

# CZEŚĆ III

## METODY ROZDZIELCZE

*Współczesne metody chromatograficzne*

### 3. Chromatografia cieczowa

# CHROMATOGRAFIA CIECZOWA

## WYSOKOCIŚNIENIOWA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA HPLC

(ang. High-Performance Liquid Chromatography),

- Najstarsza z metod chromatograficznych - klasyczna kolumnowa chromatografia cieczowa, przeżywa obecnie swój renesans dzięki nowym rozwiązaniom, skracającym czas analizy i podwyższającym rozdzielczość metody.
- Niezwykle skuteczna metoda rozdziału, jaką jest chromatografia gazowa, ma ograniczone możliwości zastosowań, gdyż **nie można nią rozdzielać związków wrażliwych na działanie temperatury**, tzn. ulegających rozkładowi podczas przeprowadzania w stan pary.

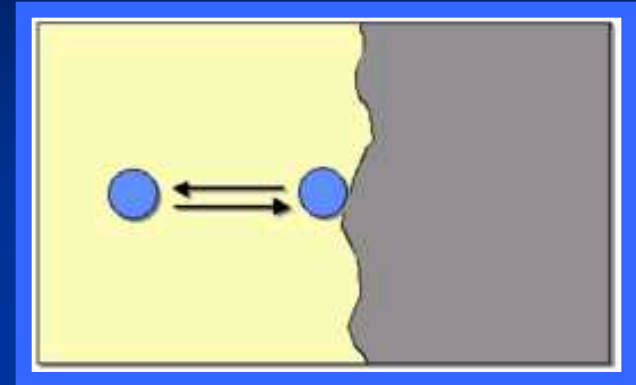
**Za pomocą chromatografii gazowej można analizować tylko ok. 20% znanych obecnie związków organicznych.**

- Nowoczesna chromatografia cieczowa, o dużej zdolności rozdzielczej, służy do rozdzielania zarówno związków lotnych o małej masie molowej, jak i polimerów, a więc stanowi doskonałe uzupełnienie chromatografii gazowej. Można ją stosować w analizie aminokwasów, białek, polimerów syntetycznych i naturalnych, kwasy nukleinowych, sterydów, lipidów, węglowodorów, witamin, alkaloidów i wielu innych związków nielotnych.

## Rodzaje chromatografii cieczowej

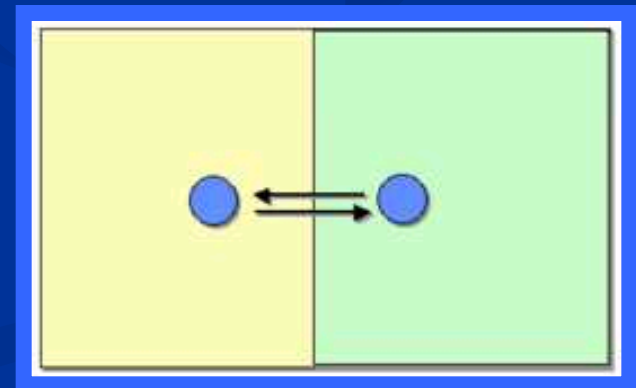
**chromatografia adsorpcyjna**  
(adsorpcja fizyczna lub chemiczna)  
kryterium rozdziału powinowactwo adsorpcyjne

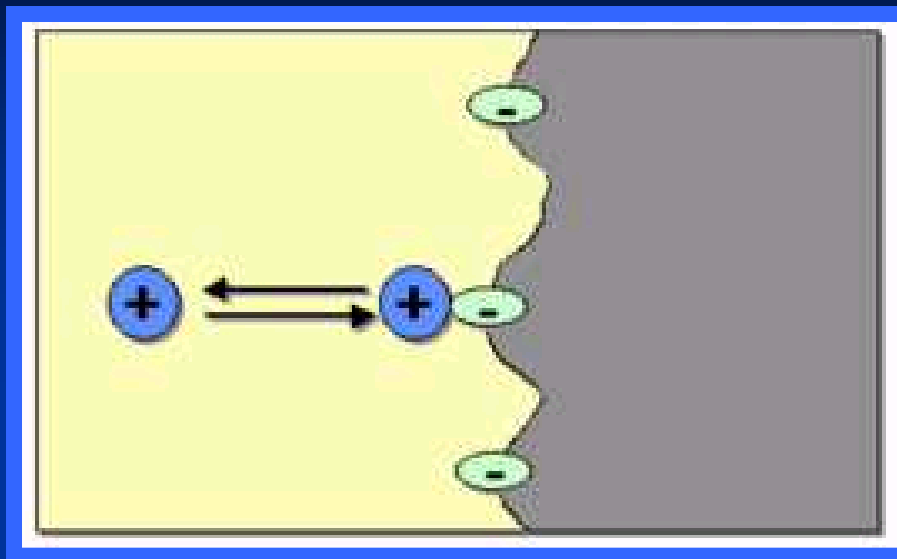
Na adsorbencie dochodzi do fizycznej adsorpcji składników. Te które silniej oddziałują z adsorbentem są eluowane później.



**chromatografia podziałowa**  
(współczynnik podziału)  
kryterium rozdziału rozpuszczalność

Rozdzielane substancje są rozpuszczane w fazie stacjonarnej i fazie ruchomej. Im większa rozpuszczalność w ciekłej fazie stacjonarnej tym większy czas retencji.





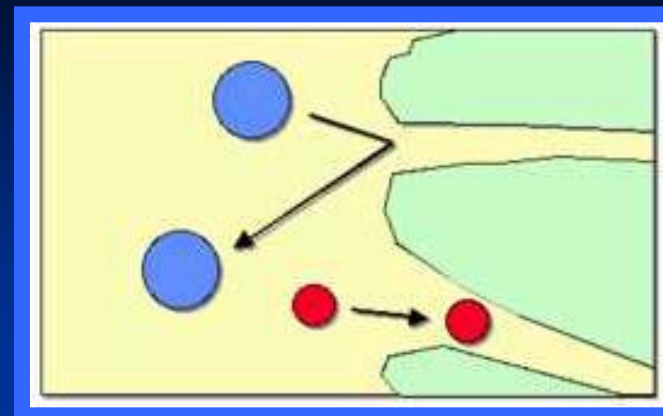
## chromatografia jonowymienna kryterium rozdziału reakcje jonitowe

powierzchnia fazy stacjonarnej jest naładowana za pomocą jonów o przeciwnym znaku w stosunku do jonów fazy ruchomej. Stąd ograniczenie tej metody do substancji jonowych lub bardzo polarnych. Im większy ładunek na analizowanej próbce tym silniejsze oddziaływanie z powierzchnią sorbenta, a co za tym idzie dłuższy czas elucji. Fazę ruchomą stanowi wodny roztwór bufora. Wartość pH lub siły jonowa jest podstawa kontroli czasu elucji, a zatem separacji.

## Chromatografia żelowa, sączenie molekularne, sita molekularne

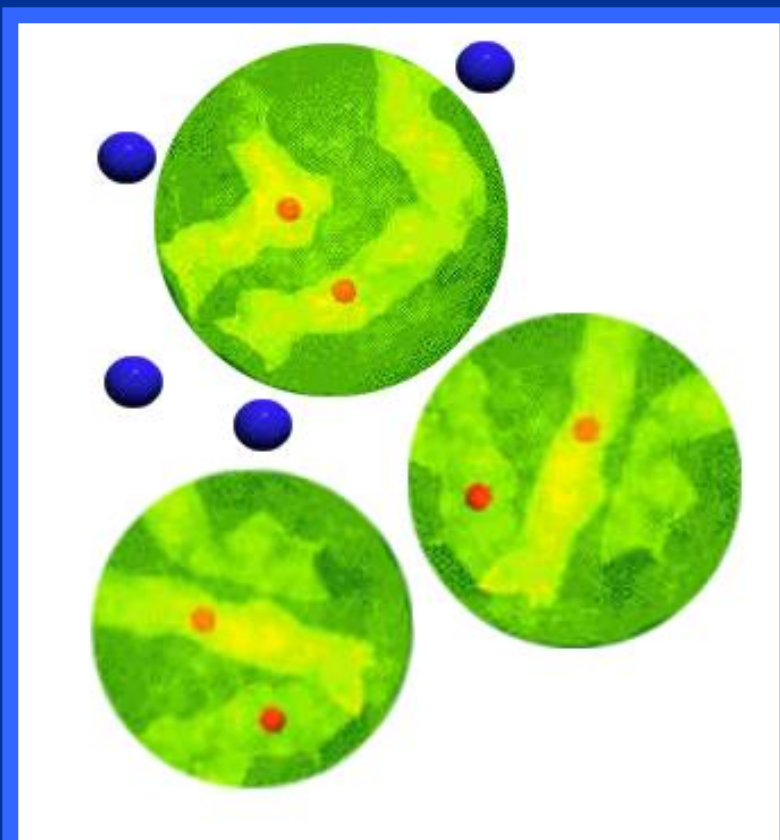
- size exclusion chromatography

*rozdział dokonywany jest w oparciu o rozmiary molekuł*



Ze względów historycznych metoda ta nosi czasem nazwę filtracja żelowa mimo, że faza stacjonarna nie jest żelem.

kolumna jest wypełniona materiałem o kontrolowanych rozmiarach porów. Kryterium rozdzielania jest wielkość (średnica) molekuł. Częsteczki próbki o małych rozmiarach migrują przez złożę znacznie dłużej, gdyż mogą penetrować pory. Większe cząsteczki są bardzo szybko wmywane przez eluent.



## Chromatografia normalnej fazy

faza stacjonarna jest zazwyczaj bardzo polarna (np. żel krzemionkowy), a faza mobilna jest niepolarna (np. n-heksan, tetrahydrofuran). Rozdzielane substancje im bardziej są polarne tym silniej oddziałują z polarnym nośnikiem.

## Chromatografia odwróconej fazy

faza stacjonarna jest zazwyczaj niepolarna, hydrofobowa, a faza mobilna jest polarna (np. mieszanina wody i metanolu). Rozdzielane substancje im mniej są polarne tym silniej oddziałują z niepolarnym nośnikiem.

## Polarność eluentu

Polarność eluentu odgrywa kluczową rolę we wszystkich rodzajach HPLC. Istnieją dwa typy kontroli polarności w trakcie procesu elucji:

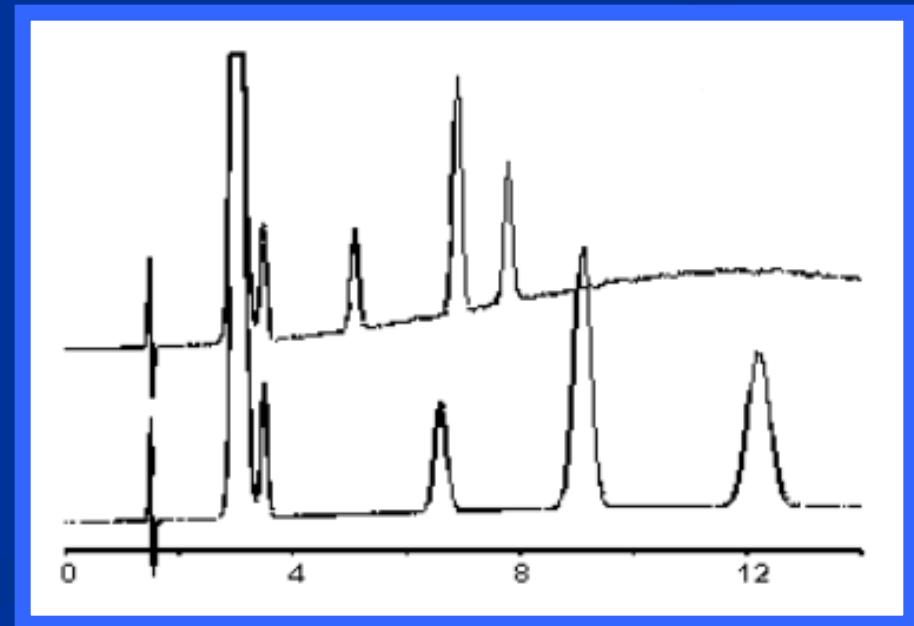
### Elucja izokratyczna

eluent o stałym składzie jest pompowany w trakcie całego procesu rozdzielczego

### Elucja gradientowa

w trakcie procesu rozdzielczego pompowany jest eluent o zmiennym składzie (rosnące stężenie lub siła jonowa)

gradientowa elucja od 30% do 65% zawartości acetonitrylu



## Mechanizm retencji

W ogólności rozdział w HPLC jest dynamicznym zestawem procesów adsorpcji/desorpcji. Cząsteczki oznaczanej substancji migrują przez porowaty materiał i oddziałują z centrami adsorpcyjnymi.

W zależności od typu chromatografii dominujące są następujące typy oddziaływań:

- hydrofobowe (niespecyficzne) – dyspersyjne oddziaływania van der Waalsa, typowe dla mechanizmu odwróconej fazy
- dipolowe (polarne) - typowe dla mechanizmu normalnej fazy
- jonowe - typowe dla mechanizmu jonowymiennego

Cząsteczki oznaczanej substancji współzawodniczą z eluentem o miejsca adsorpcyjne:

**im silniejsze oddziaływania oznaczanej substancji  
tym dłuższy czas elucji**



## Sprawność rozdziału chromatograficznego

### Selektywność

Rozdział substancji w kolumnie chromatograficznej następuje na skutek zróżnicowanej prędkości migracji rozdzielanych cząsteczek. Prędkość ta zależy od właściwości fazy stacjonarnej i fazy ruchomej. Ważną zaletą cieczy jako fazy ruchomej jest możliwość dobrania jej selektywności w sposób umożliwiający rozdział skomplikowanych mieszanin. Miarą selektywności fazy ruchomej jest retencja względna dwóch substancji A i B, zwana także *współczynnikiem selektywności  $\alpha$*

$$\alpha = \frac{t_{R_B} - t_M}{t_{R_A} - t_M} = \frac{k'_B}{k'_A}$$

## Zdolność rozdzielcza

Gdyby piki miały kształt trójkątów równoramiennych, do całkowitego rozdzielenia na linii podstawowej wystarczyłaby wartość  $R=1$ . Ponieważ w rzeczywistości piki mają kształt Gaussa, do uzyskania całkowitego rozdzielenia konieczna jest zdolność rozdzielcza  $R=1,5$ . W analizach jakościowych za najmniejszą wartość wystarczającą do identyfikacji piku przyjęto  $R=0,8$ .

$$R = \frac{\Delta t_R}{W}$$

## Liczba pólek teoretycznych

Miarą sprawności danego układu chromatograficznego jest liczba pólek teoretycznych  $N$

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$$

$t_R$ - czas retencji,  $W$ - szerokość piku, mierzona przy podstawie i wyrażona w jednostkach czasu.

## Wysokość półki teoretycznej

Użytecznym parametrem przy określaniu sprawności kolumn jest *wysokość równoważna półce teoretycznej* (WRPT), nazywana także wysokością półki (H):

Od wysokości półki zależy szerokość piku.

Wszystkie czynniki wpływające na poszerzenie pasma chromatograficznego obniżają sprawność kolumny.

$$H = \frac{L}{N}$$

gdzie:

L- to długość półki.

## Czynnikami wpływającymi na wysokość półki są:

dyfuzja podłużna ( $H_L$ ),

przenoszenie masy w fazie stacjonarnej ( $H_S$ ),

przenoszenie masy w stającej fazie ruchomej ( $H_{SM}$ ),

przenoszenie masy w poruszającej się fazie ruchomej ( $H_M$ ) -

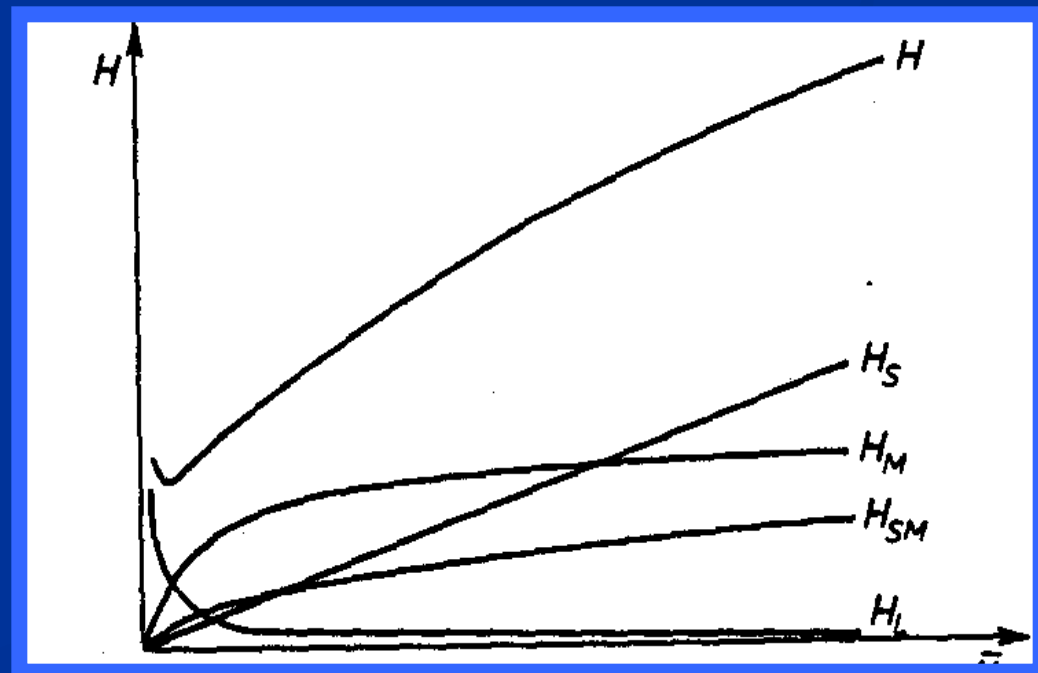
przenoszenie masy w poruszającej się fazie ruchomej ( $H_M$ ) składa się z udziałów pochodzących z dyfuzji wirowej ( $H_F$ ) i dyfuzji poprzecznej ( $H_D$ ).

$$H = H_L + H_S + H_{SM} + H_M$$

Na zdolność rozdzielczą kolumny można wpływać w dwojaki sposób:

- zmieniając właściwości termodynamiczne układu (np. zmieniając skład rozpuszczalnika),
- zmieniając wielkości charakteryzujące sprawność kolumny, takie jak: prędkość przepływu fazy ruchomej, wielkość ziaren fazy stacjonarnej czy lepkość rozpuszczalnika.

Wpływ poszczególnych składników na całkowitą wysokość półki teoretycznej w chromatografii cieczerwowej



## LICZBA PÓŁEK TEORETYCZNYCH KONIECZNA DO ROZDZIAŁU DWÓCH PIKÓW O KSZTAŁCIE KRZYWYCH GAUSSA JAKO FUNKCJA SELEKTYWNOŚCI KOLUMNY

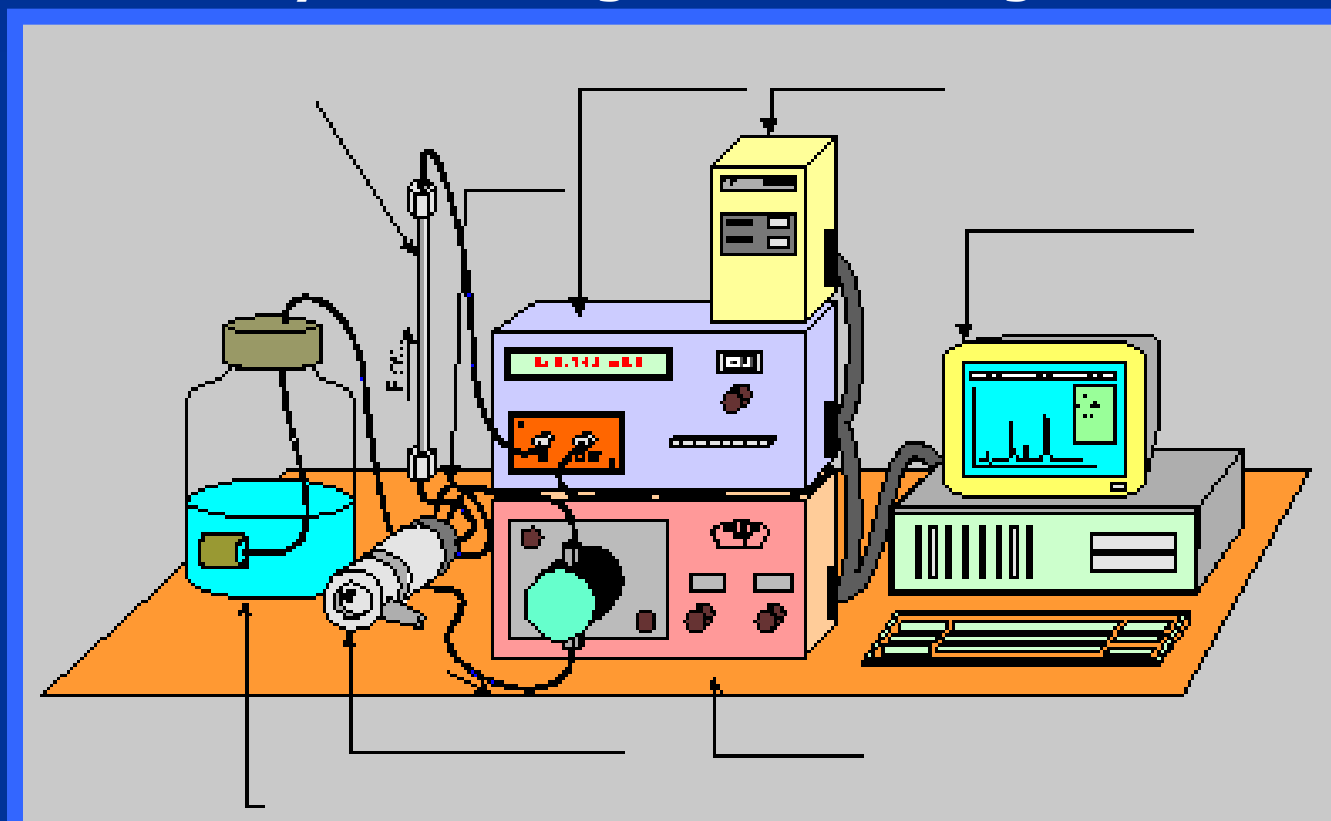
Selektywność	Liczba półek teoretycznych N
1,005	1.450.000
1,01	367.000
1,02	94.000
1,05	16.000
1,10	4.400
1,25	900
1,50	320
2,00	145

W przypadku zastosowania fazy ruchomej o dużej selektywności można uzyskać dobre efekty rozdziału przy średnich, a nawet niskich sprawnościach kolumn. Natomiast przy małych wartościach  $\alpha$  (np. 1,01) wymagana sprawność kolumn jest praktycznie nieosiągalna. W takich przypadkach, aby podwyższyć selektywność układu, należy zmienić fazę ruchomą.

## APARATURA

Chromatografy cieczowe o dużej zdolności rozdzielczej są urządzeniami drogimi i bardziej skomplikowanymi w porównaniu z chromatografami gazowymi. Jest to spowodowane tym, że rozdział prowadzi się pod wysokim ciśnieniem oraz tym, że fazą ruchomą jest ciecz, którą należy wprowadzać na kolumnę w sposób równomierny.

### Schemat blokowy chromatografu cieczowego

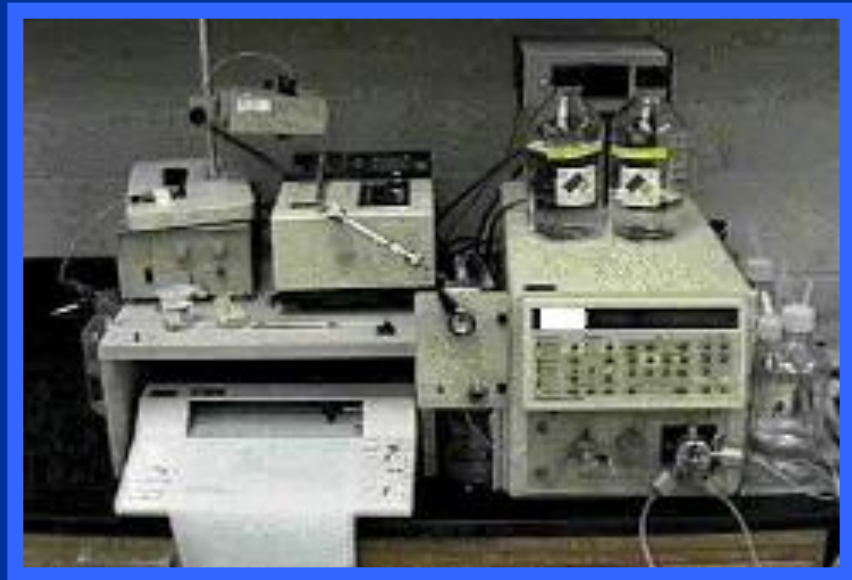


## Schemat chromatografu



**1. Zbiornik cieczy** (fazy ruchomej).

**2. Pompa** służąca do przetłaczania fazy ruchomej przez kolumnę. Szybka chromatografia cieczowa o dużej zdolności rozdzielczej wymaga stosowania ciśnień do 34 Mpa. Ponadto powinny one zapewniać stałość przepływu fazy ruchomej (maksymalne odchylenie 2%) bez pulsacji oraz możliwość regulacji prędkości przepływu w granicach 1-10 ml/min.



## 3. Urządzenie do wprowadzenia próbki.

Konstrukcja tego urządzenia ma duże znaczenie i jest trudnym do rozwiązania problemem. Istnieją dwa podstawowe urządzenia: otwory wlotowe i zawory do wprowadzenia próbek. Otwory wlotowe do wstrzykiwania próbek można podzielić na takie, które umożliwiają wprowadzenie próbki bezpośrednio do wypełnienia kolumny, oraz takie, w których próbka jest „zmiotana” na kolumnę przez fazę ruchomą. Próbkę podaje się przez przeponę za pomocą strzykawki. Zawory do wprowadzania próbek wykorzystuje się przy pracy pod ciśnieniem wyższym od 10 Mpa.



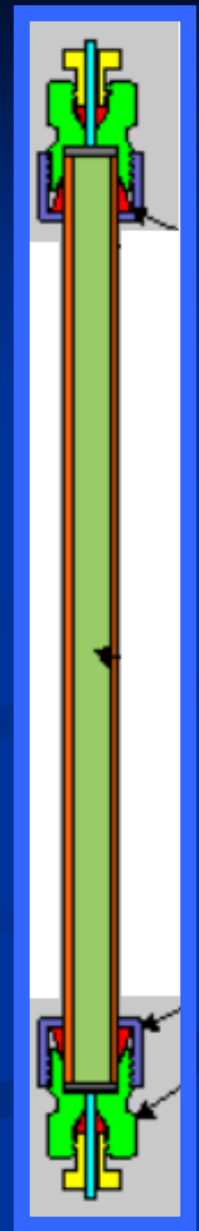


## 4. Kolumna.

Kolumna jest najważniejszą częścią chromatografu.

W wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej kolumny muszą być wykonane z materiału wykazującego dużą wytrzymałość na wysokie ciśnienie, a także posiadać konstrukcję zapewniającą szczelność układu. Kolumny dla HPLC są najczęściej prostymi rurkami o długości 10-100 cm i średnicy 0,1-2 cm. Większą sprawnością charakteryzują się kolumny o mniejszej średnicy. Kolumny chromatograficzne wykonuje się najczęściej ze szkła lub stali kwasoodpornej, pokrytej od wewnątrz teflonem.

W chromatografii cieczowej dużą rolę odgrywa sposób wypełnienia kolumny.



## 5. Detektor

Dobry detektor chromatograficzny powinien w sposób ciągły dostarczać informacji o składzie wycieku wypływającego z kolumny. W klasycznej chromatografii cieczowej metody detekcji polegały na zbieraniu odrębnych frakcji wycieku i analizowaniu ich metodami konwencjonalnymi. W wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej stosuje się detektory o działaniu ciągłym, charakteryzujące się dużą czułością i małą objętością komórki pomiarowej. W chromatografii gazowej, ze względu na zasadnicze różnice właściwości gazu nośnego i substancji rozpuszczonej, udało się opracować bardzo czułe detektory uniwersalne. W chromatografii cieczowej fazy ruchome i substancje rozdzielane mają bardzo podobne właściwości, dlatego też trudno tutaj znaleźć rozwiązania uniwersalne, daleko łatwiej analizować różne substancje, należy mieć kilka różnych detektorów.

Najczęściej w metodzie chromatografii cieczowej wykorzystuje się;

- ✓ detektor absorpcji w nadfiolecie,
- ✓ refraktometr różnicowy,
- ✓ detektor adsorpcyjny mikrokalorymetryczny,
- ✓ detektor fluorometryczny,
- ✓ detektor polarograficzny,
- ✓ detektor konduktometryczny.

**Detektor adsorpcji w nadfiolecie** jest spektrofotometrem UV o konstrukcji dostosowanej do pomiaru adsorbancji w układach przepływowych. Stosuje się detektory przepływowe, w których długość drogi optycznej wynosi 1 cm, a objętość naczynka pomiarowego 10  $\mu\text{l}$ .

**Refraktometr różnicowy.** Zasada działania tego detektora polega na pomiarze różnicy między wartościami współczynników załamania światła, eluatu z kolumny i czystego rozpuszczalnika. Zasadniczą trudność stanowi konieczność starannej regulacji temperatury próbki i układu optycznego. Objętość komórki pomiarowej jest rzędu 7  $\mu\text{l}$ .

**Detektor adsorpcyjny mikrokalorymetryczny** jest detektorem wykorzystującym pomiar ciepła adsorpcji. Zasada pracy tego detektora opiera się na pomiarze zmiany temperatury, towarzyszącej adsorpcji i desorpcji substancji rozpuszczonych w fazie ruchomej. Pomiarów dokonuje się za pomocą termistorów, z których jeden jest umieszczony w kolumnie z adsorbentem (czujnik), a drugi w specjalnej komorze odniesienia. Urządzenie takie pozwala mierzyć różnice temperatur rzędu  $10^{-4}^{\circ}\text{C}$ .

## PARAMETRY NIEKTÓRYCH DETEKTORÓW STOSOWANYCH W WYSOKOCIŚNIENIOWEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

Detektor	Rodzaj detektora	Czułość oznaczenia	Objętość komórki pomiarowej, $\mu\text{l}$	Wrażliwość na zmiany temperatury
• Absorpcja UV	selektywny	$4 \cdot 10^{-9} \text{g/ml}$	10	nieznaczna $10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}$
• Refraktometryczny	uniwersalny	$7 \cdot 10^{-7} \text{g/ml}$	7	
• Adsorpcyjny (mikrokalorymetr)	uniwersalny	$10^{-9} \text{g/s}$	9	$5 \cdot 10^{-5} \text{ } ^\circ\text{C}$
• Polarograficzny	selektywny	$10^{-9} \text{g/s}$	10	$1,5\% / ^\circ\text{C}$
• Fluorymetryczny	selektywny	$10^{-9} \text{g/s}$	10	-

## Wypełnienia kolumn w HPLC.

### Fazy stacjonarne (adsorbenty)

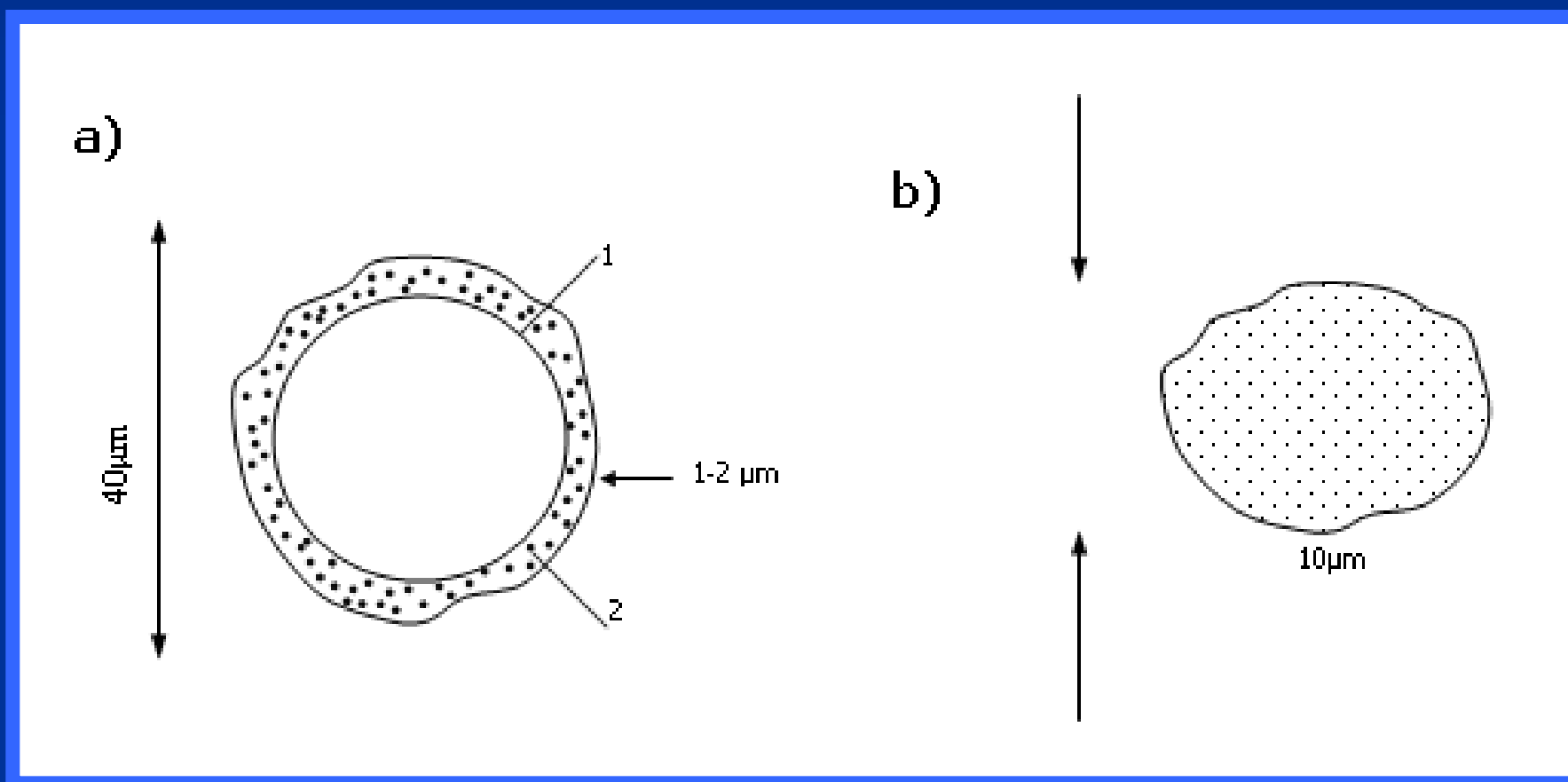
Rozdział w HPLC opera się o oddziaływanie powierzchniowe, które silnie zależą o natury chemicznej centrów adopcyjnych. Nowoczesne adsorbenty stosowane w HPLC są małymi cząstkami o bardzo rozwiniętej powierzchni, charakteryzującymi się następującymi parametrami:

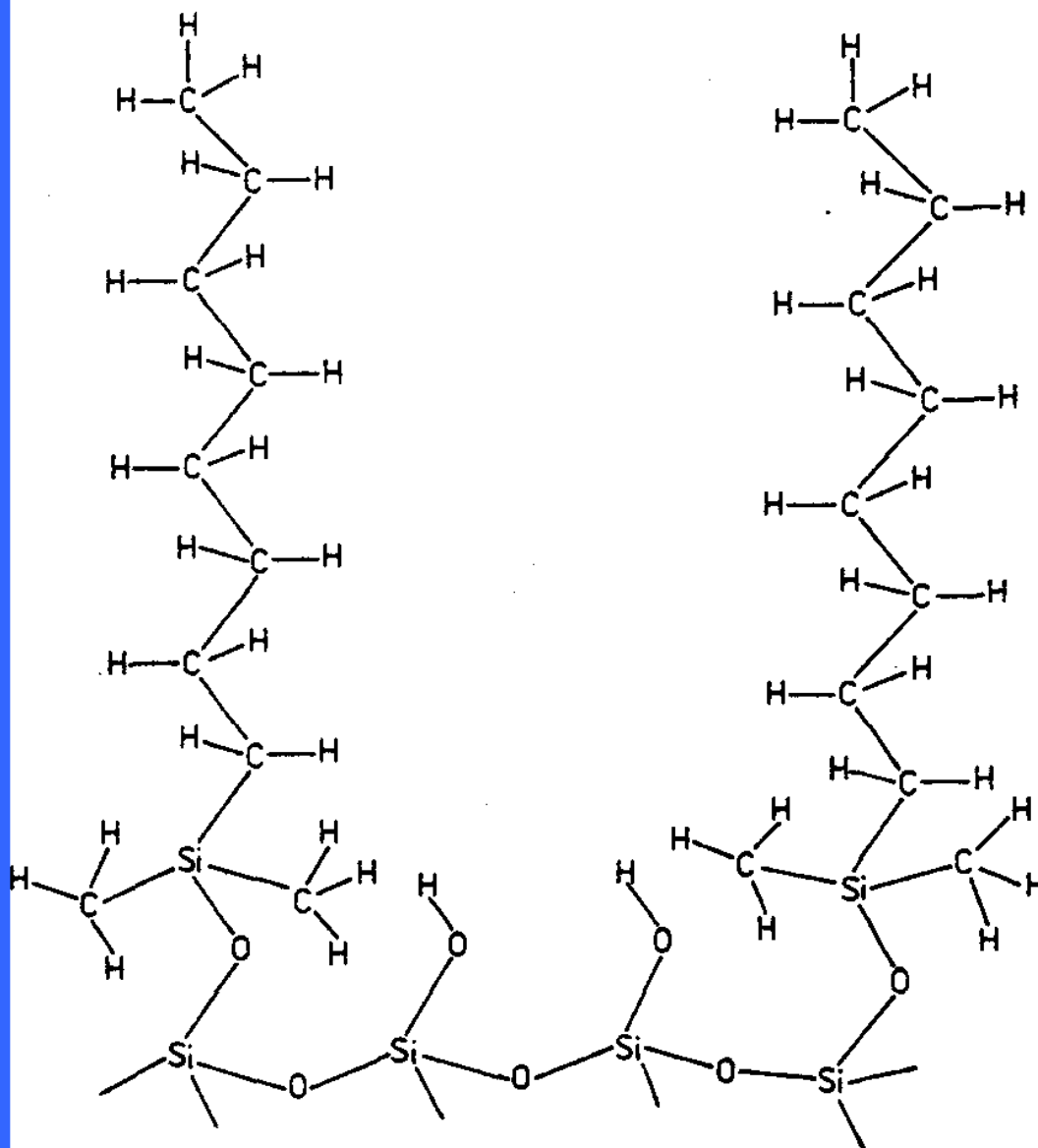
- Rozmiar cząstek 3 to 10  $\mu\text{m}$
- Rozbieżność pomiędzy rozmiarami cząstek zazwyczaj bardzo mała, mieszcząca się na ogół w granicach 10% wartości średniej
- Rozmiary porów: 70 to 300  $\text{\AA}$ ;
- Powierzchnia: 50 to 250  $\text{m}^2/\text{g}$
- Gęstość wiązania – liczba centrów adsorpcyjnych na jednostkę powierzchni: 1 to 5 per 1  $\text{nm}^2$
- Rodzaje centrów aktywnych – normalna faza: (-OH, -NH<sub>2</sub>), odwrócona faza (C8, C18, fenyl), jonity (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), (-COO<sup>-</sup>)

Wypełnienia kolumn stosowane w klasycznej chromatografii ciekowej są nieprzydatne w szybkiej chromatografii o dużej zdolności rozdzielczej. W HPLC stosuje się praktycznie dwa typy wypełnień: wypełnienia powierzchniowo porowate i wypełnienia mikroporowate w całej masie (o małej średnicy ziaren).

## *Schemat przekroju ziarna nośnika:*

- a) ziarno z powierzchniową warstwą adsorpcyjną  
(1- nieprzenikliwy rdzeń, 2- powierzchniowa warstwa adsorpcyjna),
- b) ziarno porowate w całej masie.



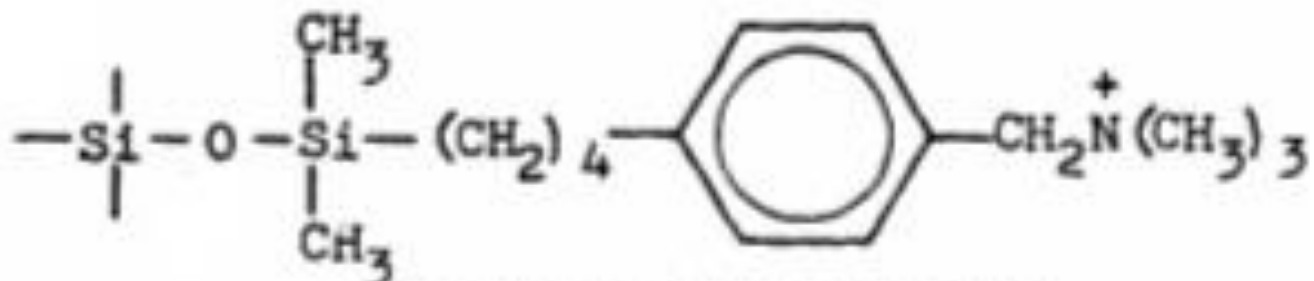


Schemat żelu krzemionkowego z chemicznie związaną grupą n-oktylodimetylosilanową. Z powierzchnią krzemionki związane są długie łańcuchy alkilowe.

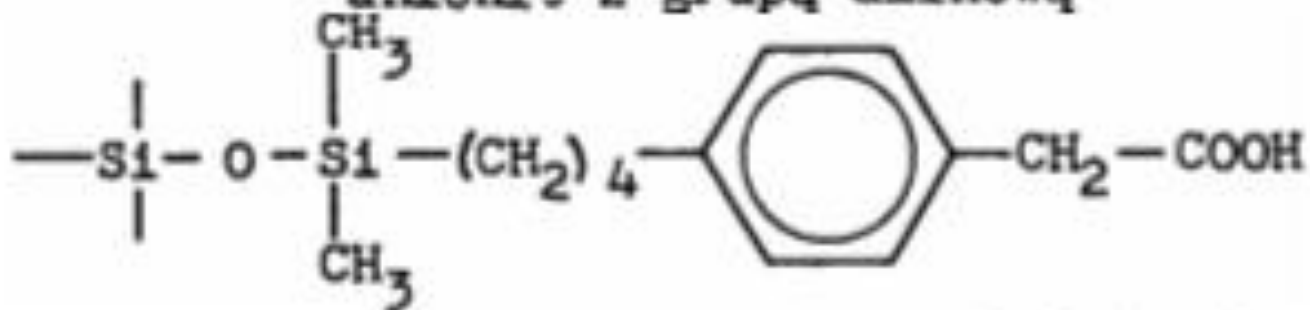
## Wymieniacze jonowe dla HPLC.

- Wymieniacze jonowe (jonity) są to nierozpuszczalne substancje wielkocząsteczkowe o budowie jonowej, zdolne do wymiany jonów, związanych z jonitem, na jony obecne w roztworze.
- W konwencjonalnej chromatografii jonitowej podstawową grupę wymieniaczy jonowych stanowią żywice jonowymienne. Każda żywica jonowymienna składa się z nierozpuszczalnego szkieletu (matrycy), z którym związane są grupy funkcyjne, zdolne do wymiany kationów (kationity) lub anionów (anionity).
- W żywicach jonowymiennych matrycę może stanowić kopolimer styrenu z diwinylobenzenem. Na bazie tego kopolimeru produkuje się kationity z takimi grupami funkcyjnymi, jak: sulfonowa  $-\text{SO}_3\text{H}$ , karboksylowa  $-\text{COOH}$ , fosfonowa  $-\text{PO}_3\text{H}_2$  i inne anionity, zawierające jako grupy funkcyjne różnego rodzaju aminy, a najczęściej czwartorzędowe sole amoniowe.

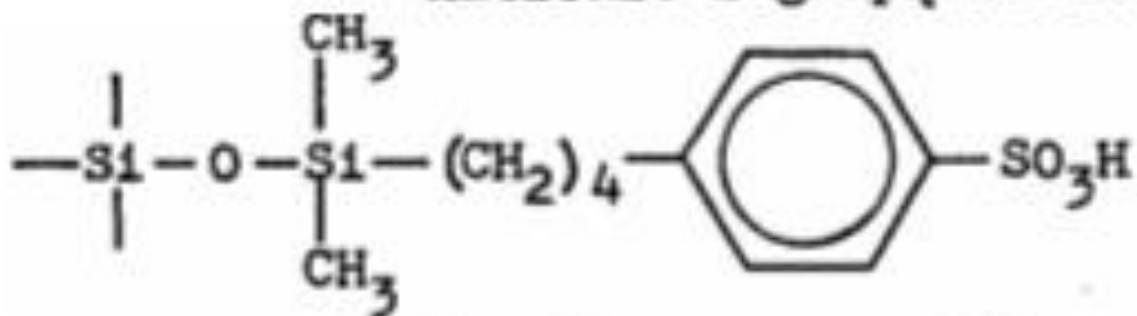




anionit z grupą aminową



kationit z grupą karboksylową



kationit z grupą sulfonową

## Wypełnienia dla chromatografii żelowej.

- Chromatografia żelowa nazywana jest także chromatografią sitową lub sączeniem molekularnym. W chromatografii żelowej o rozdziale substancji decydują wymiary rozdzielanych cząsteczek.
- Wypełnienia kolumn stanowią żele o zdefiniowanych średnicach porów, zbliżonych do rozmiarów cząsteczek analizowanych substancji. W kolumnie wypełnionej takim żelem substancje rozdzielane, o dużych rozmiarach cząsteczek, większych od średnicy porów wypełnienia, przechodzą bezpośrednio do wycieku (nie penetrują ziaren), natomiast cząsteczki o mniejszych rozmiarach wnikają w pory żeli. Im mniejsze są rozmiary cząsteczek, tym głębiej penetrują one ziarna żeli, a tym samym wolniej migrują wzdłuż kolumny. Rozdzielanie zachodzi zatem na skutek różnicy mas molowych rozdzielanych związków.

Podstawową zależność między masą molową rozdzielanych substancji a objętością retencji (elucji) przedstawia równanie

$$V_R = -B \log M + C$$

$V_R$ - objętość retencji;  $M$ - masa molowa;  $B, C$ - stałe.

➤ Wypełnienia kolumn w konwencjonalnej chromatografii żelowej są najczęściej usieciowane żele dekstranowe (sephadexy) i usieciowane żele poliakryloamidowe. Są to żele pęczniejące w wodzie i ulegające deformacji pod wpływem wysokich ciśnień. Stąd też nie można ich stosować w wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej. W HPLC jako wypełnienia kolumn stosowane są żele sztywne, do których zalicza się żele krzemionkowe o dużych średnicach porów, szkło porowate i usieciowany polistyren o strukturze porowatej.

## FAZY MOBILNE W CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ.

W HPLC typ oraz skład fazy mobilne (eluenta) jest jednym ze zmiennych parametrów, dzięki doborowi którego możliwy jest rozdział oznaczanych substancji. Do najważniejszych cech eluenta należą:

- ✓ jego czystość
- ✓ kompatybilność z detektorem
- ✓ zdolność do rozpuszczania oznaczanej próbki
- ✓ niska lepkość
- ✓ obojętność chemiczna wobec złożeń oraz oznaczanej próbki
- ✓ rozsądna cena

elenty dla normalnej fazy są zazwyczaj niepolarnymi substancjami

elenty dla odwróconej fazy są zazwyczaj mieszaniną wody i organicznego niepolarnego rozpuszczalnika (np. acetonitrylu)

- Rozdzielanie substancji za pomocą chromatografii ciekowej zależy zarówno od fazy nieruchomej jak i ruchomej, czyli kolumny i rozpuszczalnika.
- Rozpuszczalnik wybrany do przeprowadzenia danego rozdzielania nie powinien powodować żadnych nieodwracalnych zmian w kolumnie. Powinien on charakteryzować się odpowiednią zdolnością rozpuszczania próbki i nie przeszkadzać w jej odzysku (szczególnie przy rozdzielaniu jej substancji na skalę preparatywną). Poza tym rozpuszczalnik winien umożliwiać detekcję substancji rozdzielanej.
- W chromatografii ciekowej rozpuszczalnik wywiera decydujący wpływ na zdolność rozdzielczą układu. Jedną z głównych zalet chromatografii ciekowej jest to, że faza ciekła stanowi czynnik decydujący o wartości współczynnika podziału  $K$ , a tym samym współczynnika pojemnościowego  $k'$ .

## Szereg eluotropowy rozpuszczalników

Rozpuszczalnik	Moc elucyjna $\epsilon^0\text{Al}_2\text{O}_3$	Względna przenikalność elektryczna
• n- Pentan	0,00	1,84
• n- Heksan	0,01	1,88
• Cykloheksan	0,04	2,02
• Tetrachlorek węgla	0,18	2,24
• Toluen	0,29	2,38
• Benzen	0,32	2,28
• Eter dietylowy	0,38	4,33
• Chloroform	0,40	4,80
• Dichlorometan	0,42	8,93
• Tetrahydrofuren	0,45	7,58
• Dichloroetan	0,49	10,70
• Aceton	0,56	21,40
• Octan etylu	0,58	6,11
• Acetonitryl	0,65	37,50
• Pirydyna	0,71	12,40
• Etanol	0,88	25,80
• Metanol	0,95	33,60
• Woda	bardzo duża	80,40
• Kwas octowy		6,10

ułożony według ich wzrastającej mocy elucyjnej. Stosowanie dwu- i wieloskładnikowych mieszanin rozpuszczalników o różnym składzie objętościowym pozwala dowolnie regulować moc elucyjną fazy ruchomej.

## WYBÓR TECHNIKI CHROMATOGRAFICZNEJ.

Proces rozdziału metodą HPLC można prowadzić różnymi technikami. Rodzaj zastosowanej metody uzależniony jest od właściwości analizowanej substancji i przed przystąpieniem do analizy należy określić:

1. przypuszczalną masę molową analizowanej substancji (czy jest to polimer, czy też substancja o małej masie molowej);
2. rozpuszczalność badanych substancji (czy są rozpuszczalne w rozpuszczalnikach polarnych czy nie polarnych);
3. liczbę i rodzaj grup funkcyjnych w analizowanych związkach;
4. czy substancja ma charakter jonowy (czy są to kwasy, zasady czy sole).

## Zasady wyboru techniki chromatograficznej, fazy stacjonarnej i fazy ruchomej

	Metoda	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Przykłady próbek
niepolarna	LLC-RP	fazy związane C <sub>8</sub> C <sub>18</sub>	woda - metanol -acetonitryl	sterydy, węglowodory, sterydy, chloropestycydy
średnio polarna	LSC	silikażel	heksan- aceton- -nitryl	aminy, sterydy, barbiturany, alkaloidy
polarna	LLC-NP	fazy związane -CN -NO <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub>	heksan- etanol- -chloroform	alkohole, glikole, alkaloidy
kwasy	chromatografia jonowymienna	anionity	bufor wodny o pH 2-8	kwasy organiczne, nukleotydy, cukry, aminy, nieorganiczne
amfolity	chromatografia par jonowych	fazy związane C <sub>18</sub>	metanol- woda	aminokwasy
zasady	chromatografia jonowymienna	kationity	bufor wodny o pH 2-8	karbaminiany, aminy, glukozydy, kationy nieorganiczne
	chromatografia żelowa	zele	roztwory wodne aceton- tetrahydrofuran	polimery syntetyczne i naturalne



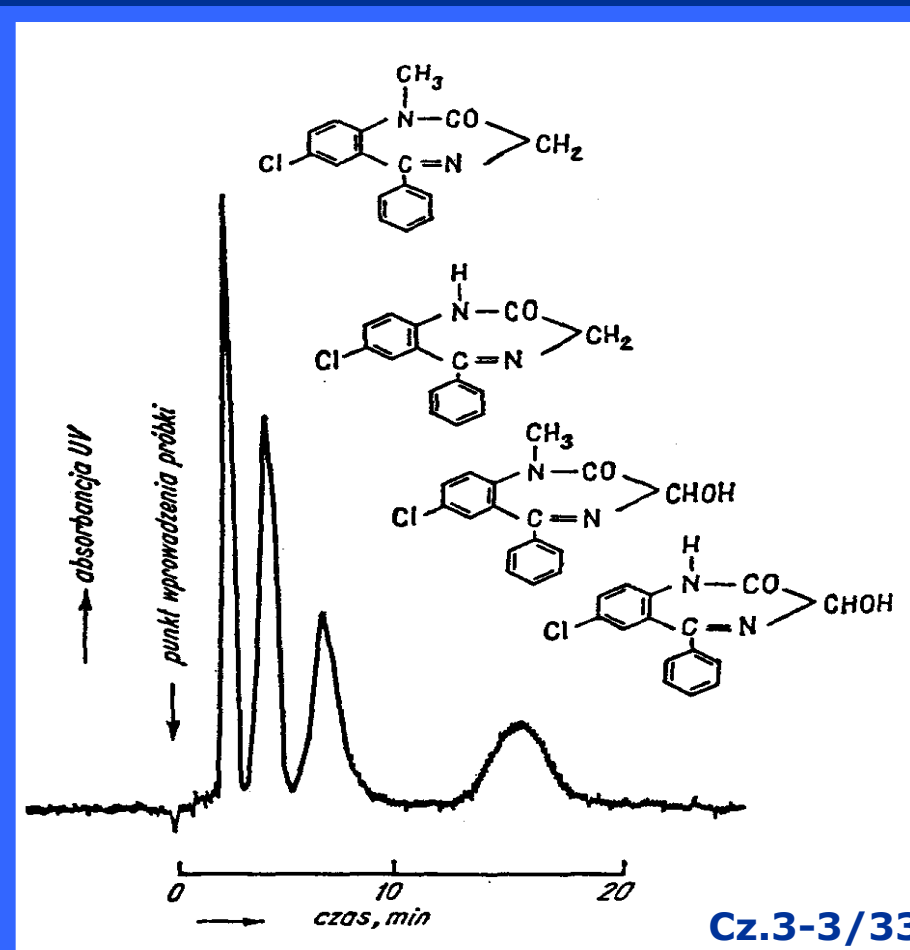
## ZASTOSOWANIE WYSOKOCIŚNIENIOWEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ.

Wysokociśnieniową chromatografię cieczową stosuje się do rozdzielania i analizy tych substancji, których nie można analizować metodą chromatografii gazowej lub których rozdzielenie tą metodą jest niemożliwe lub utrudnione.

### Przykład I.

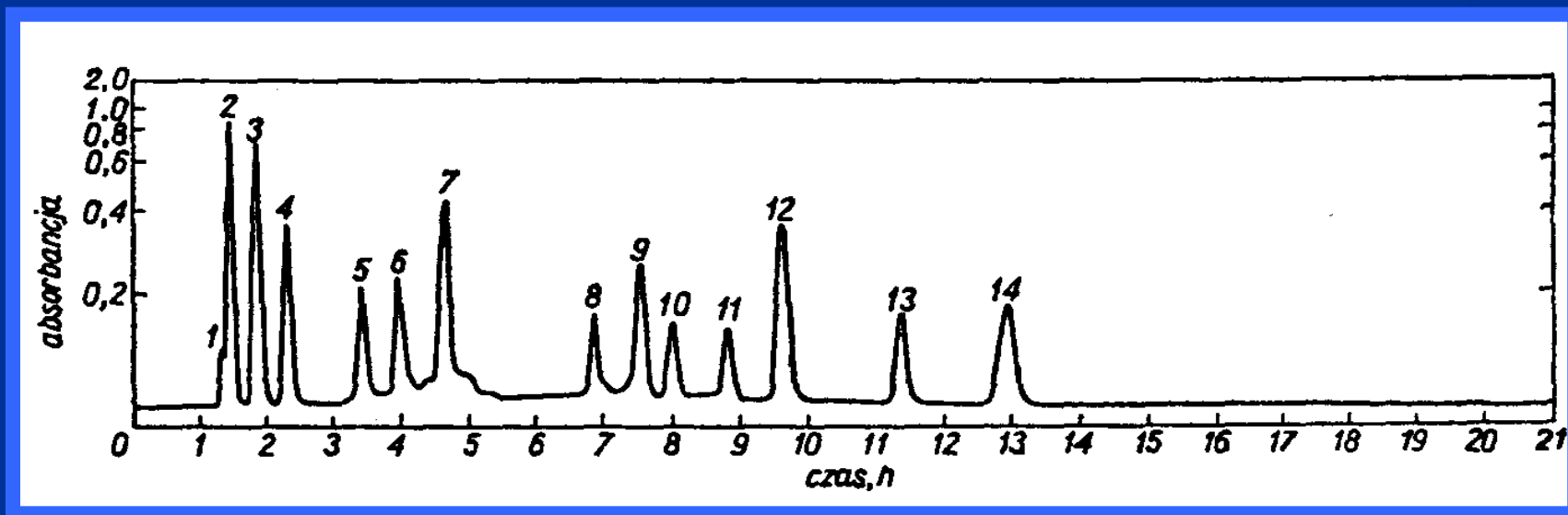
Rysunek ilustruje rozdzielanie bardzo podobnych pod względem chemicznym czterech syntetycznych benzodiazepinów.

Fazą nieruchomą jest  $\beta, \beta''$  - oksydipropionitryl związany chemicznie z porowatym szklanym rdzeniem (Durapak). Długość kolumny 100cm, średnica 1mm, średnica ziaren nośnika 36-75 $\mu$ m. Fazą ruchomą jest mieszanina heksanu i izopropanolu w stosunku 4:1. Całkowita ilość próbki 8  $\mu$ g, detektor- spektrofotometr UV.



## Przykład II

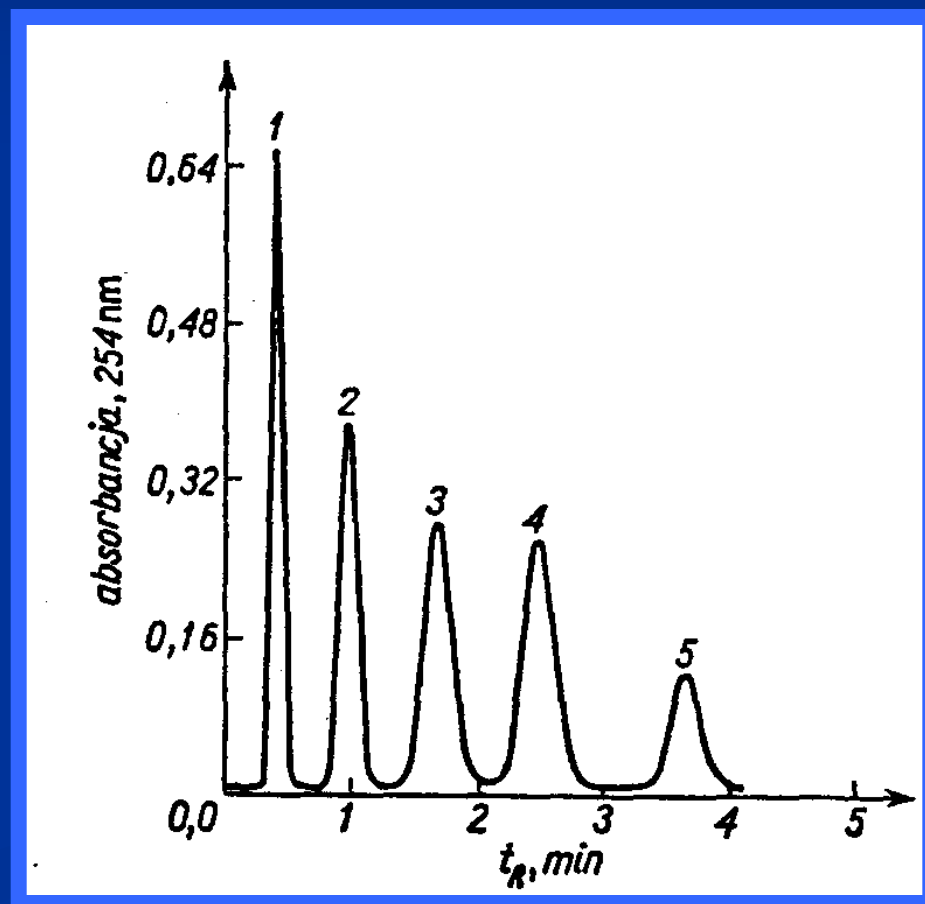
Na rysunku przedstawiono rozdzielanie 14 węglowodanów na kolumnie wypełnionej silnie zasadowym anionitem (Aminex-27) (średnica ziaren 10  $\mu\text{m}$ ). Zastosowano elucję gradientową za pomocą wodnych roztworów buforowych. Metoda ta znajduje zastosowanie do oznaczania cukrów w surowicy krwi i w moczu.



## Przykład III

Analiza składników kwasów jest jednym z trudniejszych problemów analitycznych. Dzięki chromatografii ciekowej rozwiązano problem analitycznego i preparatywnego rozdzielania nukleotydów i zasad azotowych wchodzących w skład kwasów nukleinowych. Na rysunku przedstawiono rozdzielenie 5 nukleozydów na kolumnie o długości 25cm i średnicy 0,24cm, wypełnionej silnie kwaśnym kationem o małej średnicy ziarna.

Rozdziął 5 nukleozydów na kolumnie wypełnionej silnie kwaśnym kationem: 1-urydyna, 2-inozyna, 3-guanozyna, 4-adenozyna, 5-cytodyna

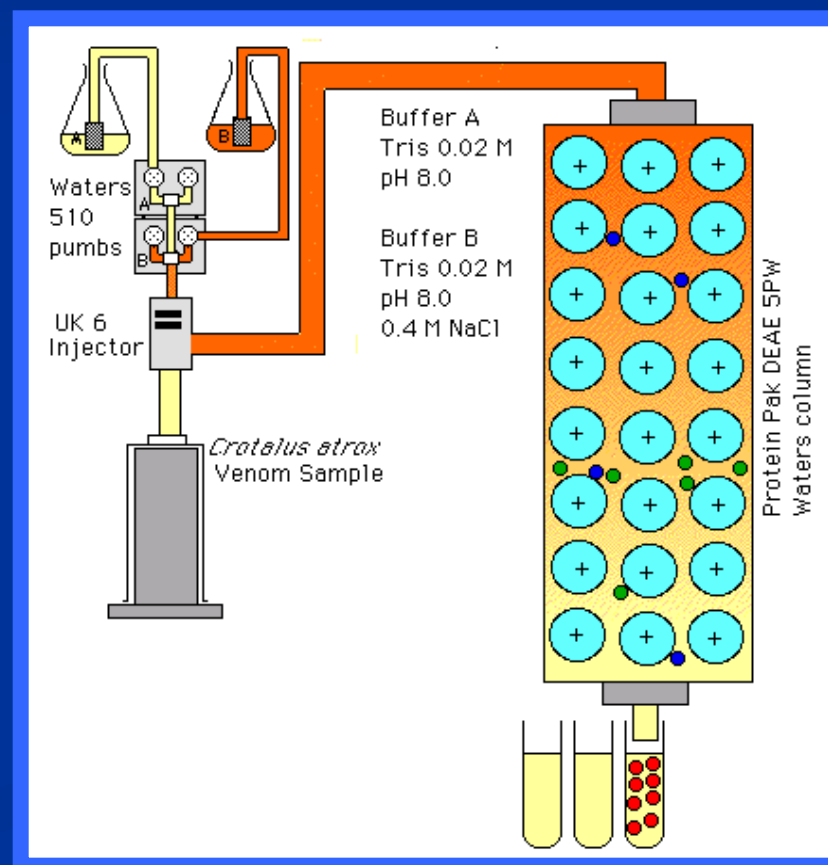
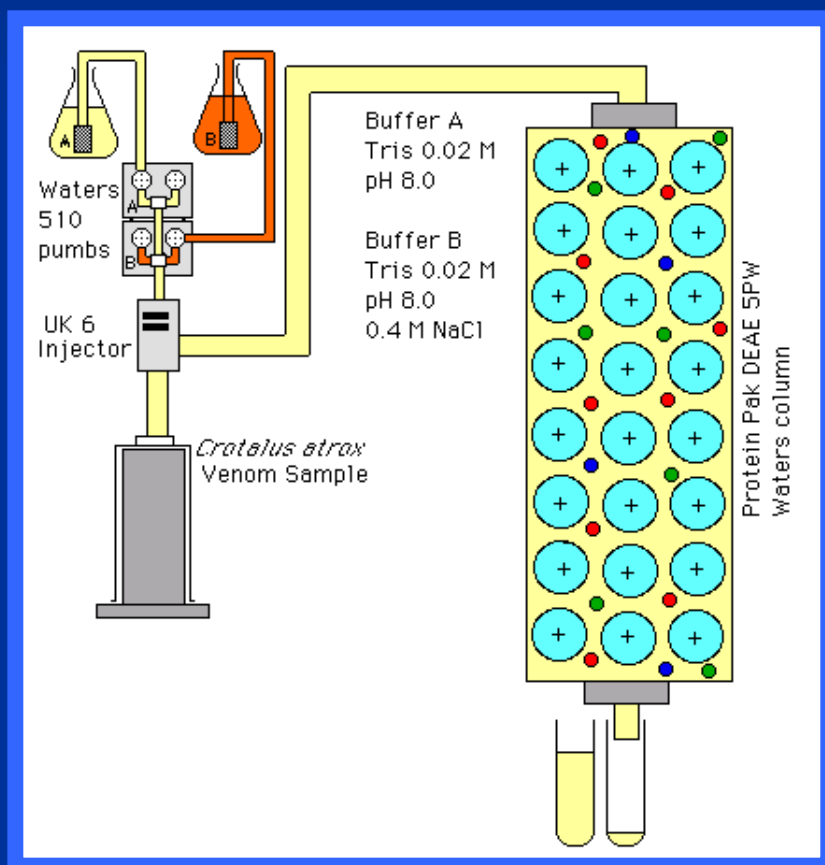


## Przykład IV

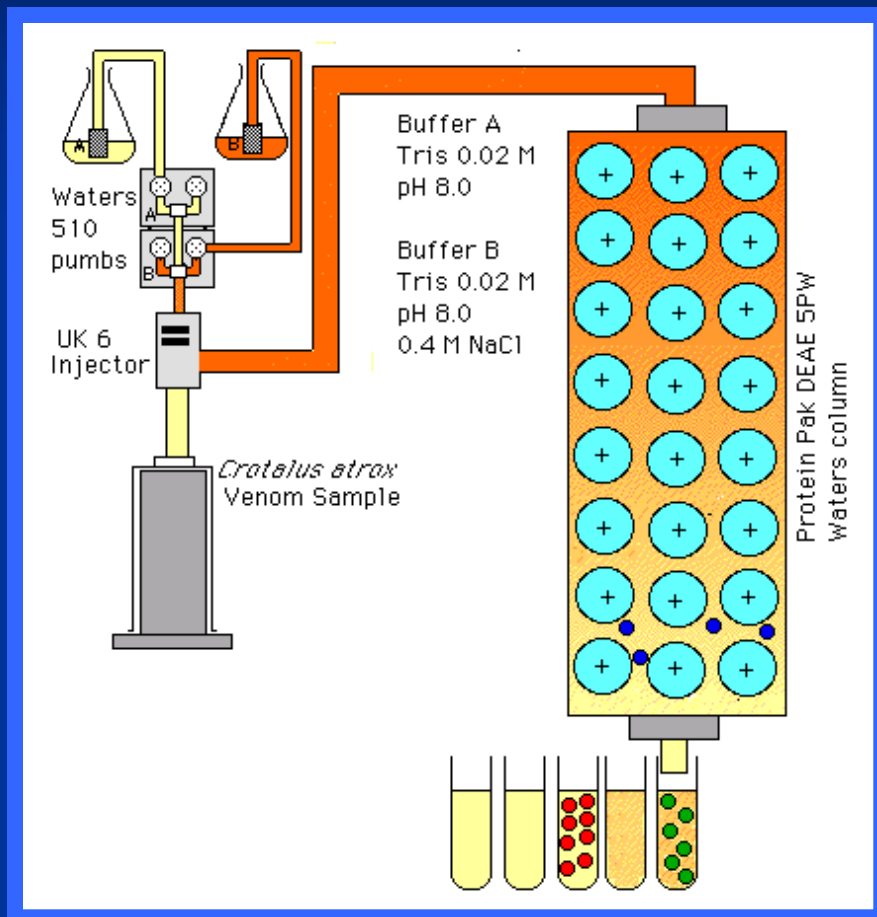
Rozdział białek metodą chromatografii żelowej

1. wprowadzenie substancji rozdzielanej

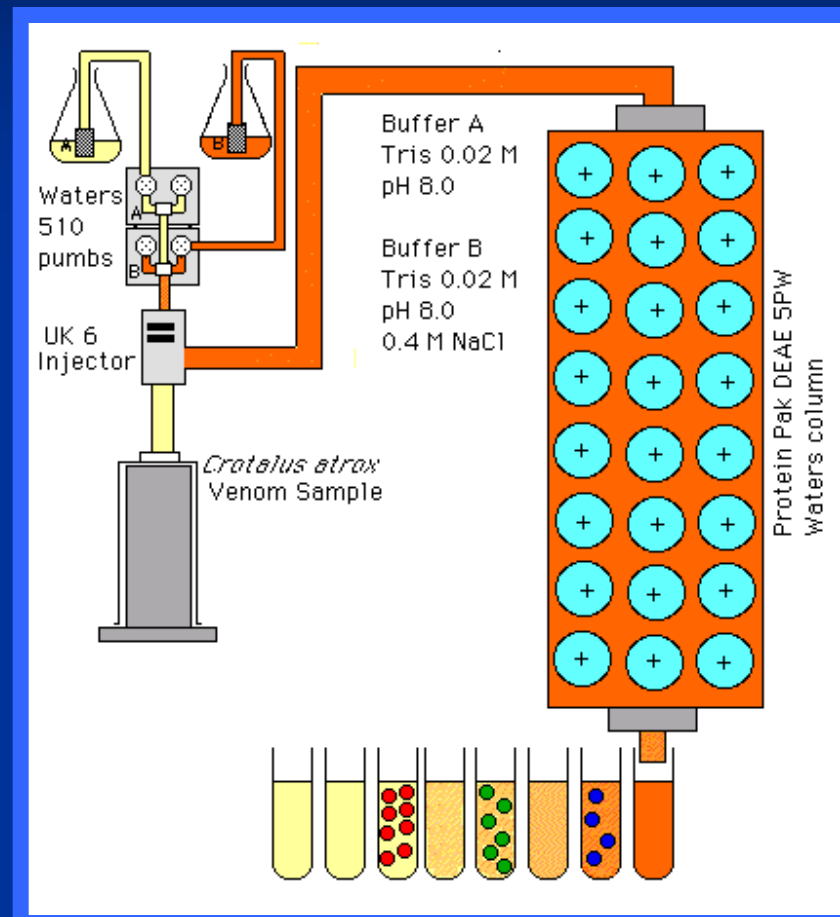
2. rozdział pierwszego składnika



## 3. rozdział drugiego składnika



## 4. rozdział i odbiór frakcji



## Zastosowanie HPLC do wykrywania fałszerstw

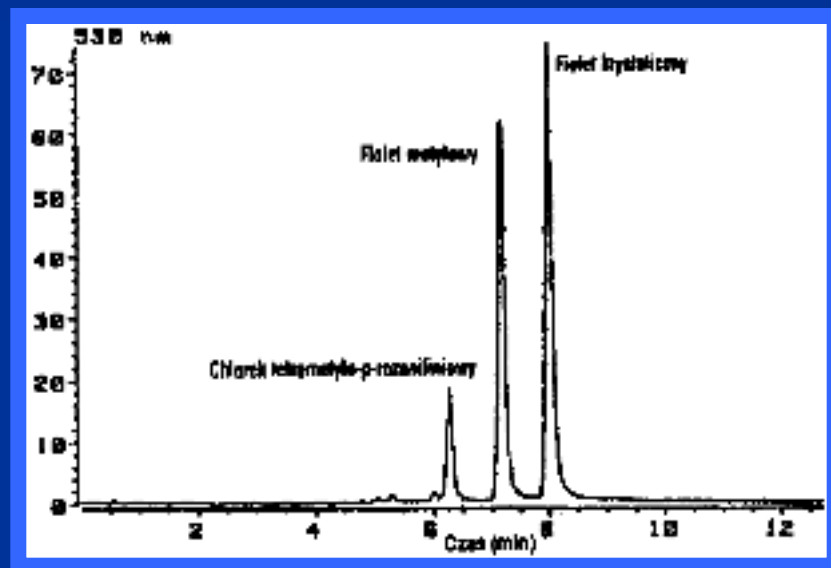
### Problem:

Po skasowaniu czeku opiewającego na 1100 EURO, jego wystawca oświadczył, że wypisał czek jedynie na 100 EURO. Czek z podejrzeniem fałszerstwa trafił do Instytutu Kryminalistyki w celu dokonania ekspertyzy. Istotną rzeczą dla ekspertów jest, by nie uszkodzić dokumentu, który może się okazać niezbędny w postępowaniu sądowym. W tym więc przypadku pobrana do analizy próbka materiału musi być minimalna.

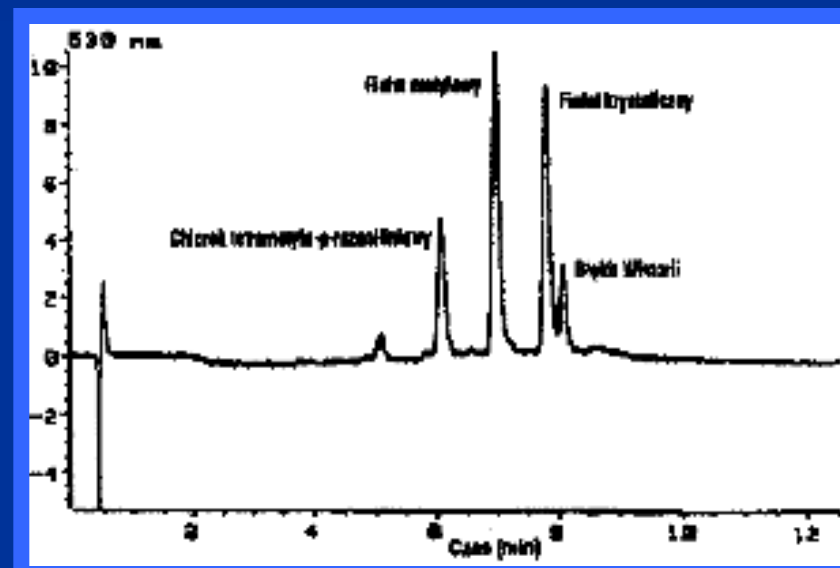
### Rozwiązanie:

- Jedną z nowoczesnych technik umożliwiających rozwiązanie tego problemu analitycznego jest wysokosprawna chromatografia cieczowa. Postępowanie analityczne jest następujące:
  - Za pomocą mikrodziurkarki pobiera się krążki dokumentu o średnicy ok. 0,8mm. Tusz ekstrahuje się z krążków w kapilarze szklanej 4 mikro l (1 mikro l = 1 mm<sup>3</sup>) rozpuszczalnika i ekstrakt nastrzykuje na kolumnę kapilarną chromatografu cieczowego.

- Aparat wykreśla chromatogram tuszu pierwszej i drugiej jedyнки z czeku ujawniając skład chemiczny próbek. Składnikami tuszu pierwszej (dopisanej) jedyнки są chlorek tetrametylo-*p*-rozaniliniowy, fiolet metylowy i fiolet krystaliczny. Tusz drugiej jedyнки zawiera wyraźnie mniej fioletu krystalicznego niż fioletu metylowego i jeszcze dodatkowo błękit Wiktorii.



Chromatogram tuszu z pierwszej jedyнки



Chromatogram tuszu z drugiej jedyнки