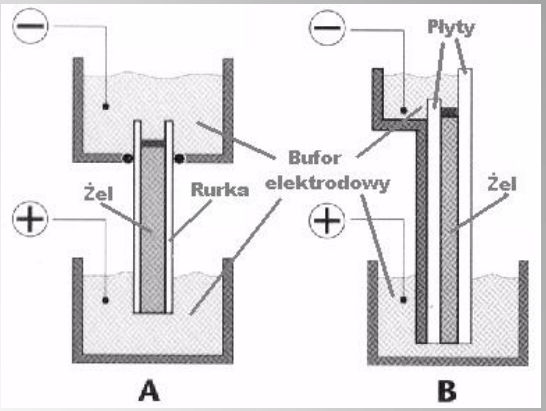
- **Przeznaczenie** elektroforezy kapilarnej - rozdziały analityczne i mikropreparatywne.
- **Ilość** nanoszonego materiału do analizy - rzędu pojedynczych nanogramów.
- **Objętość** aplikowanej próbki - zwykle w przedziale 2-4 nL ($2\text{-}4 \times 10^{-9}$ L).
- **Czas** rozdziału jednej próbki - około 10-20 minut.
- **Detekcja** rozdzielonych grup makrocząsteczek realizowana jest u ujścia kapilary przy pomocy detektora o konstrukcji zbliżonej do przepływowego detektora stosowanego w chromatografii cieczowej.

Elektroforeza

Elektroforeza pionowa

Nośnik elektroforetyczny:

- wypełnia szklane rurki (**elektroforeza rurkowa**)
- znajduje się pomiędzy dwoma płytkami rozdzielonymi przekładkami dystansowymi (*ang. spacer)* (**elektroforeza płytowa**).



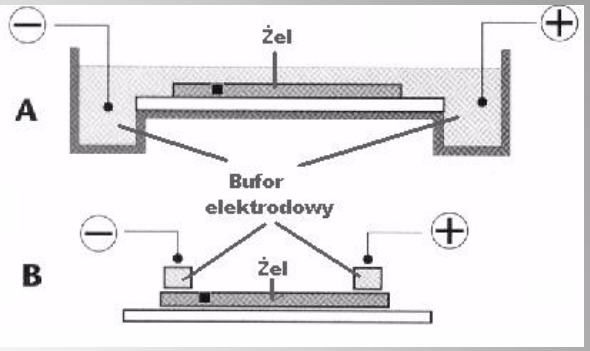
elektroforeza rurkowa elektroforeza płytowa

Elektroforeza

Elektroforeza pozioma

- **Zanurzeniowa** - nośnik umieszczony jest w płaszczyźnie poziomej.

- **Półsucha** - bufory elektrodowe zamknięte są w zestalonej agarozie lub w warstwach bibuły filtracyjnej, pozwala na znaczne ograniczenie zużycia chemikaliów niezbędnych do przygotowania buforów.



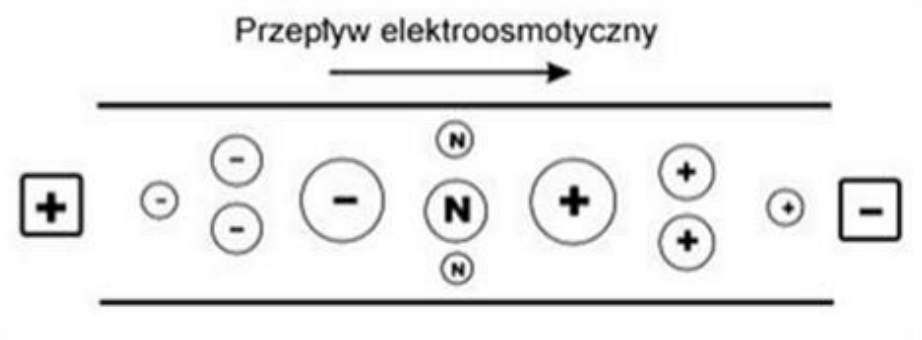
A. elektroforeza zanurzeniowa
B. elektroforeza półsucha

Elektroforeza

Cząsteczki wędrują w żelu w zależności od ich ładunku, rozmiaru, kształtu oraz oporów ruchu środowiska (gęstości żelu).

Kolejność, w jakiej rozdzielane cząstki docierają do katody:

1. małe obdarzone dużym ładunkiem kationy
2. większe kationy o mniejszym ładunku
3. nierozdzielone cząsteczki obojętne,
4. duże aniony o małym ładunku
5. małe aniony posiadające duży ładunek elektryczny.



Elektroforeza

Rozdzielenie elektroforetyczne z wykorzystaniem żeli składa się z kilku etapów:

- przygotowanie żelu o odpowiednim usieciowaniu,
- zanurzenie żelu w elektrolicie,
- wprowadzenie analizowanych próbek do wąskich studzienek na czole żelu,
- podłączenie elektrod – przeprowadzenie rozdzielenia,
- wyłączenie zasilania,
- wizualizacja rozdzieleń.

Chromatografia

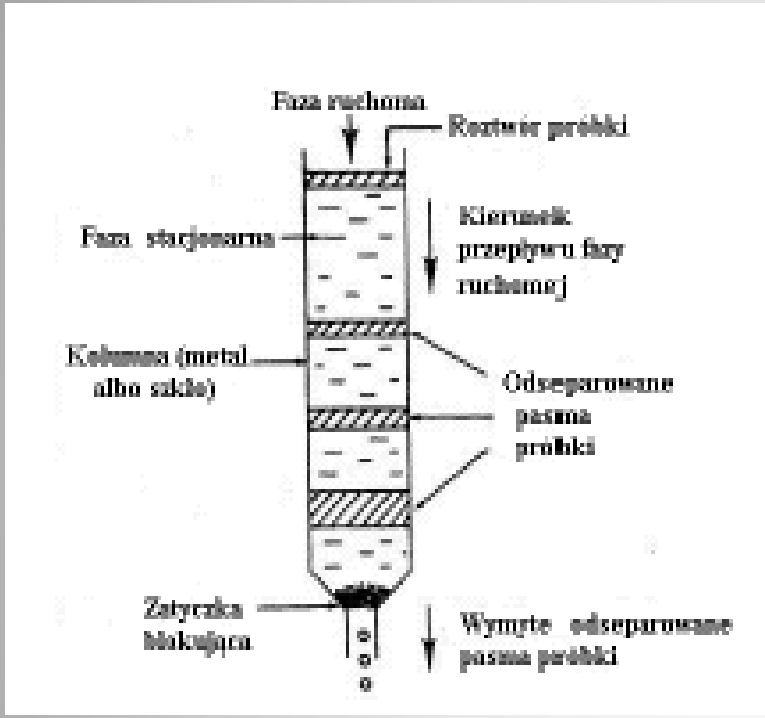
Michaił Siemionowicz Cwiet

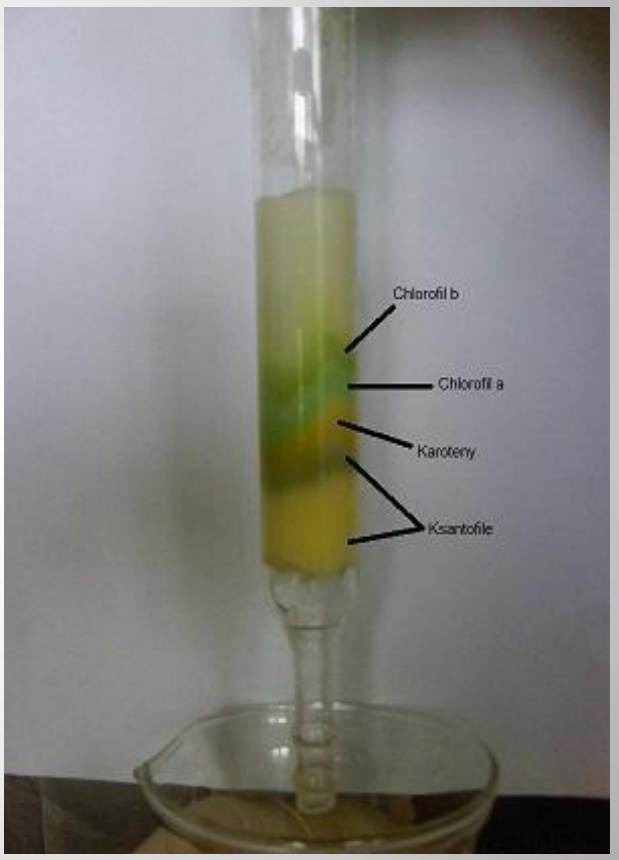
1872 – 1919

Profesor botaniki Uniwersytetu (1907-1908)

i Politechniki Warszawskiej (1908-1915)

Pierwszy chromatograficzny rozdział



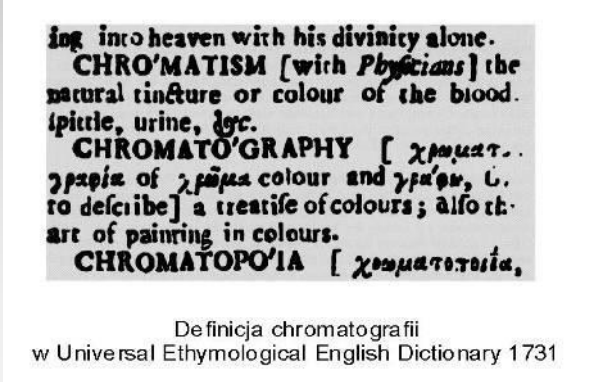


Chromatografia

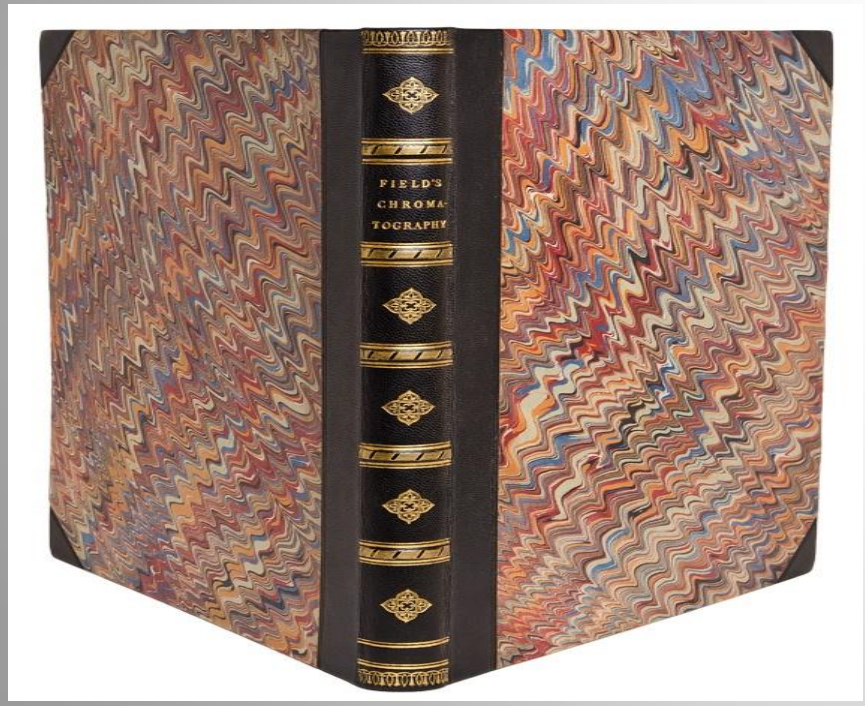
ros. Tsvet, цвет = kolor

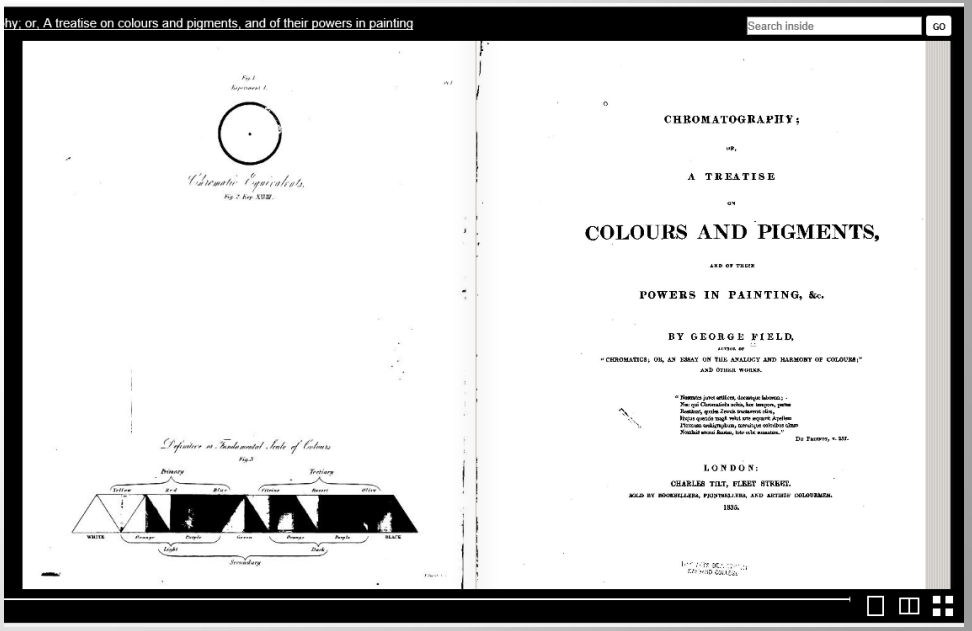
gr. *chromatos* = barwa

***grapho* = pisze**


ing into heaven with his divinity alone.
CHRO'MATISM [with *Physicians*] the natural tincture or colour of the blood, spittle, urine, &c.
CHROMATO'GRAPHY [χρωματ-γραφία of χρῶμα colour and γράφω, to describe] a treatise of colours; also the art of painting in colours.
CHROMATOPO'IA [χρωματοποιία,

Definicja chromatografii
w Universal Ethymological English Dictionary 1731





Rozwój chromatografii

- Lata 30-te – właściwy rozwój chromatografii, rozdzielanie mieszanin substancji naturalnych;

Nagrody Nobla

- 1937 r. – P. Karrer, karotenoidy
- 1938 r. – R. Kuhn, karotenoidy i witaminy
- 1939 r. – L. Ruzicka, polietyleny i terpeny; A. F. J. Butenandt, hormony płciowe
- 1941 r. – prace A. J. Martina i R. L. Synge'a, początek rozwoju chromatografii podziałowej w układzie ciecz-ciecz (chromatografia bibułowa)
- 1948 r. – A. Tiselius, elektroforeza i chromatografia adsorpcyjna

Rozwój chromatografii

- Do 1973 r. – **dwunastokrotnie** przyznano Nagrodę Nobla za prace o dużym znaczeniu w chromatografii
- 1952 r. – A. T. James i A. J. Martin opublikowali podstawy **chromatografii gazowej**
- 1956 r. – E. Stahl – podał warunki wykonywania **chromatografii cienkowarstwowej**
- Lata 60-te – rozwój **wysokosprawnej chromatografii cieczowej**

Chromatografia

Podstawowa technika analityczna lub preparatywna służąca do rozdzielania i identyfikacji związków chemicznych w mieszaninie. Składniki mieszaniny:

- są rozdzielane na podstawie różnicy szybkości, z jaką są przenoszone w gazowej lub ciekłej fazie ruchomej przez fazę stacjonarną;
- migrują przez fazę stacjonarną z szybkościami określonymi przez ich powinowactwo do każdej fazy.

Chromatografia

Układ chromatograficzny składa się z:

- fazy nieruchomej
- fazy ruchomej
- mieszaniny rozdzielanych substancji

Warunkiem, który musi być spełniony, aby nastąpił **proces rozdzielenia substancji**, jest **ruch jednej fazy względem drugiej fazy**.

Chromatografia

Rozdzielenie chromatograficzne polega na:

- umieszczeniu próbki na ciekłej lub stałej fazie stacjonarnej,

- przepuszczeniu ciekłej lub gazowej fazy ruchomej przez nią lub nad nią – następuje proces **elucji** próbki z fazy stacjonarnej.

Techniki chromatograficzne

- **planarne** i **kolumnowe**, w zależności od tego, czy proces rozdzielania zachodzi na płaskiej powierzchni czy kolumnie;
- **cieczowe**, **gazowe** i **z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym**, w zależności od stanu skupienia fazy ruchomej.

Chromatografia planarna

- **bibułowa** (**PC**, ang. ***P****aper* ***C****hromatography*)

- **cienkowarstwowa** (**TLC**, ang. ***T****hin* ***L****ayer* ***C****hromatography*)

- **wysokosprawna cienkowarstwowa**

  (**HPTLC**, ang. ***H****igh* ***P****erformance* ***T****hin* ***L****ayer* ***C****hromatography*)

Chromatografia kolumnowa

- **kolumnowa grawitacyjna** (**LC**, ang. ***L****iquid* ***C****hromatography*)
- **kolumnowa wysokosprawna** (**HPLC**, ang. ***H****igh* ***P****erformance* ***L****iquid* ***C****hromatography*)
- **gazowa** (**GC**, ang. ***G****as* ***C****hromatography*)

Chromatografia

W zależności od celu przeprowadzanej analizy techniki eksperymentalne dzielimy na:

- **analityczne** - identyfikacja analitów, „mała” ilość próbki;
- **preparatywne** - wyodrębnianie poszczególnych składników z mieszaniny;
- **przemysłowe.**