

PORÓWNANIE FAZ STACJONARNYCH STOSOWANYCH W CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

1. Wstęp

Chromatografia jest techniką umożliwiającą rozdzielanie składników mieszanin jednorodnych. Na proces rozdzielania chromatograficznego analizowanej mieszaniny wpływają właściwości fizyko-chemiczne analitów oraz ich oddziaływanie z fazą ruchomą i stacjonarną. Dodatkowo na efektywność separacji wpływają właściwości układu faza ruchoma - faza stacjonarna. Fazą ruchomą w chromatografii cieczerwowej jest mieszanina rozpuszczalników, a fazą nieruchomą (stacjonarną) ciało stałe lub ciecz.

1.1. Chromatografia w normalnym układzie faz

Chromatografia w normalnym układzie faz (ang. *Normal Phase*, NP) występuje wówczas, gdy faza stacjonarna jest bardziej polarna niż faza ruchoma. Jako polarne fazy stacjonarne w NP stosuje się tlenki nieorganiczne takie jak tlenek krzemu, czy tlenek glinu oraz modyfikowane grupami polarnymi żele krzemionkowe. Do grup funkcyjnych wprowadzanych podczas modyfikacji krzemionki należą: aminowa ($-NH_2$), nitrowa ($-NO_2$), nitrylowa ($-CN$), diolowa ($-R(OH)_2$), czy amidowa ($-RCONH_2$). W chromatografii w NP jako fazy ruchome używa się pojedyncze niepolarne jak i polarne rozpuszczalniki, bądź ich mieszaniny. Zgodnie z podaną na początku definicją fazy te są mniej polarne niż faza stacjonarna. Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami są: heksan, pentan, chloroform oraz chlorek metylenu. Heksan czy pentan są rozpuszczalnikami o małej mocy elucyjnej, dlatego też miesza się je z rozpuszczalnikiem o dużej mocy elucyjnej, który zwany jest modyfikatorem. Modyfikatorami w NP mogą być: chloroform, chlorek metylenu, dichloroetan, octan etylu, tetrahydrofuran, metanol czy izopropanol. Należy unikać obecności wody, gdyż nawet niewielkie jej ilości w fazie ruchomej bądź próbce powodują dezaktywację powierzchni żelu krzemionkowego.

Rozdzielanie składników analizowanych próbek w chromatografii w normalnym układzie faz odbywa się w oparciu o interakcje polarnych grup funkcyjnych analitów z polarnymi centrami aktywnymi występującymi na powierzchni fazy stacjonarnej. Polarne cząsteczki analitów rywalizują z cząsteczkami fazy ruchomej o miejsca na powierzchni fazy stacjonarnej. W tym układzie kolejność elucji analitów jest odwrotnie proporcjonalna do

polarności. Jako pierwsze kolumnę opuszczają anality niepolarne, mało polarne, a następnie coraz bardziej polarne. W niektórych przypadkach kolejność elucji może być inna w wyniku specyficznych oddziaływań analitu z fazą stacjonarną.

1.2. Chromatografia w odwróconym układzie faz

Chromatografia w odwróconym układzie faz (ang. *Reversed Phase*, RP) jest obecnie znacznie częściej stosowana niż chromatografia w normalnym układzie faz. O chromatografii w RP mówimy wówczas, gdy faza stacjonarna jest mniej polarna niż faza ruchoma. Jako fazy stacjonarne w RP stosuje się modyfikowane żele krzemionkowe. Modyfikacja polega na reakcji powierzchniowych grup hydroksylowych żelu krzemionkowego z odpowiednimi związkami chemicznymi (silanami). Zwykle do powierzchni krzemionki przyłącza się łańcuchy alkilowe nadające tej powierzchni charakter niepolarny (hydrofobowy), bądź łańcuchy alkilowe zakończone grupami funkcyjnymi. Tak otrzymane wypełnienia nazywa się w skrócie „fazami związanymi”. W odwróconym układzie faz najczęściej jest stosowana faza oktadecylosilanowa (C-18), rzadziej stosowane są fazy C-8 i C-2. Długość łańcucha alkilowego i ich ilość wpływa na polarność fazy stacjonarnej. Im dłuższy jest łańcuch alkilowy i większa ich liczba przyłączona do powierzchni krzemionki, tym mniejsza jest polarność fazy stacjonarnej.

Jako eluenty w chromatografii w odwróconym układzie faz stosuje się mieszaniny wody (lub buforu) z rozpuszczalnikami organicznymi mieszającymi się w dowolnym stosunku z wodą. Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami organicznymi są acetonitryl, metanol i etanol, natomiast rzadziej: izopropanol, tetrahydrofuran czy aceton. W RP fazy stacjonarne są hydrofobowe w związku z tym woda lub bufor są rozpuszczalnikami o najmniejszej mocy elucyjnej, a dodatek rozpuszczalnika organicznego powoduje wzrost mocy elucyjnej fazy ruchomej. Kolejność wmywania analitów z kolumny chromatograficznej zależy od hydrofobowych właściwości badanych związków i jest odwrotna niż w przypadku układu NP. Jako pierwsze kolumnę opuszczają anality hydrofilowe, a jako ostatnie hydrofobowe.

1.3. Chromatografia oddziaływań hydrofilowych

Chromatografia oddziaływań hydrofilowych (ang. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC) to technika łącząca w sobie elementy chromatografii w normalnym i odwróconym układzie faz oraz chromatografii jonowymiennej. HILIC wykorzystuje polarne fazy stacjonarne, stosowane w chromatografii w normalnym układzie faz oraz fazy ruchome

o dużej zawartości rozpuszczalników organicznych, charakterystyczne dla chromatografii w odwróconym układzie faz. Oznaczane anality są natomiast z zakresu chromatografii jonowymiennej. W chromatografii HILIC jako fazy stacjonarne można wykorzystać każdą fazę polarną, ale najczęściej stosowane są żele krzemionkowe oraz krzemionka modyfikowana grupami $-\text{NH}_2$, $-\text{RCONH}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, czy $-\text{R}(\text{OH})_2$, bądź polarne polimery.

Jako fazy ruchome używa się mieszanin rozpuszczalników organicznych, takich jak acetonitryl, metanol, etanol z wodą lub buforem. Należy zwrócić uwagę, że odwrotnie jak w RP, największą moc elucji posiada woda czy bufor i im większa ich zawartość w eluencie tym moc elucji fazy ruchomej wzrasta.

Podczas procesu chromatografowania na powierzchni fazy stacjonarnej wytwarzana jest hydrofilowa warstwa wodna będąca podstawą podziału analitu między tę warstwę, a resztę eluentu. Ponadto analit może oddziaływać bezpośrednio ze złożem na zasadzie adsorpcji. Dodatkowo faza stacjonarna może tworzyć zarówno wiązania wodorowe z analitem, jak i oddziaływania typu dipol-dipol, co wpływa na selektywność danego układu chromatograficznego. Kolejność elucji substancji może być odwrotna, niż w RP tzn. hydrofilowe związki wykazują większą retencję niż związki hydrofobowe.

1.4. Chromatografia jonowa

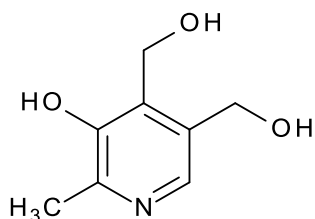
Chromatografia jonowa jest techniką umożliwiającą analizowanie mieszanin kationów i anionów zarówno nieorganicznych jak i organicznych. Istota chromatografii jonowej polega na tym, że anality w obecności buforu stanowiącego fazę ruchomą oddziałują z fazą stacjonarną, którą jest wymiennicz jonowy. Wymienniczem jonowym mogą być polimery czy modyfikowana krzemionka, które zawierają związane grupy jonowe i wymienne przeciwjony o znaku przeciwnym do umocowanej grupy. Wymiennicze jonowe dzieli się na mocne i słabe. Do mocnych wymienniczy należą: wymiennicz kationowy $-\text{SO}_3^- \text{H}^+$ i wymiennicz anionowy $-\text{NR}_3^+ \text{OH}^-$. Do słabych wymienniczy kationowych należą wymiennicze z grupami $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$ czy z rodnikiem aromatycznym zawierającym grupę $-\text{OH}$ lub $-\text{SH}$, natomiast do słabych wymienniczy anionowych należą wymiennicze z grupą $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$ i $-\text{NHR}_2$.

Jako fazy ruchome w chromatografii jonowej stosuje się elektrolity zawierające aniony konkurencyjne w stosunku do anionów wymiennicza jonowego lub kationy konkurencyjne w stosunku do kationów wymiennicza jonowego. Jony próbki i jony fazy ruchomej współzawodniczą o dostęp do jonów wymiennicza. W związku z tym faza ruchoma powinna

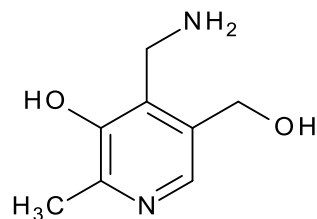
być tak dobrana aby oddziaływanie jonów analitów z wymienniczem gwarantowało dobre ich rozdzielanie w rozsądnym czasie.

1.5. Anality

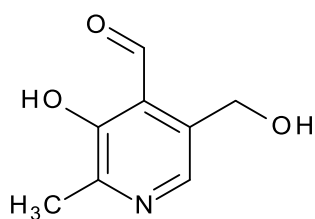
Badaniu chromatograficznemu zostaną poddane roztwory zawierające pirydoksynę (PN), pirydoksal (PL), pirydoksaminy (PM) i fosforan 5'-pirydoksalu (PLP), których wzory strukturalne przedstawiono poniżej.



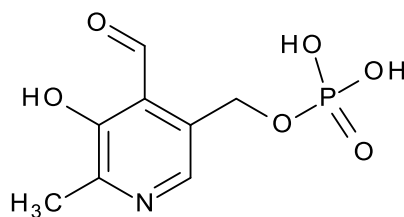
pirydoksyna (PN)



pirydoksamina (PM)



pirydoksal (PL)



fosforan 5-pirydoksalu (PLP)

Związki te są pochodną pirydyny i reprezentują cztery z sześciu form witaminy B₆, której aktywną biologicznie formą jest fosforan 5'-pirydoksalu.

2. Materiały i aparatura

W trakcie wykonywania ćwiczenia wykorzystywane będą następujące materiały i aparatura:

- chromatografy cieczerwowe wyposażone m.in. w detektor spektrofotometryczny z matrycą diodową (HPLC UV-Vis DAD):
 - Agilent Technologies 1220 Infinity;
 - Hewlett-Packard 1100.
- kolumny chromatograficzne:
 - Zorbax SB-C18 (150 × 4,6 mm; 5,0 μm), Agilent Technologies;
 - Kinetex HILIC (100 × 4,6 mm; 2,6 μm), Phenomenex.

- rozpuszczalniki i roztwory do przygotowania faz ruchomych oraz próbek:
 - woda destylowana;
 - acetonitryl (ACN);
 - 50 mmol/l bufor fosforanowy pH 2,4;
 - 0,2 mol/l bufor fosforanowy pH 7,4;
 - 50 μ mol/ml roztwór pirydoksyny (PN), pirydoksalu (PL), pirydoksaminy (PM) i fosforanu 5'-pirydoksalu (PLP).

3. Wykonanie ćwiczenia

Celem zajęć jest porównanie polarnych i niepolarnych faz stacjonarnych stosowanych w chromatografii cieczonej. Ćwiczenie to składa się z trzech głównych zadań.

ZADANIE 1.

Przygotowanie próbek do analizy.

W fiolkach ze szkła bursztynowego o pojemności 1 ml przygotować roztwory:

- a) PN, PM, PL i PLP oraz ich mieszaniny o stężeniu 100 nmol/ml w wodzie;
- b) PN, PM, PL i PLP oraz ich mieszaniny o stężeniu 100 nmol/ml w 0,2 mol/l buforze fosforanowy o pH 7,4.

ZADANIE 2.

Przeprowadzenie analizy chromatograficznej próbek z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczonej oddziaływań hydrofilowych (HILIC).

Warunki chromatograficzne:

- kolumna chromatograficzna: Kinetex HILIC (100 \times 4,6 mm; 2,6 μ m);
- faza ruchoma: **A**) 50 mmol/l bufor fosforanowy pH 2,4 **B**) ACN (A:B, v/v), początkowy skład eluentu A:B, 20:80 (v:v);
- prędkość przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min;
- elucja gradientowa: 0 - 2,5 min 80 - 50% **B**; 2,5 - 3,5 min 50 - 80% **B**; 3,5 - 5,0 min 80% **B**;
- temperatura kolumny: 25°C;
- objętość wprowadzanej próbki: 5 μ l;
- detekcja: UV-Vis DAD: λ_{PLP} 348 nm, λ_{PN} 290 nm, $\lambda_{PL, PM}$ 328 nm;
- czas analizy: 5 min.

ZADANIE 3.

Przeprowadzenie analizy chromatograficznej próbek z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP - HPLC).

Warunki chromatograficzne:

- kolumna chromatograficzna: Zorbax SB-C18 (150 × 4,6 mm; 5,0 μm);
- faza ruchoma: **A)** 50 mmol/l bufor fosforanowy pH 2,4 **B)** ACN, początkowy skład eluentu A:B, 95:5 (v:v);
- prędkość przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min;
- elucja izokratyczna;
- temperatura kolumny: 25°C;
- objętość wprowadzanej próbki: 5 μl;
- detekcja: UV-Vis DAD: λ_{PLP} 348 nm, λ_{PN} 290 nm, λ_{PL, PM} 328 nm;
- czas analizy: 5 min.

Ogólny schemat działania:

Pamiętaj, aby na każdym etapie wykonywania ćwiczenia postępować zgodnie ze wskazówkami prowadzącego zajęć.

1. Włączenie chromatografu cieczowego Agilent Technologies 1220 Infinity lub Hewlett-Packard 1100 oraz zainstalowanie kolumny chromatograficznej;
2. kondycjonowanie kolumny chromatograficznej (**ZADANIE 2.** Kinetex HILIC, **ZADANIE 3.** Zorbax SB-C18) początkowo w układzie H₂O:ACN a następnie 50 mmol/l bufor fosforanowy pH 2,4: ACN;
3. ustawienie parametrów metody oraz sekwencji;
4. przeprowadzenie analiz chromatograficznych przygotowanych wcześniej próbek;
5. zakończenie pracy, w tym wymycie z układu chromatograficznego buforu oraz przygotowanie kolumny chromatograficznej do dłuższego przechowywania.

4. Opracowanie wyników

- a) Zinterpretować otrzymane wyniki przeprowadzając analizę jakościową zarejestrowanych sygnałów analitycznych, wyniki należy zestawić w tabeli której wzór zamieszczono poniżej:

Analit	Czas martwy [min]	Czas retencji [min]	A [mAu×s]	H [mAu]	W _{h1/2} [min]	Symetria pików
PN						
PL						
PM						
PLP						

- b) wyznaczyć wartości podstawowych parametrów retencyjnych tj. czas retencji substancji niezatrzymanej tzw. czas martwy (t_M), całkowity czas retencji (t_R), zredukowany czas retencji (t_R') oraz wartość współczynnika retencji (k) chromatografowanych substancji;
- c) wyznaczyć wartości wybranych wielkości charakteryzujących selektywność oraz sprawność układu chromatograficznego tj. współczynnika rozdzielania (α), rozdzielczości pików (R_s) oraz liczbę półek teoretycznych (N), jeżeli jest to możliwe.

Ponadto poprawnie przygotowane sprawozdanie z wykonanego ćwiczenia powinno zawierać:

1. Tabelę, w której zestawione zostaną wyznaczone wartości podstawowych parametrów retencyjnych oraz wielkości charakteryzujących selektywność i sprawność układu chromatograficznego;
2. przykładowe chromatogramy próbek wodnych roztworów standardów PN, PM, PL i PLP oraz ich mieszaniny o stężeniu 100 nmol/ml, przygotowanych w wodzie oraz 0,2 mol/l buforze fosforanowy o pH 7,4;
3. wnioski końcowe.

Proponowana literatura

1. Z. Witkiewicz, J. Kałużna-Czaplińska, Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2015.
2. W. Szczepaniak, Metody instrumentalne w analizie chemicznej, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2015. (Część IV, Rozdziały: 14, 16 i 17).