



# **CHROMATOGRAFIA W UKŁADZIE FAZ ODWRÓCONYCH**

*Dr in z. Agata Kot-Wasik*

*Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny,  
Politechnika Gdańska, 2007*

# UKŁAD FAZ ODWRÓCONYCH (RP-HPLC)?

to taki układ, w którym faza stacjonarna jest mniej polarna niż faza ruchoma

Nazwa “układ faz odwróconych” jest nazwa **zwyczajowa**, wynikająca z historii rozwoju chromatografii cieczowej.

W początkowym okresie stosowania technik chromatograficznych fazami stacjonarnymi były polarne sorbenty, natomiast fazami ruchomymi rozpuszczalniki mniej polarne. Taki układ jest traktowany jako “układ faz normalnych” (NP).

# RETENCJA W UKŁADZIE RP

Zależy od :

- **Pokrycia powierzchni  $\text{SiO}_2$  ( $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ )?**
- **polarności próbki**
- **składu fazy ruchomej**
- **temperatury**

# FAZY STACJONARNE

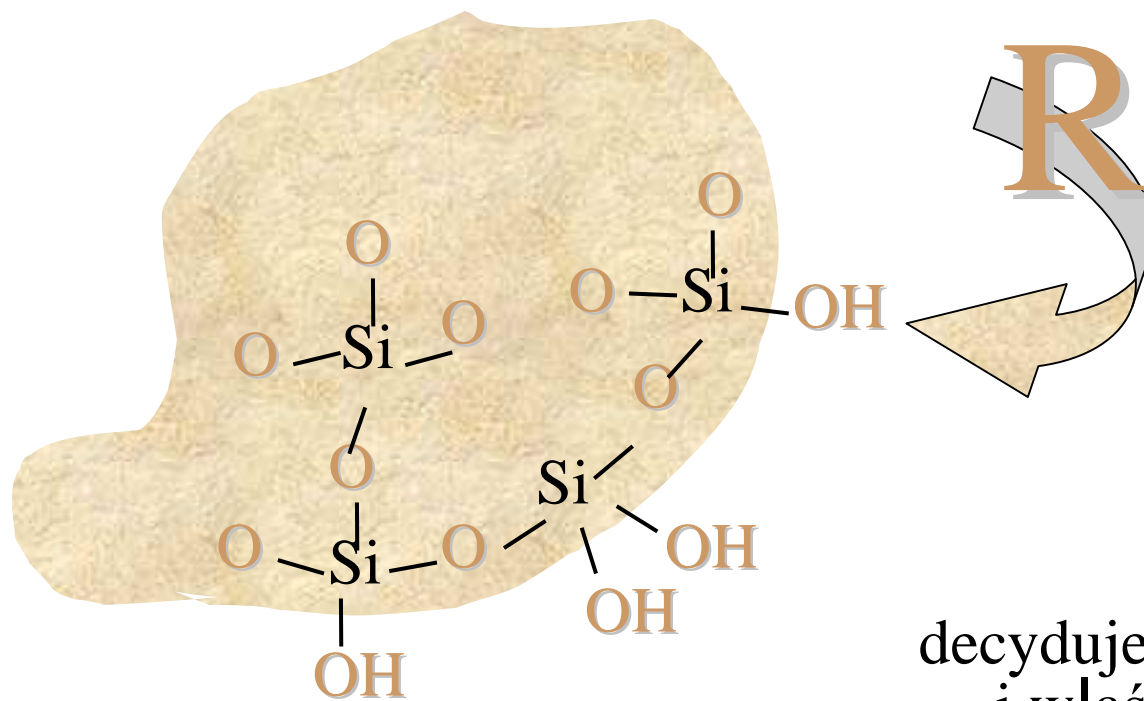
Otrzymuje się w wyniku modyfikacji powierzchni sorbentów, najczęściej polarnych, nie polarnymi, albo średnio polarnymi cząsteczkami fazy stacjonarnej, chemicznie związanymi z cząsteczkami powierzchni “nośnika”.

Materiałem wyjściowym jest **zel krzemionkowy**, ale wykorzystuje się też tlenek glinu, dwutlenek tytanu, cyrkonu, albo polimery organiczne (kopolimer styrenu i diwinylobenzenu, albo poliamidy, lub polimetakrylany i inne).

# OTRZYMYWANIE

Opiera się na reakcji powierzchniowych grup OH z odpowiednimi silanami  $(\text{CH}_3)_2 \text{R Si Cl}$





decyduje o charakterze  
i właściwościach  
powierzchni,  
otrzymanego sorbentu

# Najczęściej w praktyce stosowane wypełnienia

Rodzaj modyfikacji	Grupa funkcyjna	Najczęściej stosowany skrót nazwy
n-alkanami	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	C 2
	$-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	C 4
	$-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$	C 8
	$-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{28}\text{CH}_3$	C 18
grupą fenylową	$-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_x\text{C}_6\text{H}_5$	fenylowa
grupą propylocyjanową	$-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CN}$	cyjanowa
grupą perfluorową <sup>*)</sup>	$-\text{CH}_2(\text{CF}_2)_x\text{CF}_3$	
grupą polarną, np amidową, karbaminianową, eterową <sup>*)</sup>	$-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$	

<sup>\*)</sup> Fazy wprowadzone do handlu w ostatnich latach.

# OGRANICZENIA

Fazy związane wyprodukowane na bazie żelu krzemionkowego są trwałe w pewnym przedziale pH!

**zazwyczaj 2 – 8,**

**często jednak 2,5 – 7,5.**



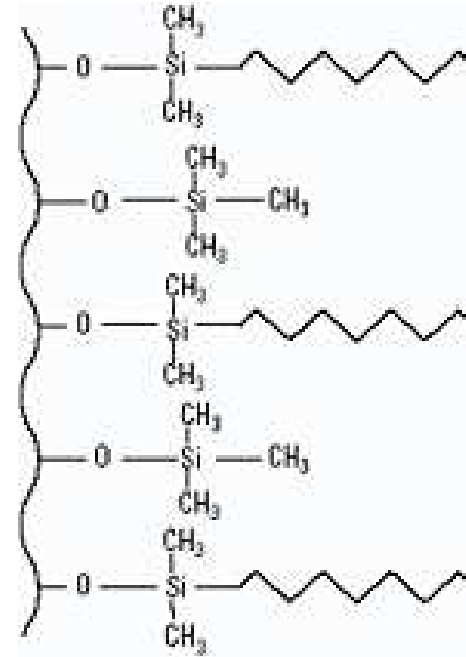
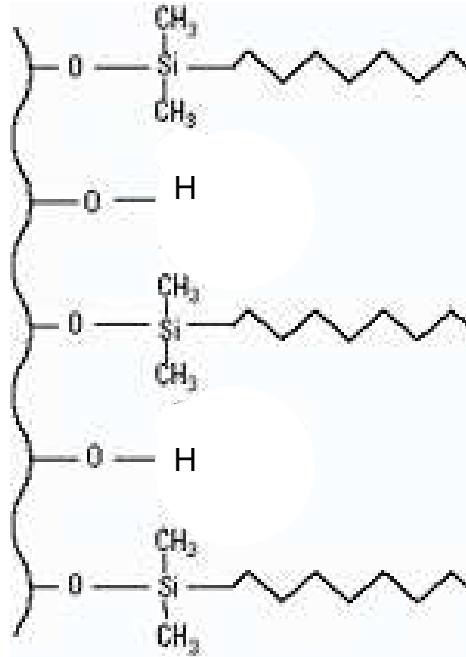
# OGRANICZENIA

zakres stosowalności fazy satacjonarnej: **2,5 – 7,5**.

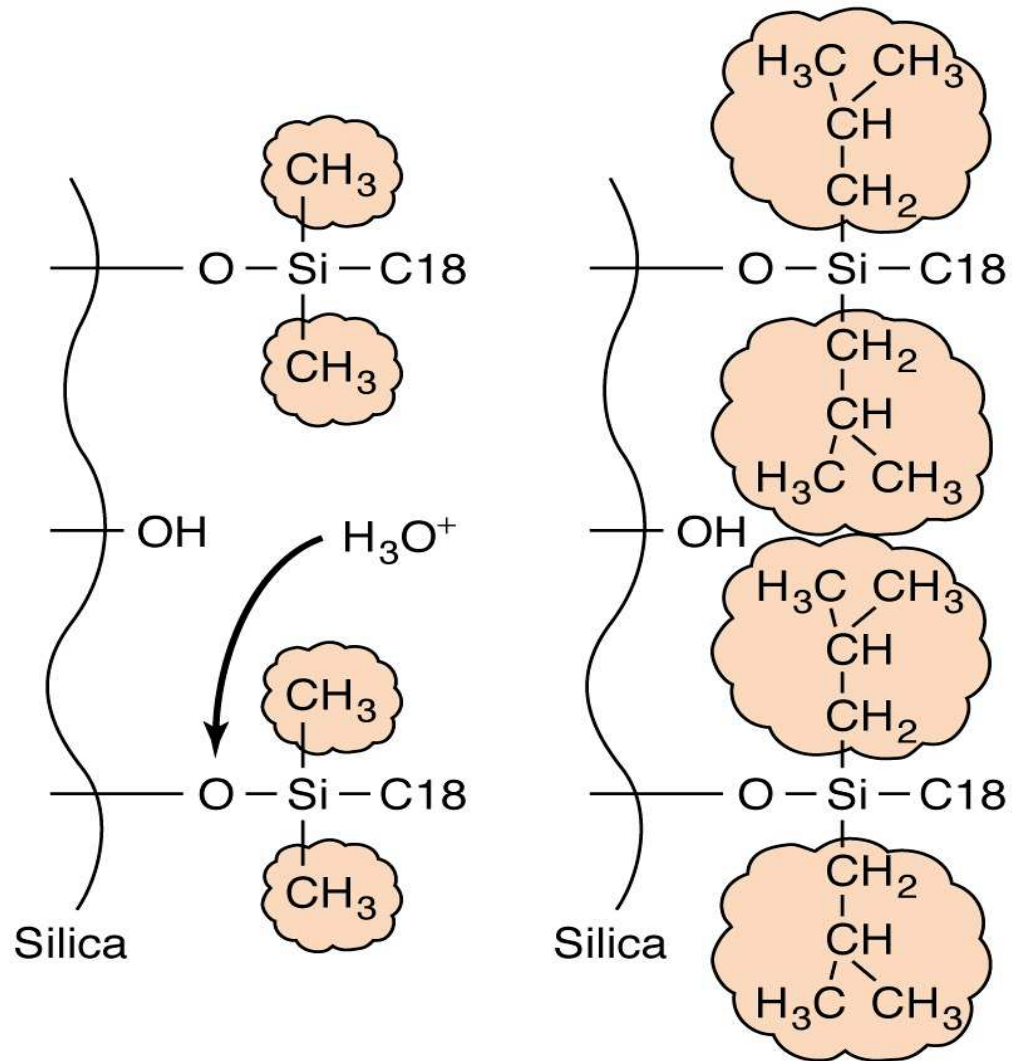
**Przy  $\text{pH} < 2$  następuje wymywanie fazy związanej z kolumny wskutek rozerwania wiązania siloksanowego (hydrolizy).**

**Przy  $\text{pH} > 7$ , zaczyna mieć miejsce rozpuszczanie się żelu.**

# „ENDCAPPING”



# STERYCZNE BLOKOWANIE



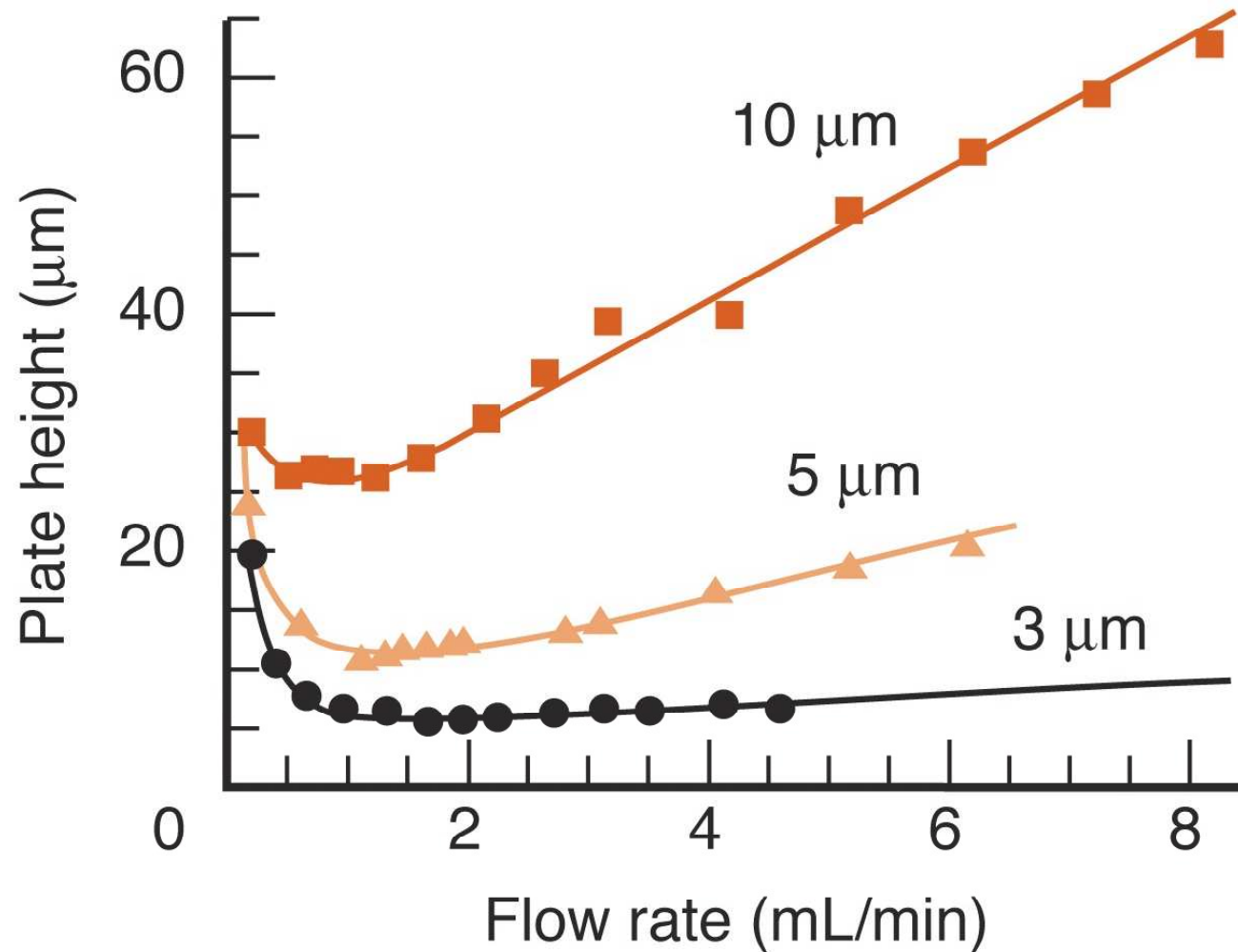
# FAZY OTRZYMANE PRZEZ RÓŻNYCH PRODUCENTÓW RÓŻNIĄ SIĘ!

**Najczęściej wypełnienia różnią się stopniem  
pokrycia fazą organiczną.**

**np. faza typu C18 może zawierać aż 27%  
węgla lub tylko 12 %, tyle samo, co C8.**

*Różnice te powodują przede wszystkim różnice w  
retencji związków, rzadziej w selektywności.*

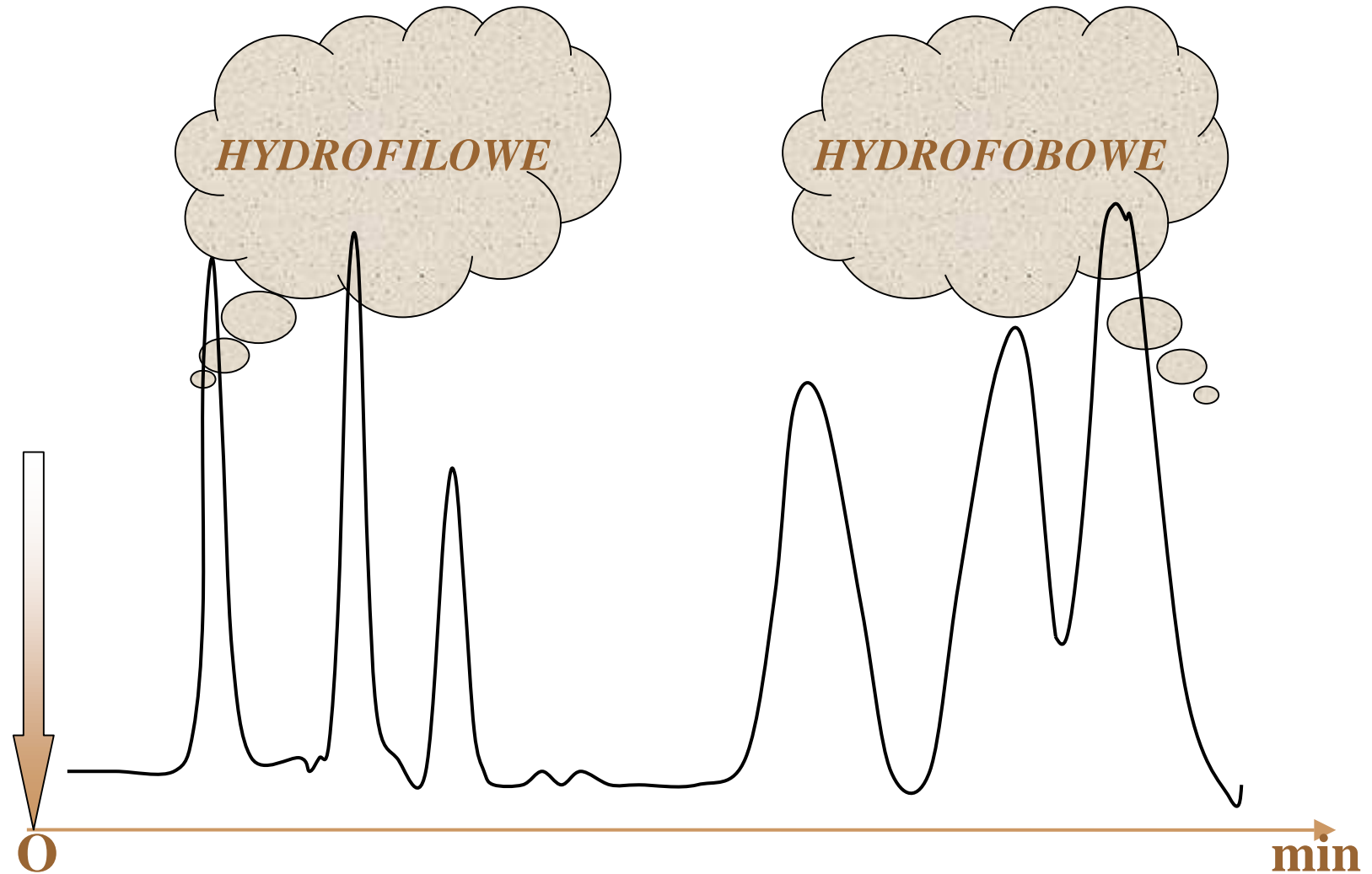
# Jaką średnicę ziaren wybrać ?



# RETENCJA W UKŁADZIE RP

Zależy od :

- Pokrycia powierzchni  $\text{SiO}_2$  ( $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ )?
- polarności próbki
- składu fazy ruchomej
- temperatury



*Substancje eluują w kolejności od najbardziej polarnych (ściśle najbardziej hydrofilowych) do niepolarnych (najmniej hydrofilowych), a w szeregach homologicznych od nisko- do wysokocząsteczkowych.*

# SELEKTYWNOŚĆ

Jest miarą różnic w retencji poszczególnych rozdzielanych substancji.

Jest zależna od typu fazy stacjonarnej, typu i składu fazy ruchomej oraz w pewnym stopniu od temperatury.



# RODZAJE SELEKTYWNOŚCI

Trzy rodzaje selektywności związane z oddziaływaniem substancji z fazą stacjonarną :

- selektywność względem grupy metylenowej, zwana hydrofobowa
- selektywność chemiczna (lub polarna), wynikająca z oddziaływań jonowych, dipolowych lub wiązań wodorowych z powierzchniowymi grupami OH, ewentualnie tworzeniem kompleksów z metalami z warstwy powierzchniowej
- selektywność steryczna, wynikająca ze struktury wypełnienia i kształtu cząsteczek substancji rozdzielanych.

# SELEKTYWNOŚĆ HYDROFOBOWA

- określa różnice retencji dwóch sąsiednich **elementów** szeregu homologicznego, różniących się o grupę - CH<sub>2</sub> -
  - rośnie ze wzrostem długości łańcucha fazy związanej oraz ze stopniem pokrycia powierzchni.
  - zależy od rodzaju i ilości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej.

*Ten rodzaj selektywności wyróżnia chromatografię w układach faz odwróconych spośród wszystkich innych typów chromatografii.*

# SELEKTYWNOŚĆ CHEMICZNA

- z uwagi na zależność od oddziaływań polarnych, jest istotna tylko dla substancji zawierających polarne grupy funkcyjne
  - Zależy również od składu fazy ruchomej.

# SELEKTYWNOŚĆ STERYCZNA

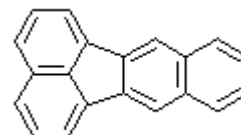
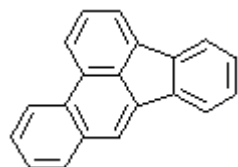
- jest istotna w rozdzielaniu wielopierścieniowych węglowodorów skondensowanych, polibifenyli, steroidów, karotenoidów.
  - jest lepsza w kolumnach monomerycznych i polimerycznych o dużym stopniu pokrycia faza związana.

*Prawdopodobnie selektywność tego rodzaju związana jest z większym uporządkowaniem struktury fazy organicznej w wypełnieniach o dużym stopniu pokrycia*

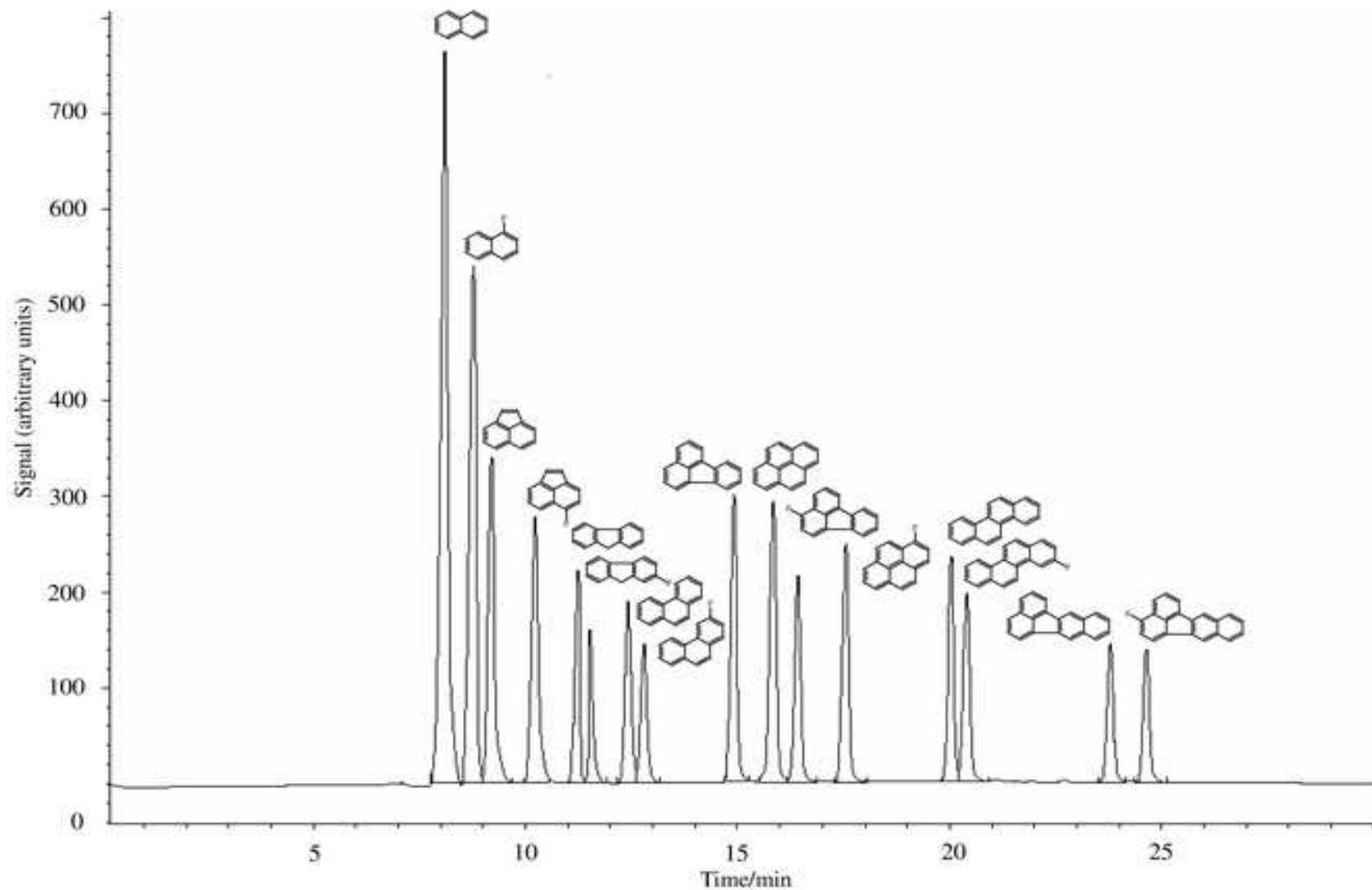
# SELEKTYWNOŚĆ STERYCZNA

- *przykład: analiza WWA (16 wg EPA)*

*benzo(b)fluoranten i benzo(k)fluoranten*



# SELEKTYWNOŚĆ STERYCZNA



# RETENCJA W UKŁADZIE RP

Zależy od :

- Pokrycia powierzchni  $\text{SiO}_2$  ( $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ )?
- polarności próbki
- składu fazy ruchomej
- temperatury

# Faza ruchoma w układach RP

Wartości eluotropowe dla fazy C18:

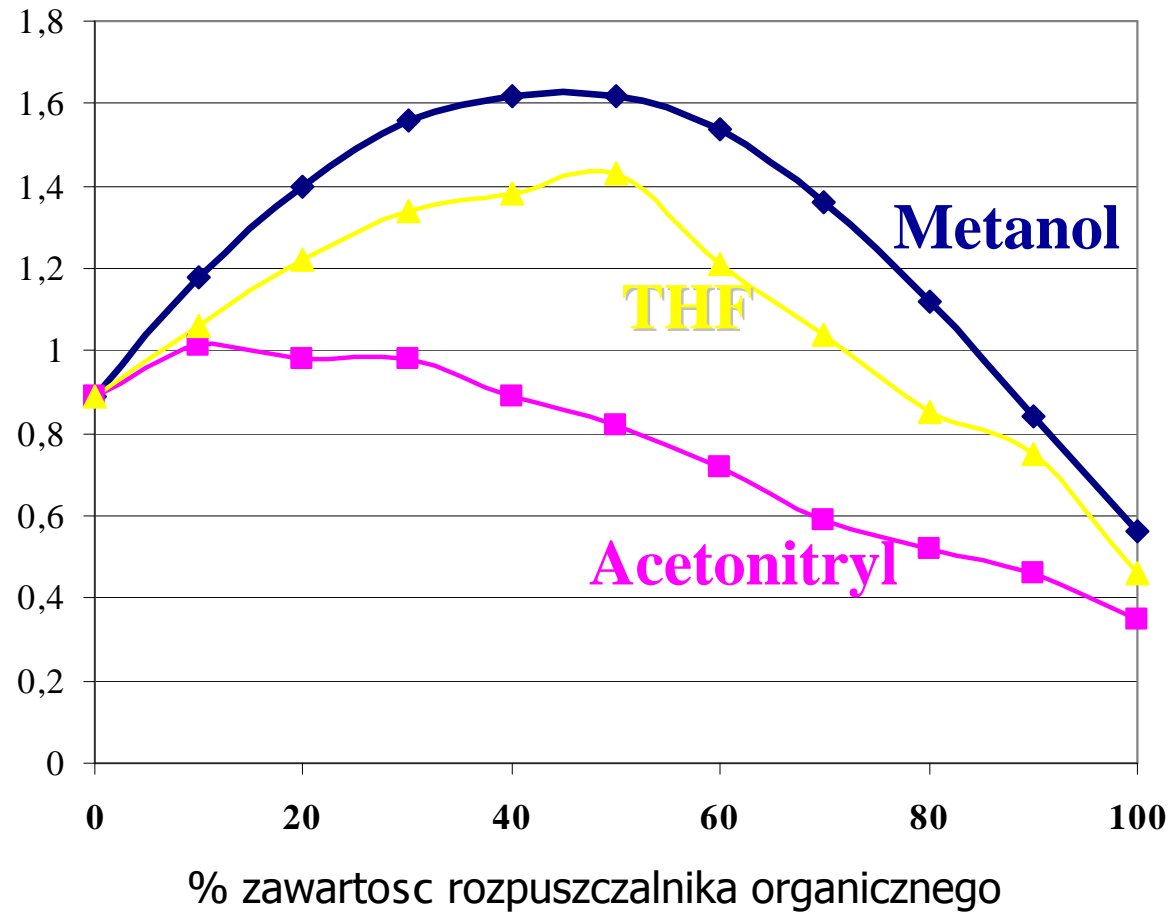
najslabszy

**H<sub>2</sub>O (0) < MeOH (1.0) < ACN (3.1) < EtOH  
< THF (3.7) < iPrOH (8.3) < CH<sub>3</sub>Cl**

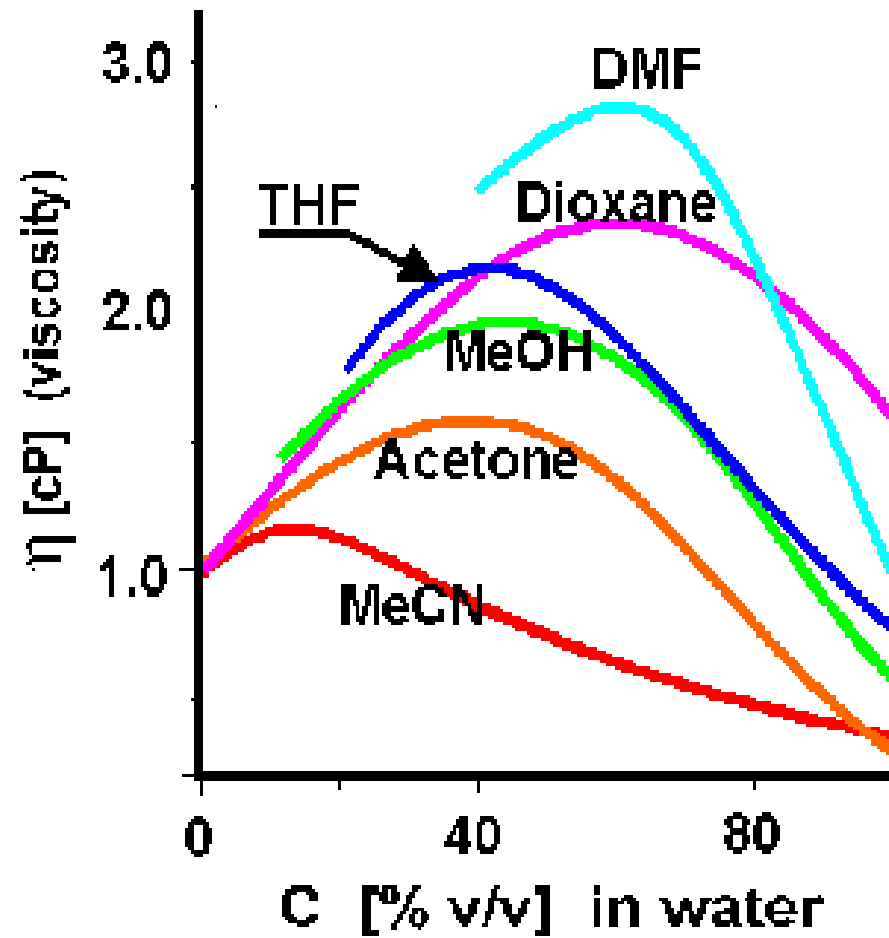
najsilniejszy



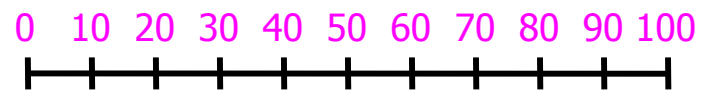
# Lepkość fazy ruchomej



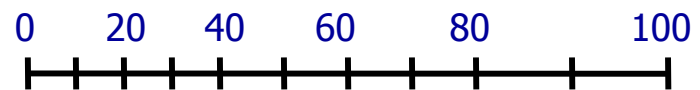
# Lepkość fazy ruchomej



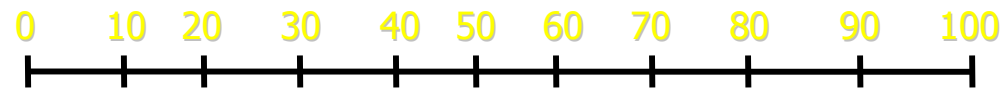
# Zamiana składnika organicznego



**ACN/H<sub>2</sub>O**



**MeOH/ H<sub>2</sub>O**



**THF/ H<sub>2</sub>O**

# Wlasciwosci fazy ruchomej

Nazwa rozpuszczalnika	Przepuszczalność światła, powyżej ... nm.	Współczynnik załamania światła w 20°C	Lepkość, cP	Temperatura wrzenia
Metanol	205	1,3284	0,55	64,7
Acetonitryl	190	1,3441	0,38	81,6
Tetrahydrofuran	212 (230 ?)	1,4072	0,55	66,0
Woda	190	1,3330	1,00	100
Kwas octowy	230			

## Zależność pomiędzy zawartością rozpuszczalnika organicznego a retencją substancji

$$\lg k = \lg k_w - n c$$

gdzie:  $k$  = współczynnik retencji

$k_w$  = wartość  $k$  w czystej wodzie

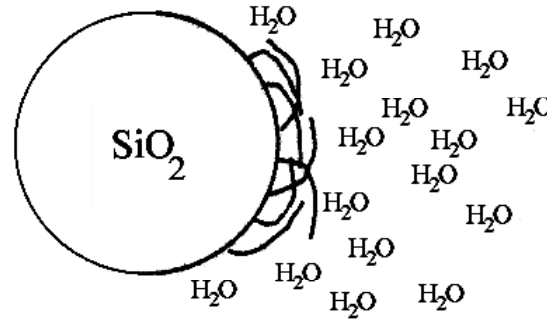
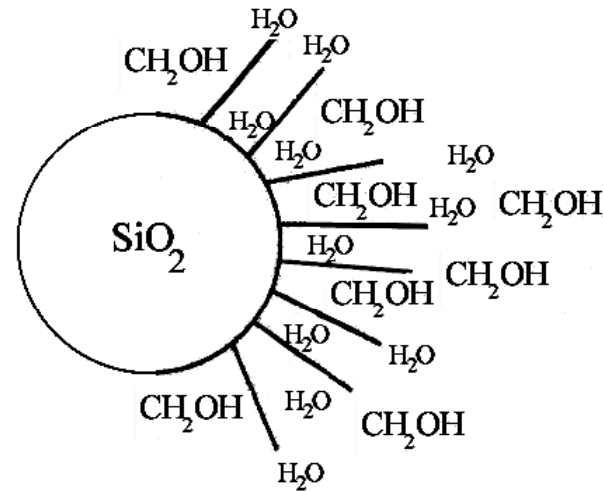
$c$  = udział objętościowy rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej

$n$  = stała, zależna od rodzaju rozpuszczalnika stanowiącego składnik eluentu i od rodzaju substancji rozdzielanej

*Pozwala na szybkie oszacowanie odpowiedniego składu fazy ruchomej, po uzyskaniu danych retencji z użyciem dwu faz ruchomych, różniących się stężeniem organicznego modyfikatora.*

# Faza ruchoma : 100% H<sub>2</sub>O

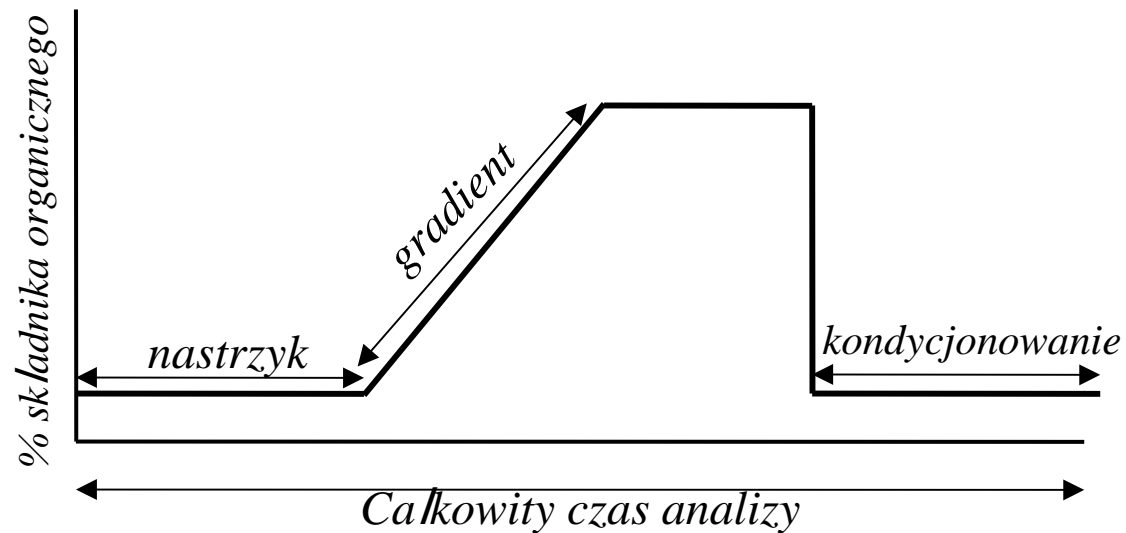
W przypadku dobierania mocy elucyjnej fazy ruchomej odpowiedniej do rozdzielania mieszanin substancji polarnych na sorbentach typu C18 należy uważać, aby zawartość wody w fazie ruchomej nie przekraczała 95%. Przy tak dużej zawartości wody powierzchnia fazy stacjonarnej nie jest zwilżana przez fazę ruchomą i łańcuchy węglowodorowe mają tendencję do zaginania się w kierunku powierzchni.



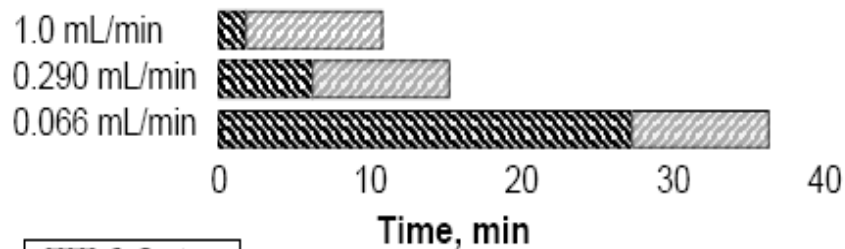
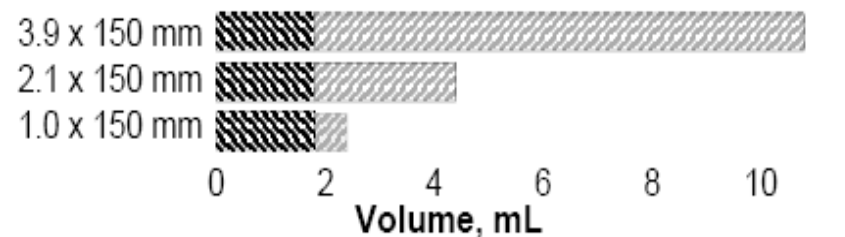
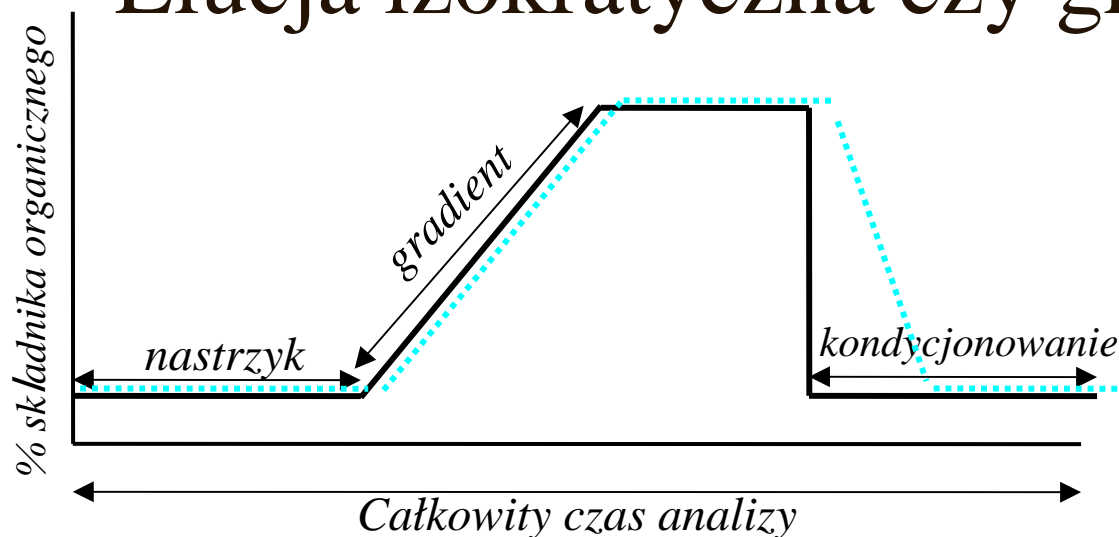
# Elucja izokratyczna czy gradientowa ?

Elucja izokratyczna – stały skład fazy ruchomej

**Elucja gradientowa** – zmiana ciągła (lub skokowa) składu fazy ruchomej



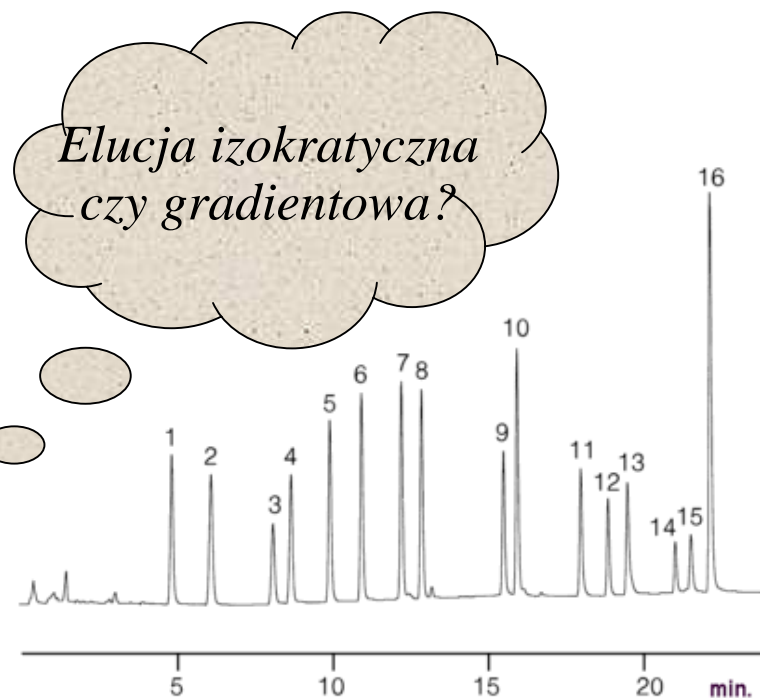
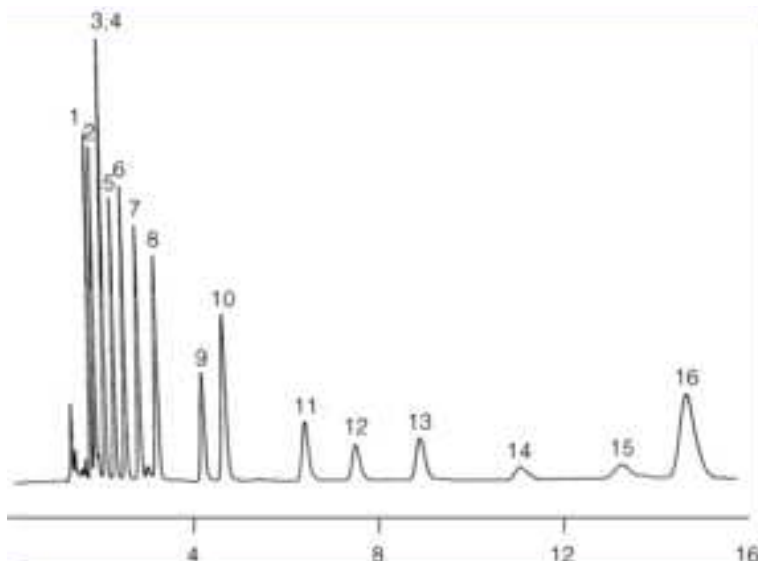
# Elucja izokratyczna czy gradientowa ?



 3xSystem  
 5xColumn



## Przykład: analiza 16 WWA



**Kolumna: GROM-SIL PAH -1  
(250 x 4mm)?**

**Faza ruchoma: water /ACN =15 /85**

**Przepływ: 1.5 ml/min**

**13 MPa**

**Temperatura: 25 °C**

**Detekcja: 254 nm**

- 1) Naphthalene
- 2) Acenaphthylene
- 3) Acenaphthene
- 4) Fluorene
- 5) Phenanthrene
- 6) Anthracene
- 7) Fluoranthene
- 8) Pyrene
- 9) Benz(a)anthracene
- 10) Chrysene
- 11) Benzo(b)fluoranthene
- 12) Benzo(k)fluoranthene
- 13) Benzo(a)pyrene
- 14) Dibenzo(a,h)anthracene
- 15) Benzo(g,h)perylene
- 16) Ideno(1,2,3,c,d)pyrene

**Kolumna: GROM-SIL PAH -1  
(250 x 4mm)?**

**Faza ruchoma: water (A) /ACN (B)?**

**Gradient: 50%B (0-5 min), 50-85%B  
(5-15 min), 85-100%B (15-20 min),  
100%B (20-25 min)?**

**Przepływ: 1.5 ml/min**

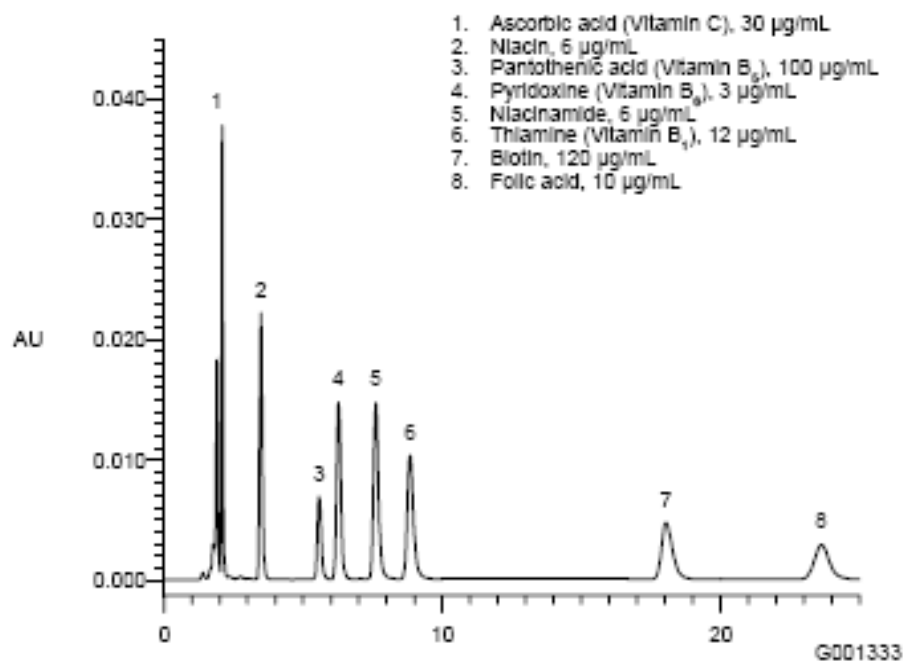
**13 MPa**

**Temperatura: 25 °C**

**Detekcja: 254 nm**

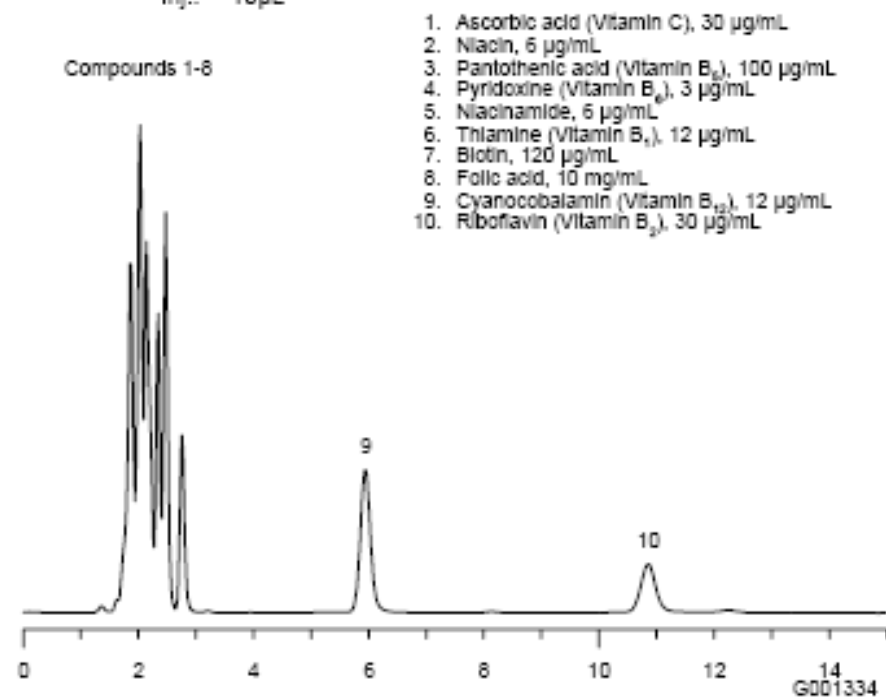
**Figure C. Isocratic Elution of Water-Soluble Vitamins (I)**

Column: Discovery C18, 15cm x 4.6mm ID, 5µm particles  
Cat. No.: 504955  
Mobile Phase: A = 50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7; B: Methanol; 99%A/1%B isocratically  
Flow Rate: 1mL/min  
Pressure: 1300psi  
Temp.: 35°C  
Det.: UV, 220nm  
Inj.: 10µL

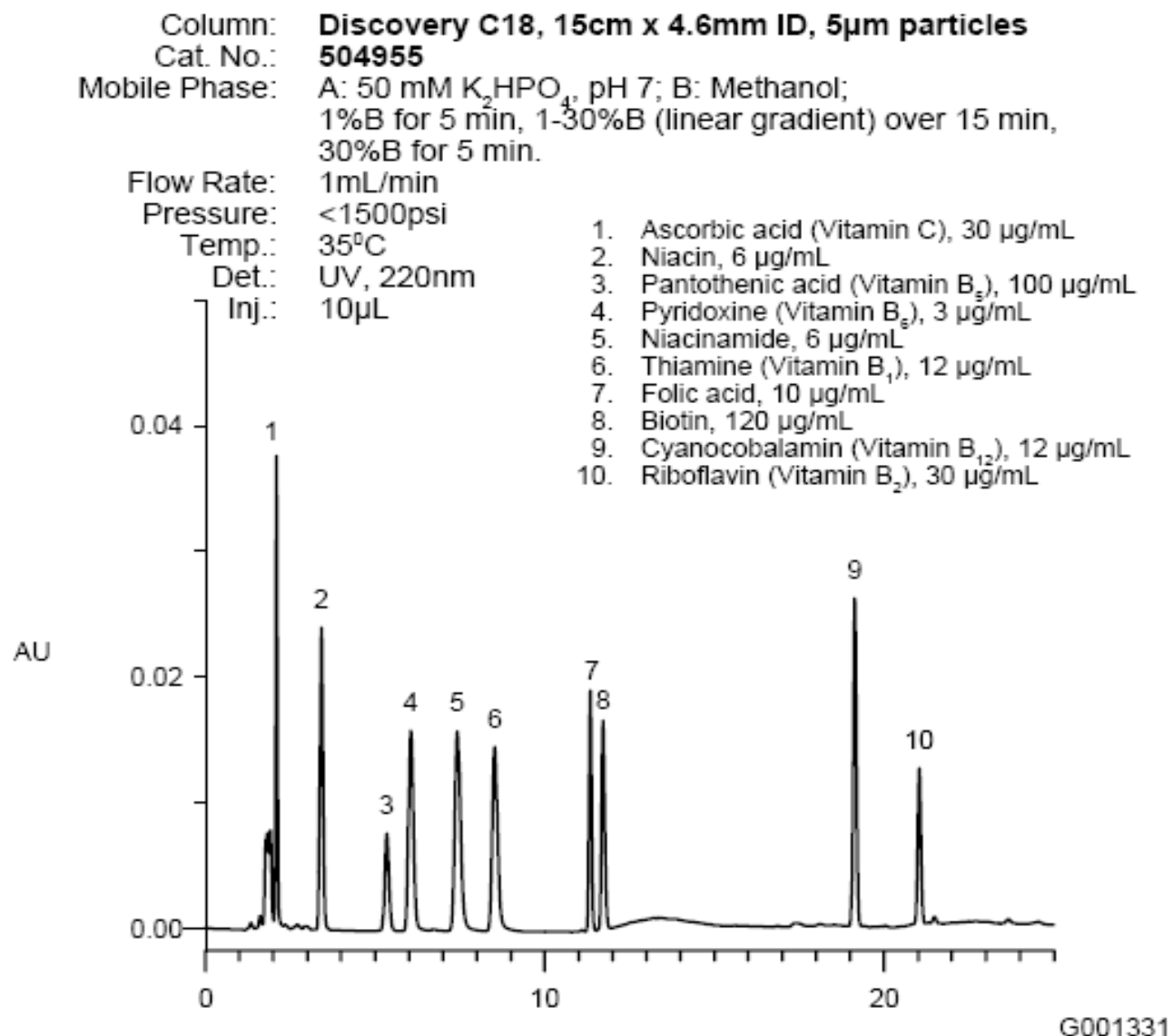


**Figure D. Isocratic Elution of Water-Soluble Vitamins (II)**

Column: Discovery C18, 15cm x 4.6mm ID, 5µm particles  
Cat. No.: 504955  
Mobile Phase: A = 50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7 B: Methanol; 80%A/20%B isocratically  
Flow Rate: 1mL/min  
Pressure: 1400psi  
Temp.: 35°C  
Det.: UV, 220nm  
Inj.: 10µL



## Figure A. Gradient Elution of Ten Water-Soluble Vitamins



# Problemy stosowania gradientu

- Rozwiązania:
- „skrócić” gradienty
  - stosować krótsze kolumny chromatograficzne
  - stosować większe przepływy fazy ruchomej
  - stosować mniejsze średnice ziaren wypełnienia
  - skrócić czas kondycjonowania kolumny
  - podwyższyć temperaturę pracy kolumny
  - zminimalizować objętości opóźnienia gradientu i efekty pozakolumnowe w układzie chromatograficznym

# RETENCJA W UKŁADZIE RP

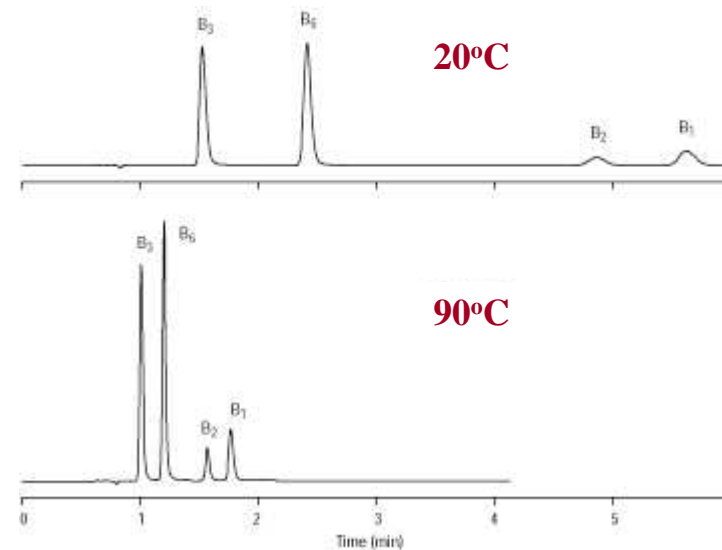
Zależy od :

- Pokrycia powierzchni  $\text{SiO}_2$  ( $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ )?
- polarności próbki
- składu fazy ruchomej
- temperatury

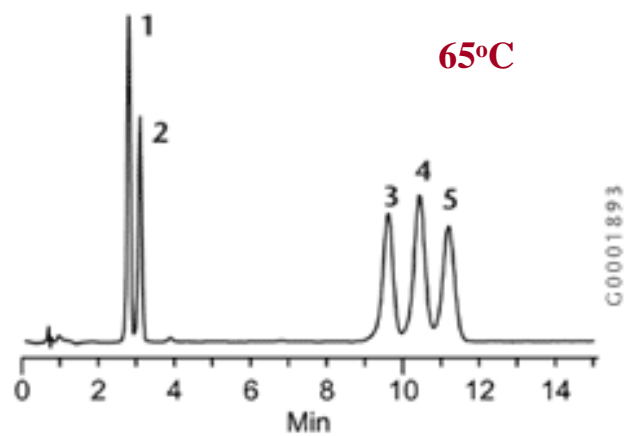
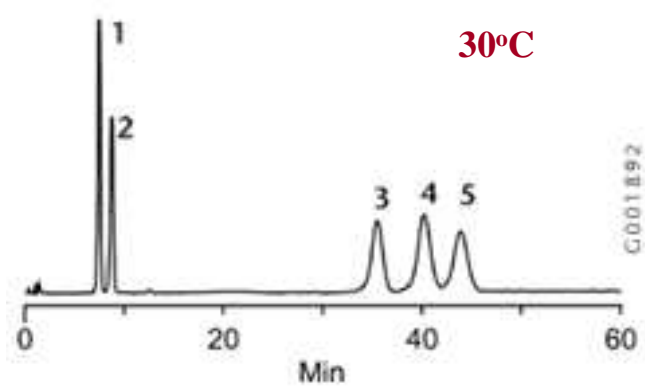
# WPLÝW TEMPERATURY

## Przyklad 1. Rozdzielanie witamin

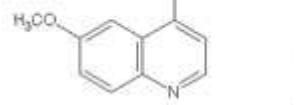
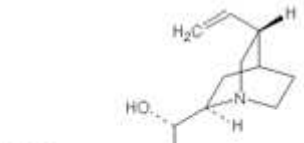
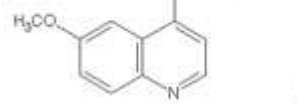
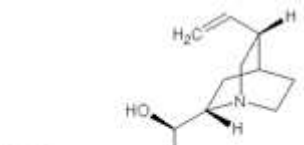
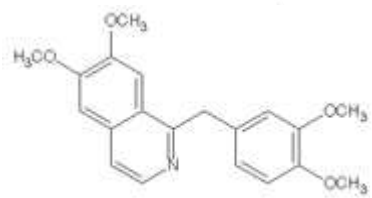
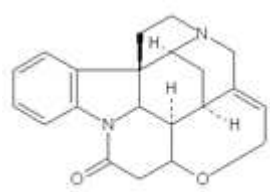
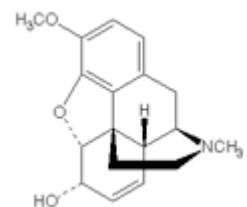
Wzrost temperatury przede wszystkim **zmniejsza retencje substancji** rozdzielanych i tym samym moze wpłynac na selektywność rozdzielania



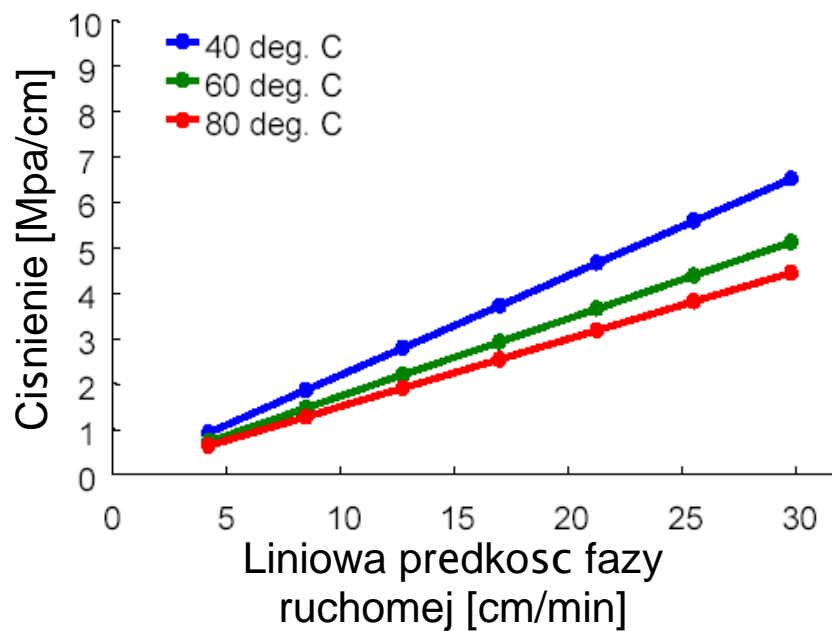
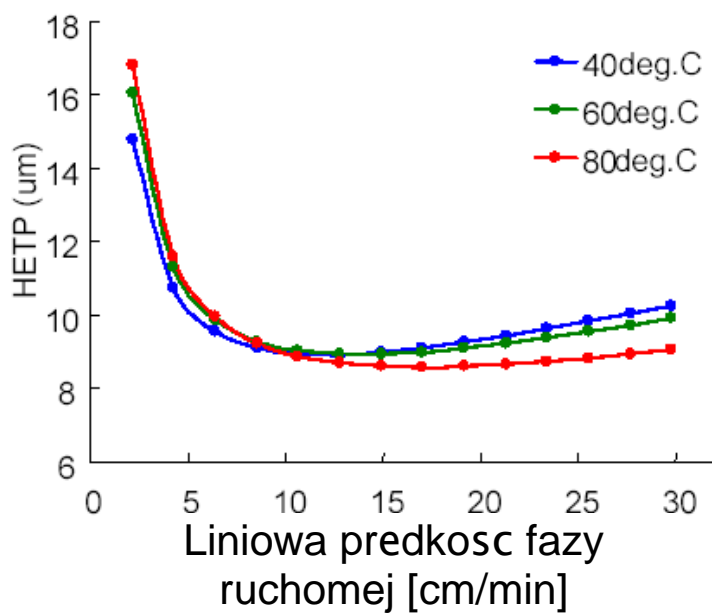
## Przykład 2. Rozdzielanie alkaloidów



(90:10) 20mM fosforan potasu, (pH 12.0):CH<sub>3</sub>CN, 1.5mL/min



1. Codeine
2. Strychnine
3. Papaverine
4. Quinine
5. Quinidine





# RETENCJA SUBSTANCJI

Rosnie ze wzrostem:

- stopnia pokrycia powierzchni związana faza organiczna
- dlugosci lancucha fazy związanej
- hydrofobowosci grupy funkcyjnej decydujacej o charakterze powierzchni sorpcyjnej
- hydrofobowosci substancji rozdzielanych
- zawartosci wody w fazie ruchomej



cd ...

**CHROMATOGRAFIA W  
UKŁADZIE FAZ ODWRÓCONYCH**  
*nowe trendy*

Dr inż. Agata Kot-Wasik

*Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny,  
Politechnika Gdańska, 2007*