



Metody rozdzielcze Chromatografia

Metody rozdzielcze

Kryteria klasyfikacji:

- cel
- rodzaj mieszaniny
- fizyczne i chemiczne zjawiska wykorzystywane w rozdzielaniu

Podstawowe grupy mechanizmów wykorzystywanych w separacji analitycznej:

- podział
- adsorpcja
- filtracja

Techniki separacyjne w chemii analitycznej

- **Techniki ekstrakcyjne:**

 - Ekstrakcja gazem

 - Ekstrakcja cieczą

 - Ekstrakcja do fazy stałej

- **Techniki elektromigracyjne:**

 - Elektroforeza żelowa na płaszczyźnie

 - Elektroforeza kapilarna

- **Techniki chromatograficzne:**

 - Chromatografia cieczowa (Chromatografia kolumnowa, planarna)

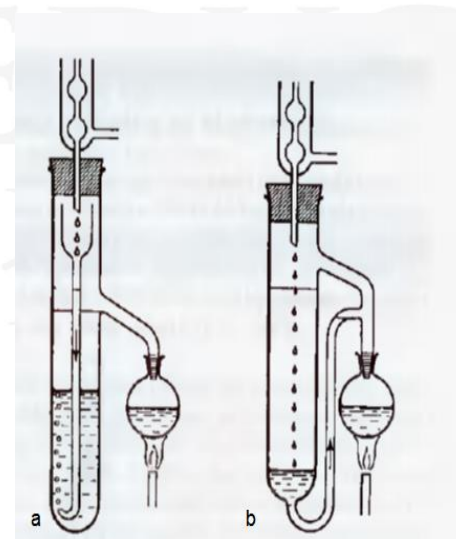
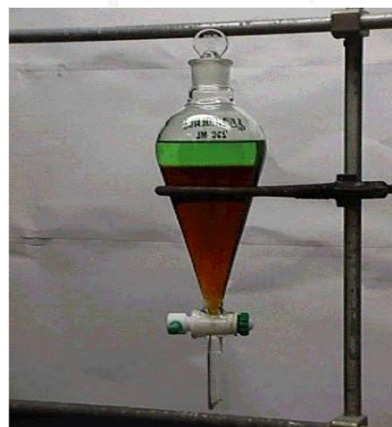
 - Chromatografia gazowa (Chromatografia kolumnowa)

 - Chromatografia cieczą w stanie nadkrytycznym (Chromatografia kolumnowa)

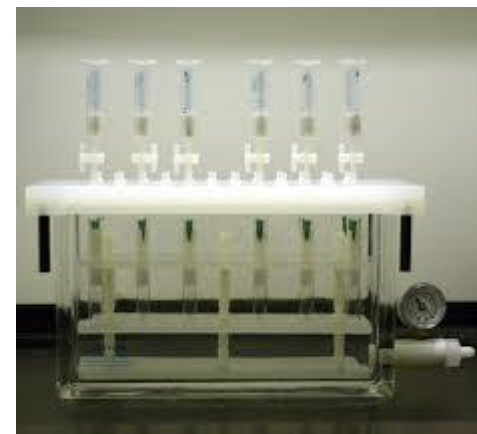
Techniki separacyjne - ekstrakcja

Ekstrakcja próbek ciekłych

- Ekstrakcja **ciecz-gaz**, np.
 - statyczna/dynamiczna analiza fazy nadpowierzchniowej
 - wmywanie 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



Ekstraktor ciągły do rozpuszczalników
a) lżejszych od wody, b) cięższych od wody.

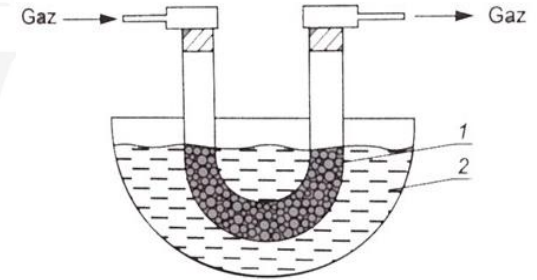


Techniki separacyjne - ekstrakcja

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 wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym



Techniki separacyjne - ekstrakcja

Ekstrakcja próbek gazowych

- Ekstrakcja **gaz-ciecz**

 - Ekstrakcja do fazy ciekłej

 - Ekstrakcja przez błony półprzepuszczalne

- Ekstrakcja **gaz-ciało stałe**

 - Ekstrakcja do fazy stacjonarnej

 - Mikroekstrakcja do fazy stałej

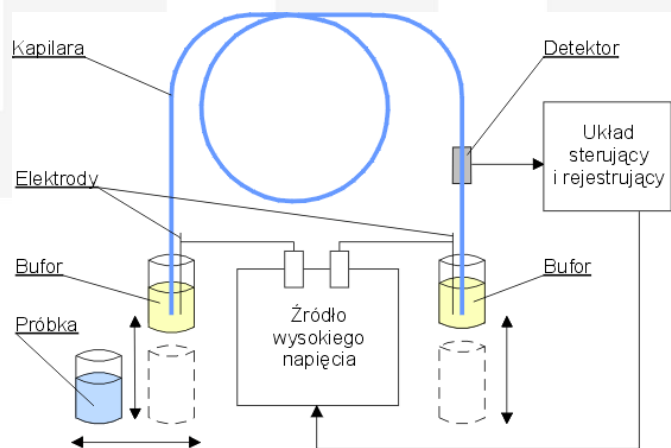
 - Ekstrakcja przez membrany porowate

Techniki elektromigracyjne - elektroforeza

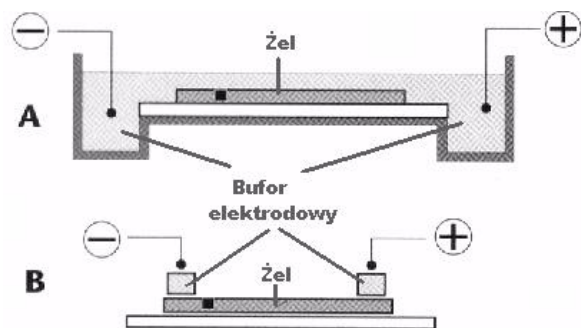
Rozdział mieszaniny makrocząsteczek pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego.

- **elektroforeza kapilarna** (*ang. capillary electrophoresis*),
- **elektroforeza pionowa** (*ang. vertical electrophoresis*),
- **elektroforeza pozioma** (*ang. horizontal electrophoresis*).

Elektroforeza kapilarna

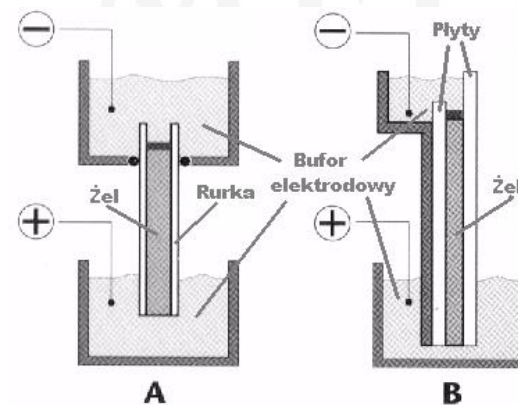


Elektroforeza pozioma



- A. elektroforeza zanurzeniowa
- B. elektroforeza półsucha

Elektroforeza pionowa

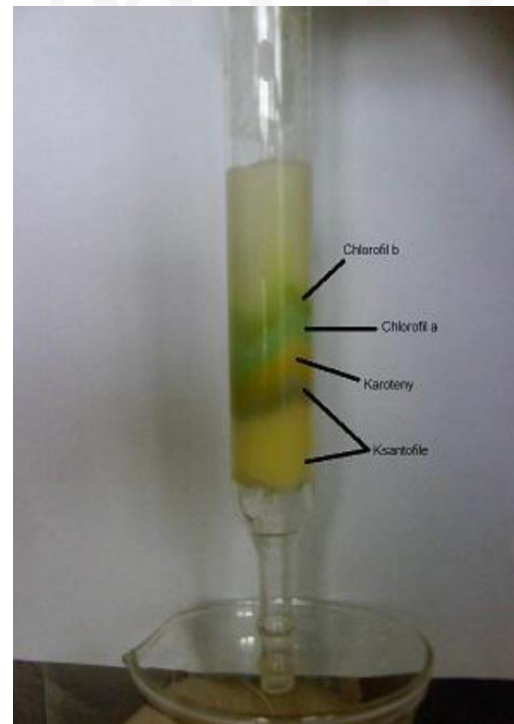


- A. elektroforeza rurkowa
- B. elektroforeza płytowa

Chromatografia



Michał Siemionowicz Cwiet
1872 – 1919



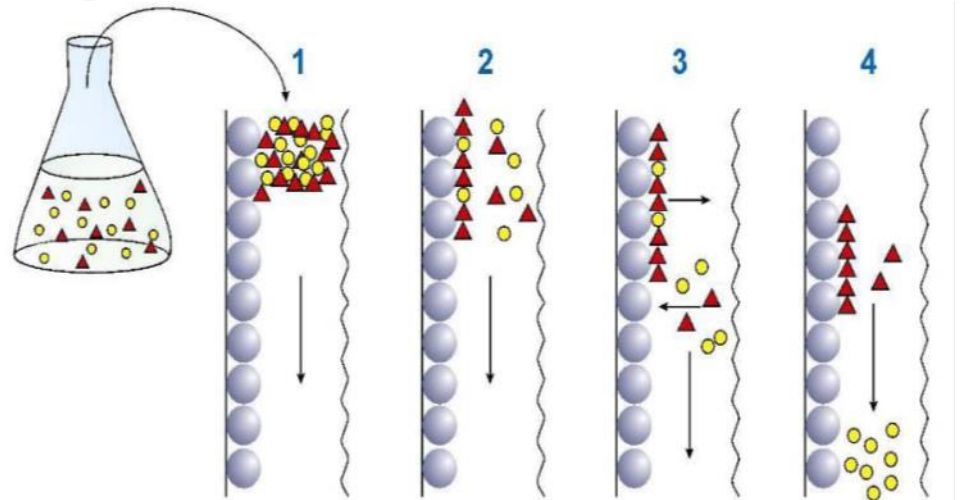
ros. Tsvet, цвет = kolor
gr. *chromatos* = barwa
grapho = pisze

Chromatografia

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

Układ chromatograficzny składa się z:

- fazy nieruchomej
- fazy ruchomej
- mieszaniny rozdzielanych substancji



Techniki chromatograficzne

- planarne i kolumnowe
- cieczowe, gazowe i z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym

Chromatografia planarna

- **bibułowa** (*Paper Chromatography, PC*)
- **cienkowarstwowa** (*Thin Layer Chromatography, TLC*)
- **wysokosprawna cienkowarstwowa** (*High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC*)

Chromatografia kolumnowa

- **kolumnowa grawitacyjna** (*Liquid Chromatography, LC*)
- **kolumnowa wysokosprawna** (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*)
- **gazowa** (*Gas Chromatography, GC*)

Faza stacjonarna (nieruchoma)

Faza stacjonarna jest unieruchomiona w odpowiednim miejscu wewnątrz kolumny lub na płaskiej powierzchni – **geometria metody**.

Faza stacjonarna ma charakter i spełnia rolę **sorbentu** – na zasadzie zatrzymywania substancji rozdzielanej na powierzchni (**adsorpcja**) lub w masie (**absorpcja**).

Fazę stacjonarną stanowią:

- Porowate ciała stałe o dużej powierzchni adsorpcji,
- Ciecze trudno lotne,
- Substancje o charakterze żelowym.

Nośnik

Faza stacjonarna o zdolnościach sorpcyjnych, rozmieszczona jest na powierzchni **nośnika**.

W **chromatografii cienkowarstwowej** nośnikami są:

- płyty szklane
- płyty aluminiowe
- płyty plastikowe

W **chromatografii bibułowej**:

- paski bibuły

W **chromatografii gazowej**:

- powierzchnia wewnętrzna kolumny

W **chromatografii kolumnowej**:

- nośnik nie występuje lub jest nim pozbawione zdolności sorpcyjnych wypełnienie drobnoziarniste.

Faza ruchoma (eluent)

Faza ruchoma może być:

- **Ciecżą** – w chromatografii ciekłowej (**LC – liquid chromatography**) – występuje najczęściej, zarówno w technikach planarnych jak i kolumnowych.
- **Gazem** – w chromatografii gazowej (**GC – gas chromatography**)
- **Płynem w stanie nadkrytycznym** – w chromatografii fluidalnej (**SFC – supercritical fluid chromatography**).

Faza ruchoma (eluent)

- W celu ułatwienia wyboru właściwego rozpuszczalnika jako eluentu, rozpuszczalniki ułożono w szeregi eluotropowe.
- W przypadku polarnych faz stacjonarnych (np. żelu krzemionkowego lub tlenku glinu) rozpuszczalniki ułożone wg rosnącej mocy eluowania (miarą której są indeksy polarności) mają kolejność następującą:

n-pentan < n-heksan < cykloheksan < tetrachlorek węgla < toluen < benzen < eter dietylowy < chloroform < dichlorometan < tetrahydrofuran < dichloroetan < aceton < octan etylu < acetonitryl < pirydyna < etanol < metanol < woda < kwas octowy.

- Moc elucji przy chromatografowaniu na niepolarniej fazie stacjonarnej (np. węglowej fazie odwróconej) jest odwrotna.

Faza ruchoma (eluent)

Inne ważne cechy eluentów:

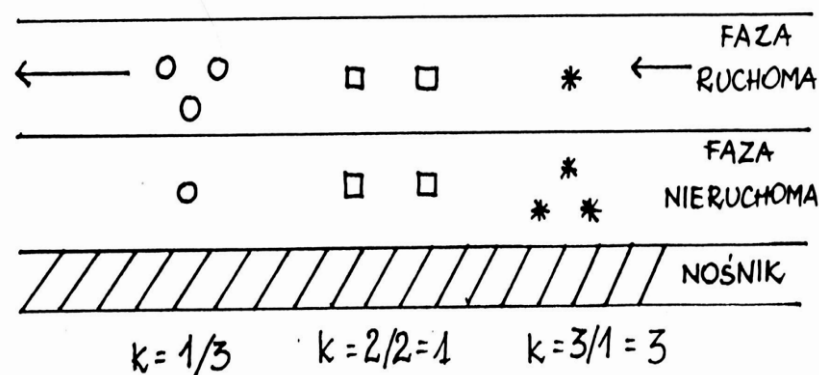
- **lepkość**
- **współczynnik załamania światła**
- **granica długości fali promieniowania elektromagnetycznego**

Parametry chromatograficzne

Retencja (łac. *retentio* – zatrzymywanie) - w chromatografii charakteryzuje czas przebywania substancji w kolumnie chromatograficznej.

Współczynnik retencji k :

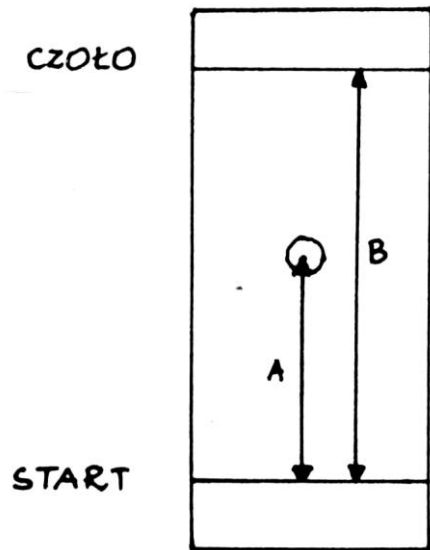
$$k = \frac{\text{zawartość substancji w fazie nieruchomej}}{\text{zawartość substancji w fazie ruchomej}}$$



Współczynnik retencji zależy od struktury molekularnej substancji chromatografowanej.

Parametry chromatograficzne – chromatografia planarna

Współczynnik migracji R_f



$$R_f = A/B$$

$$0,0 < R_f < 1,0$$

$$R_f = 1/(1+k)$$

$$R_M = \log k = \log ((1/R_f) - 1)$$

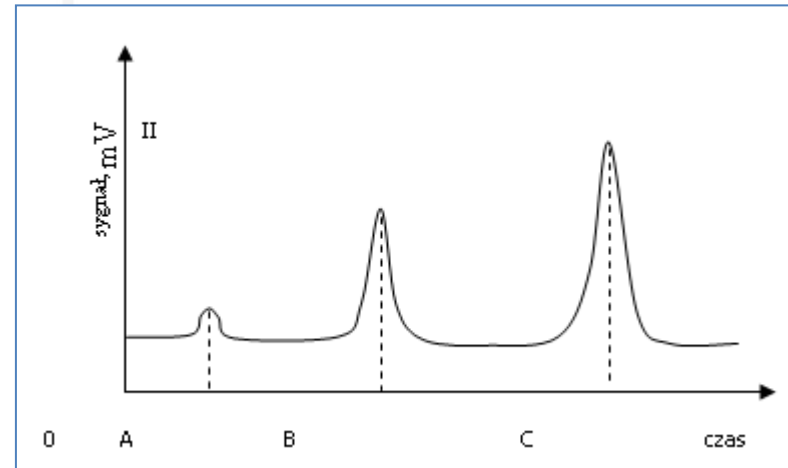
Inne nazwy stosowane dla współczynnika migracji to: **faktor retencji; ułamek prędkości; współczynnik zatrzymania lub spowolnienia; rate fraction.**

Parametry chromatograficzne – chromatografia kolumnowa

Chromatogram stanowi graficzną reprezentację sygnału chromatograficznego.

Dostarcza informacji:

- o **składzie jakościowym**
- o **składzie ilościowym**



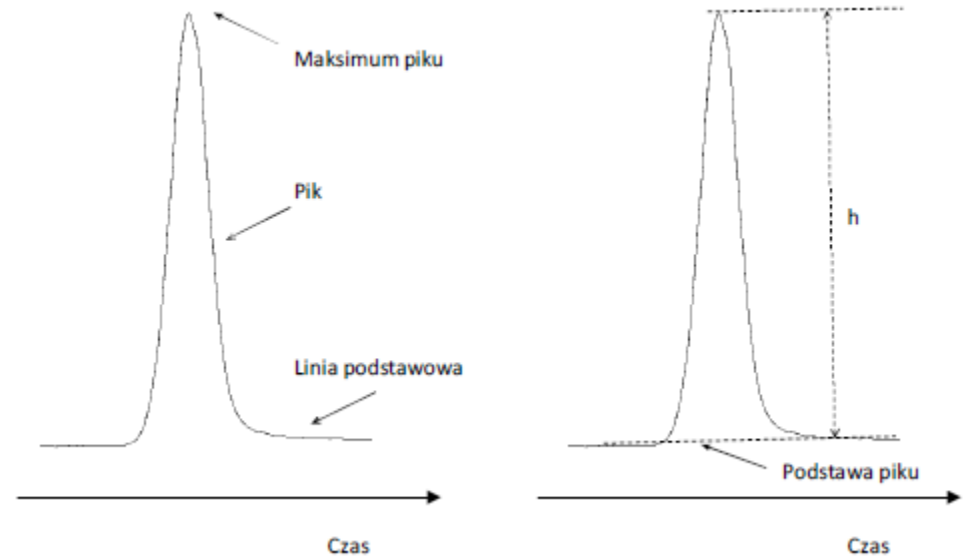
Parametry chromatograficzne – chromatografia kolumnowa

Pik

Linia podstawowa (linia zerowa)

Podstawa piku

Wysokość piku (h)



Parametry chromatograficzne – chromatografia kolumnowa

- czas retencji substancji niezatrzymywanej t_M (czas martwy; zerowy)

- całkowity czas retencji t_R

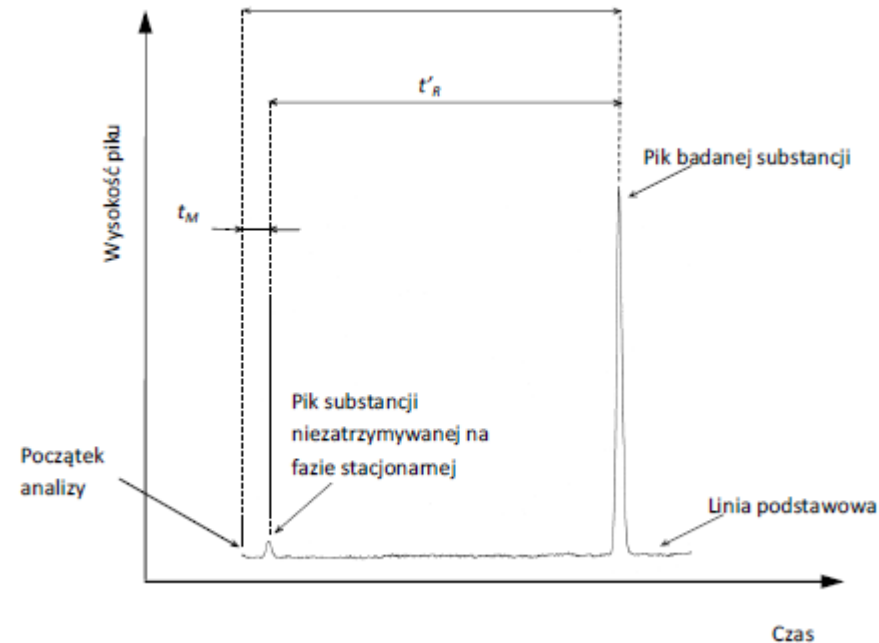
- zredukowany czas retencji t'_R

$$t'_R = t_R - t_M$$

- objętość retencji substancji niezatrzymywanej V_M (objętość martwa, zerowa) $V_M = t_M F_c$

- całkowita objętość retencji V_R $V_R = t_R F_c$

- zredukowana objętość retencji V'_R $V'_R = V_R - V_M$



Parametry chromatograficzne – chromatografia kolumnowa

Selektywność - Współczynnik rozdzielania (α)

$$\alpha = k_2 / k_1$$

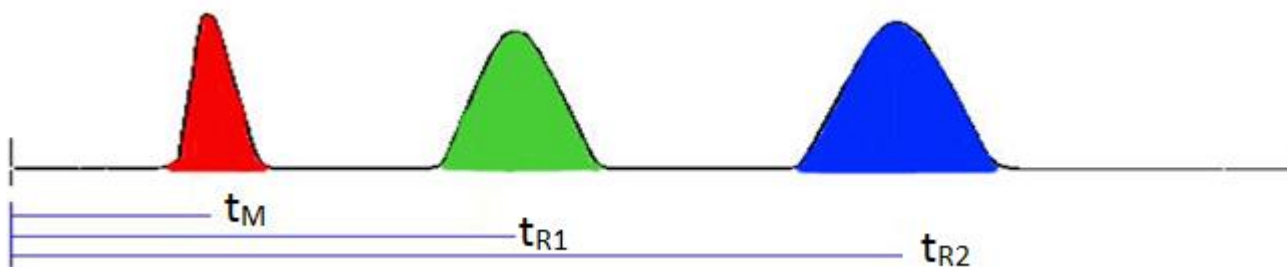
$$\alpha = t_{R2} / t_{R1}$$

k_1 - współczynnik retencji pierwszego piku

k_2 - współczynnik retencji drugiego piku

t_{R1} – czas retencji pierwszego piku

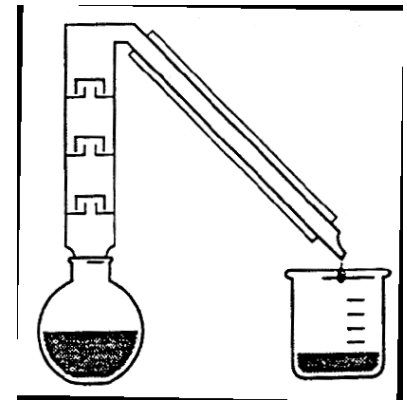
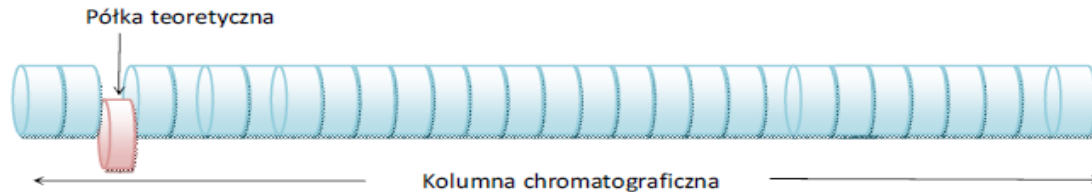
t_{R2} – czas retencji drugiego piku



Parametry chromatograficzne – chromatografia kolumnowa

Sprawność kolumny; Teoretyczna liczba pól (N)

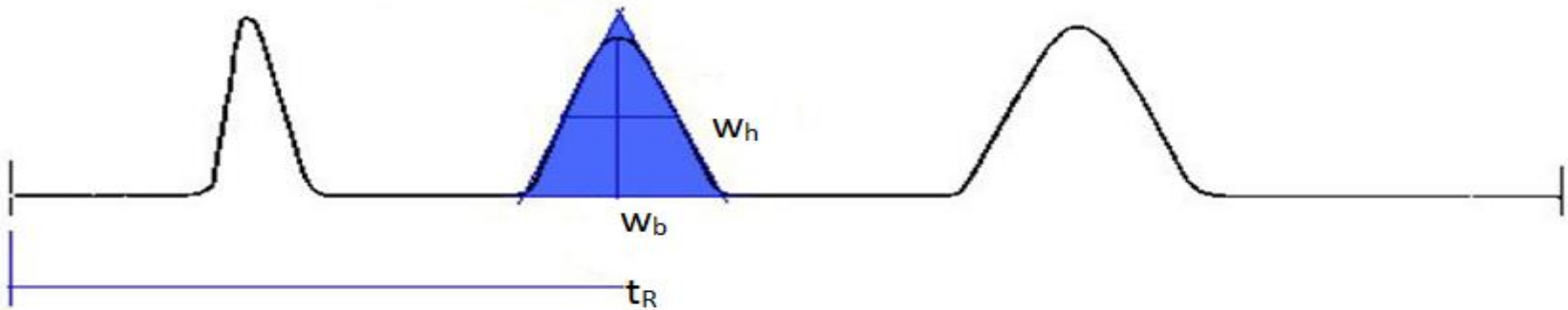
- objętość kolumny, w której zostaje osiągnięty stan (dynamicznej) równowagi pomiędzy stężeniem związku w fazie stacjonarnej, a jego stężeniem w fazie ruchomej.



Parametry chromatograficzne – chromatografia kolumnowa

$$N = 16[t_R / w_b]^2$$

$$N = 5.545 [t_R / w_h]^2$$



N = liczba pólk teoretycznych

t_R = czas retencji, całkowity czas jaki substancja spędza w kolumnie

w_h = szerokość piku w połowie wysokości (w jednostkach czasu)

w_b = szerokość piku w podstawie (w jednostkach czasu)

Liczba pólk efektywnych N_{ef}

$$N_{ef} = 16 \left(\frac{t_R - t_M}{w_b} \right)^2$$

Parametry chromatograficzne – chromatografia kolumnowa

$$N = L/H$$

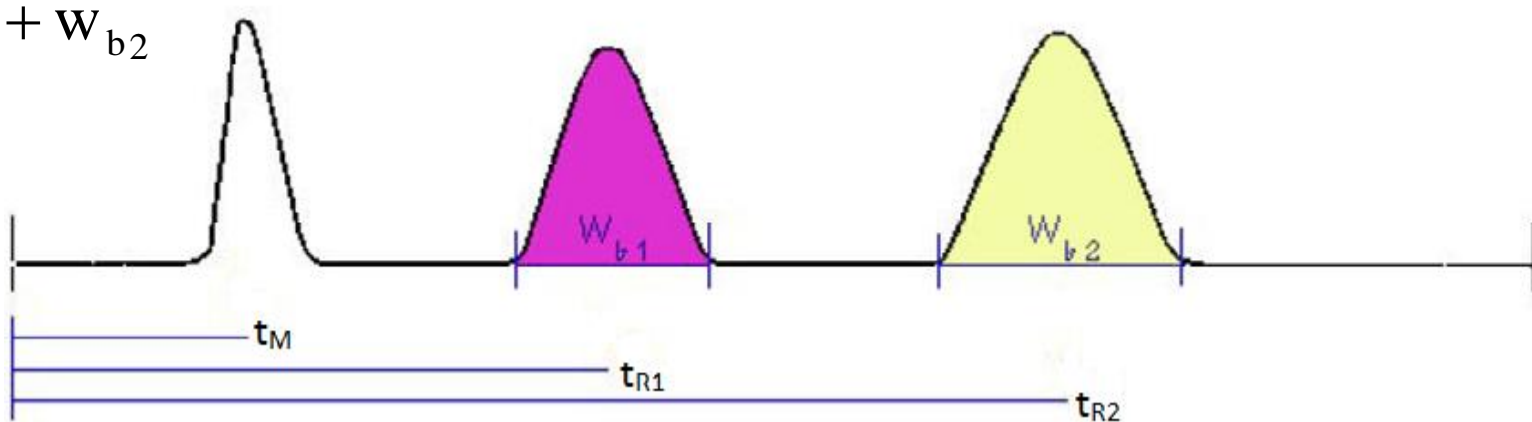
H (WRPT) - odcinek długości kolumny odpowiadający jednostkowej objętości kolumny, w której zostaje osiągnięty stan równowagi między stężeniami substancji chromatografowanej w fazie ruchomej i nieruchomej.

Im większa jest wysokość półki teoretycznej, tym mniej półek teoretycznych znajduje się w danej kolumnie i tym mniej sprawna jest kolumna, co powoduje, że uzyskane piki rozdzielanych substancji są szersze.

Parametry chromatograficzne – chromatografia kolumnowa

Powiązanie sprawności i selektywności - Rozdzielczość pików R_s

$$R_s = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}}$$



t_{R1} - czas retencji pierwszego pik

t_{R2} - czas retencji drugiego pik

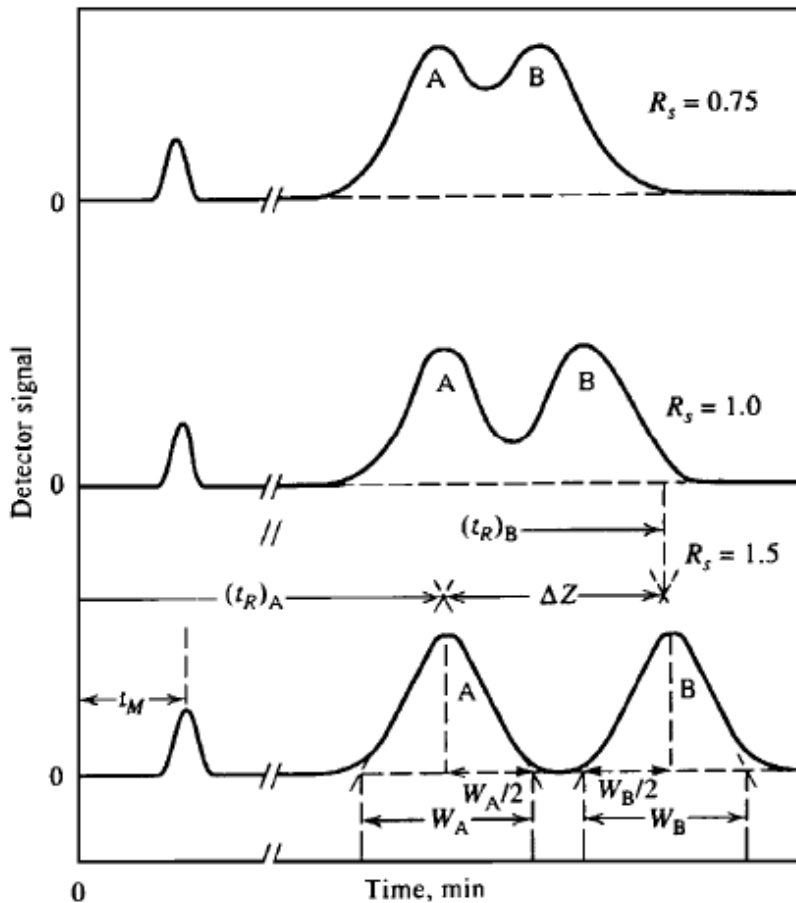
w_{b1} - szerokość pik przy podstawie (w jednostkach czasu) – pik pierwszy

w_{b2} - szerokość pik przy podstawie (w jednostkach czasu) – pik drugi

Pełne rozdzielenie występuje przy $R_s = 1,5$.

Parametry chromatograficzne – chromatografia kolumnowa

Rozdzielczość pików R_s



$R_s = 0,75$ - niekompletny rozdział

$R_s = 1,0$ - istnieje obszar pokrywania się sygnałów składników

$R_s = 1,5$ - rozdział prawidłowy

Parametry chromatograficzne – chromatografia kolumnowa

Zdolność rozdzielcza pików - wzór Purnella:

$$R_s = 0,25\sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k}{k + 1}$$

Podstawowe mechanizmy retencji

Mechanizm retencji

podziały

adsorpcyjny

jonowymienny

żelowo-permeacyjny

Mechanizm sorpcji

podział

adsorpcja

wymiana jonowa

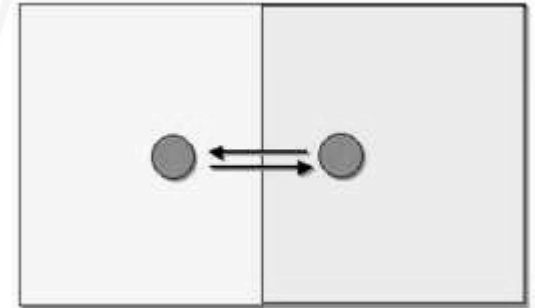
wykluczenie

Podziałowy mechanizm retencji

Podział jest procesem podobnym do ekstrakcji rozpuszczalnikowej.

Substancje rozdzielane dzielą się zgodnie z ich rozpuszczalnością (powinowactwem) w fazie stacjonarnej i ruchomej.

$$D = \frac{C_s \text{ (stężenie substancji w fazie nieruchomej)}}{C_m \text{ (stężenie substancji w fazie ruchomej)}}$$



Fazą stacjonarną w mechanizmie podziałowym jest ciecż trudno lotna, żel lub inna substancja pęczniejąca.

Czysty mechanizm podziałowy występuje w chromatografii gaz-ciecż.

Chromatografia podziałowa

- **Chromatografia cieczenio-gazowa** (gazowa, GC)
- **Chromatografia cieczenio-cieczenio** (np. bibulowa, PC)

Techniki: kolumnowa grawitacyjna, planarna, GC, HPLC

Chromatografia podziałowa

Chromatografia cieczowo-cieczowa

układ z normalnymi fazami (NP – Normal Phase)

- faza ruchoma – ciecz organiczna (np. heksan, benzen lub chloroform);
- faza stacjonarna – ciecz polarna osadzona na nośniku stałym (np. woda na celulozie);

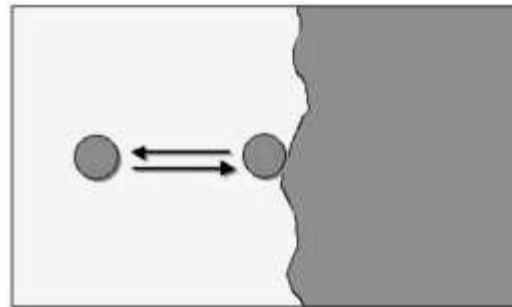
układ z odwróconymi fazami (RP- Reverse Phase)

- faza ruchoma – ciecz polarna (np. woda, metanol);
- faza stacjonarna – niepolarna, np. rozpuszczalnik organiczny zaadsorbowany na nośniku;

Adsorpcyjny mechanizm retencji

Chromatografia ciecz - ciało stałe

Rozdział następuje pomiędzy ciekłą fazę ruchomą a fazę stacjonarną, na której odwracalnie adsorbują się cząsteczki rozdzielanych substancji.

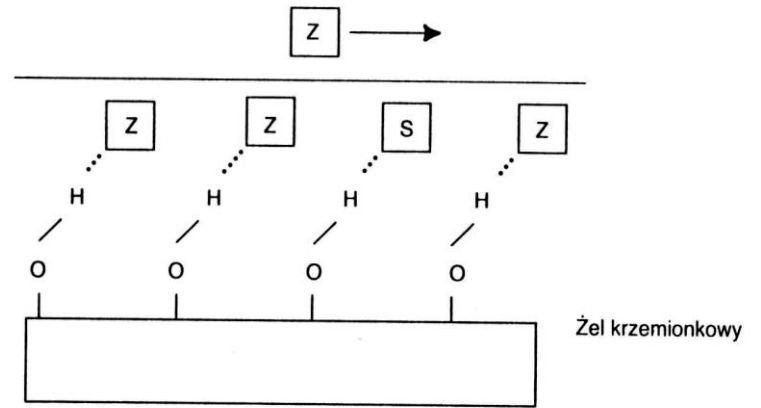
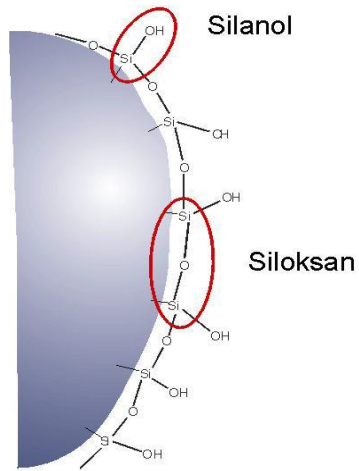


Na adsorbencie dochodzi do fizycznej adsorpcji składników. Te które silniej oddziałują z adsorbentem są eluowane później.

Adsorpcyjny mechanizm retencji

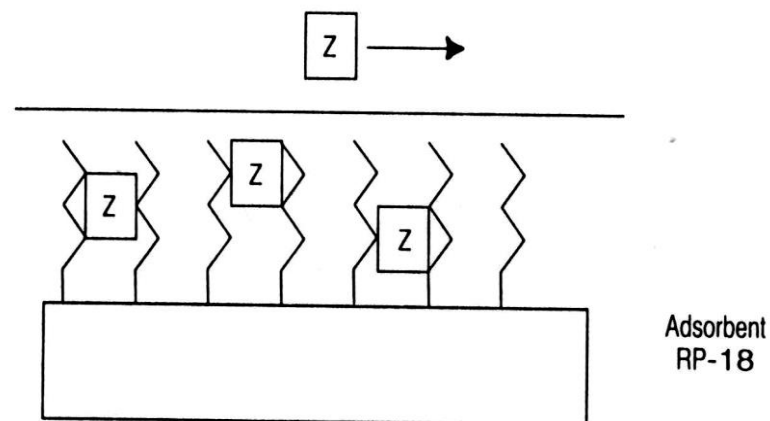
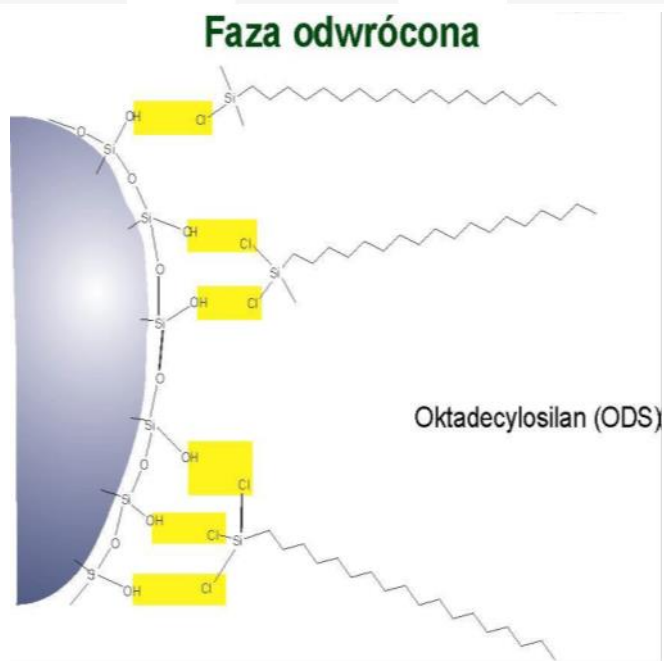
Normalnym układ faz (NP)

Faza normalna



Adsorpcyjny mechanizm retencji

Odwróconym układ faz (RP)



Rodzaje adsorbentów

- **adsorbenty polarne** (hydrofilowe), np. SiO_2 , tlenki metali);
- **adsorbenty niepolarne** (lipofilowe), np. węgle aktywne i modyfikowane krzemionki o powierzchni pokrytej związanymi chemicznie łańcuchami alkilowymi.

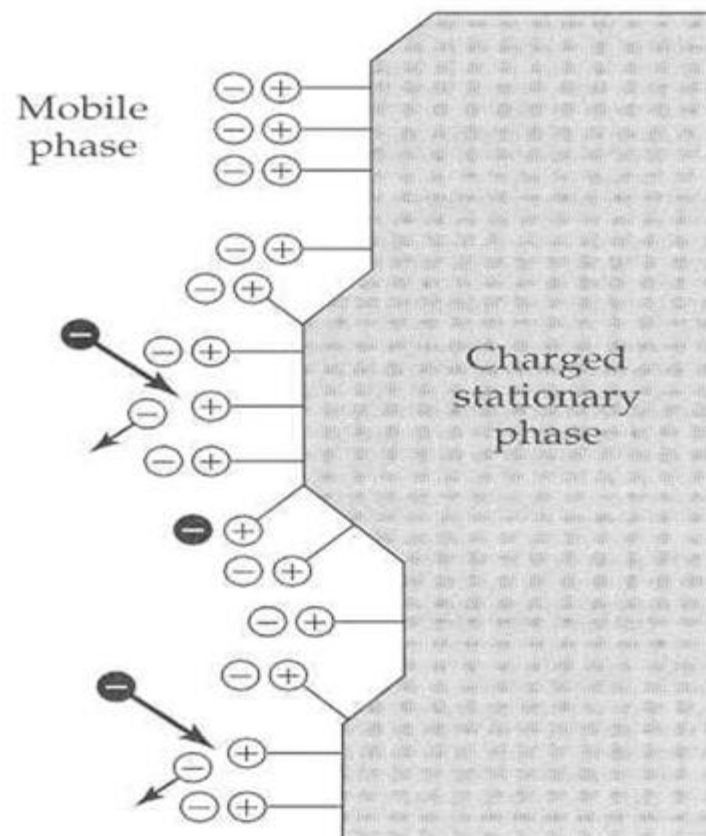
Szereg aktywności adsorbentów pod względem wiązania związków organicznych:
celuloza < skrobia < sacharoza < CaSO_4 < silikażel < MgO < Al_2O_3 < węgiel aktywny

Szereg eluotropowy rozpuszczalników

heksan < CCl_4 < benzen < CHCl_3 < $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ < $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ < aceton < $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ <
 CH_3OH < H_2O < CH_3COOH < pirydyna

Jonowymienny mechanizm retencji

Wymiana jonowa jest procesem, w którym **jony substancji** rozpuszczonej w fazie ruchomej mogą ulegać wymianie na **mobilne przeciwjony** obdarzone takim samym ładunkiem i związane z przeciwnie naładowanymi, nieruchomymi grupami, chemicznie związanymi z fazą stacjonarną.



Jonowymienny mechanizm retencji

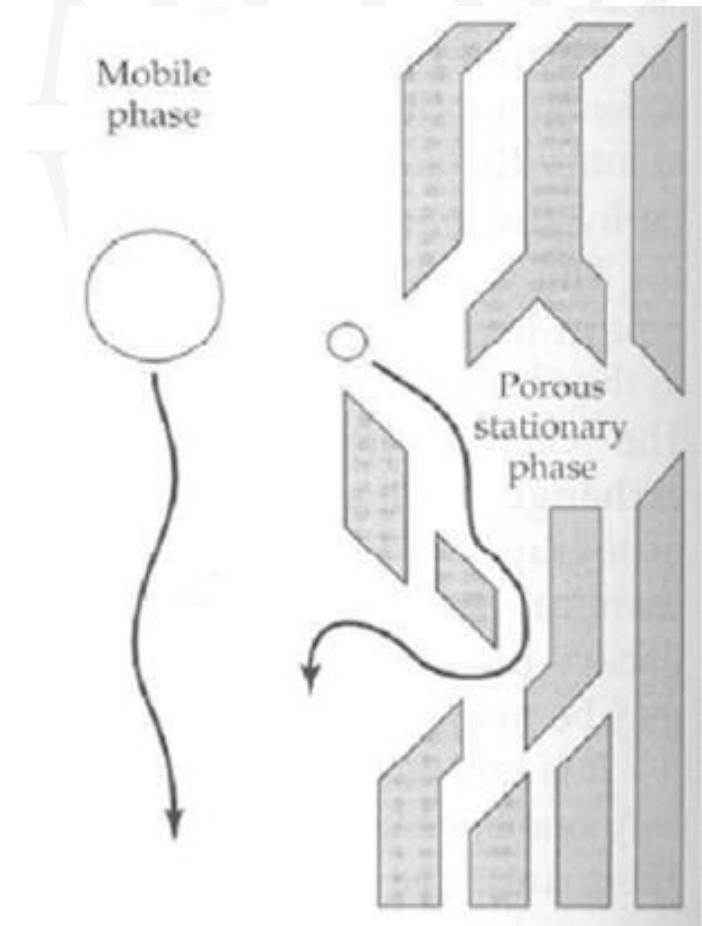
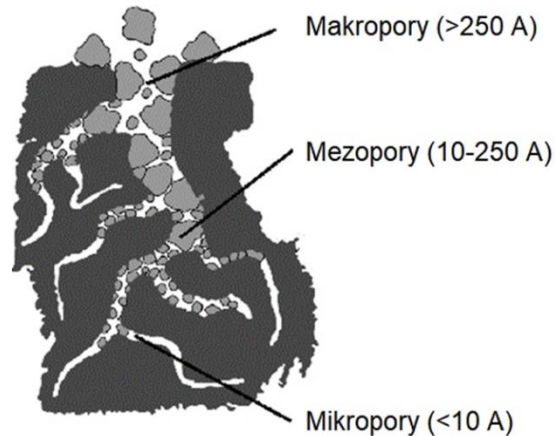
Wymieniacze jonowe: kationity i anionity



R - część organiczna polimeru

Żelowo-permeacyjny mechanizm retencji

Wykluczenie jest procesem, w którym cząstki substancji rozdzielanej o rozmiarach większych od średnicy największych porów fazy stacjonarnej pozostają wyłącznie w fazie ruchomej ($k=0$).



KLASYFIKACJA METOD CHROMATOGRAFICZNYCH

Rodzaj metody

Chromatografia cieczowa (LC)

Chromatografia bibułowa (PC)

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Wysokosprawna chromatografia
cieczowa (HPLC)

Chromatografia nadkrytyczna (SFC)

Chromatografia gazowa (GC)

Chromatografia gaz-ciecz (GLC)

Chromatografia gaz-ciało stałe (GSC)

Geometria układu (Format)

planarna

planarna

kolumnowa

kolumnowa

kolumnowa

kolumnowa

Technika

podział

adsorpcja, podział,
wymiana jonowa,
wykluczanie

adsorpcja, podział,
wymiana jonowa,
wykluczanie

podział

podział

adsorpcja

Chromatografia bibułowa (PC)

Format – planarna

Mechanizm sorpcji (technika) – podział

Nośnik – bibuła

Faza stacjonarna – ciekła – woda zawarta w higroskopijnej bibule.

Faza ruchoma – rozpuszczalnik organiczny lub mieszanina rozpuszczalników.

Chromatografia bibułowa (PC)

Komory do chromatografii bibułowej – różne naczynia o kształtach prostopadłościennych, cylindrycznych, a nawet próbówki.

Nanoszenie próbki – podlega zasadom ogólnym chromatografii. Próbki nanoszone są w postaci roztworów w rozpuszczalnikach łatwo lotnych.

Substancja rozdzielana przenoszona jest wraz z fazą ruchomą, ulegając podziałowi pomiędzy dwie niemieszające się ciecze: eluent i wodę związaną z bibułą.

Identyfikacja – porównanie z wzorcem chromatografowanym równocześnie.

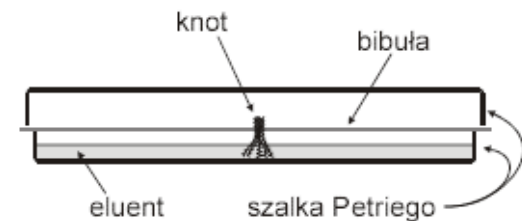
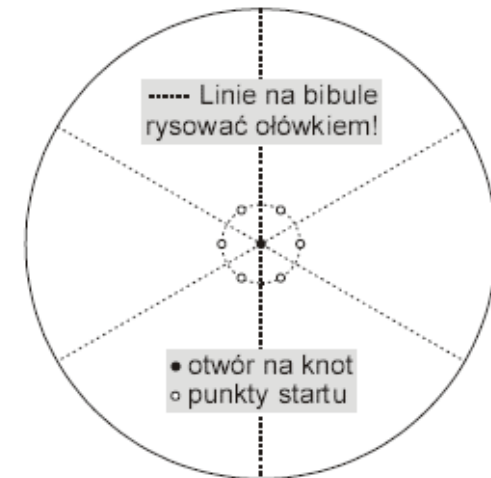
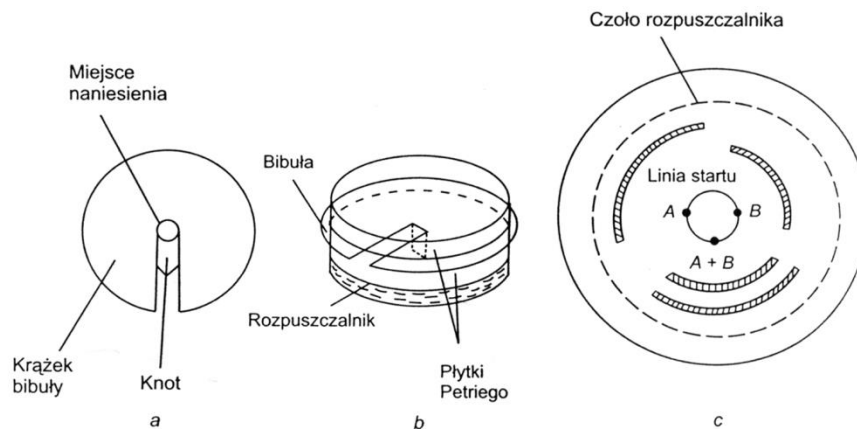
Chromatografia bibułowa (PC)

Metody zależne od rodzaju przepływu eluentu po powierzchni bibuły:

Metoda wstępująca

Metoda zstępująca lub spływowa

Metoda pierścieniowa



Chromatografia bibułowa (PC)

Metoda dwuwymiarowa lub dwukierunkowa – stosowana w przypadku niewystarczającego rozdzielenia składników po pierwszym rozwinięciu chromatogramu.

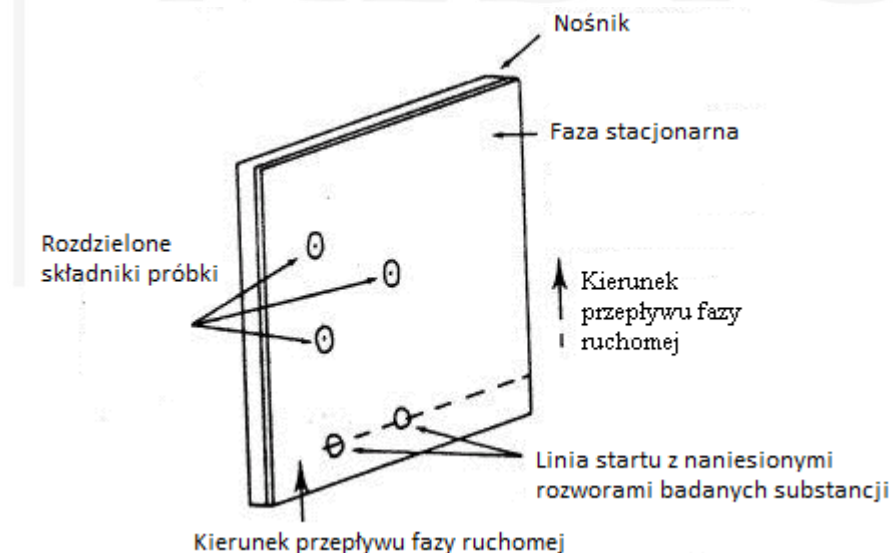
Metoda elektrochromatografii – rozpuszczalnik porusza się w polu elektrycznym do 400V. Jest to przypadek połączenia chromatografii z elektroforezą. Stosowany wyłącznie do rozdzielenia substancji ulegających jonizacji lub silnie polarnych.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Format – planarna

Mechanizm sorpcji – podział,
adsorpcja, wymiana jonowa,
wykluczanie

Nośnik – płytki szklane, aluminiowe,
plastikowe



Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Faza stacjonarna - żel krzemionkowy, celuloza, żywice jonowymienne, tlenek glinu, ziemia okrzemkowa, selektory chiralne.

Faza ruchoma - rzadko pojedyncze rozpuszczalniki, często mieszaniny rozpuszczalników o różnej polarności – od niepolarnych węglowodorów do polarnych alkoholi, wody oraz rozpuszczalników kwasowych i zasadowych.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Komory elucyjne – różne naczynia o kształtach prostopadłościennych, cylindrycznych lub typu horyzontalnego.

Nanoszenie próbki – podlega zasadom ogólnym chromatografii.

Substancja rozdzielana przenoszona jest wraz z fazą ruchomą przez płaskie złożę fazy stacjonarnej metodą pionową (wstępującą) lub horyzontalną.

Identyfikacja – spryskiwanie odczynnikami wywołującym reakcję barwną lub wskaźnikiem fluorescencyjnym dla obserwacji w świetle UV.



Fazy stacjonarne (sorbenty) w TLC

Sorbent	Mechanizm sorpcji	Rozdzielane substancje
Żel krzemionkowy (NP)	adsorpcja	aminokwasy, węglowodory, alkaloidy, witaminy
Krzemionka modyfikowana węglowodorami (RP)	zmodyfikowany podział	związki niepolarne
Celuloza sproszkowana	podział	aminokwasy, nukleotydy, węglowodany
Tlenek glinu	adsorpcja	węglowodory, alkaloidy, barwniki spożywcze, lipidy, jony met.
Ziemia okrzemkowa	podział	cukry, kwasy tłuszczowe
Celuloza jonowymienna	wymiana jonowa	kwasy nukleinowe, nukleotydy, jony metali, halogenki
Żel Sephadex	wykluczanie	polimery, białka, kompleksy metali
β -cyklodekstryny	stereoadsorpcja	mieszanki enancjomerów

Wykrywanie rozdzielonych składników (analiza jakościowa)

- Spryskiwanie płytki **odczynnikiem chromogennym** (zawierającym w cząsteczce grupy chromoforowe), który reaguje ze wszystkimi rozdzielanymi substancjami lub tylko z zawierającymi specyficzne grupy funkcyjne i tworzy barwne połączenia (barwne plamki).
- Oglądanie płytki w świetle **lampy UV** (o długości fali 254 nm lub 366 nm).
- Spryskiwanie płytki **stężonym kwasem siarkowym** lub **azotowym**.
- Wystawianie płytki na działanie **par jodu** w zamkniętej komorze.
- Skanowanie powierzchni płytki **densytometrem**.

Wykrywanie rozdzielonych składników (analiza jakościowa)

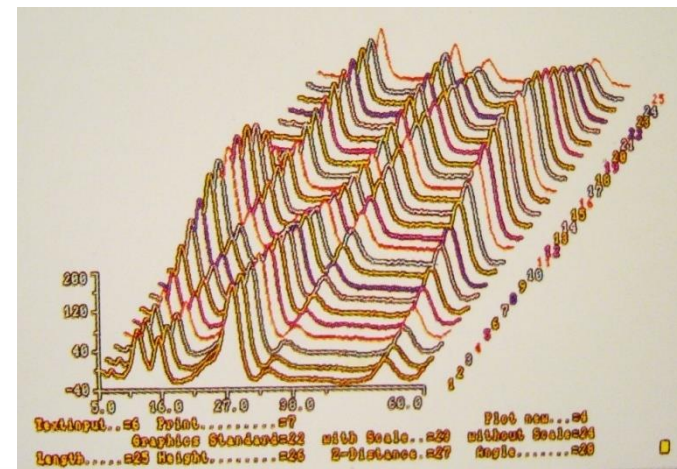
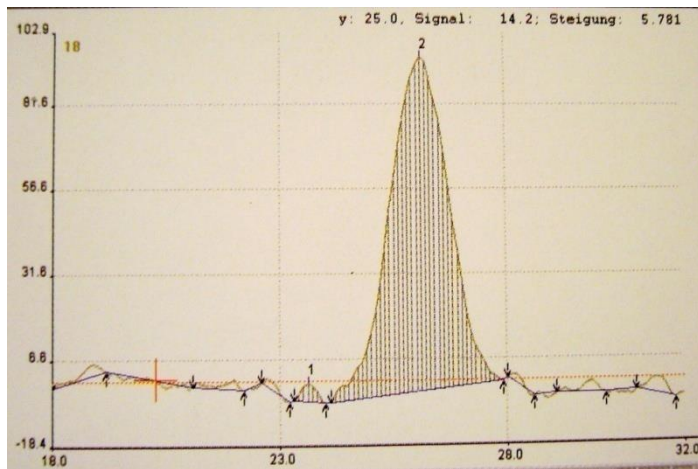
Przykłady odczynników wizualizacyjnych w TLC

Metoda detekcji	Barwa plamki	Rozdzielane substancje
Odczynniki ogólne		
Kwas fosfomolibdenowy + ogrzewanie	ciemnoniebieska	wiele zw. organicznych
Stężony kwas siarkowy + ogrzewanie	zwęglona brunatno czarna	wszystkie zw. organiczne
Pary jodu	brązowa	wiele zw. organicznych
Odczynniki selektywne		
Ninhydryna	różowa → czerwono fioletowej	aminokwasy i aminy
2,4-Dinitrofenylohydrazyna	pomarańczowa/czerwona	związki karbonylowe
Zieleń bromokrezolowa/błękit bromokrezolowy	żółta	kwasy organiczne
Fluoresceina	żółtozielona	wiele zw. organicznych
Wanilina/kwas siarkowy	niebieska, zielona, różowa	alkohole, ketony
Rodamina B	czerwona fluoresceina	lipidy
Aldehyd anyżowy/chlorek antymonu (III)	różne	steroidy
Difenyloamina/cynk	różne	pestycydy

Oznaczenie składu mieszaniny (analiza ilościowa)

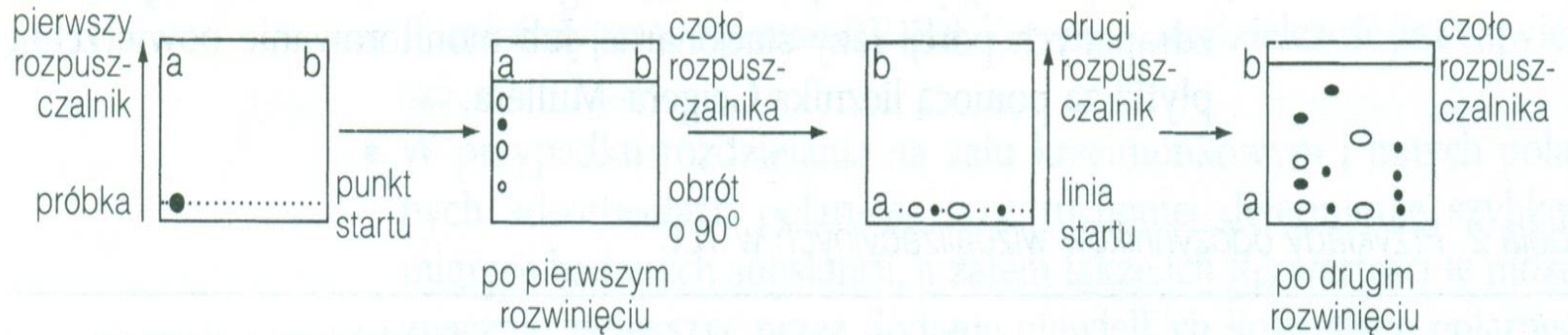
- **Metody bezpośrednie** – poprzez pomiar powierzchni plamki za pomocą planimetru.
- **Fotodensytometria** – w oznaczeniu stosowany jest pomiar światła odbitego lub przepuszczonego – głównie UV/VIS.
- **Fluorymetria** – pomiar natężenia światła emitowanego przez substancje fluoryzujące.
- **Oznaczenie pośrednie w eluatach** – sorbent z powierzchni płytki zawierający plamkę ekstrahowany jest rozpuszczalnikiem a roztwór badany poddaje się analizie instrumentalnej (NMR, IR, UV lub innej).

Fotodensytometria w TLC



Inne procedury TLC

Dwuwymiarowa TLC – stosowana dla pełnego rozdzielenia substancji o podobnych właściwościach chemicznych.



Inne procedury TLC

Wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa (HPTLC)

- Stosowane są płytki pokryte **cieńszą warstwą** (0,1 mm grubości) **bardzo drobnoziarnistego sorbentu** (średnia wielkość ziarna 5 μm).
- Zwiększa się czułość i rozdzielczość rozdziału.
- Odczyty chromatogramów prowadzone są przy pomocy **densytometru**.

Porównanie TLC z HPTLC

Parametr	TLC	HPTLC
Wielkość płytki [cm]	20 x 20	10 x 10
Grubość warstwy [μm]	100-250	200
Przeciętna wielkość ziaren [μm]	20	5-15
Rozkład średnicy ziaren	10-60	wąski
Objętość próbki [μL]	1-5	0,1-0,5
Średnica plamki [mm]		
w chwili startu	3-6	1,0-1,5
po rozwinięciu	8-15	2-6
Czas rozwijania [min]	30-200	3-6
Granice wykrywalności		
absorpcja światła [ng]	1-5	0,1-0,5
fluorescencja [pg]	50-100	5-10

Chromatografia gazowa (GC)

Format – kolumnowa

Mechanizm sorpcji (technika) – podział (gaz-ciecz **GLC**), adsorpcja (gaz-ciało stałe **GSC**).

Nośnik – ściana kolumny, drobnoziarniste ciało stałe

Faza stacjonarna – wysokowrzące ciecze, oleje, woski, stałe drobnoziarniste adsorbenty

Kolumny – długie, wąskie rurki kapilarne (otwarte) z fazą stacjonarną pokrywającą ściany lub krótkie rurki o większej średnicy, wypełnione sorbentem (kolumny pakowane).

Faza ruchoma – obojętny gaz oczyszczany w adsorbentach, a dostarczany z butli przez zawory regulujące ciśnienie i przepływ. Azot stosowany do kolumny pakowanej, hel w kolumnach kapilarnych.

Chromatografia gazowa (GC)

Dozowanie próbki – gazowe, ciekłe lub stałe – wprowadzane przez dozownik (mikrostrzykawka, zawór) do fazy ruchomej na szczycie kolumny w postaci roztworu 0,5-20 μL .

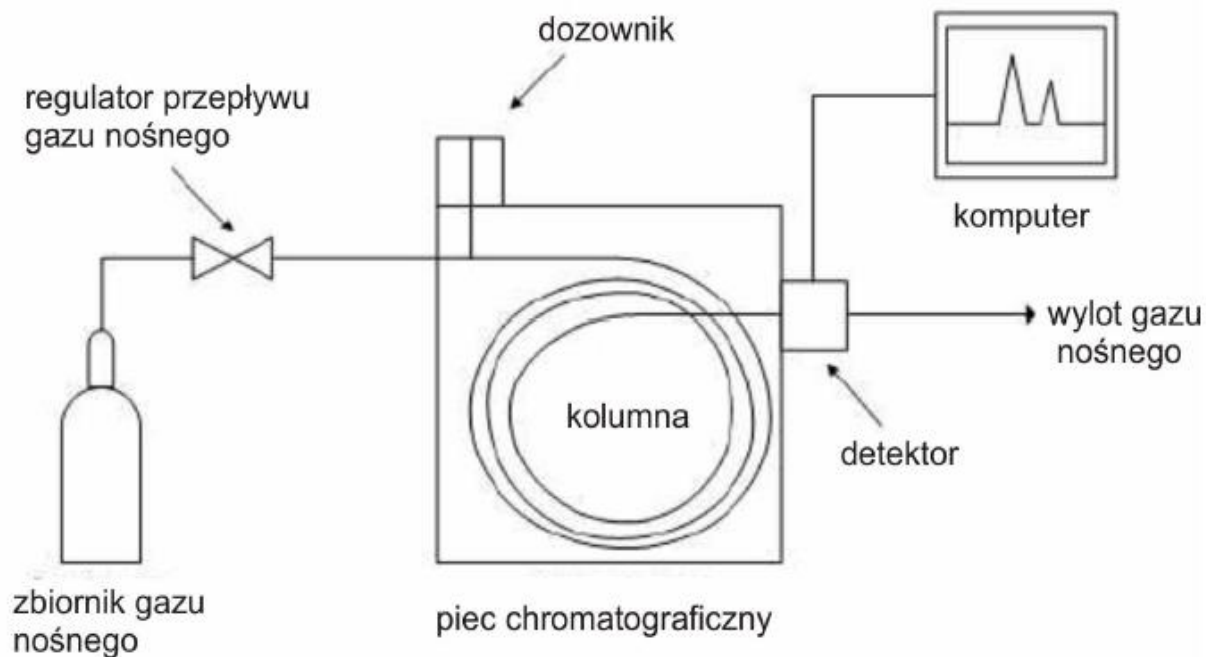
Regulacja temperatury – kolumny znajdują się w termostatowanych piecach.

Temperatura rozdziału jest stała lub regulowana (wzrastająca w czasie rozdziału).

Temperatura elucji 50-350°C.

Identyfikacja – substancje rozdzielane wykrywane są w fazie ruchomej w kolejności elucji przez detektory.

Chromatografia gazowa (GC)



Schemat chromatografu gazowego.

Kolumny stosowane w GC

- **pakowane** (kolumny z wypełnieniem): **analityczne, mikropakowane i preparatywne**
- **kapilarne** - kolumny o przekroju otwartym



kolumna pakowana
stal nierdzewna

kolumna pakowana
szkło

kolumna kapilarna
krzemowa

kolumna pakowana
stal nierdzewna

Fazy stacjonarne stosowane w GC

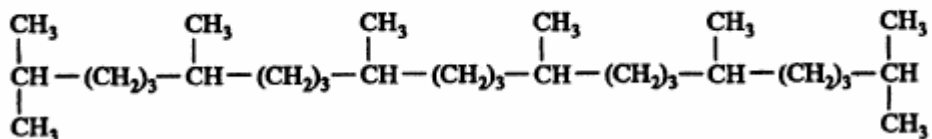
Chromatografia gaz-ciało stałe, GSC

Adsorbenty węglowe, żele krzemionkowe, sita molekularne, polimery porowate.
Stosowane do analiz gazów i węglowodorów o niskich masach cząsteczkowych.

Chromatografia gaz-ciecz, GLC

- fazy niepolarne: węglowodory będące dobrymi rozpuszczalnikami substancji niepolarnych, np. skwalan.

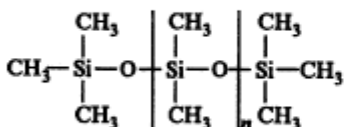
2,6,10,14,18,22-heksametylotetrakozan



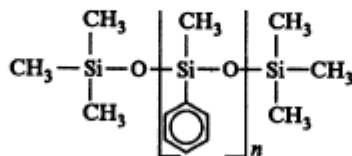
Fazy stacjonarne stosowane w GC

- fazy średniopolarne: silikony. Są to siloksany o różnej masie cząsteczkowej: polidimetylosiloksan, polimetylofenylosiloksan, policyjanoalkilosiloksan.

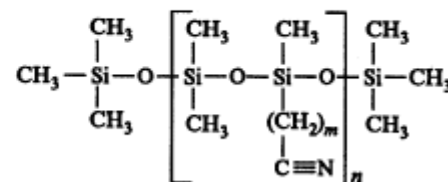
dimetylopolisiloksan



fenylometrylopolisiloksan

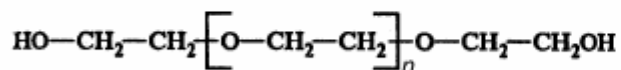


cyjanometrylopolisiloksan

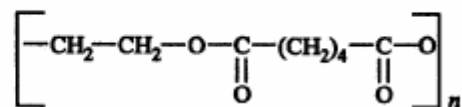


- fazy polarne: glikole polietylenowe (np. Carbowax) oraz estry.

poliglikol etylenowy



poliadypinian glikolu etylenowego



- fazy polarne oparte o kopolimery styrenu i diwinylobenzenu.

Fazy ruchome stosowana w GC

- wodór, azot, argon lub hel
- Przy wyborze gazu nośnego należy się kierować przede wszystkim rodzajem wybranego detektora oraz ceną, dostępnością i czystością gazu.
- Wymagana czystość gazów wynosi $>99,999\%$.

Detektory stosowane w GC

Detektory można podzielić na:

- *nieselektywne* – detektory uniwersalne, reagują na wszystkie składniki próbki,
- *selektywne* – reagują na pewną grupę związków, które mają podobne właściwości chemiczne lub fizyczne,
- *specyficzne* – reagują na pojedynczy związek chemiczny.

Detektory stosowane w GC

Rodzaj detektora	Analizowane próbki	Granice wykrywalności
Pomieniowo-jonizacyjny	węglowodory	0,2 pg/s
Ciepłno-przewodnościowy	uniwersalny	500 pg/mL
Wychwytu elektronów	związki halogenoorganiczne	5 fg/s
Spektrometr mas	dopasowany do każdego rodzaju związków	0,25-100 pg
Termojonizacyjny	związki azotowe i fosforowe	1 pg/s (N) 0,1 pg/s (P)
Przewodnictwa elektrolitycznego (detektor Halla)	związki zawierające fluorowce, siarkę lub azot	0,5 pg/s (Cl) 2 pg/s (S) 4 pg/s (N)
Fotojonizacyjny	związki jonizowane przez promieniowanie UV	2 pg/s
IR z transformacją Fouriera	związki organiczne	0,2-40 ng

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

Format – kolumnowa

Mechanizm sorpcji (technika) – podział, adsorpcja, wymiana jonowa, wykluczanie, powinowactwa i chiralna.

Nośnik – ściana kolumny, drobnoziarniste ciało stałe.

Faza stacjonarna – modyfikowana krzemionka, niemodyfikowana krzemionka, żywice polimerowe, żele.

Kolumny – proste rurki ze stali nierdzewnej (dł. 5-25 cm, śr. 4,5-10 mm) wypełnione fazą stacjonarną drobnoziarnistą lub polimerem.

Faza ruchoma – **mieszanina rozpuszczalników** (do czterech składników).

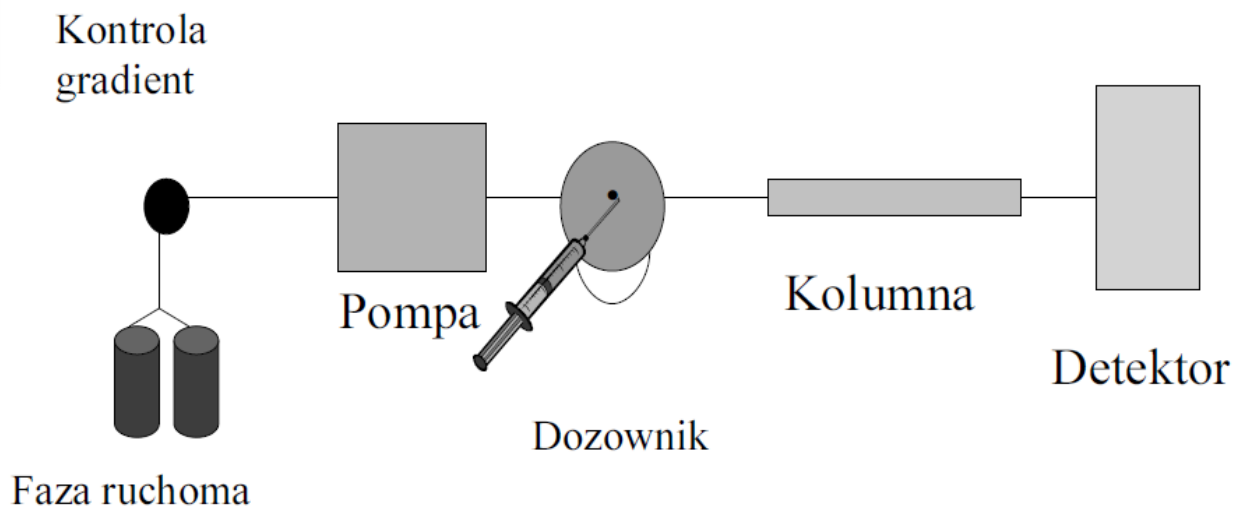
Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

Dozowanie próbki – ciekłe próbki i roztwory wprowadzane przez dozownik (zawór) do fazy ruchomej na szczycie kolumny.

Identyfikacja – substancje rozdzielane wykrywane są w fazie ruchomej w kolejności wypływu przez detektor – zależność stężenia od czasu.

Detektory – absorpcyjny; fluorescencyjny; elektrochemiczny, FTIR; spektrometr mas; refraktometryczny; konduktometryczny.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)



Kolumny HPLC

Typy kolumn do HPLC:

- konwencjonalne
- o małej średnicy

Kolumny:

- mikrokolumny
- analityczne
- preparatywne



Kolumny HPLC

Porównanie kolumn konwencjonalnych z kolumnami o małej średnicy

Kolumny konwencjonalne

Rurki

Stal nierdzewna

dł. 3, 10, 15, 20 i 25 cm;

średnica zew. 6,3 mm, wewn. 4,6 mm

Faza stacjonarna

Porowata, mikroziarnista krzemionka, chemicznie modyfikowana krzemionka (fazy związane) lub kopolimery styren/diwinylobenzen
średnia średnica ziaren 3, 5 lub 10 μm i wąski zakres rozmiarów ziaren.

Ciśnienie pracy

3,5-21,5 MPa

Typowe fazy ruchome

Węglowodory + rozpuszczalniki chlorowane lub alkohole do rozdzielania w normalnym układzie faz; metanol lub acetonitryl + woda lub wodne roztwory buforowe do rozdzielania w odwróconym układzie faz.

Natężenie przepływu 1-3 ml/min

Działanie

Sprawność wzrasta, gdy zmniejszają się rozmiary ziarna, lecz czas życia kolumny z 3- μm ziarnem jest krótszy.

Rozdzielanie na 3-cm szybkiej kolumnie trwa mniej niż 1 minutę.

Kolumny o małej średnicy

Rurki

Stal nierdzewna

dł. 25 i 50 cm;

średnica zew. 6,3 mm, wewn. 1 lub 2 mm

Faza stacjonarna

Porowata, mikroziarnista krzemionka, chemicznie modyfikowana krzemionka (fazy związane) lub kopolimery styren/diwinylobenzen
średnia średnica ziaren 3, 5 lub 10 μm i wąski zakres rozmiarów ziaren.

Ciśnienie pracy

7,0-35,0 MPa

Typowe fazy ruchome

Węglowodory + rozpuszczalniki chlorowane lub alkohole do rozdzielania w normalnym układzie faz; metanol lub acetonitryl + woda lub wodne roztwory buforowe do rozdzielania w odwróconym układzie faz.

Natężenie przepływu 10-100 $\mu\text{l}/\text{min}$

Działanie

Bardzo sprawne i czułe, lecz powolne.

Zużycie rozpuszczalnika tylko $\frac{1}{4}$ tego, co w przypadku kolumny konwencjonalnej.

Fazy stacjonarne w chromatografii HPLC

Faza stacjonarna	Mechanizm sorpcji	Charakterystyka
Niemodyfikowana krzemionka, SiO ₂	Adsorpcja, NP	polarna, uniwersalna
FAZY ZWIĄZANE		
Krzemionka modyfikowana węglowodorami C2, C4, C8, C18	zmodyfikowany podział, RP	niepolarne, uniwersalne, ograniczony zakres pH 2,5-7,5
Krzemionka z grupami aminopropylowymi, -C ₃ H ₆ NH ₂	zmodyfikowany podział, NP lub RP	polarna do rozdziatu węglowodanów, ograniczony zakres pH 2,5-7,5
Krzemionka z grupami sulfonowymi, -(CH ₂) _n SO ₃ H	wymiana kationowa	ograniczona pojemność i pH 2,5-7,5
Krzemionka z czwartorzędowymi grupami amoniowymi, -(CH ₂) _n NR ₃ OH	wymiana anionowa	

Fazy stacjonarne w chromatografii HPLC

Faza stacjonarna	Mechanizm sorpcji	Charakterystyka
Krzemionka o regulowanej porowatości	wykluczanie zależne od wielkości cząstek	uniwersalna
Krzemionka z α, β, γ -cyklodekstrynami	selektywność chiralna	kosztowna, nietrwała
FAZY POLIMEROWE		
Usieciowane kopolimery styren/diwinylobenzen	podział, wykluczenie, wymiana jonowa	niepolarna, niemodyfikowana, trwała w zakresie pH 1-13

Fazy ruchome stosowane w HPLC

Faza ruchoma (eluent) - ciecz (najczęściej jest to mieszanina rozpuszczalników) włączana pod wysokim ciśnieniem, która charakteryzuje się odpowiednią zdolnością elucyjną i zapewnia odpowiednią rozdzielczość.

Elucja:

- **Izokratyczna** - stały skład fazy ruchomej
- **Gradientowa** - skład eluentu jest zmienny

Szereg eluotropowy rozpuszczalników

dla adsorbentów polarnych

Rozpuszczalnik	Moc elucyjna
n-Pentan	0,00
n-Heksan	0,01
Cykloheksan	0,04
CCl ₄	0,18
Toluen	0,29
Eter etylowy	0,38
Chloroform	0,40
Dichlorometan	0,42
Tetrahydrofuran	0,45
Aceton	0,56
Acetonitryl	0,71
Pirydyna	0,88
Etanol	0,95
Metanol	Bardzo duża
Woda kwas octowy	Bardzo duża

Szereg eluotropowy rozpuszczalników

stosowany do faz RP

Rozpuszczalnik	Indeks polarności
Woda	10,2
DMSO	7,2
Glikol etylenowy	6,9
Acetonitryl	5,8
Metanol	5,1
Aceton	5,1
Dioksan	4,8
Etanol	4,3
Tetrahydrofuran	4,0
i-Propanol	3,9

Detektory spektrofotometryczne UV-VIS

1. Fotometry z filtrami
2. Spektrofometry o zmiennej długości fali
3. Detektory typu *photodiode-array*

Detektory systemu HPLC

Fluorymetryczny – reaguje selektywnie na substancje fluoryzujące.

Refraktometryczny – najbardziej uniwersalny. Pomiar zmiany współczynnika załamania światła fazy ruchomej (różnicowy).

Elektrochemiczny – pomiar przewodności dla substancji jonowych lub prądu w reakcji elektrochemicznego utlenienia lub redukcji.

Spektrometr mas – możliwość identyfikacji wszystkich substancji.

Odmiany HPLC

Chromatografia adsorpcyjna

Chromatografia podziałowa zmodyfikowana

Chromatografia jonowymienna

Chiralna chromatografia cieczowa

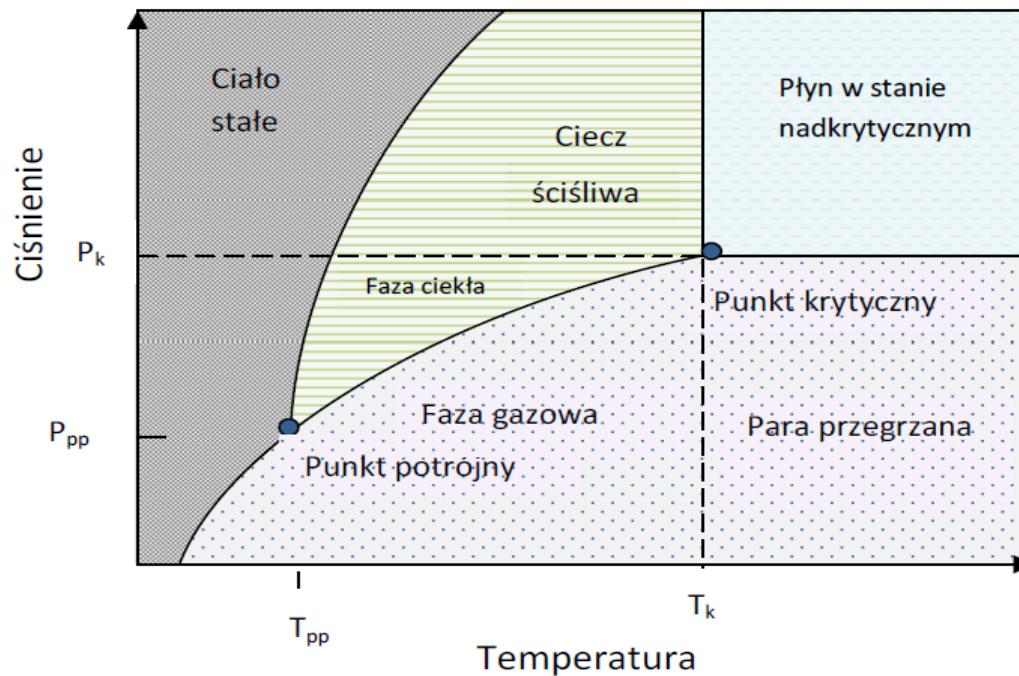
Chromatografia żelowa, wykluczania zależnego od wielkości cząstek

Chromatografia fluidalna

Chromatografia powinowactwa

Chromatografia fluidalna

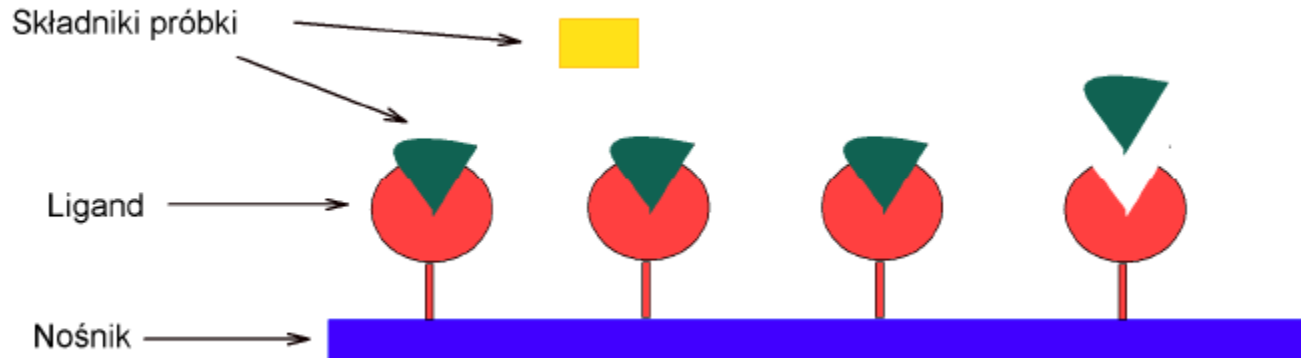
Chromatografia płynem nadkrytycznym (SFC - *Supercritical Fluid Chromatography*)



Chromatografia powinowactwa (Affinity Chromatography)

Wykorzystuje się tu najczęściej przeciwciała lub enzymy unieruchomione na nośniku.

Jeśli w próbce występuje odpowiedni antygen lub substrat, to jest on selektywnie zatrzymywany na kolumnie.



Analiza ilościowa w technikach chromatograficznych

- Mierzony parametr (pole powierzchni lub wysokość piku) jest funkcją stężenia (lub masy) chromatografowanej substancji:

$$P_p = f(c);$$

$$P_p = f(m)$$

$$h_p = f(c);$$

$$h_p = f(m)$$

P_p – pole powierzchni piku, h_p – wysokość piku,

c – stężenie substancji chromatografowanej, m - masa substancji chromatografowanej.

Analiza ilościowa w technikach chromatograficznych

Najczęściej stosujemy trzy metody analizy ilościowej:

- **metoda krzywej kalibracyjnej** (wzorca zewnętrznego, kalibracja bezwzględna),
- **metoda wzorca wewnętrznego**,
- **metoda dodatku wzorca**.

Metoda krzywej kalibracyjnej

- **Metodę krzywej kalibracyjnej** stosuje się wtedy, kiedy **znamy dokładnie objętości roztworów dozowane do chromatografu (najlepiej dozować dokładnie taką samą objętość każdego roztworu wzorcowego)**.
- Mierzony parametr (pole powierzchni lub wysokość piku) jest funkcją liniową stężenia.

$$P_p = a \cdot c + b$$

$$h_p = a \cdot c + b$$

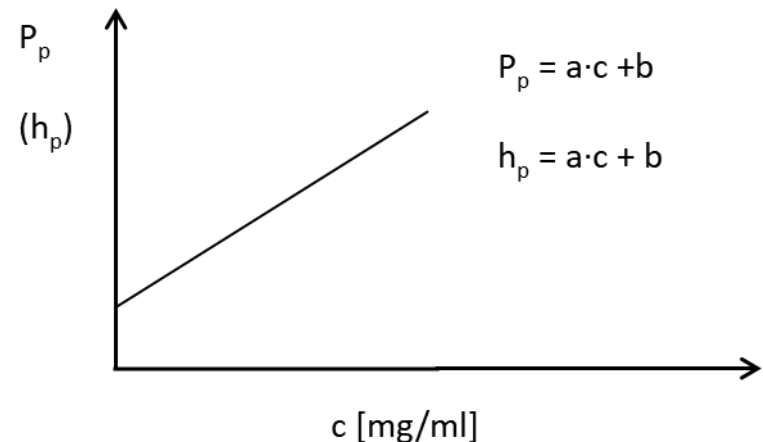
P_p – pole powierzchni piku

h_p – wysokość piku

c – stężenie substancji chromatografowanej

a – współczynnik kierunkowy prostej

b – wartość stała



Metoda wzorca wewnętrznego

$$P_{pa} = a_a \cdot c_a$$

$$P_{pw} = a_w \cdot c_w$$

$$h_{pa} = a_a \cdot c_a$$

$$h_{pw} = a_w \cdot c_w$$

P_{pa} , P_{pw} – pole powierzchni piku analitu/wzorca

h_{pa} , h_{pw} – wysokość piku analitu/wzorca

a_a , a_w – współczynnik kierunkowy prostej

c_a , c_w – stężenie analitu/wzorca w próbce dozowanej do chromatografu

Metoda dodatku wzorca

Metodę dodatku wzorca stosujemy, jeżeli równanie krzywej kalibracyjnej ma przebieg prostoliniowy, zaś wartość b jest równa zero.

Objętość aplikowanej próbki (na kolumnę lub płytkę chromatograficzną) musi być stała.

Stężenie analitu wyznaczyć można na podstawie układu dwóch równań:

$$\begin{cases} h_1 = a \cdot c \\ h_2 = a(c + c_w) \end{cases}$$
$$c = h_1 c_w / (h_2 - h_1)$$

Walidacja metod chromatograficznych

Walidacja metody (ang. *method validation*):

- jest to proces oceny metody analitycznej, którego celem jest zapewnienie zgodności ze stawianymi tej metodzie wymogami, definiujący tę metodę, a także pozwalający określić jej przydatność;
 - ma na celu zapewnienie, czy proces analizy przebiega w sposób rzetelny i precyzyjny oraz czy daje miarodajne wyniki.

Walidacja metod chromatograficznych

Zestawienie parametrów zgodnych z rekomendacją *International Conference on Harmonisation (ICH)* oraz z zaleceniami *The United States Pharmacopeia (USP)*, będących podstawą procesu walidacji:

- specyficzność i selektywność
- dokładność
- precyzja (powtarzalność, odtwarzalność = precyzja pośrednia)
- liniowość
- zakres
- granice wykrywalności i oznaczalności
- trwałość
- robustness (odporność metody)
- ruggednes (odtwarzalność metody).

Walidacja metod chromatograficznych

Selektywność i specyficzność (*Selectivity and specificity*)

- **Selektywność** bądź **specyficzność** metody powinna być sprawdzona zarówno na czystych wzorcach oraz na mieszaninach o składzie odpowiadającym preparatowi farmaceutycznemu. Wpływy substancji współobecnych powinny być sprecyzowane i udokumentowane.
- **Specyficzność** metody powinna być oceniona przy potwierdzeniu tożsamości, badaniu zanieczyszczeń i oznaczaniu zawartości substancji czynnej.

Walidacja metod chromatograficznych

Dokładność (*Accuracy*)

- **Metoda dokładna** pozwala uzyskać wynik bliski wartości rzeczywistej, nieobciążony błędem systematycznym.
- Do oceny dokładności wyznacza się błąd bezwzględny lub względny (%).
- Zwykle wykonuje się nie mniej niż 9 oznaczeń, dla 3 zakresów stężeń, powtarzając każde oznaczenie 3-krotnie.
- Wyniki oznaczeń porównuje się z wynikami uzyskanymi dla substancji wzorcowej, lub porównawczej, lub z wynikami uzyskanymi inną metodą.

Walidacja metod chromatograficznych

Precyzja, Powtarzalność, Odtwarzalność

- Mogą być charakteryzowane przez odchylenie standardowe pojedynczego wyniku (s), względne odchylenie standardowe RSD (*Relative Standard Deviation*) lub współczynnik zmienności (*Coefficient of Variation*), wyrażony w procentach.
- Należy przeprowadzić co najmniej dziewięć niezależnych oznaczeń, po trzy powtórzenia na trzech poziomach stężeń.
- Precyzję metody określa rozrzut wyników w serii pomiarów.
- Precyzja dostarcza informacji na temat błędów przypadkowych.

Walidacja metod chromatograficznych

Precyzja (*Precision*)

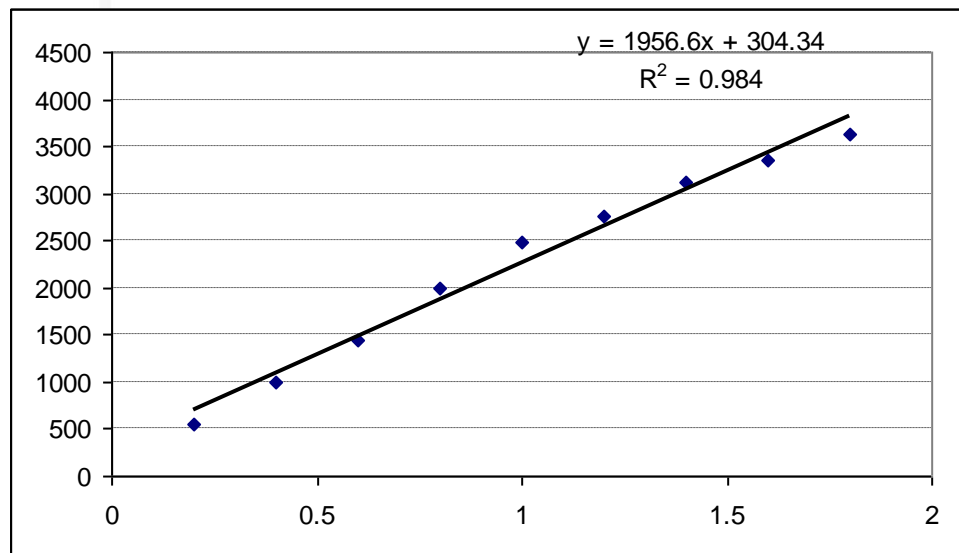
- Precyzja może być wyrażona jako **powtarzalność** (*Repeatability*) i **odtworzalność** (*Reproducibility*).
- **Powtarzalność** odnosi się do pomiarów uzyskanych w jednym laboratorium, przez tego samego analityka, na tym samym przyrządzie, z zastosowaniem tych samych odczynników i w stosunkowo krótkim czasie.
- **Odtwarzalność** odnosi się do precyzji obliczonej z wyników uzyskanych w różnych laboratoriach, przez różnych analityków, z zastosowaniem odczynników pochodzących z różnych źródeł, na różnych przyrządach, w różnych dniach.

Walidacja metod chromatograficznych

Liniowość (*Linearity*)

Zakres liniowy metody wyznacza się najczęściej na podstawie wykresu kalibracyjnego urządzenia pomiarowego.

- Do oceny liniowości stosuje się nie mniej niż 6 stężeń substancji oznaczanej, w zakresie ok. 50-150% wartości spodziewanej.
- Odpowiedź detektora jako funkcja stężenia powinna być liniowa.



Walidacja metod chromatograficznych

Zakres metody (*Range*)

Zakres metody analitycznej obejmuje przedział pomiędzy najniższym i najwyższym stężeniem substancji badanej, w którym oznaczenie jest prowadzone z akceptowaną dokładnością, precyzją i liniowością.

Granica wykrywalności (DL) jest to najmniejsza ilość badanej substancji w próbce, która może być wykryta, ale nie oznaczona jako dokładna wartość.

Granica oznaczalności (QL) jest to najmniejsza ilość substancji badanej, którą można oznaczyć z akceptowaną precyzją i dokładnością.

Walidacja metod chromatograficznych

Odporność metody (*Robustness*)

Badanie to pozwala zdefiniować dopuszczalne (niewielkie) zmiany parametrów krytycznych postępowania analitycznego, niewpływających istotnie na wyniki oznaczeń.

W przypadku izokratycznej metody HPLC, typowymi parametrami krytycznymi są:

- rodzaj i wymiary kolumny, wielkość ziaren fazy stacjonarnej,
- skład fazy ruchomej,
- wartość pH fazy ruchomej,
- stężenie soli w buforze wchodzącym w skład fazy ruchomej,
- szybkość przepływu fazy ruchomej,
- długość fali detektora,
- wprowadzana objętość próbki,
- temperatura.

Walidacja metod chromatograficznych

Odtwarzalność metody analitycznej (*Ruggedness*)

Jest miarą powtarzalności otrzymania spodziewanych wyników analizy w warunkach normalnych w różnych laboratoriach przez różnych analityków.

Rewalidacja metody

Wskazana szczególnie przy zmianie:

- sposobu syntezy substancji czynnej,
- składu wyrobu gotowego,
- przepisu analitycznego.

Ocena statystyczna wyników

Jedną z metod wykrywania wyników wątpliwych, w próbkach nie przekraczających zwykle 10 wyników, jest metoda zwana **testem Q-Dixona**.

$$Q = \frac{x_n - x_w}{R}$$

x_w – wynik wątpliwy

x_n – wynik najbliższy co do wielkości w uporządkowanym szeregu wyników o coraz większej wartości,

R – rozstęp, czyli różnica pomiędzy największym i najmniejszym wynikiem w próbie.

Wynik wątpliwy x_w odrzuca się wówczas, gdy obliczona wartość Q jest większa od wartości krytycznej Q_k .

Literatura

- R. Kocjan „Chemia analityczna. Podręcznik dla studentów. Analiza instrumentalna. Tom 2”
- D.A. Skoog, D.M. West, J.F. Holler i inni „Podstawy chemii analitycznej”
- J. Kałużna-Czaplińska, Z. Witkiewicz „Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych”