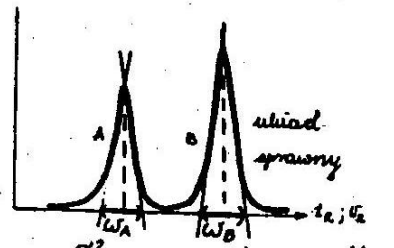
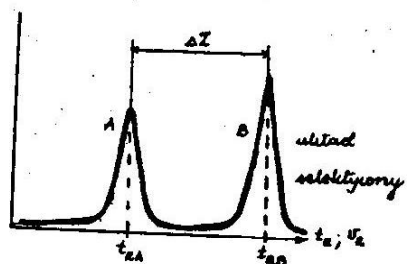
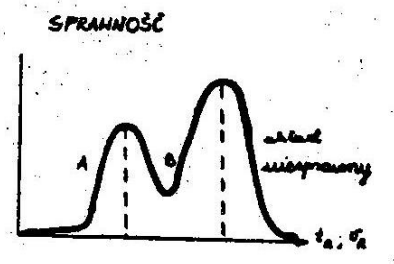
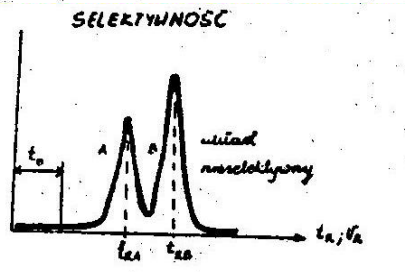


Techniki Rozdzielania

- *ostatni wykład – powtórzenie z rozszerzeniem -*

M. Kamiński

Gdańsk, 2015



$$t_{RA} \neq t_{RB}; v_{RA} \neq v_{RB}; K_A \neq K_B$$

$$H = \frac{G^2}{L}; H = \frac{L}{N}; h = \frac{H}{dp}$$

$$v_R = F \cdot t_R$$

$$K_A = \frac{C_A(s)}{C_A(m)}; K_B = \frac{C_B(s)}{C_B(m)}$$

$$N_{ef} = N \left(\frac{k'}{k'+1} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R - t_0}{W} \right)^2$$

$$k' = K \frac{v(s)}{v(m)} \quad \text{ilość substancji w fazie stałej} / \text{ilość substancji w fazie ciekłej}$$

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

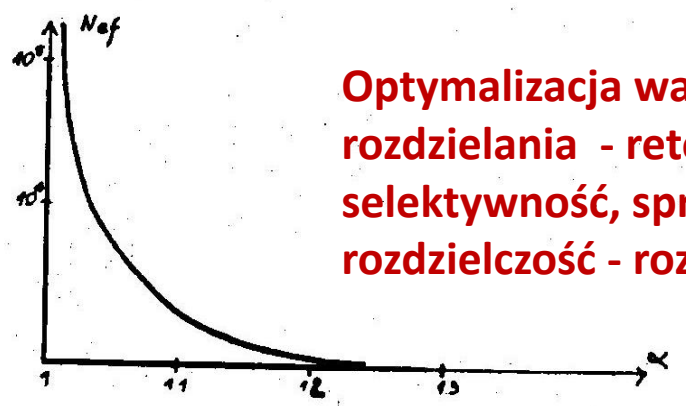
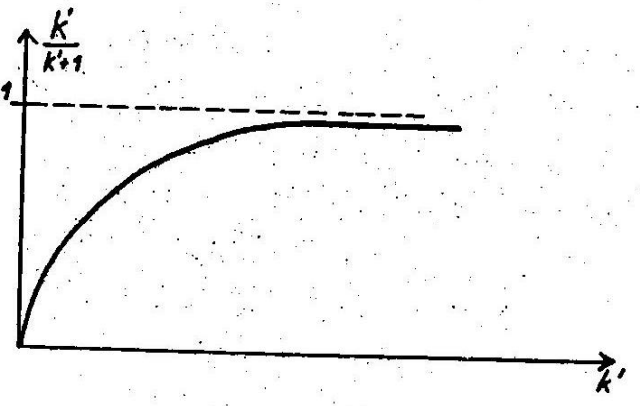
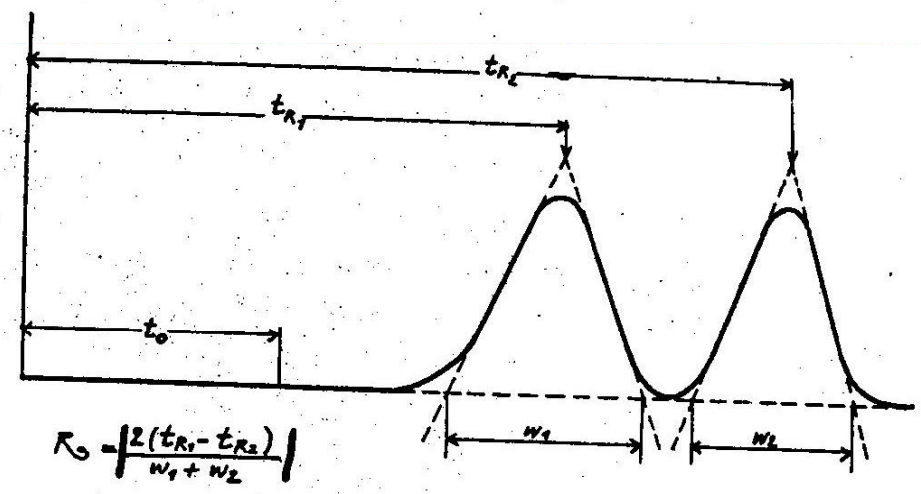
$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{K_B}{K_A} = \frac{t_{RB} - t_0}{t_{RA} - t_0}$$

HARUNEK ROZDZIAKU → $R_s \gg 1$

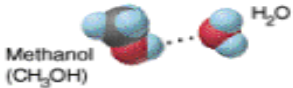
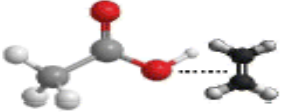
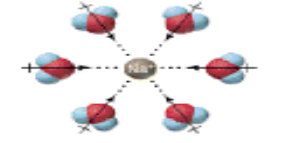
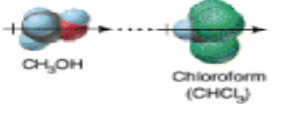
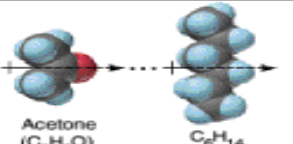
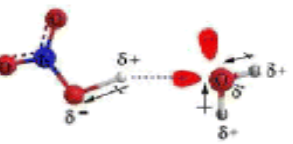
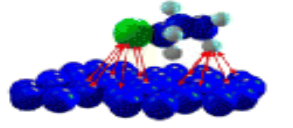
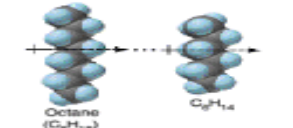
$$R_s = \frac{t_{RB} - t_{RA}}{\frac{1}{2}(W_A + W_B)} = \frac{\Delta Z}{\frac{1}{2}(W_A + W_B)} \quad \text{--- ①}$$

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_B}{k'_B + 1} \right) \sqrt{N} \quad \text{--- ②}$$

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \sqrt{N_{ef0}} \quad \text{--- ③}$$



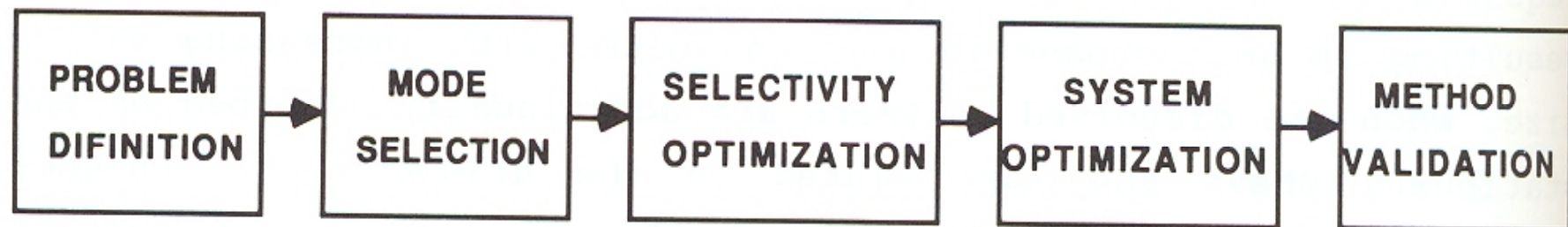
Optimalizacja warunków rozdzielania - retencja, selektywność, sprawność, rozdzielczość - rozdzielanie

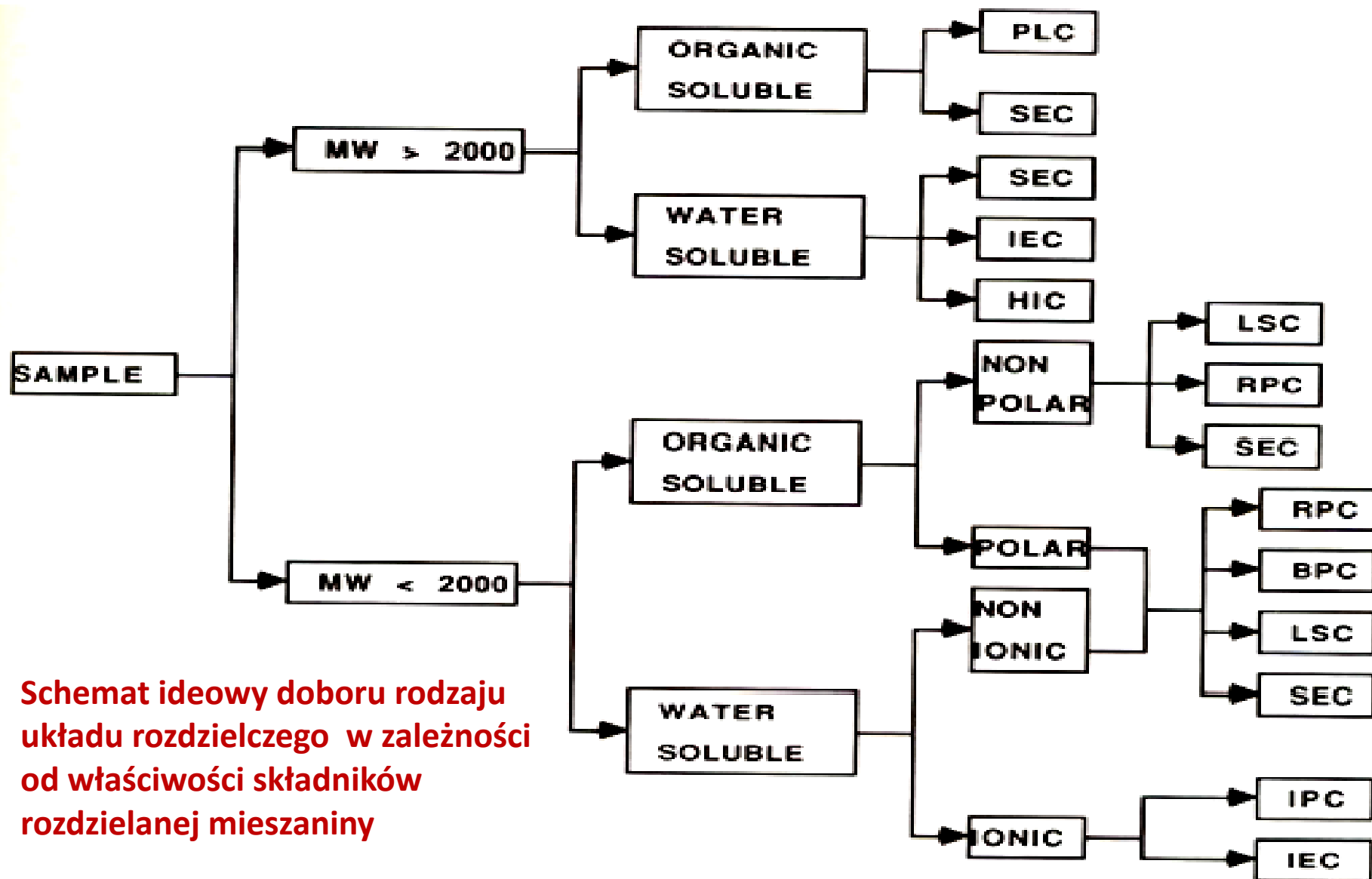
Type of interaction		Characterization	Energy [kJ·mol ⁻¹]	Example system
Chemical interactions	Hydrogen bonding	formed between hydrogen of the protodonor group and atom being hydrogen acceptor, can be formed within the same molecule, as well as between two different	- (4 - 17)	 Methanol (CH ₃ OH)
	Donor – acceptor interactions	occurs between pairs of electron donor (Lewis base) and acceptor (Lewis acid)	- (4 - 17)	
Physical interactions	Ion – dipole	ion acts on electrically neutral molecule; leads to a multicomponents	- (4 - 17)	
	Dipole – dipole	force between two electrically neutral particles, but having determined dipole moments	- (4 - 17)	 CH ₃ OH Chloroform (CHCl ₃)
	Dipole-induced dipole	forces between the molecule possesses clear dipole moment and non-polar molecule	- (4 - 17)	 Acetone (C ₃ H ₆ O) C ₆ H ₁₄
	Temporary dipole-induced dipole	two electrically neutral particles, if they come close together, will attract on the electrostatic forces way	- (4 - 17)	
Intermolecular interactions (Van der Waals forces)		weak forces of attraction between the fragments of individual molecules, declining rapidly with increasing distance between the interacting particles, do not lead to permanent connections	- (2 - 4)	
Hydrophobic interactions		forces operating in the aquatic environment between molecules with low affinity for water	- 4	 Octane (C ₈ H ₁₈) C ₈ H ₁₈

PHYSICAL PROPERTIES OF SOME COMMON SOLVENTS USED IN LIQUID CHROMATOGRAPHY (20°C)

Solvent	Boiling Point (°C)	Viscosity (cP)	Refractive Index	UV Cut-off (nm)	Dielectric Constant	Dipole Moment (D)	Surface Tension (dyne/cm)
Hexane	69	0.30	1.375	195	1.89	0.08	18.4
Carbon Tetrachloride	77	0.97	1.460	263	2.24	0.0	26.8
Benzene	80	0.65	1.501	278	2.28	0.0	28.9
Diethyl Ether	35	0.24	1.352	218	4.30	1.15	17.1
Methyl tert.-Butyl Ether	55	0.27	1.369	210	---	1.32 (a)	19.4 (a)
Dioxane	101	1.37	1.422	215	2.25	0.45	34.5 (a)
Tetrahydrofuran	66	0.55	1.407	212	7.58 (a)	1.75 (a)	26.4 (a)
Ethyl Acetate	77	0.45	1.372	256	6.02 (a)	1.88 (a)	23.8
Chloroform	61	0.57	1.446	245	4.81	1.15 (a)	27.2
Dichloromethane	40	0.44	1.424	233	9.08	1.14 (a)	28.1
Acetone	56	0.36	1.359	330	20.70 (a)	2.69	23.3
Acetonitrile	82	0.36	1.344	190	37.50	3.44	19.1
2-Propanol	82	2.40	1.377	205	18.30 (a)	1.66 (b)	21.8 (c)
Methanol	65	0.55	1.328	205	33.60	2.87	22.6
Acetic Acid	118	1.30	1.372	---	6.15	5.15	27.8
Water	100	1.00	1.333	<190	80.37	3.11	73.0

NAJWAŻNIEJSZE ETAPY DOBORU OPTYMALNYCH WARUNKÓW ROZDZIELANIA





Schemat ideowy doboru rodzaju układu rozdzielczego w zależności od właściwości składników rozdzielanej mieszaniny

Figure 4.27 Flow chart for column selection based on sample type (MW = molecular weight). PLC = precipitation-liquid chromatography; SEC = size-exclusion chromatography; IEC = ion-exchange chromatography; HIC = hydrophobic interaction chromatography; LSC = liquid-solid chromatography; RPC = reversed-phase liquid chromatography; BPC = (polar) bonded-phase chromatography; and IPC = ion-pair chromatography.

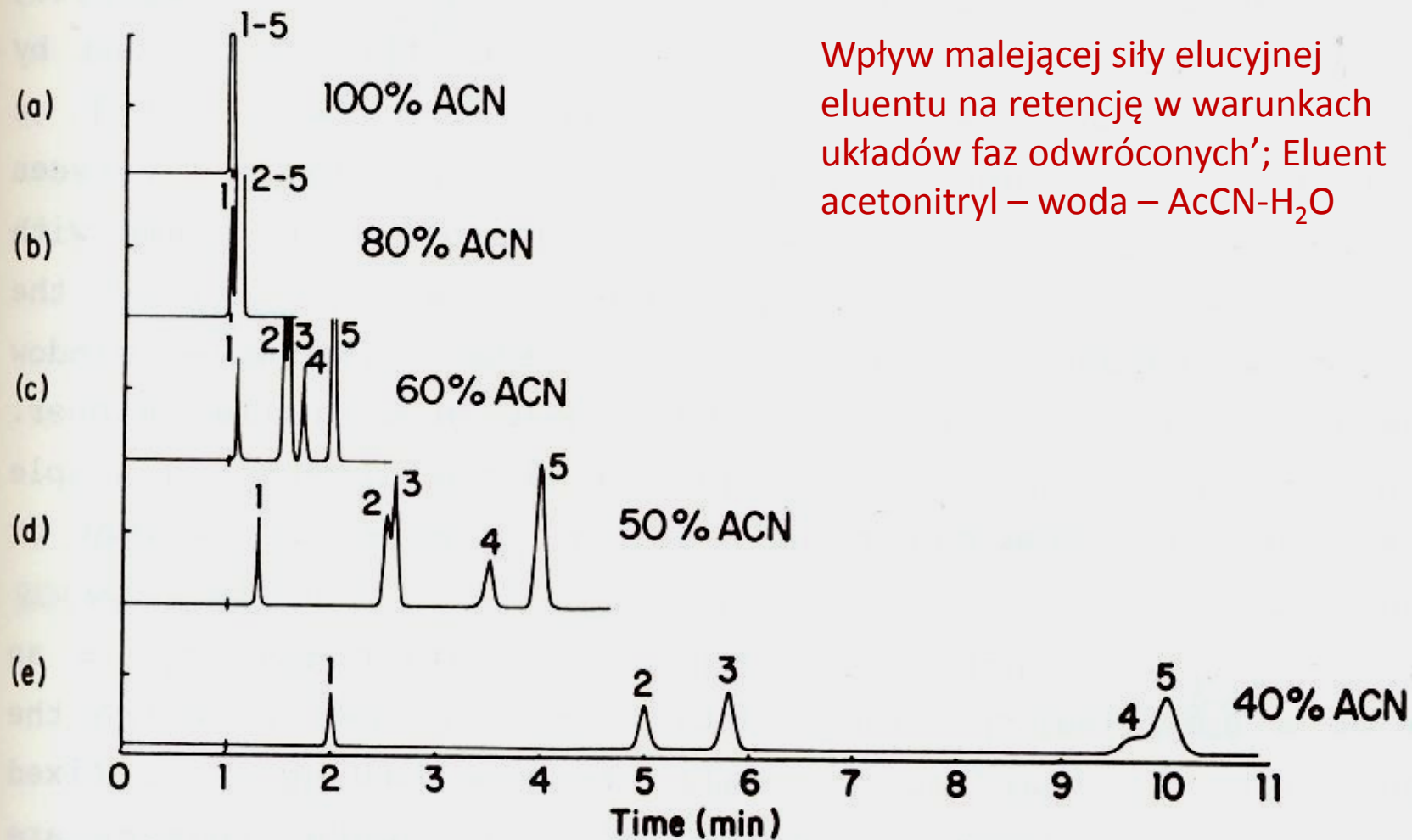
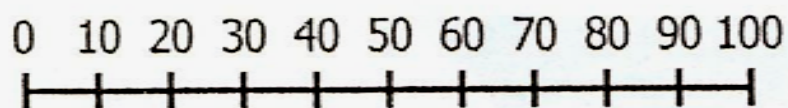


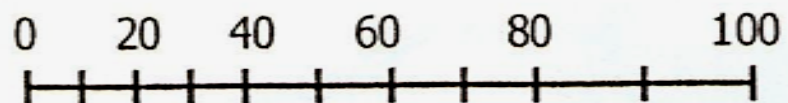
Figure 4.31 Sequential, isocratic elution using a stepwise reduction in solvent strength to identify a binary solvent of acceptable strength for elution of a five component mixture. In this example the column holdup time was 1 min.

Nazwa rozpuszczalnika	Przepuszczalność światła, powyżej ... nm.	Współczynnik załamania światła w 20 ^o 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			

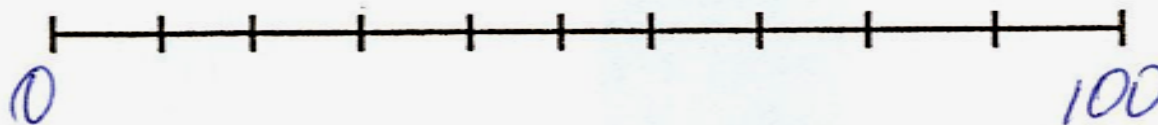
Warunki izoelucyjne, tzn. taka sama siła elucyjna eluentu, mimo różnych składników organicznych fazy ruchomej w warunkach odwróconych układów faz - RP



ACN/H₂O



MeOH/ H₂O



THF/H₂O

Nieliniowe zmiany lepkości mieszanin polarnych składników cieczy organicznych z wodą

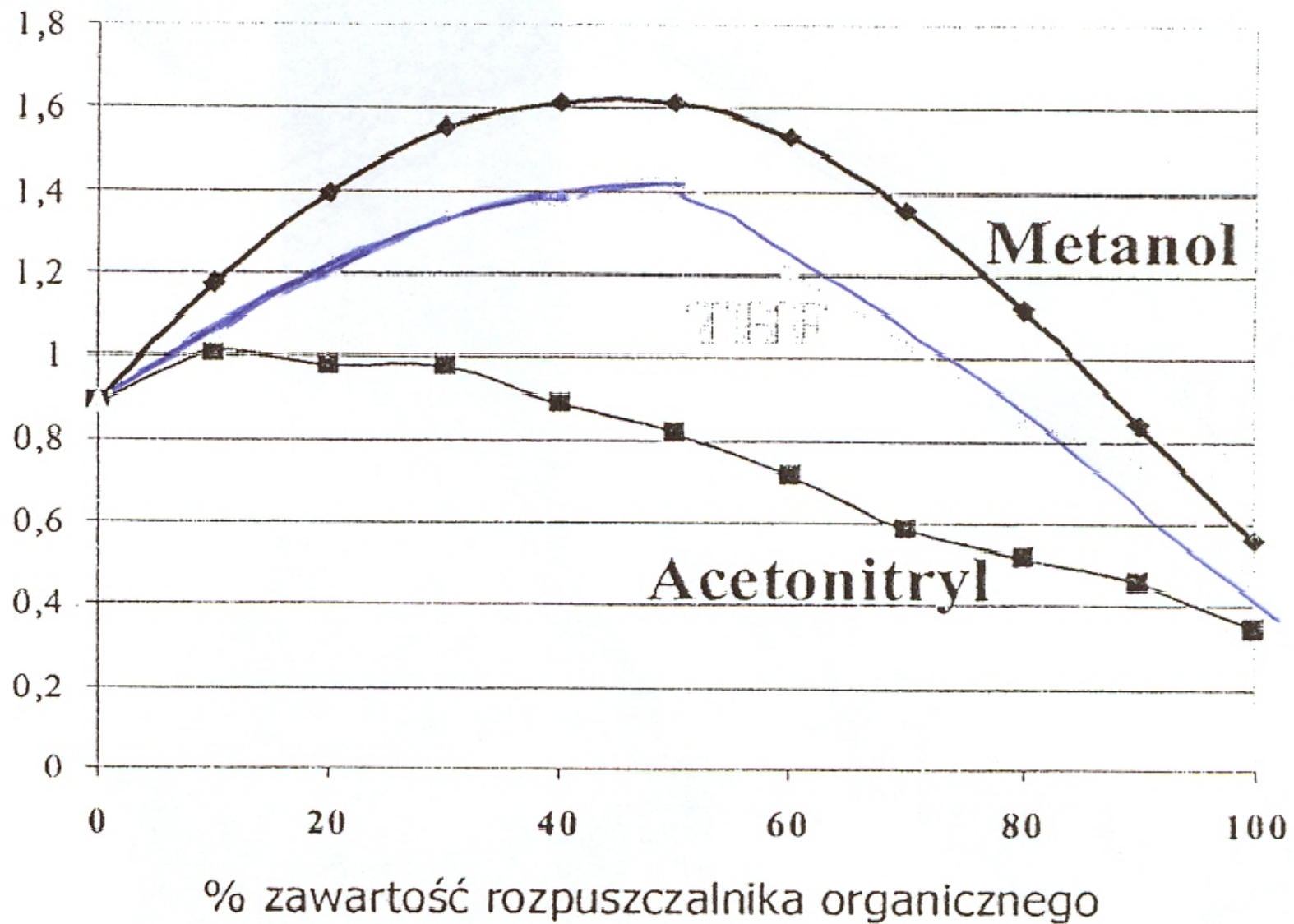
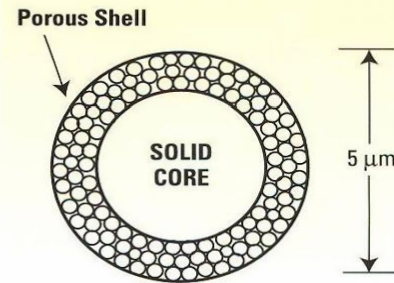




Figure 2
High Efficiency at High Flow Rates



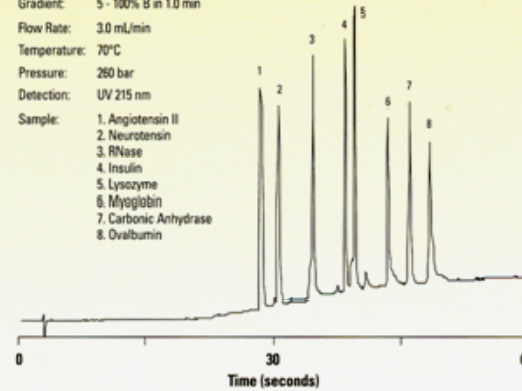
The Poroshell 300SB-C18 particle is a revolutionary chromatography media — superficially porous particles — that produce very fast, high resolution, RP-HPLC separation of proteins, DNA and other macromolecules. Poroshell works well for high resolution of macromolecules because of the rapid mass transfer in and out of the thin porous shell bonded phase. Mass transfer for macromolecules on comparable, completely porous particles, is slower due to the increased path the macromolecule must travel.



Rozdzielanie peptydów i białek z elucją gradientową i szeroko porowatym sorbentem
CSP Core Surface Particles (RP)

Figure 3
Fast, High Resolution Separation of Peptides and Proteins with Poroshell 300SB-C18 ... in Seconds

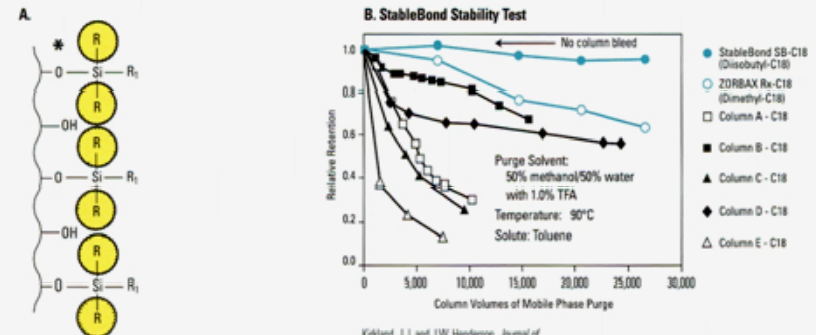
Column: Poroshell 300SB-C18
2.1 x 75 mm
Mobile Phase: A: 0.1% TFA
B: 0.07% TFA in ACN
Gradient: 5 - 100% B in 1.0 min
Flow Rate: 3.0 mL/min
Temperature: 70°C
Pressure: 260 bar
Detection: UV 215 nm
Sample: 1. Angiotensin II
2. Neurotensin
3. RNase
4. Insulin
5. Lysozyme
6. Myoglobin
7. Carbonic Anhydrase
8. Ovalbumin



Separation between solutes indicates good peak capacity for rapidly separating complex samples.

Kirkland, J.J., *Journal of Chromatographic Science*, 38 (2000) 535-544.

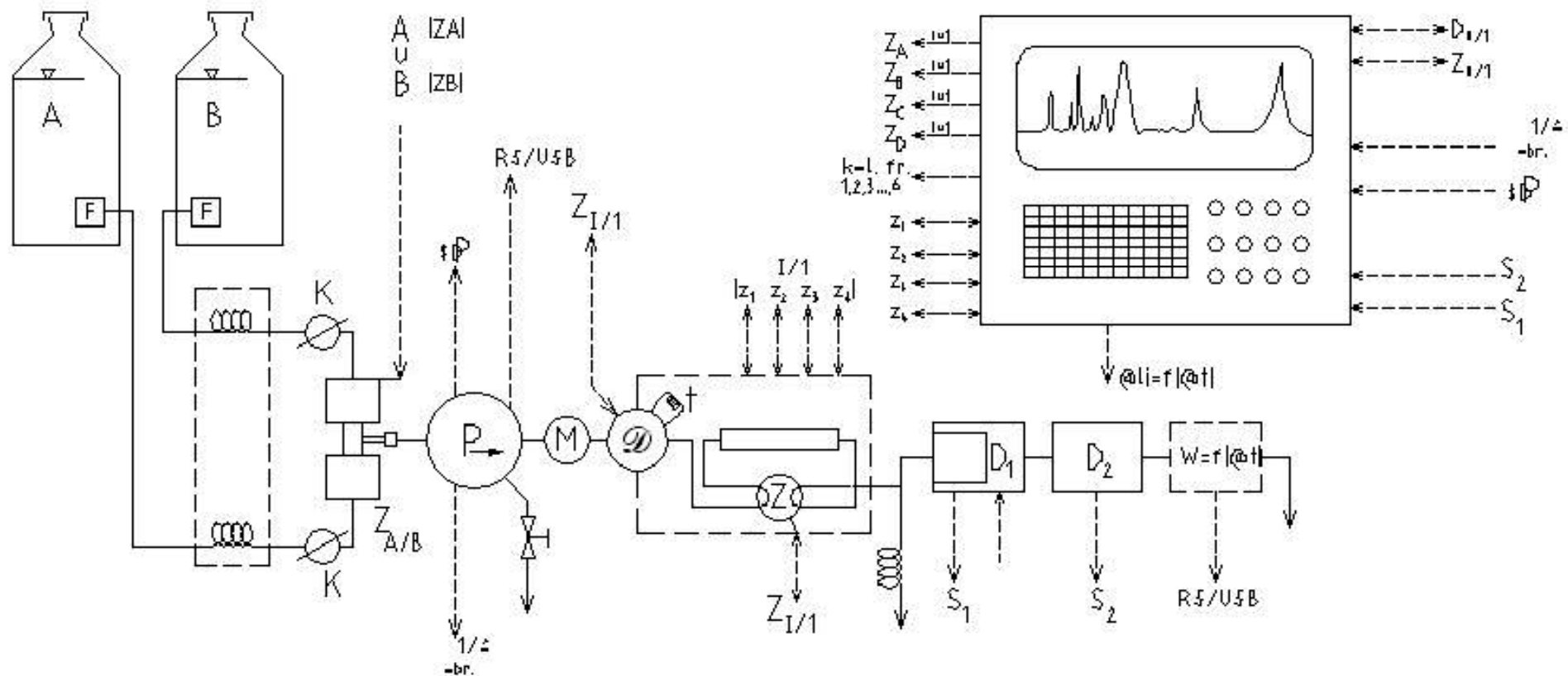
Figure 4
Excellent for LC/MS, Poroshell 300SB-C18 Uses StableBond Chemistry to Minimize Column Bleed at Low pH



Kirkland, J.J. and J.W. Henderson, *Journal of Chromatographic Science*, 32 (1994) 473-480.

At low pH, reversed phase bonded phases silica break down by hydrolyzing the siloxane bond* (Figure 4A). This breakdown can be almost entirely eliminated by using bulky silanes shown above in StableBond RP-HPLC bonding chemistry.

Poroshell 300SB-C18 is bonded with StableBond surface chemistry employed in the widely used ZORBAX SB and 300SB columns. StableBond columns can be used at low pH with unsurpassed stability for difficult separations — even at high temperatures.



Schemat ideowy aparatu HPLC, m.in. - z tzw. niskociśnieniowym systemem gradientowym (programowania składu eleuentu, złożonego z dwóch składników A i B, z trzydrogowym zaworem proporcjonującym ($Z_{A/B}$), zaworem dozującym z pętlą (D) oraz zaworem przepływu zwrotnego eluentu w kolumnie (Z))

NP-HPLC - rozdzielanie grupowe składników benzyn z elucją wsteczną w kolumnie (E-BF *Eluent Back-Flush*) i detekcją refraktometryczną (RID). Ma miejsce elucja wsteczna MTBE / EtOH w nC6, mimo zasadniczych różnic polarności tych związków chemicznych (ujemne piki od niższej wartości RI od eluentu)

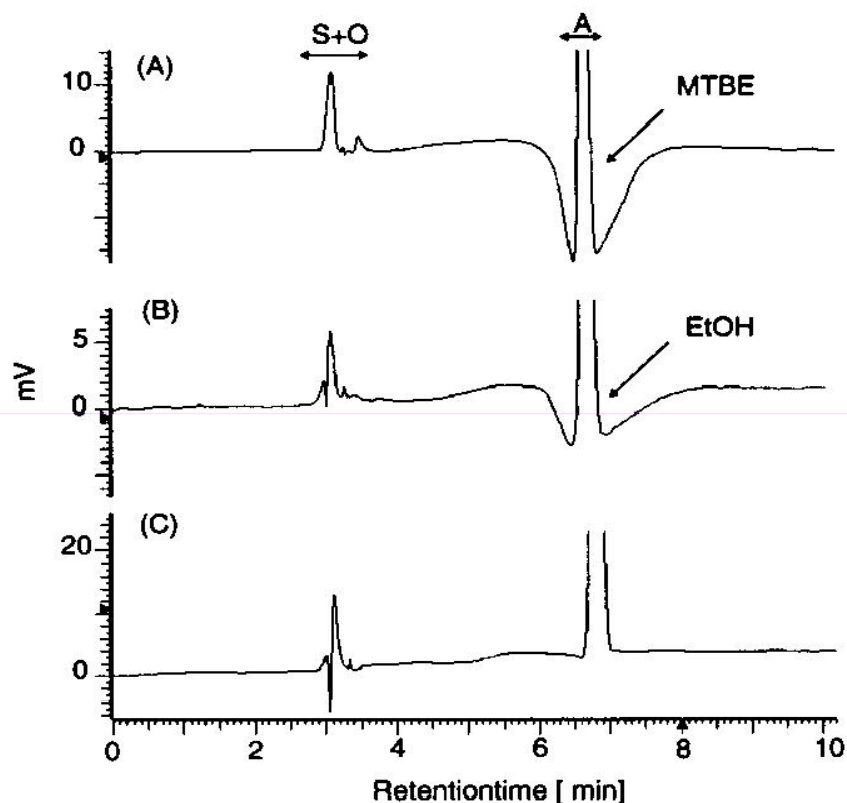


Fig. 3. Chromatograms obtained with RID for gasolines with various content of oxygenates: (A) gasoline with 10% (v/v) MTBE; (B) gasoline with 0.6% (v/v) EtOH and (C) gasoline without oxygenates. Chromatographic conditions: as described in Section 2; backflush (BF) 3 min 25 s; eluent: *n*-hexane. Peak assignment as in Fig. 2.

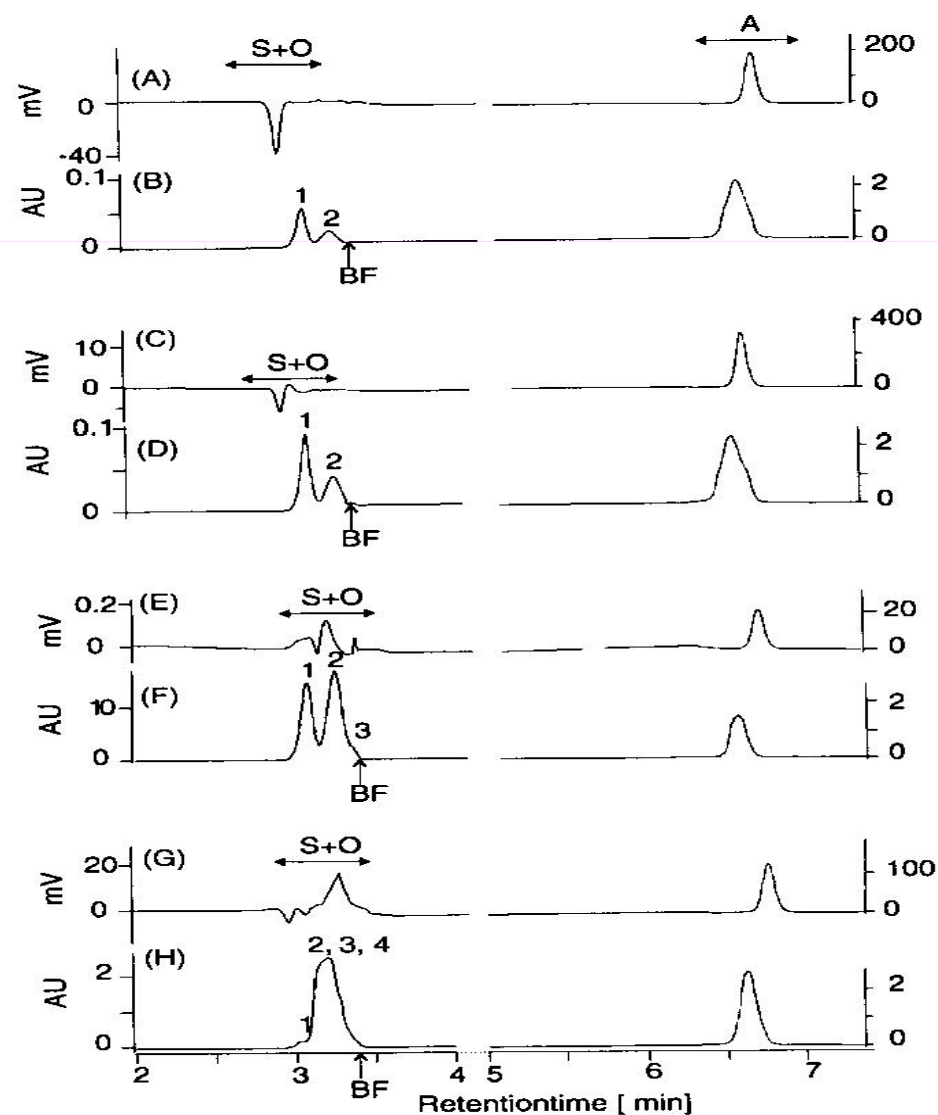
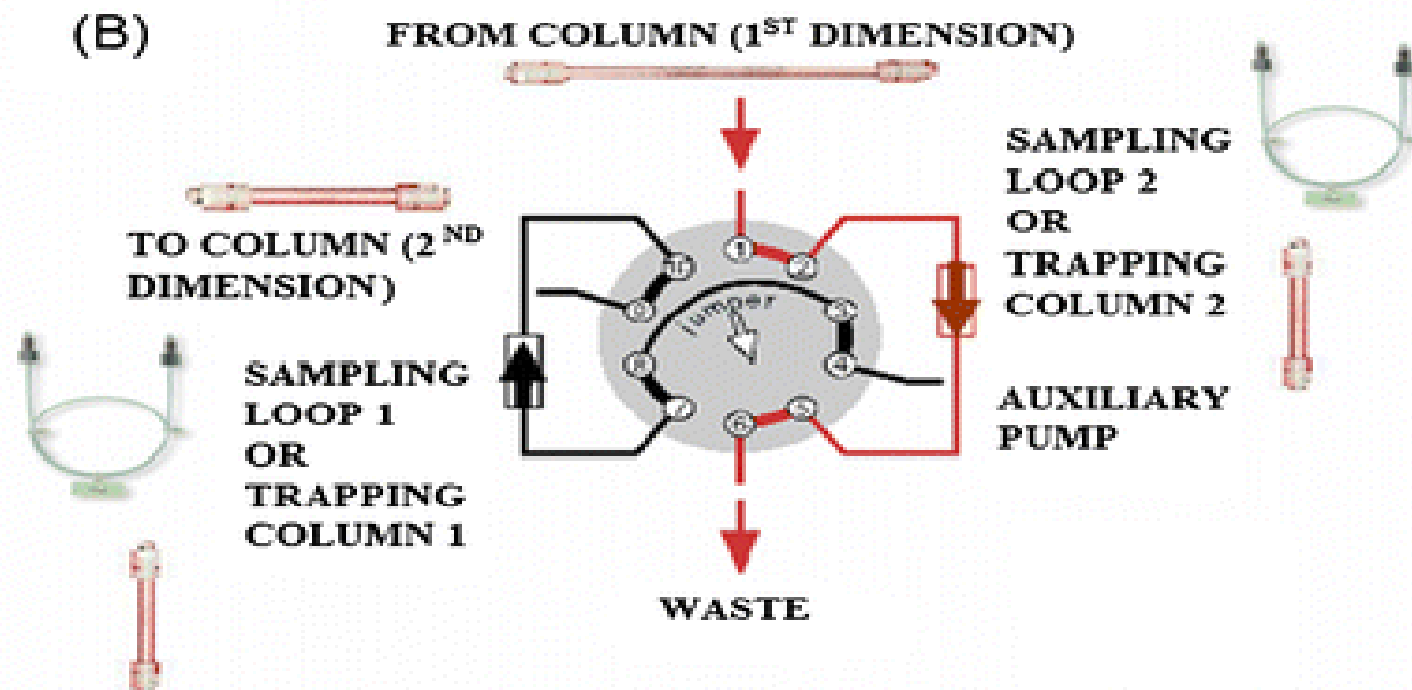
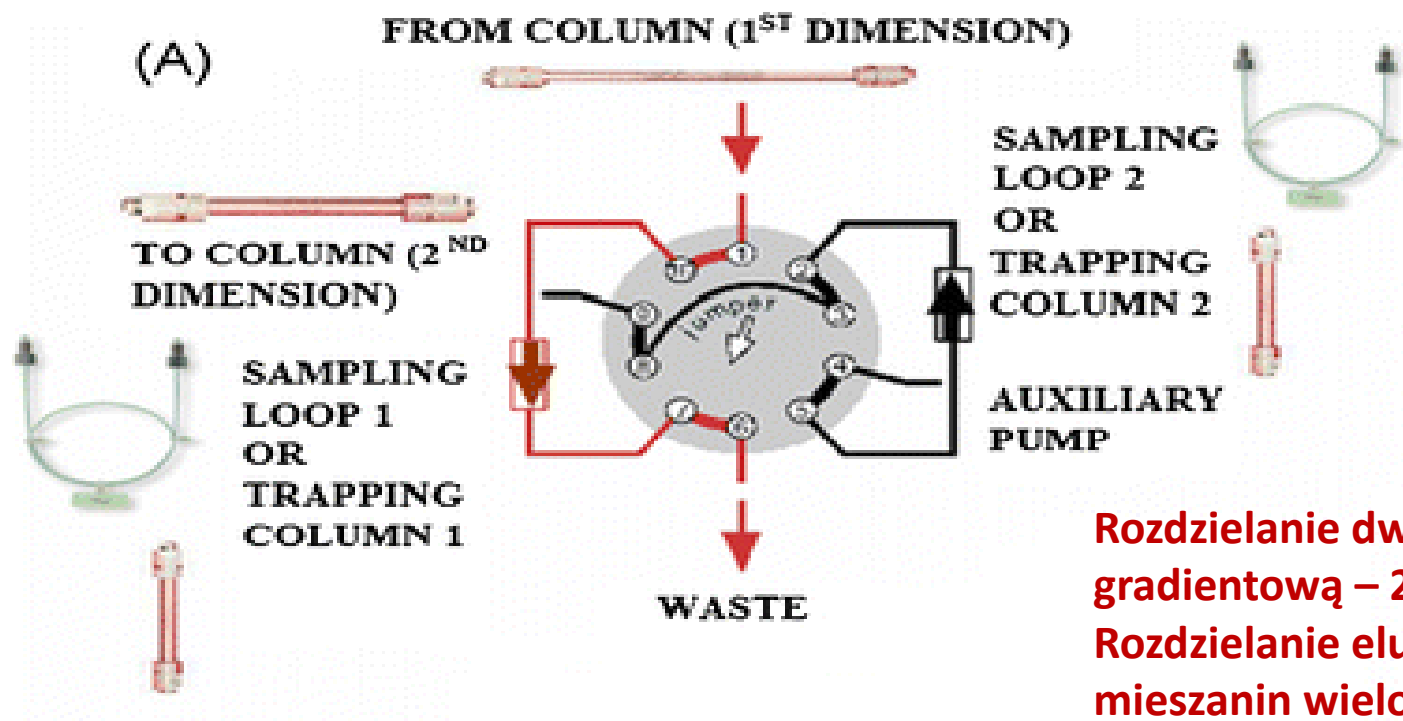
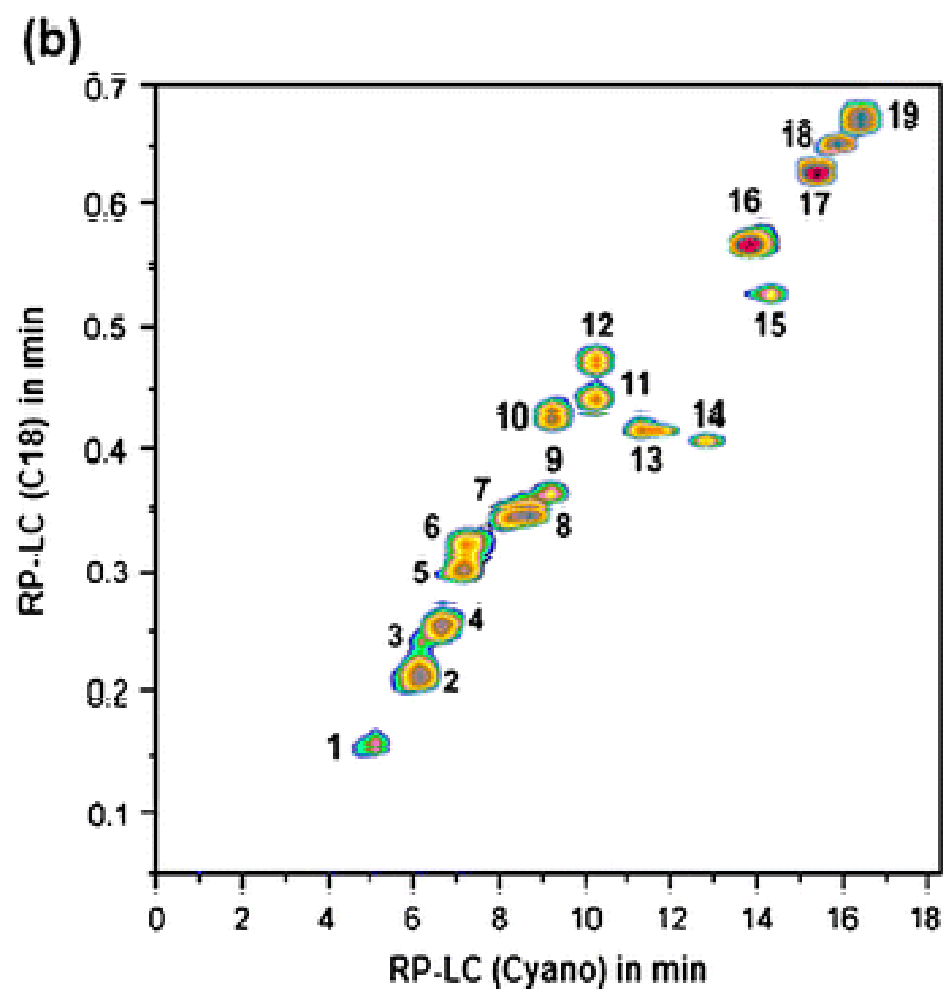
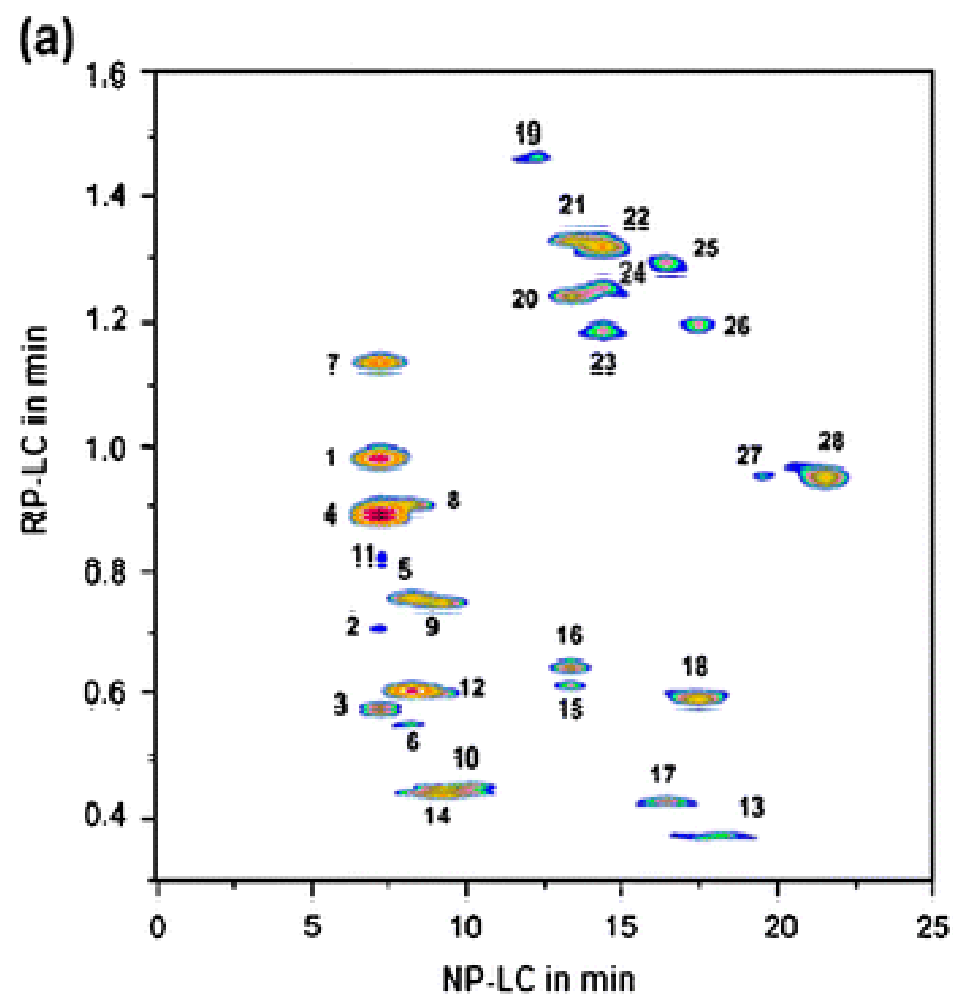
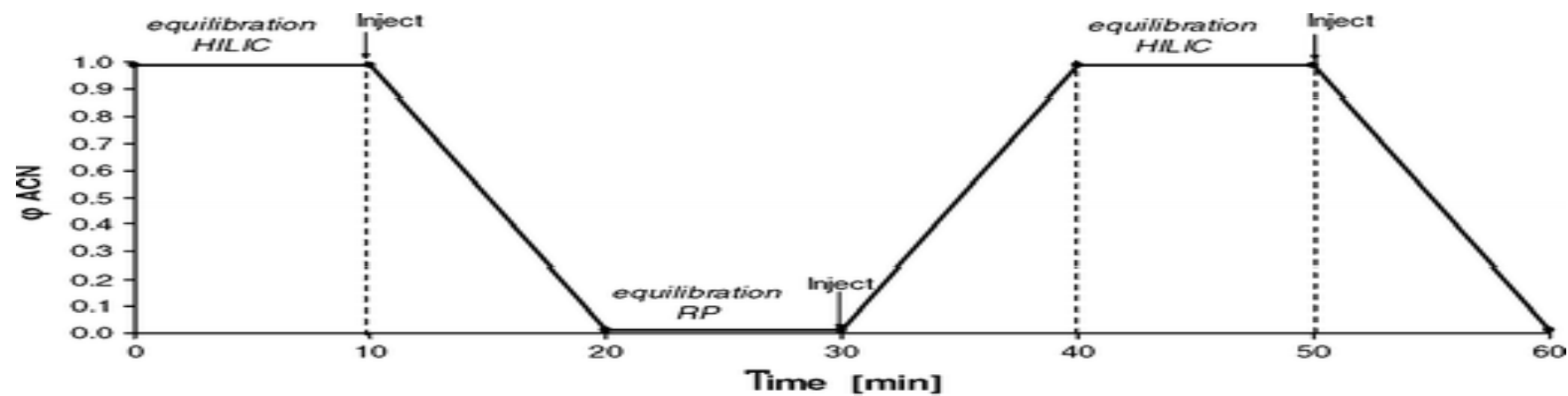
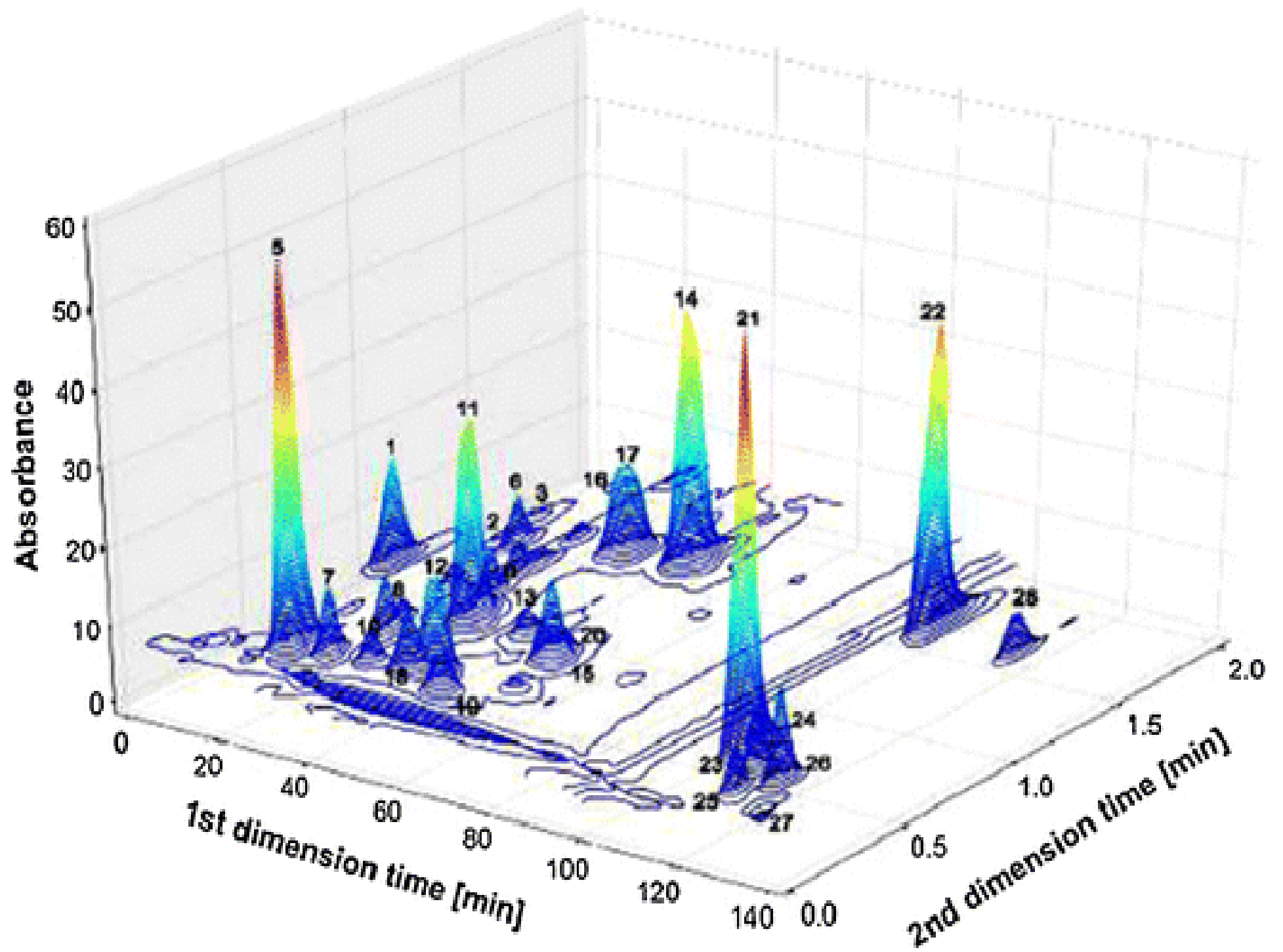
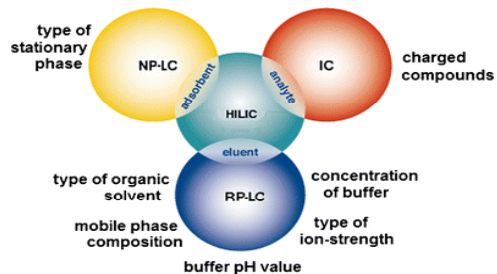


Fig. 2. Chromatograms of gasoline (A and B), gasoline components: product of continuous catalytic reforming—CCR (C and D); product of fluid catalytic cracking—FCC (E and F) and pyrocondensate (G and H). Chromatographic conditions: as described in Section 2; backflush (BF) 3 min 25 s; eluent: *n*-heptane. Chromatograms A, C, E and G were obtained using a refractive index detector, while chromatograms B, D, F and H were obtained using DAD in the integration mode over the range 207–240 nm. Peaks: S + O—saturates + alkenes, elution range 2.9–3.4 min; A—aromatic hydrocarbons, elution range 6.3–6.8 min; 1, monoalkenes; 2, isolated dienes; 3, conjugated dienes; 4, trienes and polyenes (including those with conjugated bonds).







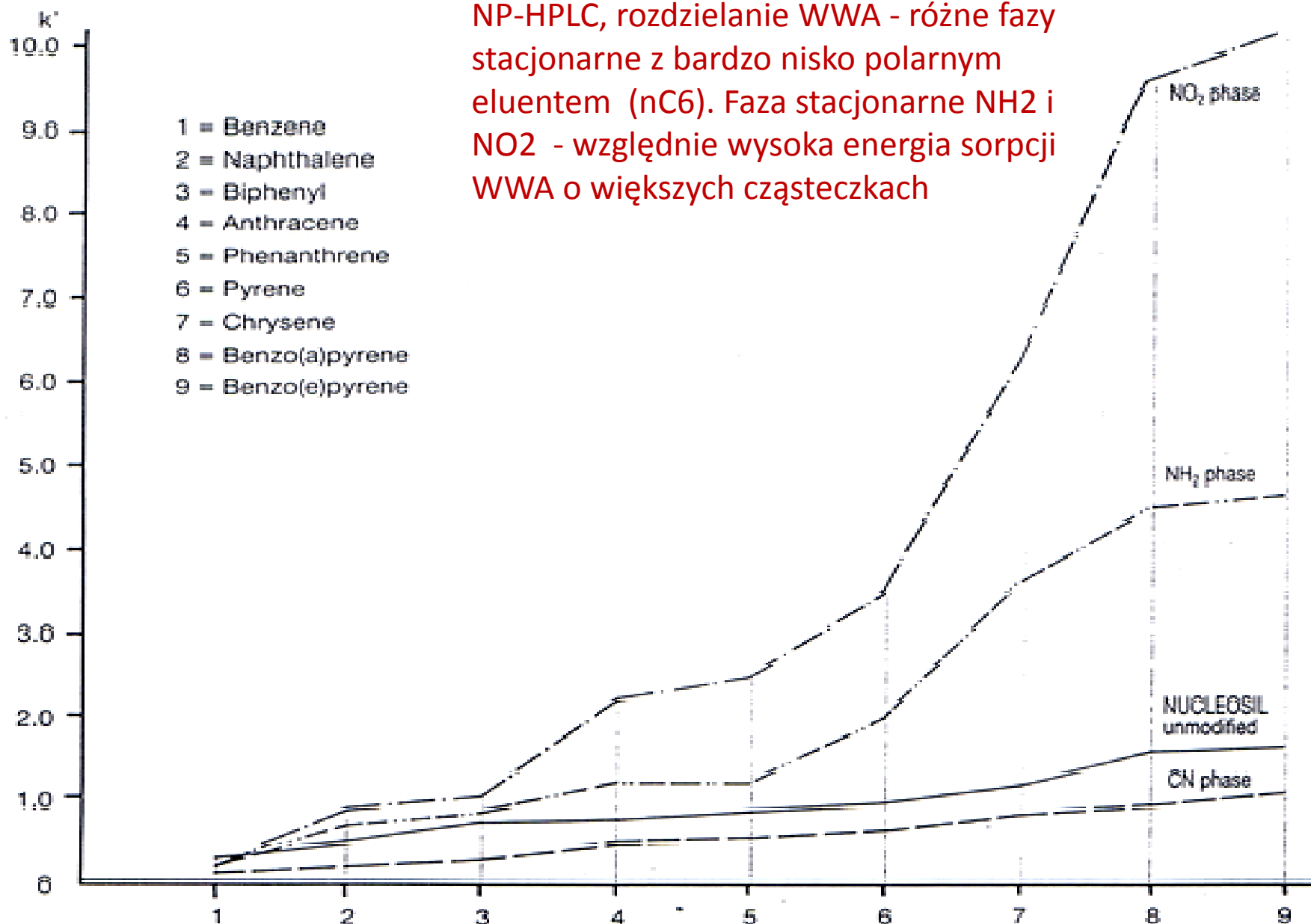


Ta sama faza stacjonarna może służyć w warunkach RP, NP, HILIC (!)

Packing materials	Structure of stationary phase
polyethylene glycol/silica (HS PEG)	
"click" β-cyclodextrin	
"click" saccharides ("click" maltose)	
"click" dipeptide	
zwitterionic sulfobetaine bonded phases (ZIC-HILIC)	
cationic exchangers bonded phases	
mix-mode RP/anionic exchangers bonded phases	

Packing materials	Structure of stationary phase
underivatized silica stationary phases that contain functional groups such as siloxanes, silanols with (or without) a small quantity of metals	<p>Siloxan</p> <p>Silanol</p>
DIOL bonded phases	
cyano bonded phases	
amino bonded phases	
alkylamide	
amide bonded phases	
mix-mode	
polymeric structures of poly(succinimide) derivatives	

NP-HPLC, rozdzielanie WWA - różne fazy stacjonarne z bardzo nisko polarnym eluentem (nC6). Faza stacjonarne NH₂ i NO₂ - względnie wysoka energia sorpcji WWA o większych cząsteczkach



The chromatographic system

A HILIC separation system is essentially instrumentally identical to RPLC systems. Because of the similarities to RPLC in mobile phase conditions, it can be tempting to apply the same routines for preparation of, for example, samples and wash solutions also for HILIC. This will definitely lead to problems for the chromatographer. The succeeding sections therefore treat the most critical parts of the HILIC separation system and contain guidelines for its successful operation while describing the theories behind the advices.

The column

HILIC columns contain a stationary phase that is hydrophilic and quite often also charged, at least in some region of the pH-scale. Compounds separating on the column interact with the stationary phase, and is generally more strongly retained the more hydrophilic the compound is. Unlike most other chromatographic techniques, part of the mobile phase is an integral part of the stationary phase (as outlined below), wherefore it is crucial to keep the water concentration in the eluent within certain limits. Typically the water fraction should be ~3-60%.

HILIC retention characteristics

Under HILIC conditions, a water-enriched liquid layer will be established within the stationary phase. The separation is achieved by partitioning of solutes from the eluent into this hydrophilic environment (see Figure 3), a process that typically is exothermic. Hence, both hydrogen bonding, the extent of which depends on the acidity or basicity of the solutes, and dipole-dipole interactions, which depend the dipole moments and polarizability of the solutes, are factors governing retention. The primary function of HILIC stationary phases is thus to bind water. However, with any of the charged HILIC stationary phases available, the retention will also be influenced by electrostatic (ionic) interactions,

as illustrated in Figure 3 for a zwitterionic stationary phase.

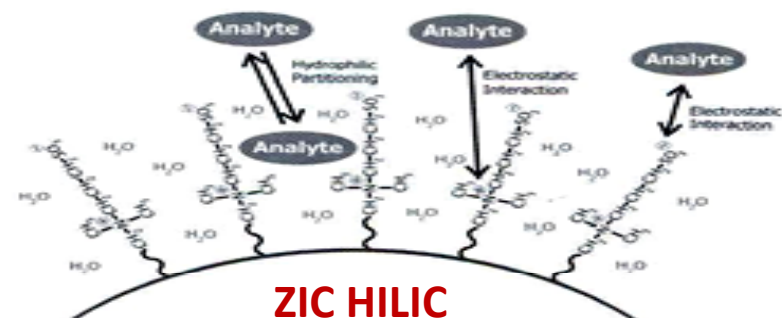


Figure 3: The retention processes in HILIC illustrated by hydrophilic partitioning, and electrostatic interactions with either positive or negative charges.

Secondary interactions

Although of limited importance for the primary HILIC retention, charged stationary phases adds a second, very significant, dimension of selectivity due to the opportunities of electrostatic interactions with the analytes. The downside of electrostatic interactions is the need of salts or buffers in the mobile phase to disrupt these interactions for analyte elution. Higher buffer concentrations may be negative to MS detection sensitivity. With zwitterionic stationary phases, however, the electrostatic forces of each charge are partly counterbalanced by the proximity of an ion with opposite charge, i.e., the combined overall effect is weaker electrostatic interactions, see Figure 4.

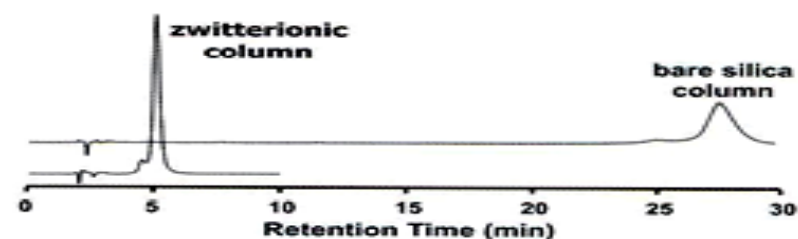
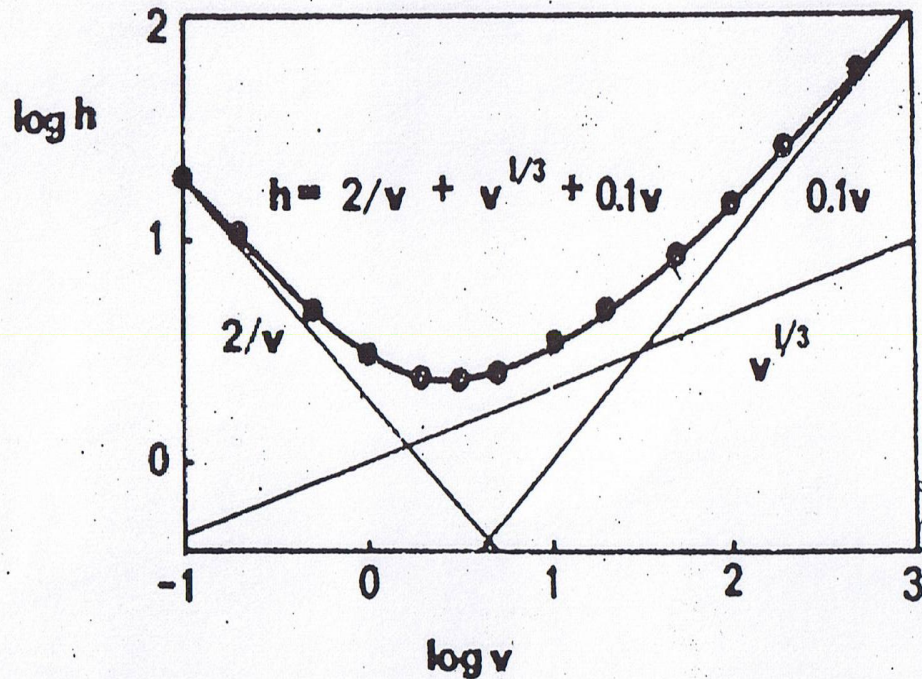


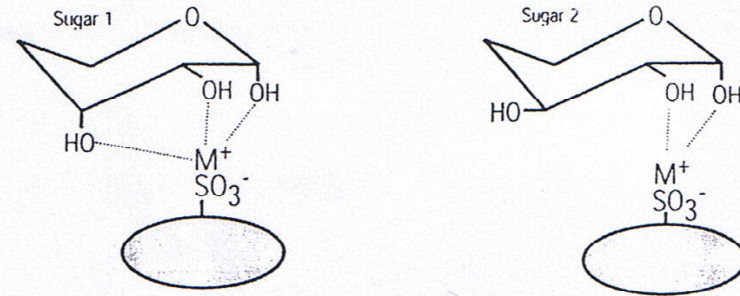
Figure 4: Retention of the peptide bradykinin (pI 12) on different HILIC stationary phases (columns 100x4.6 mm). Eluent: 40% acetonitrile in ammonium acetate buffer (50 mM, pH 6.5).

Ion Exclusion Chromatography

h = f(v)



Mechanisms of Carbohydrate Separations



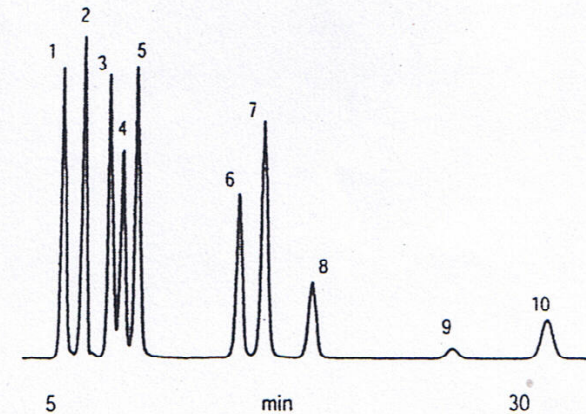
Carbohydrates are separated by ion-exchange, ligand-exchange, and ion-exclusion mechanisms. In this example, sugar 1 would be retained longer than sugar 2 because it has more hydroxyls available for simultaneous interaction with the stationary phase metal ion.

Sugars, Organic Acids, Alcohols

Column: MetaCarb 87H Plus, 300 x 7.8mm
 Order No.: A5215
 Eluent: 0.1N H₂SO₄
 Flow: 0.5 ml/min
 Detection: RI,
 Temp: Ambient

Sample:

1. citric acid
2. tartaric acid
3. glucose
4. malic acid
5. fructose
6. lactic acid
7. glycerol
8. acetic acid
9. methanol
10. ethanol



NP LC - HPLC – TLC

Zależność $\lg(k)=f(X)$ powinna być liniowa,

gdy: X – ułamek molowy składnika bardziej polarnego eluentu dwuskładnikowego

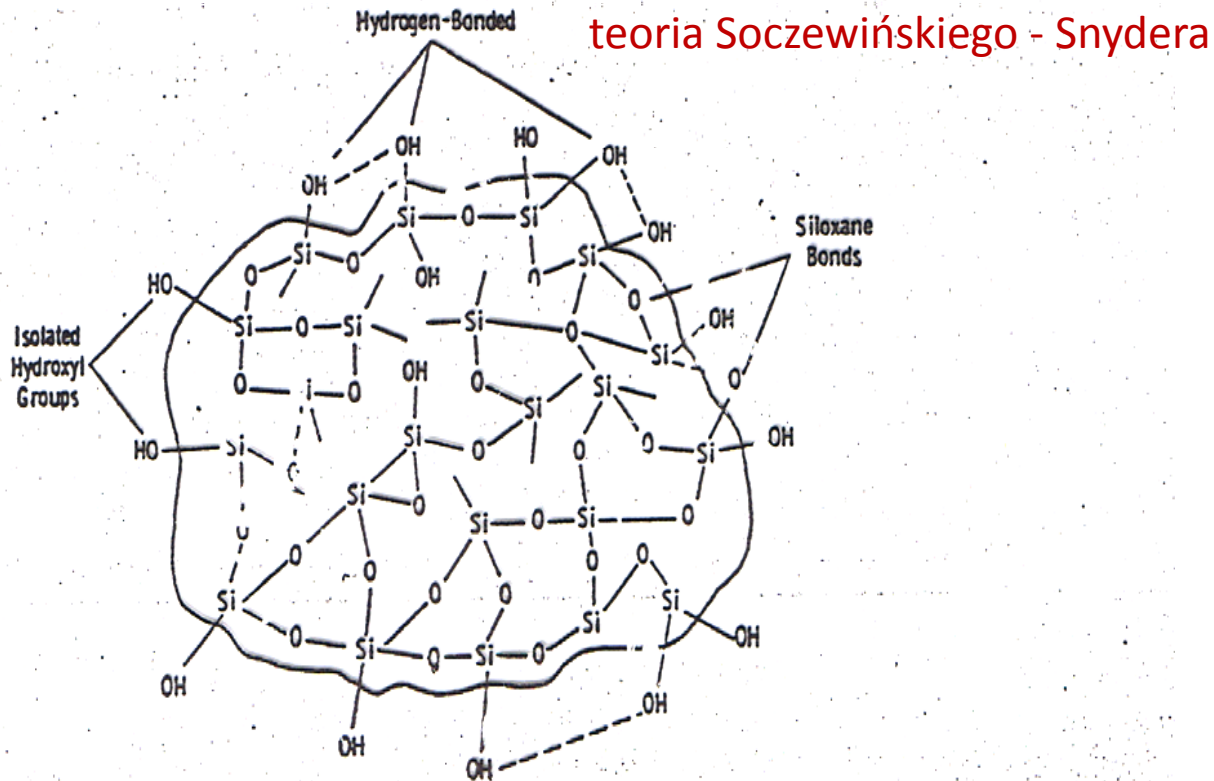
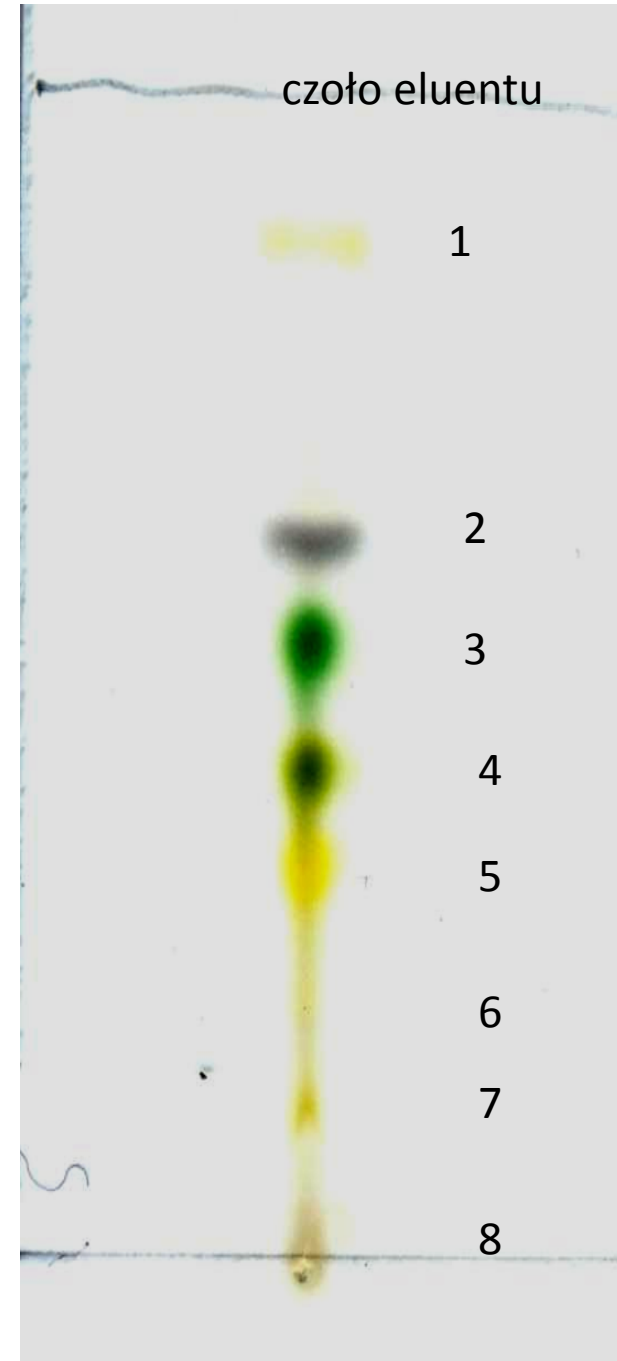
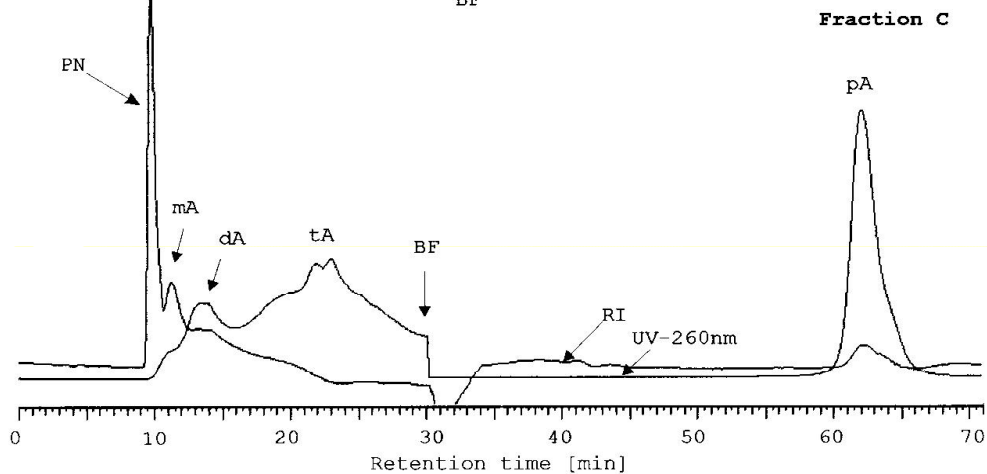
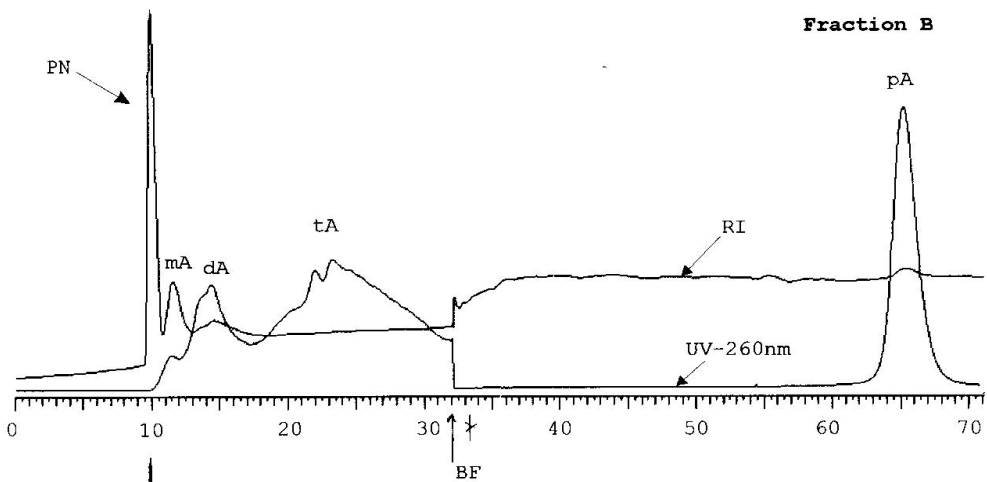
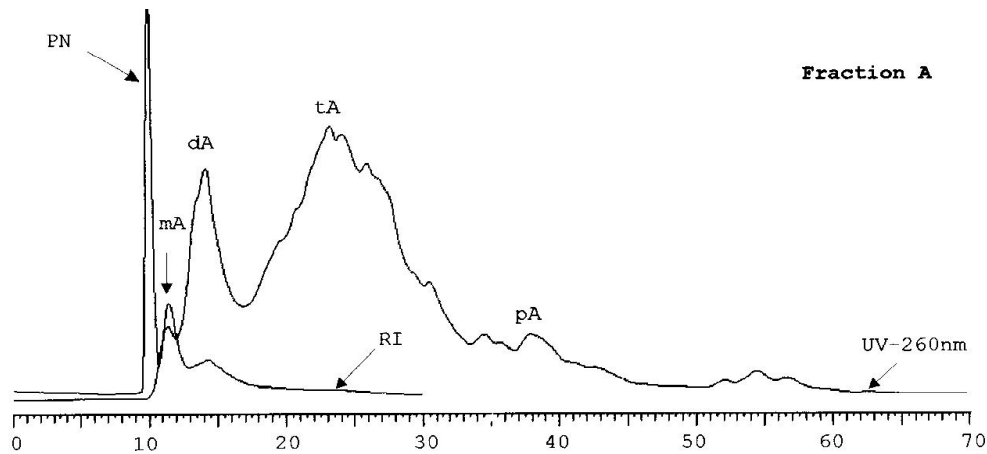


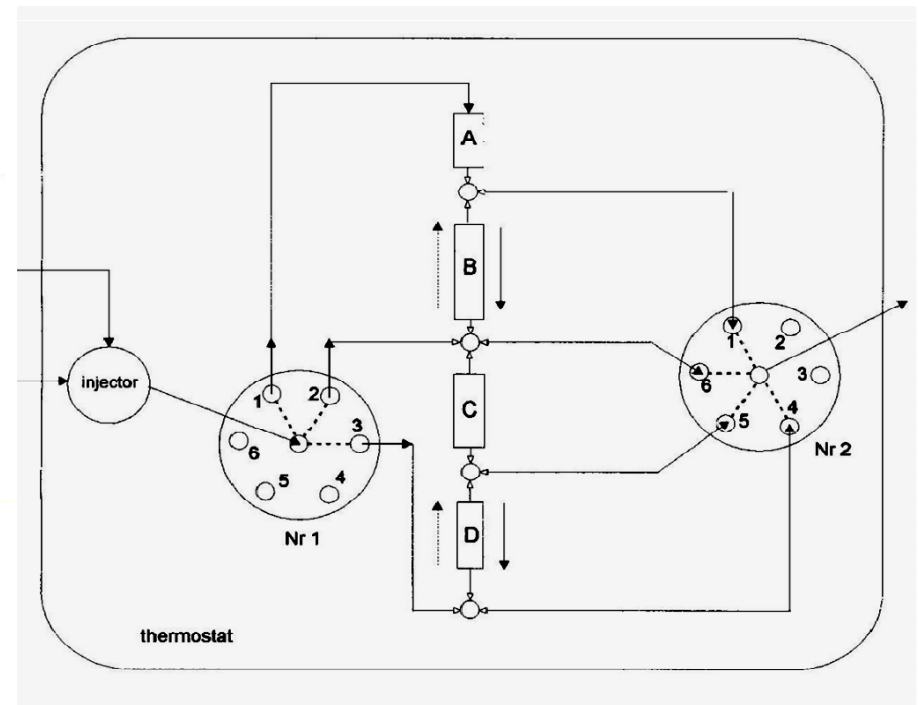
Figure 4.3 Structure of silica gel, depicting the various types of bonds and silanol groups present. (Reproduced with permission from ref. 13. Copyright. Academic Press, Inc.)





NC-NP-HPLC/BF/RID/UV-VIS-DAD

Wielokolumnowe (NC) rozdzielanie grupowe frakcji ropy naftowej z destylacji próżniowej w normalnych układach faz (NP-HPLC) w bezwodnych warunkach adsorpcyjnych, z niepolarnym eluentem (nC6), z detekcją refraktometryczną (RID) oraz fotometryczną (UV-VIS-DAD), z przełączaniem kolumn i z przepływem zwrotnym eluentu w kolumnach (E-BF)



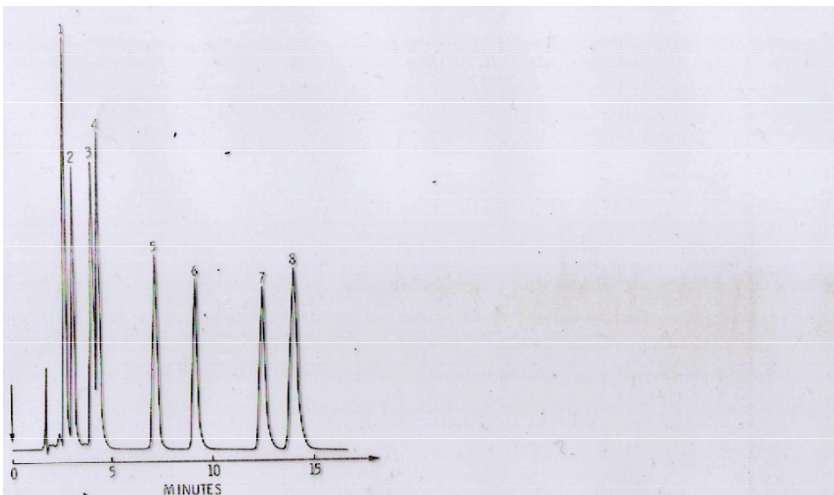
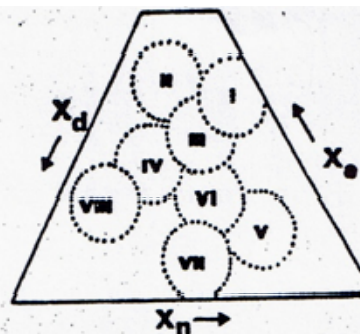


Figure 4.21 Separation of a mixture of aniline derivatives and aromatic alcohols on LiChrosorb Si 60, $d_p = 5 \mu\text{m}$. Mobile phase iso-octane-dichloromethane-isopropanol (900:90:10, v/v/v), flow rate 1.5 ml/min. Peak identification: 1, 2,6-diethylaniline; 2, 2-methyl-6-ethylaniline; 3, o-isopropylaniline; 4, o-ethylaniline; 5, 2-phenyl-2-propanol; 6, o-methylbenzyl alcohol; 7, benzyl alcohol; 8, cinnamyl alcohol.



Rys. 6.1. Klasyfikacja rozpuszczalników na podstawie parametrów selektywności x_d , x_n , x_e , gdzie d , n oraz e opisują odpowiednio oddziaływanie protono-akceptorowe, protono-donorowe i silne oddziaływanie dipolowe (patrz równanie 2.34) [1, 5]. Identyfikację poszczególnych klas rozpuszczalników przedstawiono w tabeli 6.3.

Teoria adsorpcji i retencji w normalnych układach faz – NP./LC Snydera – Soczewińskiego, wyróżnia - 8 grup składników eluentu („rozpuszczalników”) o różnych oddziaływaniach sorpcyjnych względem powierzchni sorpcyjnej tlenku gliny / żelu krzemionkowego, potem uzupełniona dla sorbentów chemicznie zw.

Klasyfikacja rozpuszczalników wg Snydera [1]

Grupy rozpuszczalników.

Grupa	Rozpuszczalnik
I	eter metylo- <i>t</i> -butylowy (etry alifatyczne)
II	metanol (alkohole alifatyczne)
III	tetrahydrofuran
IV	kwasy octowe formamid
V	chlorek metylenu, chlorek etylenu
VI	dioksan acetonitryl
VII	toluen
VIII	woda, chloroform

Grupa	Rozpuszczalniki
I	etry alifatyczne, trialkiloaminy, tetrametyloguanidyna
II	alkohole alifatyczne
III	pirydyny, tetrahydrofuran, amidy z wyjątkiem formamidu, etery glikolowe, sulfotlenki
IV	glikole, alkohol benzylowy, kwas octowy, formamid
V	dichlorometan, dichloroetylen
VI	(a) fosforan trikrezylu, ketony i estry alifatyczne, polietry, dioksan (b) związki sulfonowe, nityle, węglan propylenu
VII	węglowodory aromatyczne oraz ich halogenopochodne, nitrozwiązki, etery aromatyczne
VIII	fluoroalkanole, <i>m</i> -krezol, chloroform, woda

Inne, późniejsze teorie adsorpcji, albo podziału, takie, jak termodynamiczna teoria Ościka -, teoria Hildebrandta, są bardziej uzasadnione teoretycznie, jednak, teoria Soczewińskiego - Snydera jest wygodna w praktyce.

akceptor protonów

Teoria Soczewińskiego – Snydera zakłada istnienie „chemicznej równowagi adsorpcyjnej” na powierzchni sorpcyjnej adsorbentu; Teoria Ościka ... – istnienie tam równowagi termodynamicznej, teoria Hildebrandta, istnienie równowagowego podziału.

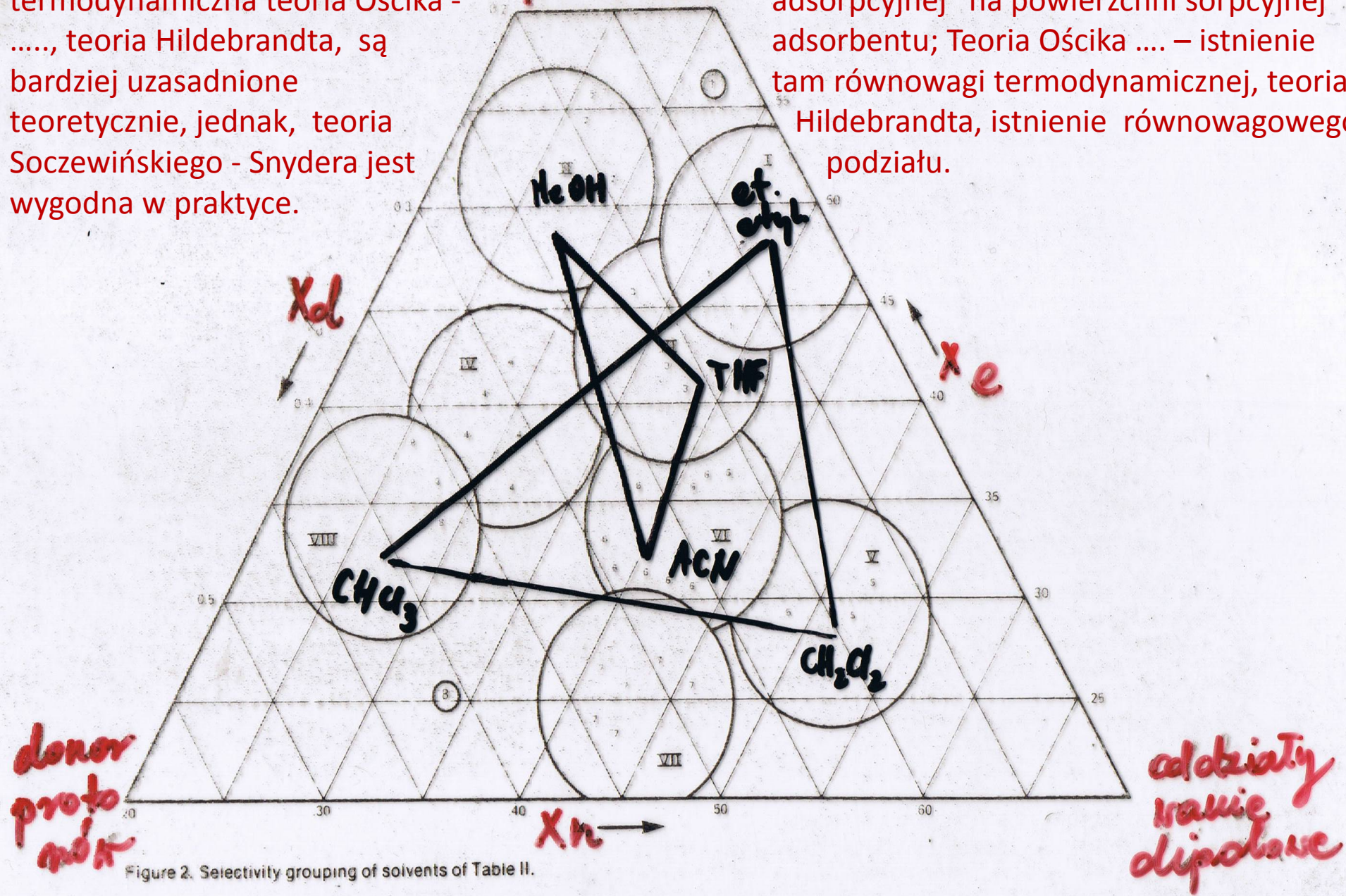
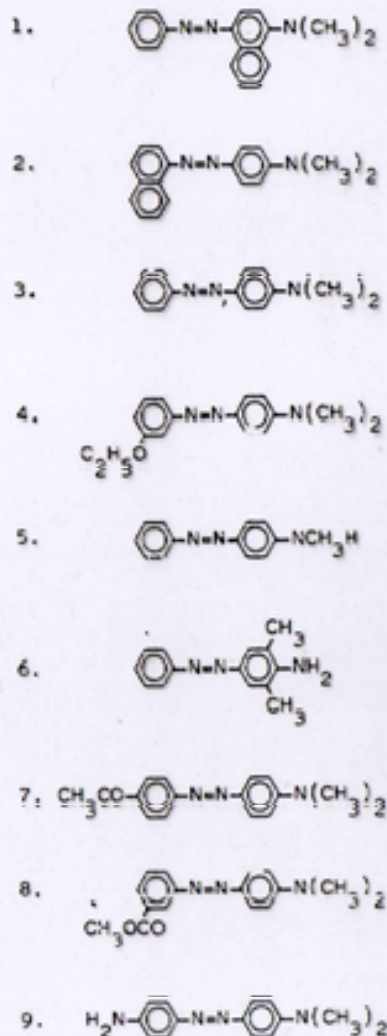


Figure 2. Selectivity grouping of solvents of Table II.

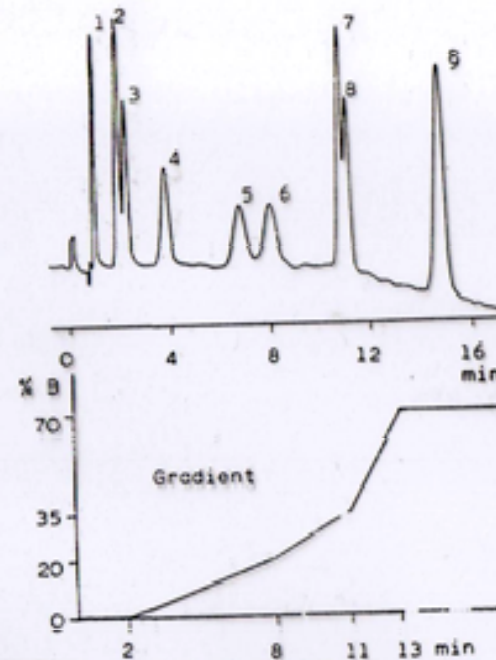
Nitril: Diese Phase trennt häufig ähnlich wie Silicagel, wegen ihrer geringeren Polarität jedoch mit kleineren k' -Werten bei gleicher mobiler Phase¹. Sie besitzt eine besondere Selektivität für Komponenten mit Doppelbindungen. Ein Beispiel ist die Trennung von Azofarbstoffen (Abb. 12.2):



Amino: Eine bereits klassische Verwendung der Aminophase ist ihr Einsatz in der Zuckeranalytik, wie Abbildung 12.3 belegt. Die Aminofunktion kann in Wasserstoffbrücken sowohl als Protonenakzeptor wie auch als Protonendonator wirken (sie ist sowohl Brönstedbase wie -säure).

1) Ein Beispiel dazu: H. Pfander, H. Schurtenberger und V.R. Meyer, *Chimia* 34, 179 (1980)

Abb. 12.2 Trennung von Azofarbstoffen auf einer Nitrilphase (nach Varian)



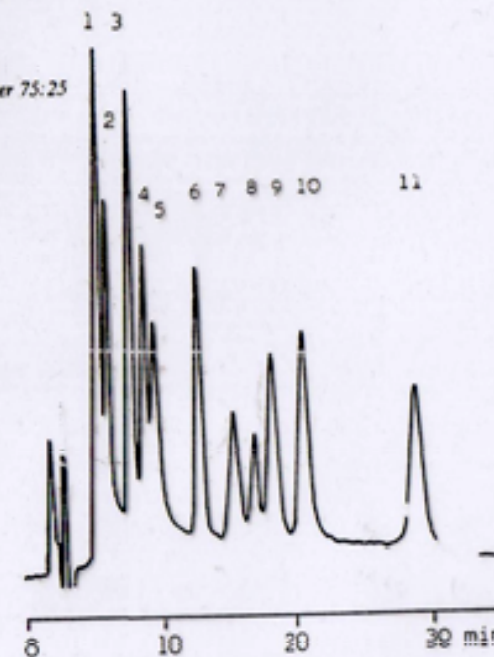
stationäre Phase: MicroPak C₈N
Säule: 15 cm x 2 mm
mobile Phase: A Hexan mit 0,2% Isopropanol
B Methylchlorid mit 0,2% Isopropanol
Gradient wie angegeben, total 1 ml/min

NP-HPLC (CN) – selektywność inna niż SiO₂, DIOL, ... , elucja gradientowa

Abb. 12.3 Trennung von Zuckern auf einer Aminophase (nach Kipp Analytica)

Säule: 4,6 mm x 20 cm
stationäre Phase: LiChrosorb NH₂, 5 μm
mobile Phase: 1 ml/min Acetonitril/Wasser 75:25
Detektor: UV 190 nm

- 1) Rhamnose
- 2) Xylose
- 3) Fructose
- 4) Glucose
- 5) Galactose
- 6) Saccharose
- 7) Maltose
- 8) Trehalose
- 9) Lactose
- 10) Melibiose
- 11) Raffinose



HILIC – NH₂ / AcCN – H₂O 75-25; Selektivność dla cukrów.

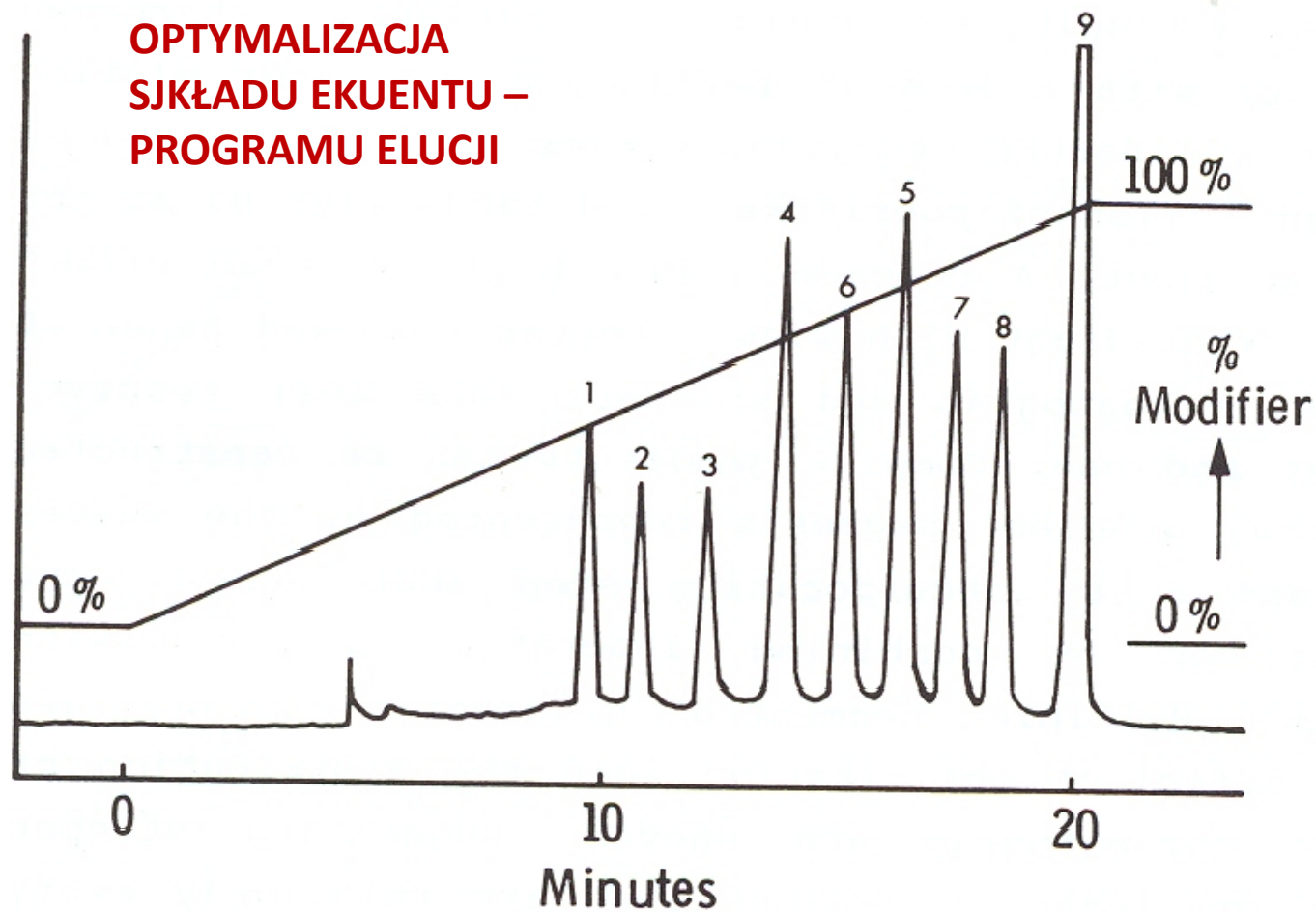


Figure 4.36 Example of an optimum linear-solvent-strength gradient. Peak identification: 1 = benzyl alcohol; 2 = 2-phenylethanol; 3 = o-cresol; 4 = nitrobenzene; 5 = diethyl o-phthalate; 6 = benzophenone; 7 = naphthalene; 8 = biphenyl; and 9 = anthracene. (Reproduced with permission from ref. 557. Copyright Elsevier Scientific Publishing Co.)

Przewidywanie optymalnego eluentu / programu elucji

Istnieje kilka komputerowych narzędzi programowych doboru optymalnych składników

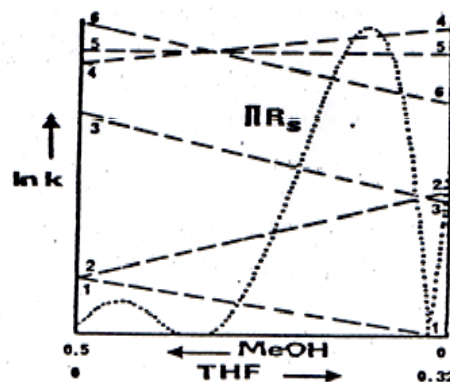
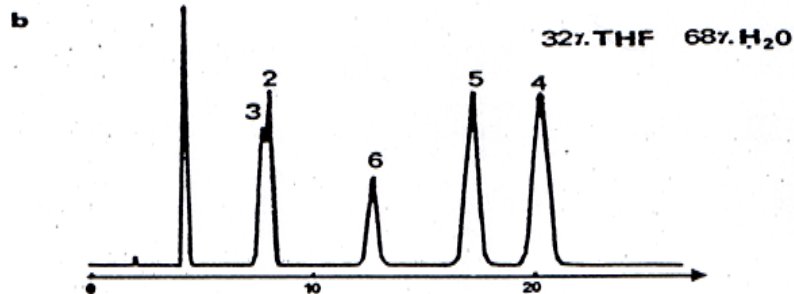
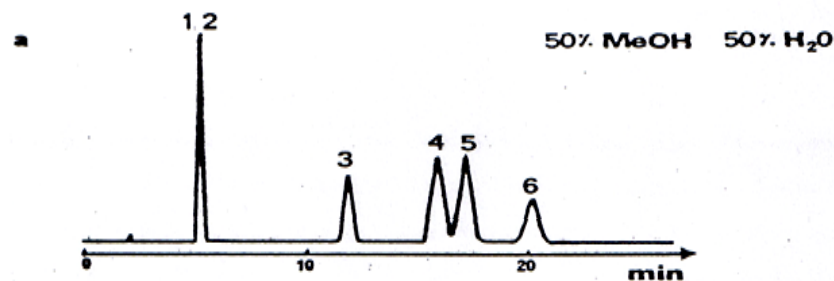
eluentu oraz optymalnego przebiegu programu elucji w RP/NP/HILIC-HPLC.

Ilustracja obok pokazuje zasadę algorytmu postępowania

zastosowaną w tego rodzaju „narzędziach programowych”.

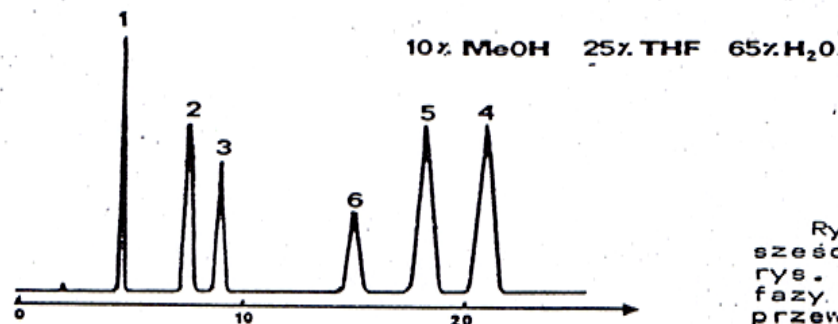
Wykonuje się eksperymenty w standardowych warunkach i obliczane zostają wartości

iloczynów $R(R_s)$. Punkt „maksimum globalnego” oznacza optimum (na rysunku obok – dla warunków RP-HPLC, elucji izokratycznej z trójskładnikowym eluentem.

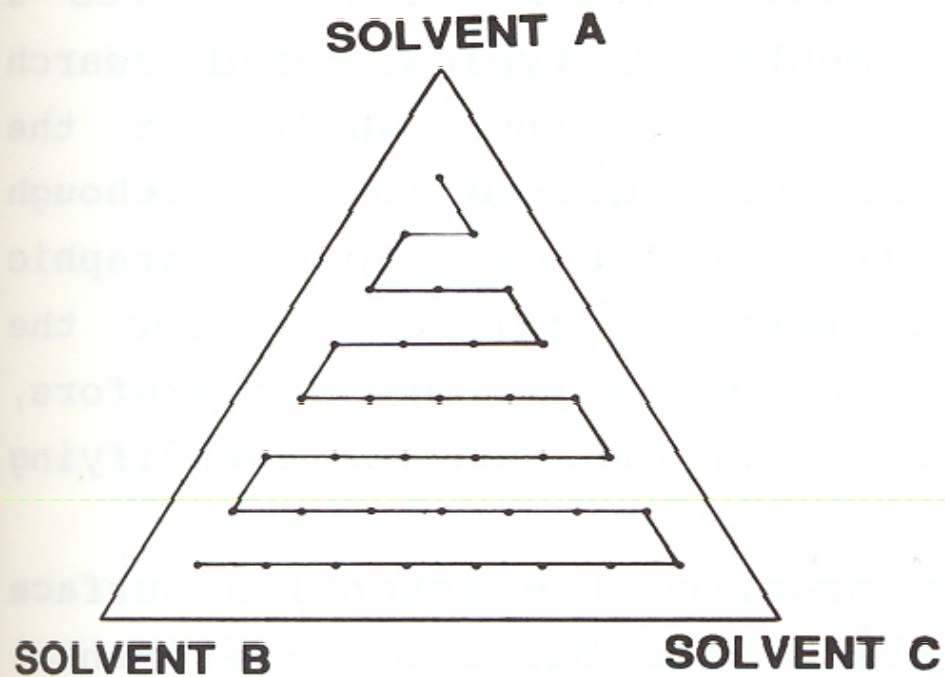


Rys. 10.4. Chromatogram sześciu substancji (1-alkohol benzytowy, 2-fenol, 3-3-fenylpropa-
nol, 4-2,4-dimetylofe-
nol, 5-benzen, 6-ftal-
lan dietylowy) dla faz
ruchomych:
a - MeOH/H₂O (50/50 v/v),
b - THF/H₂O (32/68 v/v)

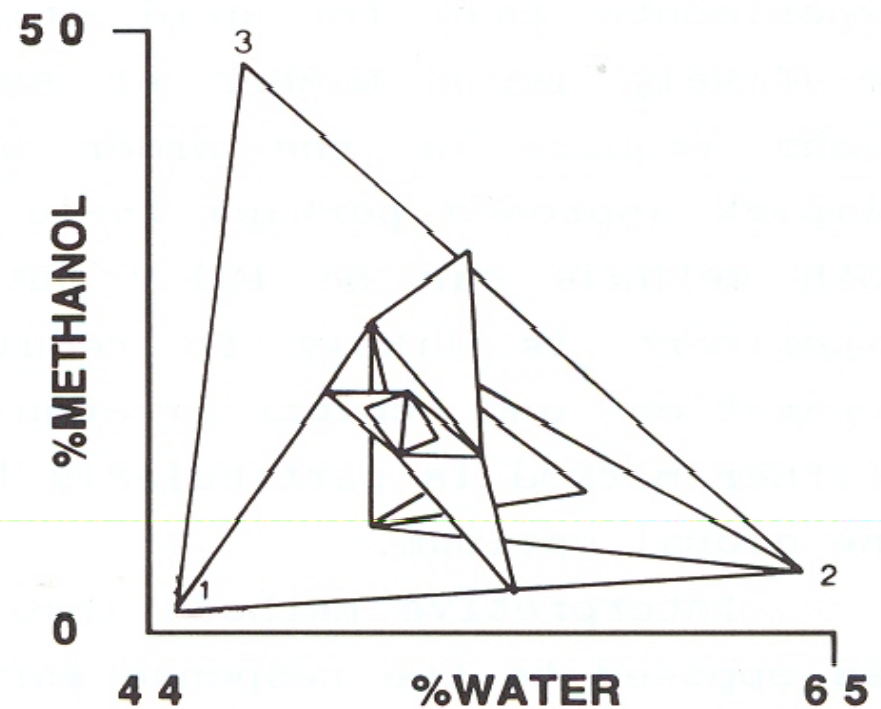
Rys. 10.5. Diagram selek-
cji fazy skonstruowany
na podstawie chromatogra-
mów przedstawionych na
rys. 10.4 a, b



Rys. 10.6. Chromatogram
sześciu substancji (patrz
rys. 10.4) uzyskany dla
fazy ruchomej o składzie
przewidzianym na podsta-
wie diagramu selekcji fazy



A



B

Figure 4.32 Experimental design showing the grid search solvent optimization system employed by PESOS (A) and an example of a simplex search for a global optimum (B).

Zasady ogólne eksperymentalnego poszukiwania globalnego optimum w warunkach zakresu zmienności parametrów doświadczalnych

Zasady ogólne
 eksperymentalnego /
 „teoretycznego” poszukiwania
 globalnego optimum przez
 narzędzia programowe w
 warunkach zakresu zmienności
 4-ech parametrów
 doświadczalnych – zawartość
 MeOH, AcCN, THF, H₂O
 („buforu”) w eluencie.

W warunkach nieznanych
 struktur molekularnych
 wykonanie 7-miu
 rozdziałań i przekazanie
 danych do komputera na
 zasadzie : nr piku - czas
 retencji, prowadzi do
 optymalnej postaci
 programu elucji.

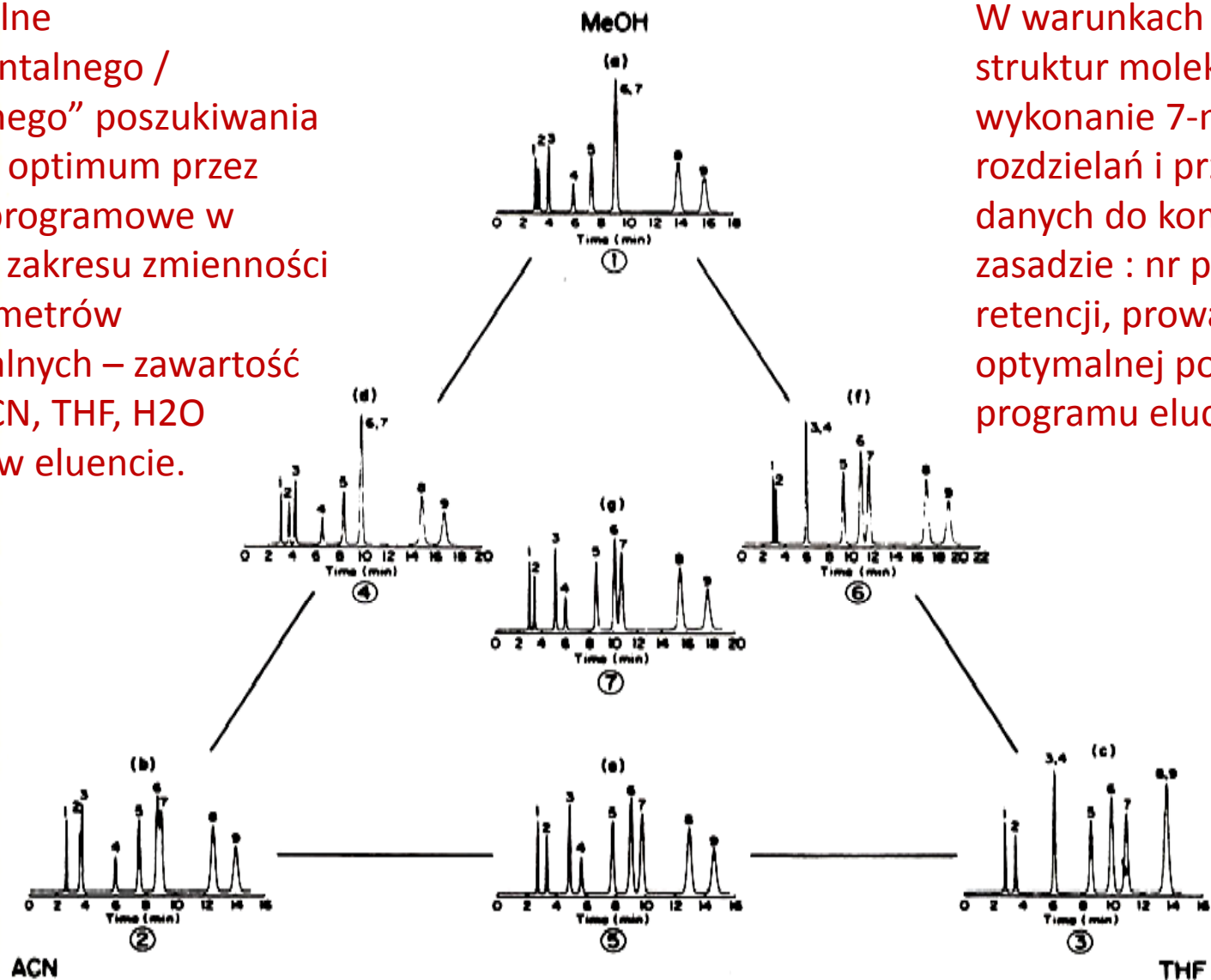


Figure 4.33 Separation of nine substituted naphthalenes using the mixture-design statistical technique to optimize the composition of the mobile phase (Reproduced with permission from ref. 480. Copyright John Wiley and Sons).

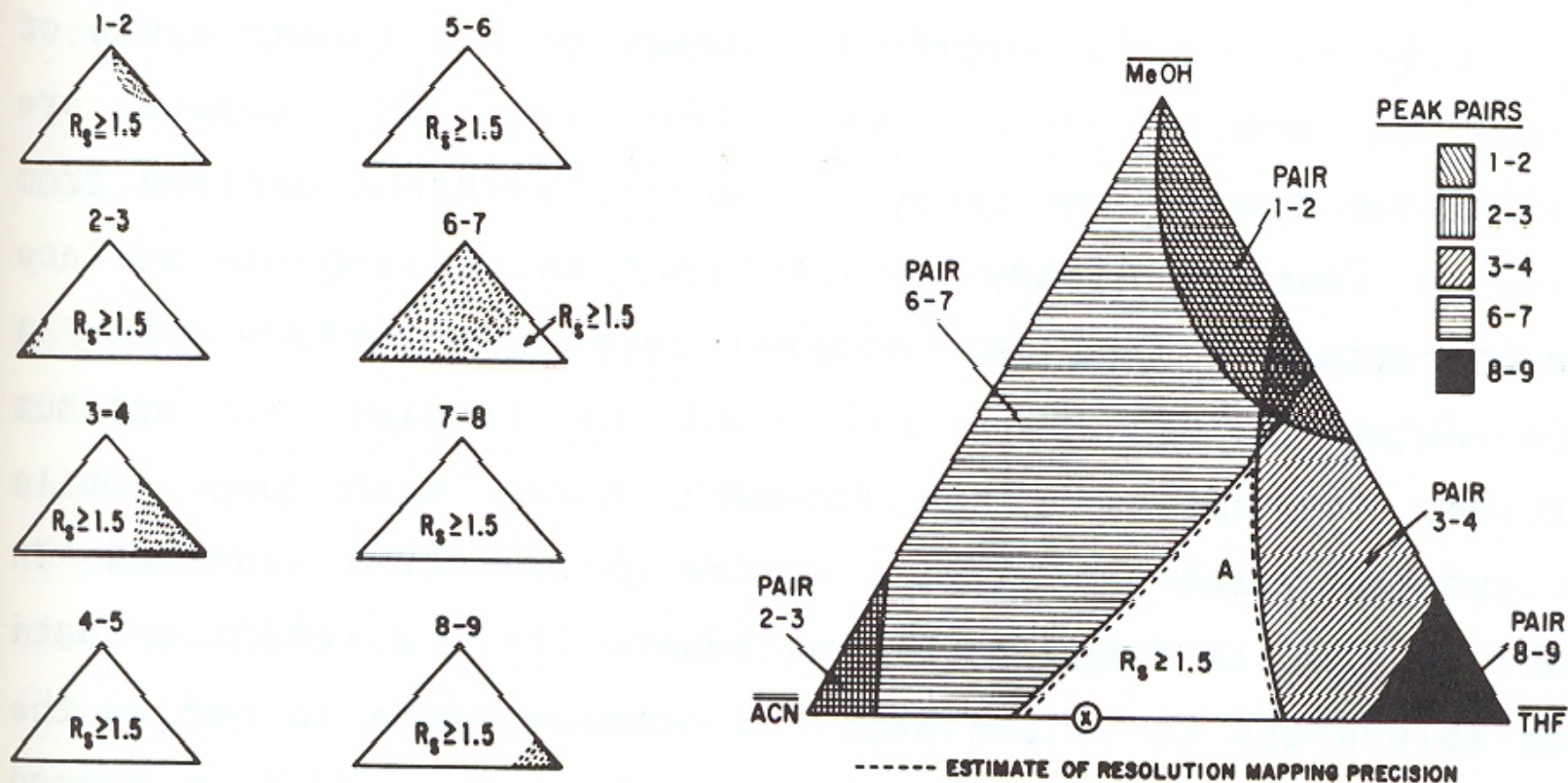
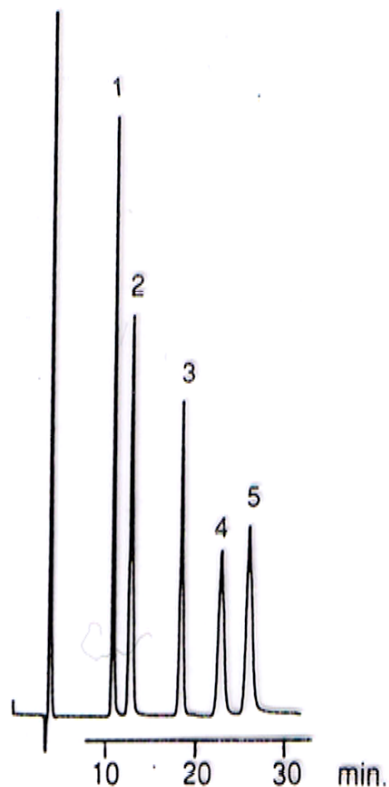


Figure 4.34 Peak-pair resolution maps and an overlapping resolution map for the separation of nine substituted naphthalene compounds by reversed-phase liquid chromatography illustrated in Figure 4.33. (Reproduced with permission from ref. 545. Copyright Elsevier Scientific Publishing Co.)

HILIC / RP cukry / peptydy

Figure 23. Simple sugars



1. Fructose
2. Glucose
3. Sucrose
4. Maltose
5. Lactose

Column: YMC-Pack PA Gel 120A S-5
4.6 x 250mm
PA-03-5

Eluent: 75/25 acetonitrile/water

Flow rate: 1.0 ml/min

Temperature: Ambient

Detection: RI

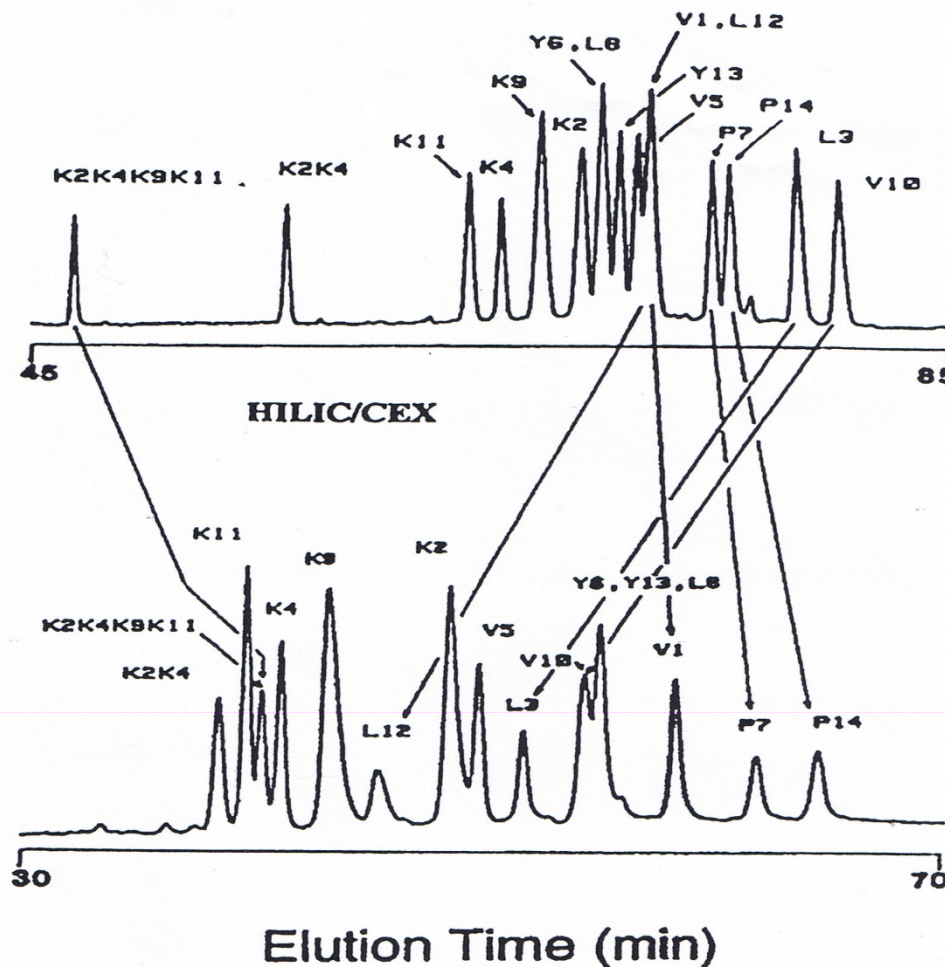


Fig. 2 Comparison of RPLC and HILIC/CEX elution profiles of cyclic peptides. RPLC: Zorbax 300XDB-C₈ column; linear gradient (0.5% acetonitrile/min) from 0.05% aqueous trifluoroacetic acid (TFA) to 0.05% TFA in acetonitrile at 1 mL/min; at 70°C and detection at 210 nm. HILIC/CEX: Polysulfoethyl A column; 5 min isocratic elution with buffer A (20 mM aqueous triethylammonium phosphate with 90% acetonitrile), followed by linear gradient (2.5 mM sodium perchlorate/min) from buffer A to buffer B (buffer A containing 400 mM sodium perchlorate with 80% acetonitrile); at 30°C and detection at 210 nm. [Reprinted from C. T. Mant, L. H. Kondejewski, and R. S. Hodges, *J. Chromatogr.* 816 (1998), p. 79, with permission of Elsevier Science.]

TABLE 4.25

SELECTION OF OPTIMAL LINEAR SOLVENT STRENGTH GRADIENTS IN LIQUID CHROMATOGRAPHY

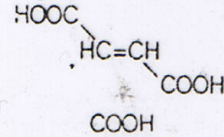
Column Type	Gradient Shape	Range or Rate
Reversed-Phase BPC	Linear increase in %B (Organic modifier)	5-7% B/ t_m
Normal-Phase BPC	Vary composition of binary mobile phase linearly to give change in polarity equal to $0.5 P'/t_m$	12-15% B/ t_m
Liquid-Solid	Vary composition of binary mobile phase in a concave fashion to give a change in solvent strength equal to $0.02 \epsilon^0/t_m$	$(10-18)t_m$ for a 0-100% gradient(a)
Ion-Exchange	Increase salt concentration by 1.6 fold per t_m in a concave gradient	
	Increase pH by 0.2 units/ t_m , linear gradient (cation exchange)	pH varied from 2-6 in $20t_m$
	Decrease pH by 0.2 units/ t_m , linear gradient (anion exchange)	pH varied from 8-2 in $30t_m$

(a) Gradients from 5-95% B are generally preferred from a practical point of view

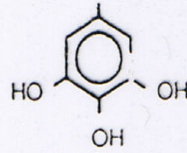
1 Benzol



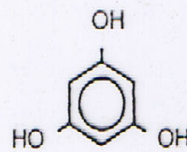
2 Fumarsäure



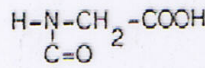
3 Gallussäure



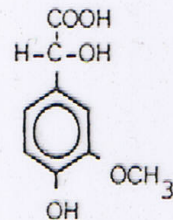
4 Phloroglucin



5 Hippursäure



6 4-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäure



NP-W

Dynamicznie generowana polarna ciekła faza stacjonarna dzięki kondensacji kapilarnej polarnego / nych składnika / ów eluentu w mikro-porach sorbentu

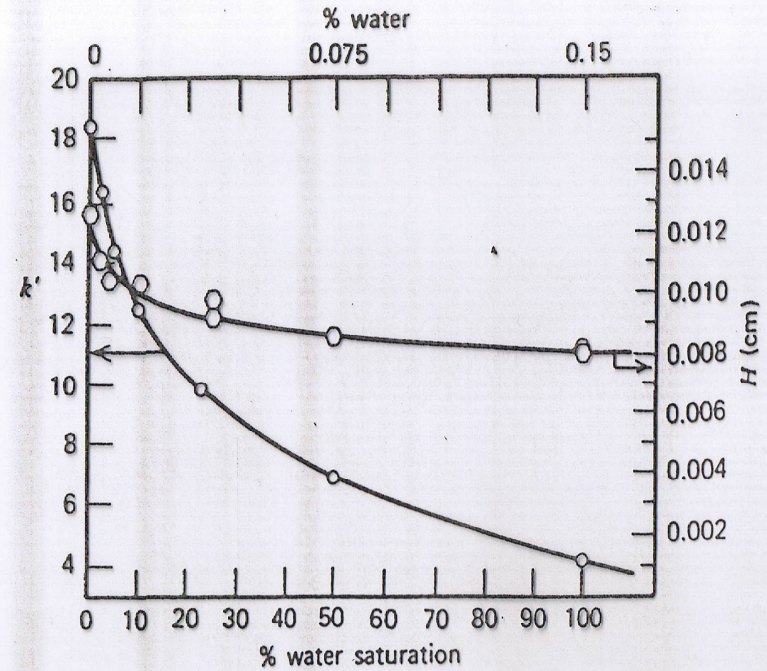
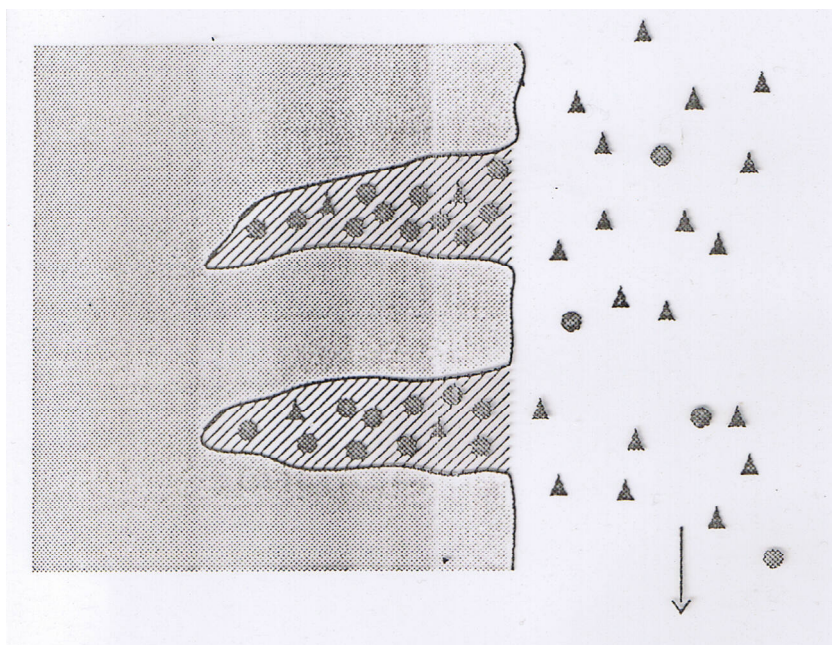
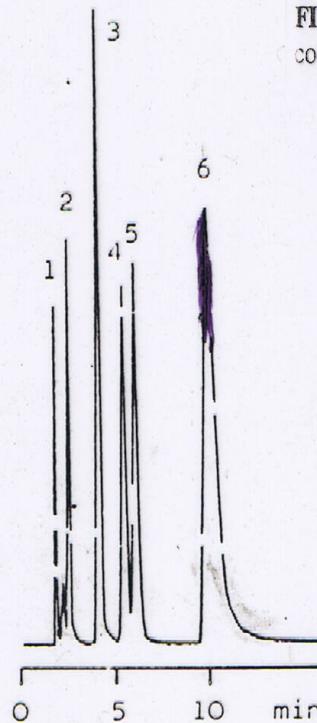


FIGURE 6.31 Retention of phenyl propanol on silica as a function of the water content of the mobile phase (methylene chloride). (Reprinted with permission from...)

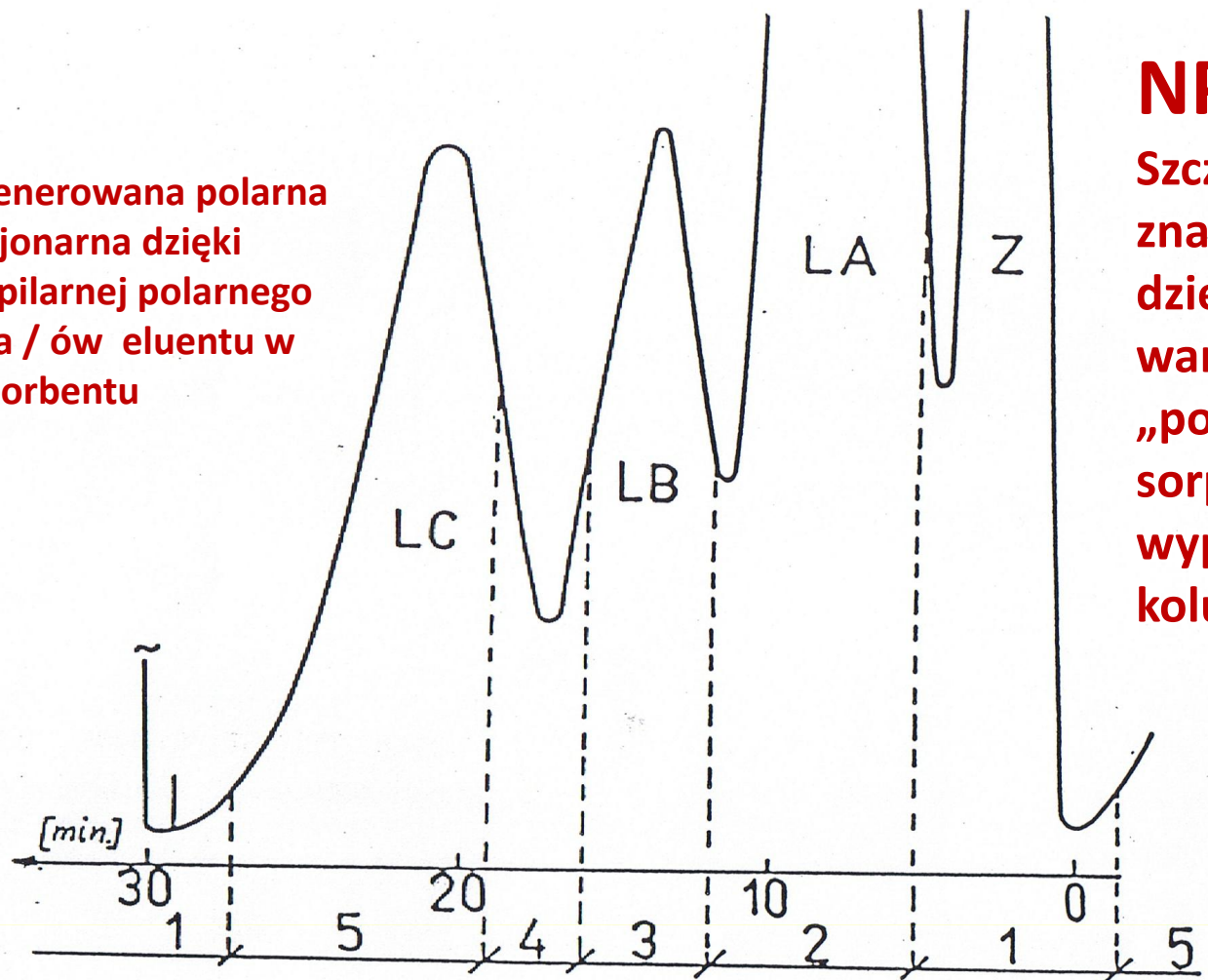
Abb. 11.1 Trennung von Phenolen und Säuren (nach S. Hara, Y. Dobashi und K. Oka, J. Chromatogr. 239, 677 (1982))

Säule: 4,6 mm x 20 cm
Trägermaterial: säurebehandeltes Silicagel 10 µm (mit nicht säurebehandeltem Silicagel zeigen Gallussäure und 4-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäure starkes Tailing)
stationäre Phase: Wasser
mobile Phase: 1 ml/min Diethylether wassergesättigt
Detektor: UV 254 nm



NP-W

Dynamicznie generowana polarna ciekła faza stacjonarna dzięki kondensacji kapilarnej polarnego /nych składnika / ów eluentu w mikro-porach sorbentu



NP-W

Szczególne znaczenie w PLC, dzięki wysokiej wartości „pojemności sorpcyjnej” wypełnienia / kolumny

Przykład chromatogramu uzyskanego w czasie trwania jednego etapu cyklicznej izolacji lanatozydu C z odpadu produkcyjnego z wykorzystaniem kolumny 800 x 150 mm, wypełnionej żelem krzemionkowym 60A $d_p = 50\mu\text{m}$ ($N_0 = 1600$)

Warunki:

Eluent - CH_2Cl_2 / CH_3OH / H_2O 92:8:0.2 V/V, natężenie przepływu 2200 ml/min, ciśn. 26 bar, temperatura pokojowa, detektor UV 254nm.

Poniżej osi czasu oznaczono numery zbiorników, gdzie zostają kierowane poszczególne frakcje.



Isolation of a pharmaceutical ingredient

Separation conditions

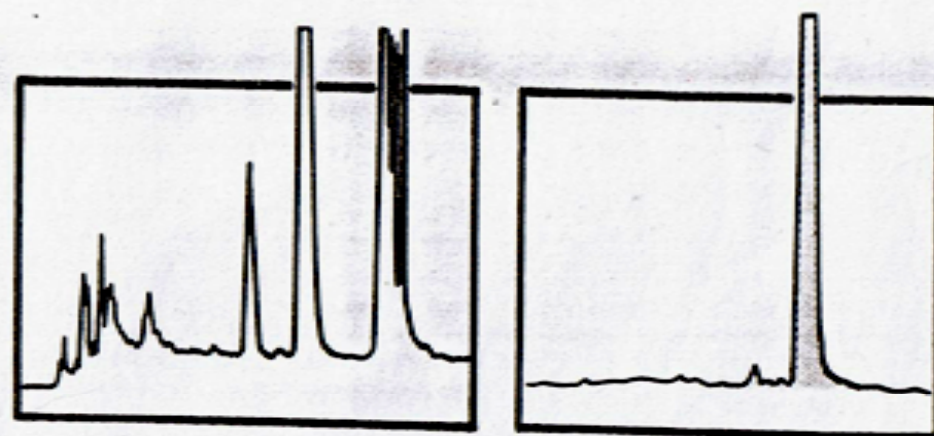
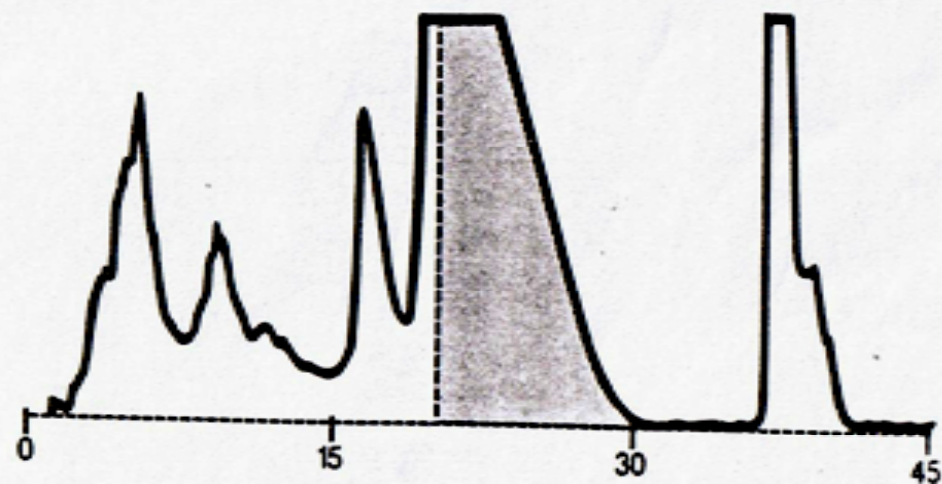
Columns: Prepbar® 250-50,
LiChrosorb®
RP-18, 10 µm
Hibar® RT 250-4
LiChrosorb®
RP-18, 10 µm

Eluent: Step gradient
0-31.5 minutes
methanol/water
(40/50 - v/v)
31.5-42 minutes
methanol/water
(95/5 - v/v)

Flow (preparative): 80 ml/min
(analytical): 1 ml/min

Detection: UV, 254 nm

Injected sample: 3 g in 50 ml
of methanol/water
(50/50 - v/v)

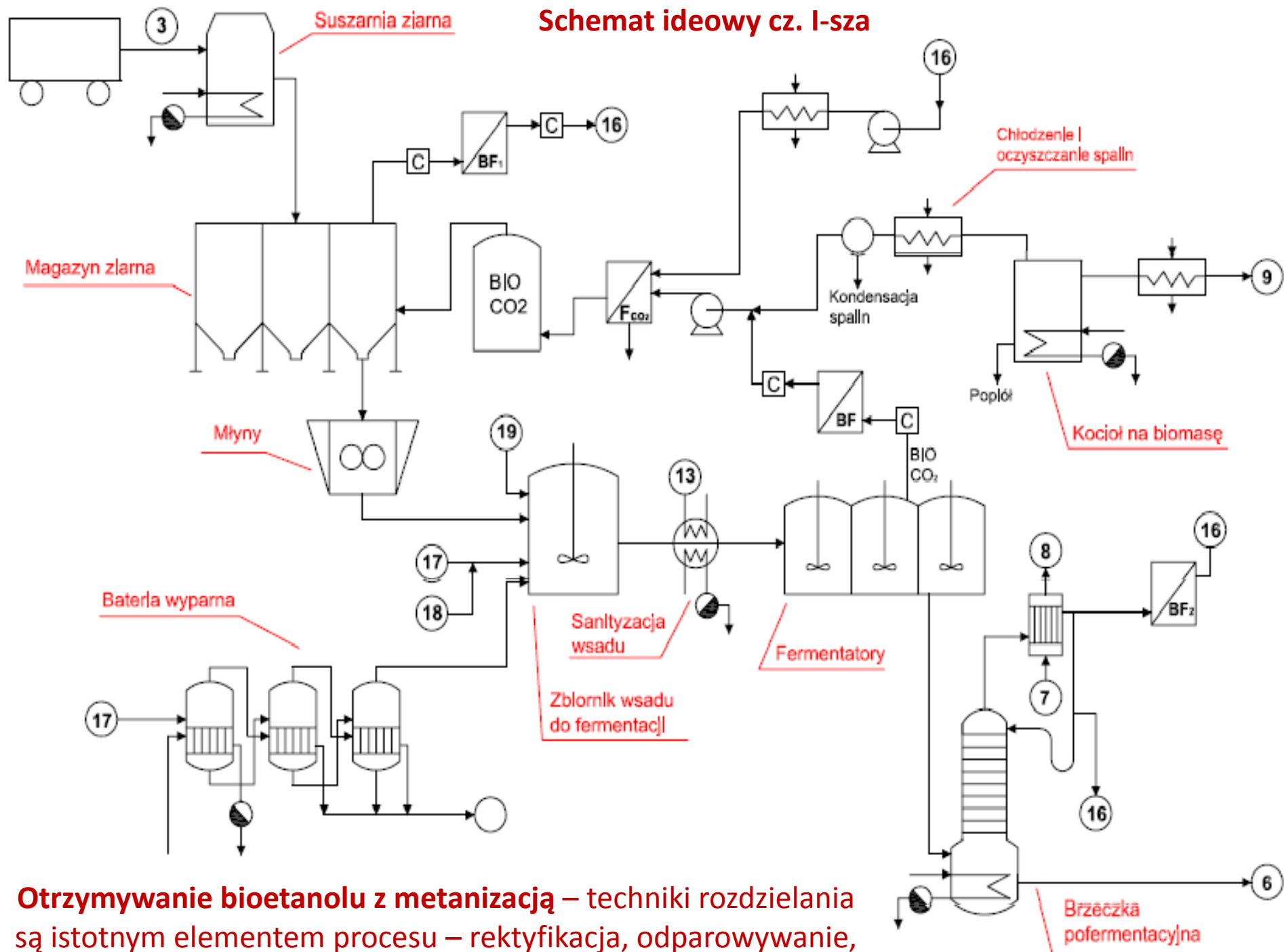


Columns/Cartridges

Etapy postępowania w celu izolacji biologicznie aktywnego białka z materiału syntetycznego, lub biologicznego

ETAP	STOSOWANA METODA / Y	CEL	UWAGI
Przeprowadzenie do roztworu	Rozcieranie, Dezintegracja ultradźwięw., Homogenizacja mechan.	Uzyskanie roztworu w odpowiednim buforze	Etap nie jest konieczny gdy peptyd powstaje w wyniku syntezy chemicznej, lub gdy jest wydzielany na zewnątrz komórki
Zatężenie roztworu	Dializa, Odwrócona osmoza, Liofilizacja, Odparowywanie	Podwyższenie stężenia	Istnieje ryzyko otrzymania produktu trudno rozpuszczalnego
Wzbogacenie roztworu w odpowiednią frakcję	Wysolenie, Filtracja, Ultrafiltracja, Rozpuszczanie frakcjonowane	Uzyskanie frakcji o podwyższonym stężeniu	Etap pomijany w przypadku warunków nadprodukcji biotechnologicznej
Wyodrębnienie frakcji o kontrolowanym zakresie masy cząsteczkowej z Odsoleniem	Chromatografia żelowa w warunkach hydrofilowych	Uzyskanie odsolonej postaci o odpowiednim zakresie masy cząsteczkowej	Etap pomijany gdy następne etapy rozdzielania są dostatecznie selektywne

<p>Właściwe rozdzielanie w celu oczyszczenia i umożliwienia izolacji pożądanej formy peptydu, białka</p>	<p>Chromatografia:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. jonowymienna (IC), 2. oddziaływań hydrofobow. (HIC) 3. adsorpcyjna (RP, hydroksypatyt, ...), 4. powinowactwa (AffinityChromat.) 5. chromatogniskow. 6. Elektrochromatograficzne metody (m.inn. CE, elektroforeza) 	<p>Wyodrębnienie potrzebnego związku chemicznego o minimalnym stopniu zanieczyszczenia</p>	<p>Bywa konieczne kilkustopniowe rozdzielanie z międzyetapowym zateżaniem frakcji, (Chromatografia metalopowinowactwa na jonach Ni bywa bardzo przydatna w przypadku istnienia histydyny w strukturze izolowanego peptydu)</p>
<p>Izolacja właściwej substancji</p>	<p>Liofilizacja, Odwrócona osmoza, Dializa Odparowywanie, Krystalizacja frakcjonowana</p>	<p>Wyodrębnienie aktywnego biologicznie peptydu / białka</p>	<p>Bardzo ważne jest zwrócenie uwagi na takie metody izolacji, które zapewniają aktywność biologiczną białka / peptydu.</p>
<p>Otrzymanie formy docelowej</p>	<p>Rozpuszczenie w soli fizjologicznej, dodatek substancji stabilizujących</p>	<p>Farmakologiczna postać</p>	<p>Stabilizatorem może być krezol, kwas benzoesowy itp.</p>



Otrzymywanie bioetanolu z metanizacją – techniki rozdzielania są istotnym elementem procesu – rektyfikacja, odparowywanie,

Przykład schematu technologicznego fragmentu instalacji "metanizacji" ciekłej fazy brzezki pofermentacyjnej oraz "kogeneracji" energii elektrycznej z wykorzystaniem "muta"

techniki rozdzielania są istotnym elementem procesu – ultrafiltracja, wirowanie, filtracja suszenie, ...

