WARNING

Materiały publikowane w formie „jest jak jest”, mogą wymagać rozszerzenia lub komentarzy.

Chromatografia cieczowa

Karol Macieląg

Chromatografia cieczowa

- Chromatografia cieczowa, LC (ang. Liquid Chromatography) – obejmuje techniki analityczne wykorzystujące zjawisko różnej szybkości migracji składników analizowanej mieszaniny. W chromatografii tej fazą ruchomą (eluentem) jest ciecz. Istotą każdej chromatografii cieczowej jest rozdział analizowanej mieszaniny na poszczególne związki chemiczne poprzez przepuszczanie roztworu tej mieszaniny przez stałe lub żelowe złoża. Różnice w szybkości migracji poszczególnych składników próbki wywołane są przez różnego typu czynniki takie jak: rozpuszczalność, współczynnik podziału, adsorpcja, reakcje chemiczne itp. Stąd wywodzi się podstawowy podział technik chromatograficznych na adsorpcyjne, podziałowe, żelowe i jonowymienne. Na skutek oddziaływań międzycząsteczkowych między związkami tworzącymi mieszaninę i złożem, jedne z nich przechodzą przez złoże szybciej, a inne wolniej. Ze względu na ilość pozyskiwanych substancji wyróżnia się **chromatografię preparatywną** (dostarczającą niewielkich ilości substancji i jedynie sporadycznie) oraz **chromatografię procesową** lub inaczej **produkcyjną** (gdy ilość pozyskiwanego produktu jest znacznie większa, a proces prowadzony jest w sposób cykliczny lub ciągły).
- Początki chromatografii związane są z rosyjskim botanikiem o nazwisku Cwiet. Nazwa chromatografia ("pisanie barwami") wzięła się od pierwszych doświadczeń botanika. Przeprowadził on tą metodą rozdział barwnych związków naturalnych już na początku XX wieku.
- Istnieje bardzo wiele rodzajów chromatografii cieczowej, które można podzielić na trzy ogólne rodzaje:
  - chromatografia cienkowarstwowa - w której złoże (zwykle żel krzemionkowy) jest nałożone na płytkę szklaną lub plastikową w postaci cienkiej, sprasowanej formy. Rozdział następuje poprzez powolne wnikanie roztworu w złoże
  - chromatografia kolumnowa - w które złoże umieszcza się w kolumnie, po czym przez kolumnę przepuszcza się roztwór analizowanej mieszaniny - jej szczególnym przypadkiem jest HPLC
  - elektroforeza - która w zasadzie jest formą chromatografii cienkowarstwowej, w której jednak najpierw nasącza się złoże mieszaniną, a rozdział następuje na skutek działania pola elektrycznego

Układ chromatograficzny

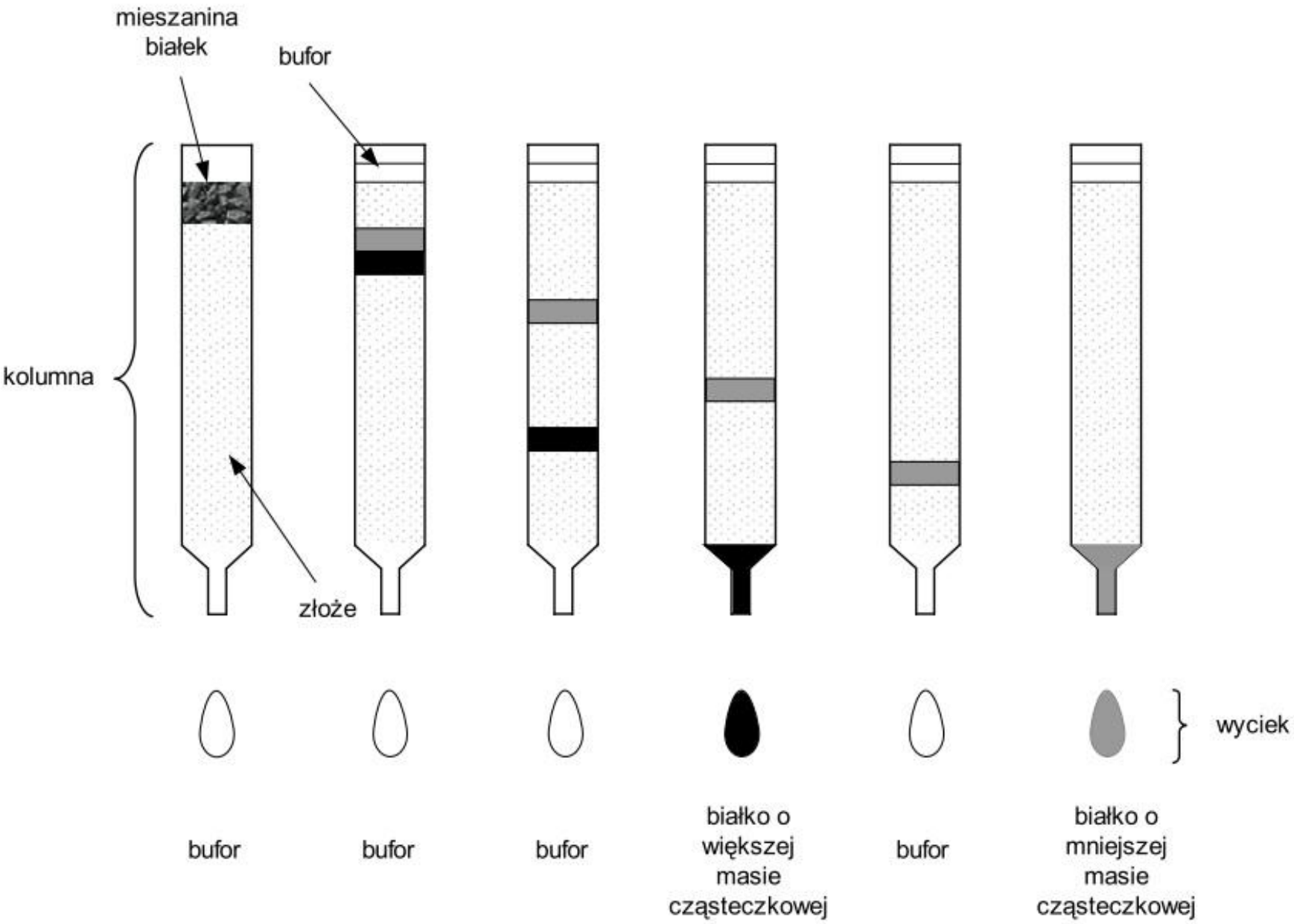
- Układ chromatograficzny składa się z trzech składników:
  - • **mieszaniny** poddawanej rozdzieleniu;
  - • **fazy stacjonarnej**, sorbentu, czyli stałego lub żelowego złoża, które może oddziaływać międzycząsteczkowo ze związkami tworzącymi analizowaną mieszaninę. Istotna dla rozdziału jest zarówno wielkość powierzchni sorpcyjnej, jak i stopień jej obsadzenia grupami funkcyjnymi;
  - • **fazy ruchomej**, czyli eluentu lub inaczej czynnika wymywającego. W przypadku chromatografii cieczowej jest nim ciekły rozpuszczalnik, który przenosi analizowaną substancję przez złoże. Dobry eluent powinien zapewniać wystarczającą selektywność układu chromatograficznego, a przy tym nie reagować ani z fazą stacjonarną, ani z substancjami rozdzielanymi (wyłączając zamierzone działania). Powinien on również charakteryzować się możliwie niską lepkością, niskim ciepłem parowania i nie absorbować światła w tych zakresach fali, które będą wykorzystywane przy detekcji.

Elucja

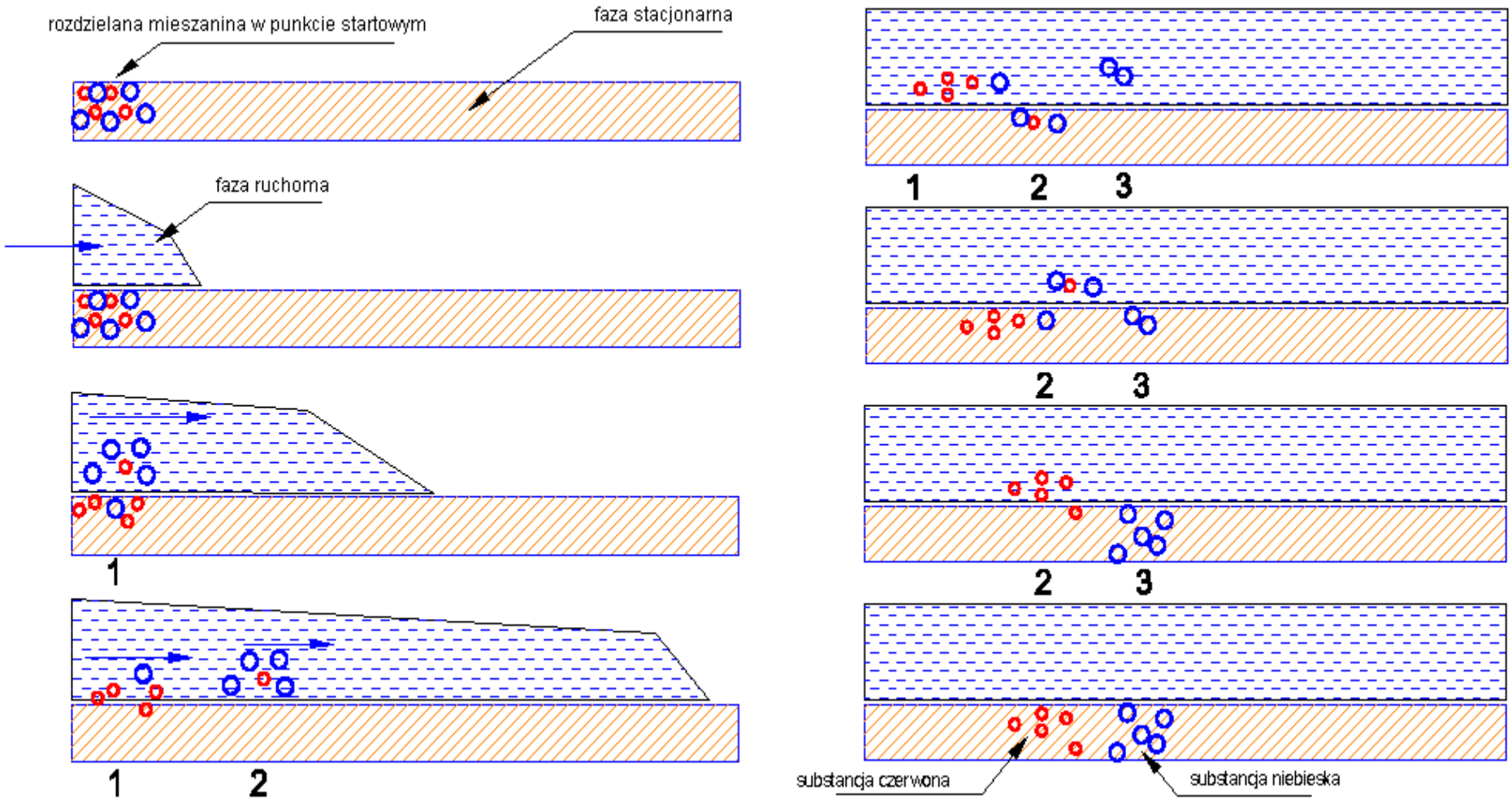
- Proces wymywania składników nazywa się elucją. Istnieją dwa sposoby jej prowadzenia:
  - • **izokratyczna** - podczas której skład eluentu jest stały;
  - • **gradientowa** - w której dzięki zmianie składu fazy ruchomej następuje wzrost siły elucyjnej (np. skład eluentu w trakcie rozdzielania zmienia się od 10% do 90% metanolu w wodzie). Faza ruchoma o odpowiedniej mocy do rozdzielenia składników o dużej retencji nie rozdziela składników wymywanych na początkowym etapie. Faza ruchoma odpowiednia dla składników o słabej retencji nie wymywa składników silnie zatrzymywanych lub też powoduje ich oddzielenie dopiero po bardzo długim czasie. Elucja gradientowa rozwiązuje ten problem dzięki systematycznemu zwiększaniu siły elucyjnej i stanowi najskuteczniejszy sposób rozwiązania tzw. ogólnego problemu elucji. Stosuje się ją w przypadkach, kiedy analizowana mieszanina składa się z substancji znacznie różniących się od siebie właściwościami sorpcyjnymi.

CIECZOWEJ ZE WZGLĘDU NA RÓŻNE MECHANIZMY ROZDZIAŁU

- **Układy chromatograficzne adsorpcyjne (ciecz - ciało stałe)**, w których wyróżnia się:
  - **Układ faz normalnych (NP)**, wykorzystujący interakcje pomiędzy polarnymi grupami funkcyjnymi rozdzielanych składników, a polarnymi centrami aktywnymi znajdującymi się na powierzchni fazy stacjonarnej. Podstawowym zjawiskiem decydującym o rozdzielaniu jest adsorpcja na powierzchni bardziej polarnego sorbentu.
  - **Układy faz odwróconych (RP)**, czyli takie, w których faza stacjonarna jest mniej polarna niż faza ruchoma. Nazwa ich wynika jedynie z historii chromatografii. Fazę ruchomą stanowi tu mieszanina wody i rozpuszczalnika organicznego. Retencja związku zależy od chemicznej natury cząsteczek substancji, eluentu i sorbentu.
- **Podziałowe (ciecz-ciecz)** - analizowane substancje rozdzielane są pomiędzy dwie ciekłe, niemieszające się fazy: ruchomą i stacjonarną, osadzoną statycznie na nośniku (związaną z nim siłami przylegania), bądź też generowaną w sposób dynamiczny w czasie przepływu eluentu przez kolumnę.
- **Chromatografię żelową, sitową** - ten typ chromatografii eliminuje, zjawisko sorpcji. Składniki mieszaniny rozdzielane są na tzw. sitach molekularnych, czyli ziarnach tworzących pory międzyziarnowe przez które płynie ciecz. Zawierają one również mikropory wewnętrzne, w których przestrzeni eluent praktycznie nie płynie. W ten sposób związki rozdzielane są ze względu na swoją wielkość i masę molową.
- **Chromatografię jonowymienną** - ten typ chromatografii korzysta z różnic w ładunku wypadkowym odmiennych cząstek, a rozdział mieszaniny następuje w wyniku odwracalnej wymiany jonów z fazą stacjonarną. Cząsteczki o małej gęstości wypadkowych ładunków dodatnich wypływają z kolumny jako pierwsze, a cząsteczki o większej gęstości ładunków - dopiero w następnej kolejności.
- **Chromatografię powinowactwa** - technika ta wykorzystuje duże powinowactwo wielu białek do specyficznych grup chemicznych (np. oddziaływanie enzym - koenzym) albo innego typu oddziaływania zachodzące pomiędzy fazą stacjonarną, a rozdzielanymi składnikami.

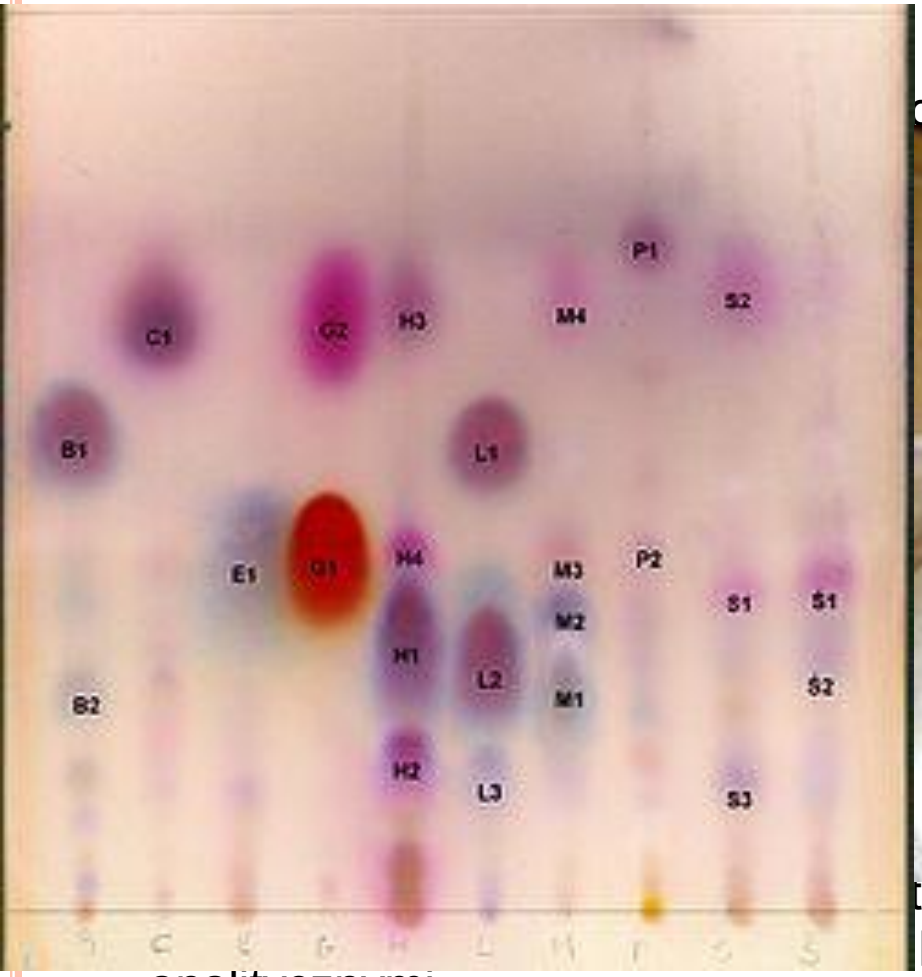

mieszanina białek
bufor
kolumna
złoże
wyciek
bufor
bufor
bufor
białko o większej masie cząsteczkowej
bufor
białko o mniejszej masie cząsteczkowej

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

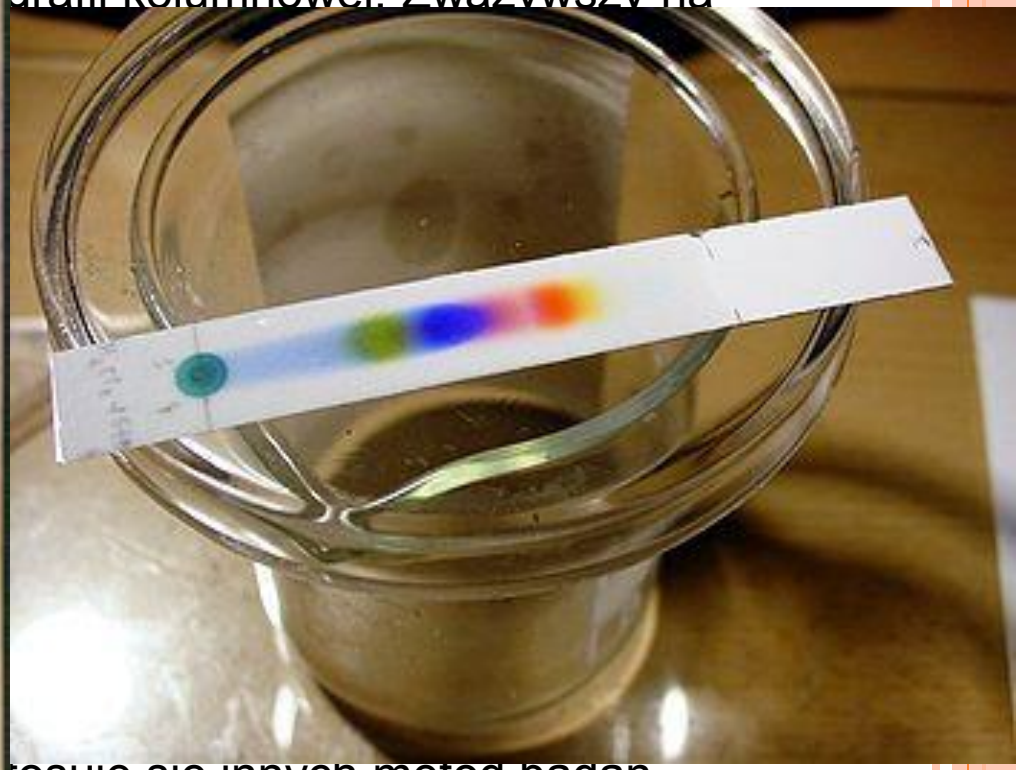


warstwy fazy stałej, a rozdzielone związki chemiczne zeskrobuje się z płytki razem ze złożem, po czym wymywa się je za pomocą odpowiedniego rozpuszczalnika.

Zalety chromatografii cienkowarstwowej



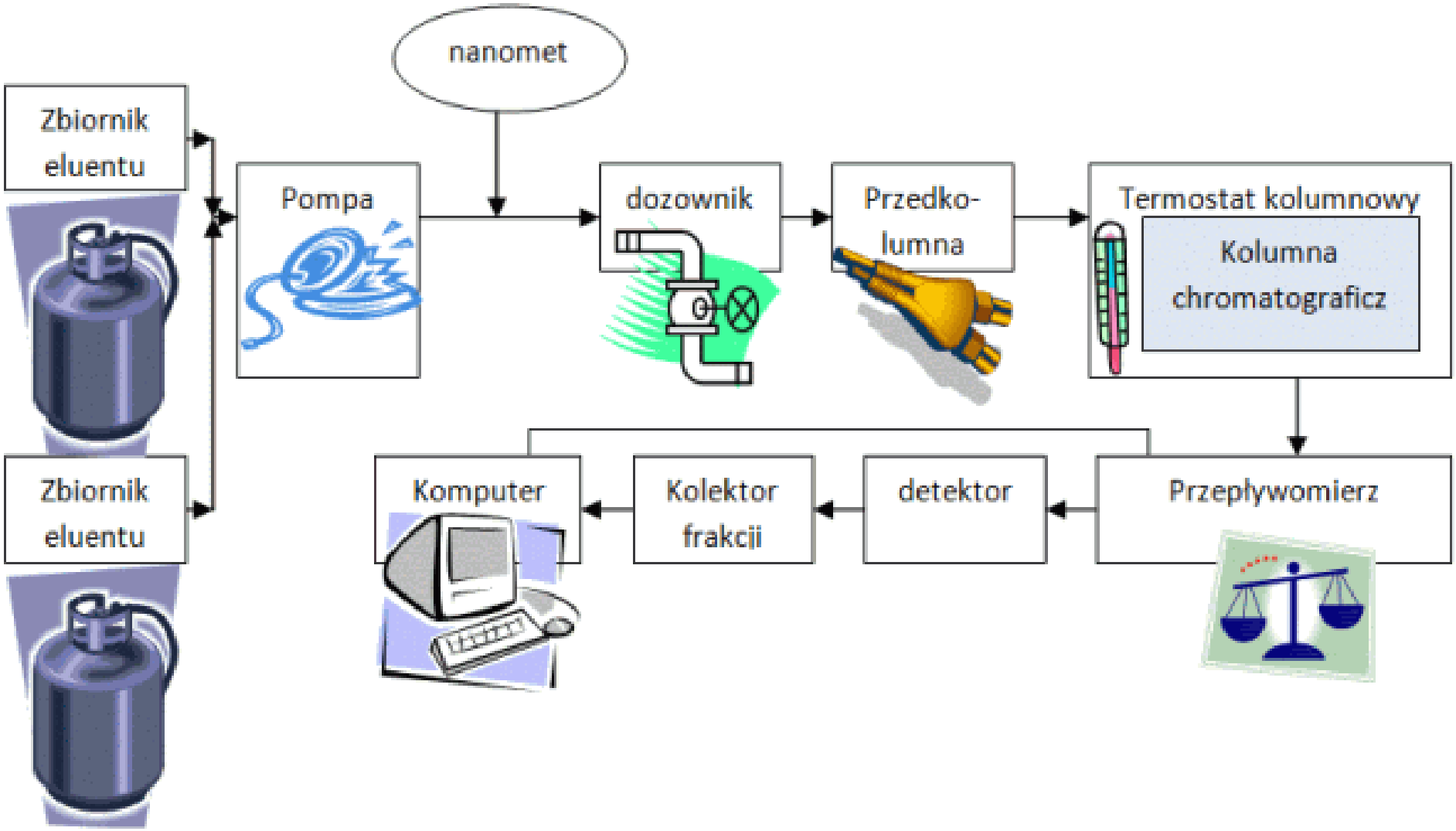
metodą komplementarną w
grafii kolumnowej. Zważywszy na



tosuje się innych metod badań.
porównaniu z innymi metodami analitycznymi,

- istnieje możliwość rozwiązywania nawet skomplikowanych problemów analitycznych bez stosowania bardzo skomplikowanej aparatury.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)



zastosowaniem elucji izokratycznej, jak i gradientowej. Układ gradientowy polega na tym, że w czasie procesu rozdzielania faza ruchoma zmienia swój skład w sposób kontrolowany, tak aby wszystkie składniki uległy rozdzieleniu, a czas analizy był możliwie krótki.

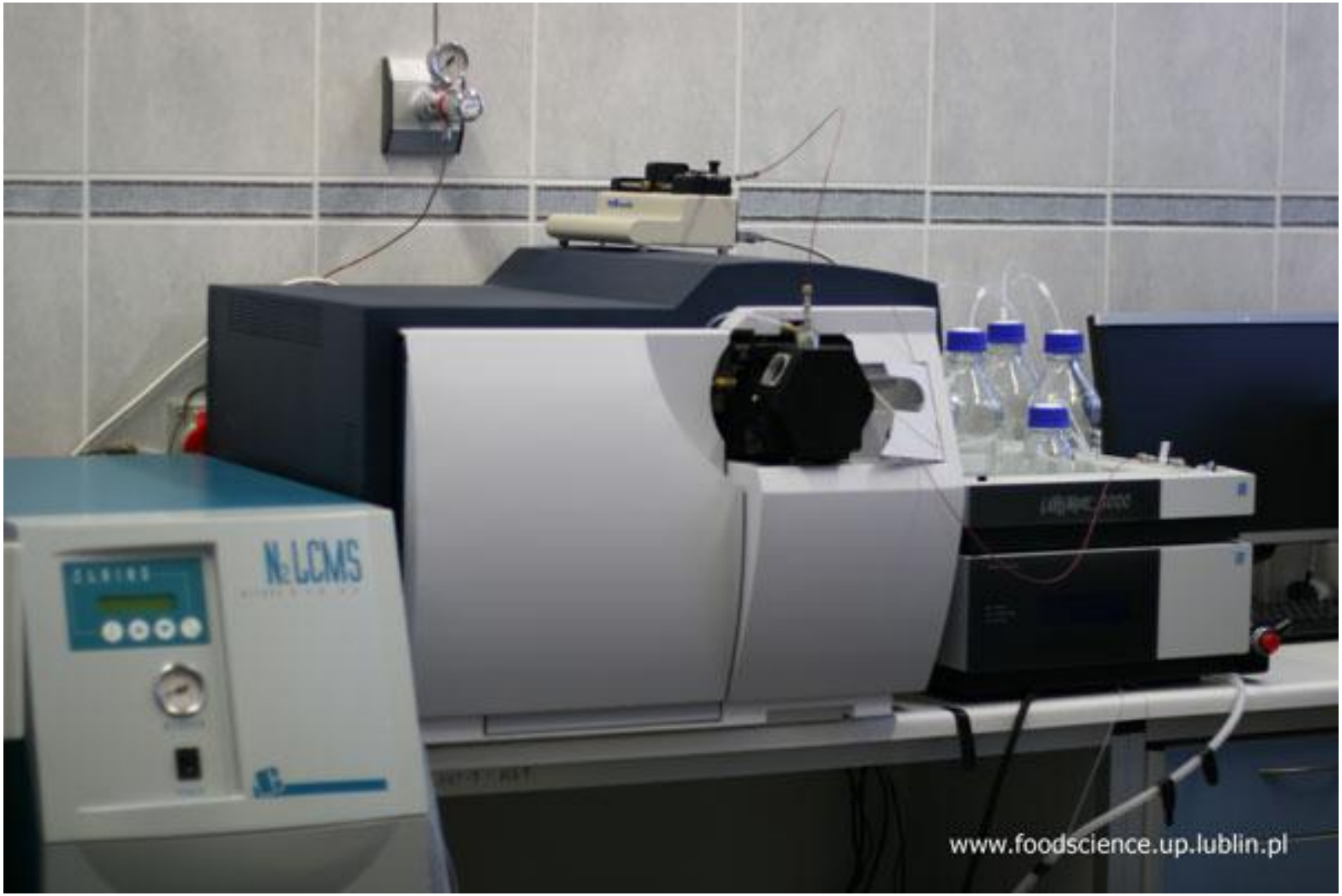
- W HPLC duże znaczenie dla rozdziału ma polarność faz. Początkowo stosowano normalny układ faz (NP), w którym faza stacjonarna jest znacznie bardziej polarna niż faza ruchoma. Obecnie najczęściej stosuje się odwrócony układ faz (RP – układ faz odwróconych), w którym faza stacjonarna jest mniej polarna niż faza ruchoma. Podział zależy od wiązania się hydrofobowych cząsteczek substancji rozpuszczonej z fazy ruchomej do unieruchomionych, hydrofobowych ligandów związanych z fazą stacjonarną. Układy RP mają bardziej trwałe wypełnienia, cechują się niższym kosztem fazy ruchomej a przede wszystkim cechują się inną selektywnością niż układy NP
- Do analiz bardzo małych ilości związków chemicznych stosuje się chromatografy typu nanoHPLC. Analiza próbki trwa kilkadziesiąt do kilkuset minut. Chromatografy nanoHPLC charakteryzują się bardzo dużą rozdzielczością kosztem mniejszej powtarzalności uzyskanych wyników.
- Szczególnym przypadkiem HPLC jest SEC (*size exlusion chromatography*) zwany również GPC (*gel permeation chromatoraphy*). Techniki te są oparte na porowatych wypełnieniach żelowych, w których rozdział następuje nie wskutek powinowactwa chemicznego analizowanych związków do wypełnienia, lecz wskutek zatrzymywania cząsteczek analizowanej mieszaniny przez pory fazy stacjonarnej. Przez kolumny SEC szybciej przechodzą związki o większej masie cząsteczkowej, a wolniej o mniejszej. Jest to metoda stosowana do oznaczania średnich mas cząsteczkowych polimerów i ich polidyspersji.
- Coraz częściej stosuje się tak zwaną ultrasprawną chromatografię cieczową (UHPLC lub UPLC, z ang. *ultra (high) performance liquid chromatography*). W tym przypadku stosuje się krótsze kolumny o mniejszej średnicy wewnętrznej rzędu 1-2 mm, oraz z mniejszym uziarnieniem złoża w kolumnie. Dzięki mniejszym ziarnom złoża rośnie stopień ich upakowania, a tym samym powierzchnia ziaren w jednostce objętości, czego efektem jest zwiększenie sprawności kolumny. Rozdział mieszaniny prowadzi się przy zwiększonym liniowym przepływie fazy ruchomej, co w połączeniu z bardziej upakowanym złożem powoduje zwiększenie ciśnienia. Całkowity przepływ fazy ruchomej często jest jednak mniejszy ze względu na dużo mniejszą średnicę kolumny i krótszy czas analizy.

Kilka obrazków

Chromatograf cieczowy z detekcją typu DIOR

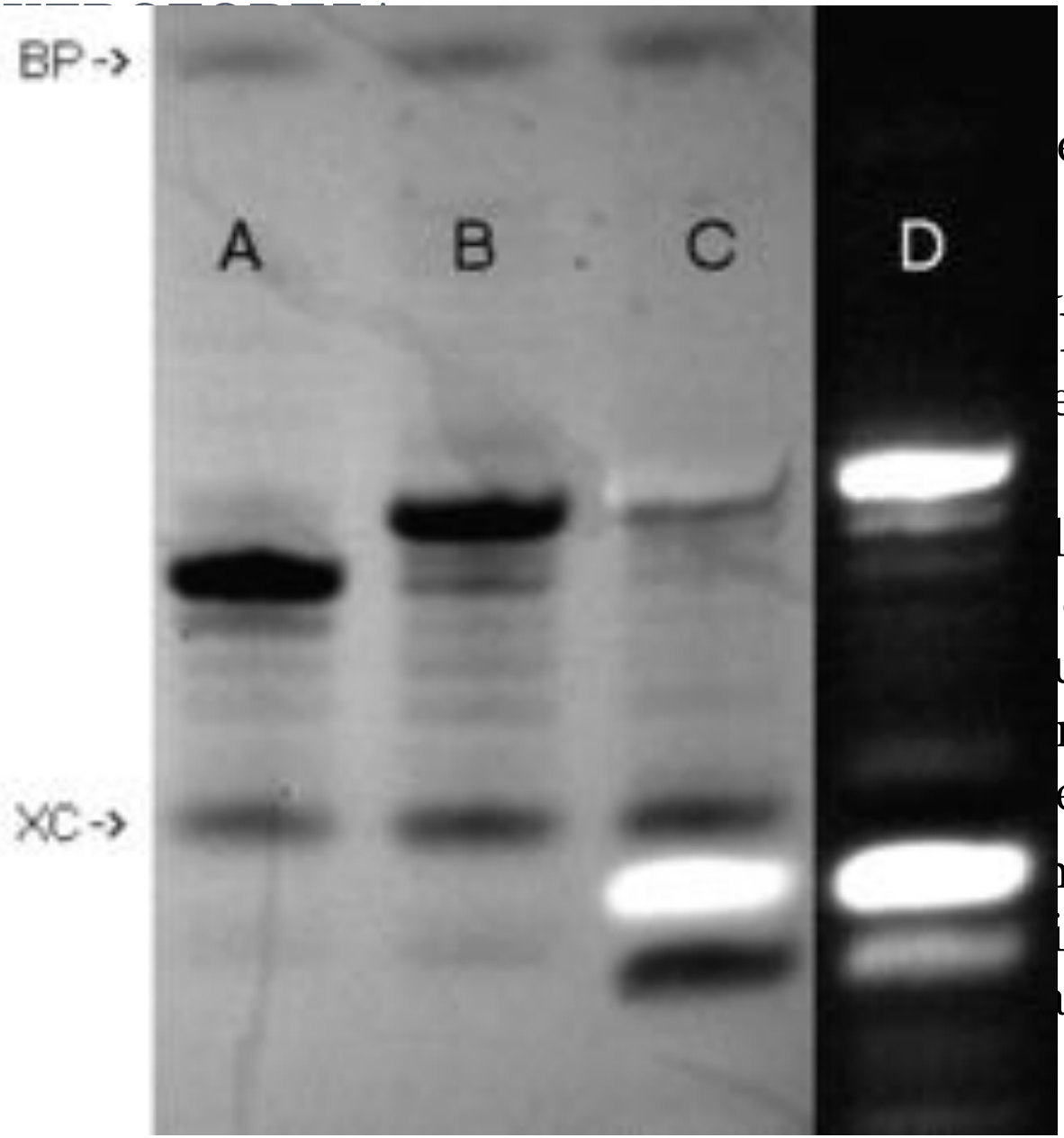
Chromatograf cieczowy preparatywny

Chromatograf cieczowy z detekcją masową



Ele

- **El** ej
  pre
  mc jest
  roz h na
  mc e
  wę
- Cz le
  ruc est w
  prz u
  ele nalny
  do eczki.
- Ist ności od
  ośr ić
  mc rzałą i
  pra



Elektroforeza żelowa

Elektroforeza kapilarna

- Elektroforeza kapilarna (*CE*, od ang. ***C**apillary **E**lectrophoresis*), zwana też elektroforezą w wolnym buforze służy najczęściej do rozdziału niewielkich cząsteczek (podobnie jak HPLC). Metoda ta jest często stosowana w biologii molekularnej do analizy DNA, znacznie rzadziej do rozdziału peptydów. Rozdział mieszanin prowadzony jest w cienkiej i długiej kapilarze kwarcowej, przypominającej z wyglądu światłowód. Kapilara ta wypełniana jest buforem.
- Próbka wprowadzana jest do wlotu kapilary, po czym jest do niej przykładane wysokie napięcie elektryczne. U wylotu kapilary zamontowany jest detektor, który rejestruje wychodzenie z rurki kolejnych związków chemicznych. Bufor płynie przez kapilarę ze stałą szybkością w stronę jednej z elektrod. Dla układu wodnego jest to zwykle katoda.
- Technika ta umożliwia rozdzielanie anionów i kationów soli organicznych i nieorganicznych.
- Odmianą elektroforezy kapilarnej jest *micelarna chromatografia elektrokinetyczna* (MEKC). W tej technice w buforze rozdziałowym znajduje się rozpuszczony detergent jonowy w takim stężeniu, aby tworzyć trwałą emulsję. Emulsja ta składa się z miceli, które są hydrofobowe wewnątrz i naładowane elektrycznie na swojej powierzchni. Micele te dzięki swemu ładunkowi poruszają się z inną prędkością niż reszta buforu, a w ich wnętrzach zamknięte są cząsteczki związków chemicznych tworzących analizowaną mieszaninę. Pozwala to rozdzielać związki chemiczne, które nie przyjmują ładunku elektrycznego nawet po przyłożeniu dużego napięcia. Metoda ta umożliwia rozdział i analizę niemal wszystkich związków chemicznych rozpuszczalnych w wodzie.