

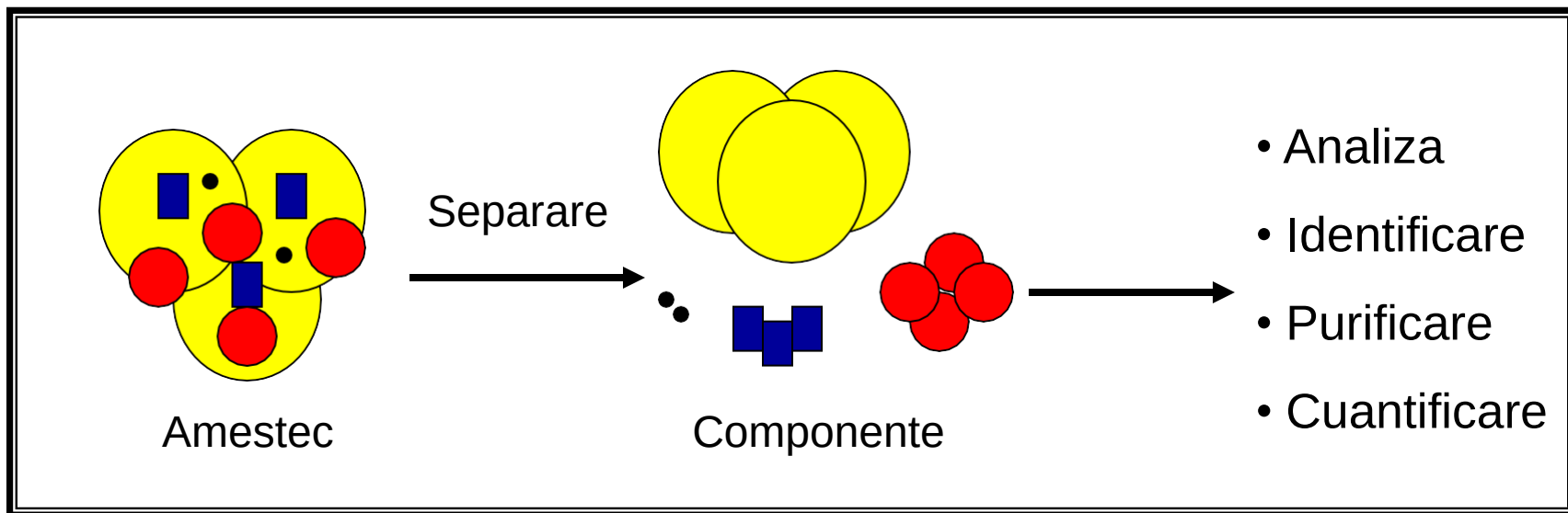
Metode Cromatografice

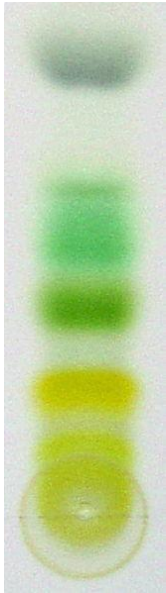
**Cromatografia de lichide de înaltă
performanță (HPLC)**

Cromatografia – o tehnica de separare a amestecurilor, în componentele sale cu scopul de a le analiza, identifica, purifica și /sau cuantifica. Cromatografia se bazează pe interacțiunea diferențiată a doi sau mai mulți compuși de separat (numiți **soluți**) cu ajutorul a două faze cromatografice: **faza mobilă** și **faza staționară**.

Principalele **avantaje** pe care le prezintă cromatografia ca metodă de separare sunt:

- *Permite separarea, identificarea și dozarea cantitativă a componentelor unui amestec.*
- *Se poate aplica unui număr foarte mare de produse, practic orice compus organic/bio-organic poate fi separat printr-o metodă cromatografică*
- *Sensibilitatea metodelor cromatografice este extrem de ridicată. În același timp însă se pot aplica și la scară preparativă.*
- *Durata analizei este redusă, comparativ cu alte metode de analiză ale amestecurilor complexe.*





1901 - botanistul rus Tswet, care a separat niște pigmenți vegetali pe o coloana umplută cu carbonat de calciu, folosind ca eluent eterul de petrol.

Denumirea provine de la cuvintele grecești **chromos** = culoare si **graphos** = scriere.

1941 - A. Martin si R. Synge au elaborat cromatografia lichida de repartitie pe coloana, pentru care au primit ulterior Premiul Nobel în 1952. Ei au separat aminoacizi acilați pe o coloana ce conținea silicagel, iar drept faza mobila au utilizat n-butanol saturat cu apa.

1943 - tot ei au pus bazele cromatografiei pe hârtie, prima forma de cromatografie planara.

1947 - s-au pus bazele cromatografia de schimb ionic.

1950 - A. Martin, care împreuna cu A.T. James a separat acizi organici volatili pe o coloana de sticla umplută cu Celite acoperita cu ulei siliconic, utilizând ca faza mobila azotul.

1959 - Cromatografia pe coloane cu gel a fost inițiată de Porath si Flodin.
Cromatografia de lichide moderna pe coloana, numita de înalta performanta sau de înalta presiune (HPLC) poate fi datata la începutul anilor 1960 și se bazează pe lucrările lui Csaba Horváth, efectuate la Universitatea Yale.

1967 – Cromatografia de bioafinitate.

1. Clasificarea în funcție de mecanismul separării:

- 1.1. Cromatografie de adsorbție;
- 1.2. Cromatografie de repartitie;
- 1.3. Cromatografie de schimb ionic;
- 1.4. Cromatografie de excluziune;
- 1.5. Cromatografie de afinitate.

2. Clasificarea în funcție de natura fazelor cromatografice:

- 2.1. Cromatografie de gaze:
 - 2.1. Gaz-lichid (GLC);
 - 2.2. Gaz-solid (GSC).
- 2.2. Cromatografie de lichide:
 - 2.1. Lichid-lichid (LLC);
 - 2.2. Lichid-solid (LSC);
- 2.3. Cromatografie cu fluide supercritice (SFC).

3. Clasificarea în funcție de configurația sistemului cromatografic:

- 3.1. Cromatografie pe coloană:
 - 3.1.1 Cromatografie pe coloane clasice (cu umplutură);
 - 3.1.2 Cromatografie pe coloane capilare:
- 3.2. Cromatografie planara:
 - 3.2.1 Cromatografie în strat subțire;
 - 3.2.2 Cromatografie pe hârtie.

Cromatografia de gaze (GC)

Analizează compuși organici volatili. Faza mobilă este un gaz, iar faza staționară este de regulă un lichid pe un suport solid sau un solid adsorbant.

Cromatografia de lichide (LC)

Se folosește pentru separarea analiților în soluție. Faza mobilă este un solvent iar faza staționară este un lichid pe un suport solid (ex. rășine schimbătoare de ioni).

Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)

O variantă a cromatografiei de lichide care utilizează presiune înaltă pentru a crește eficiența separării.

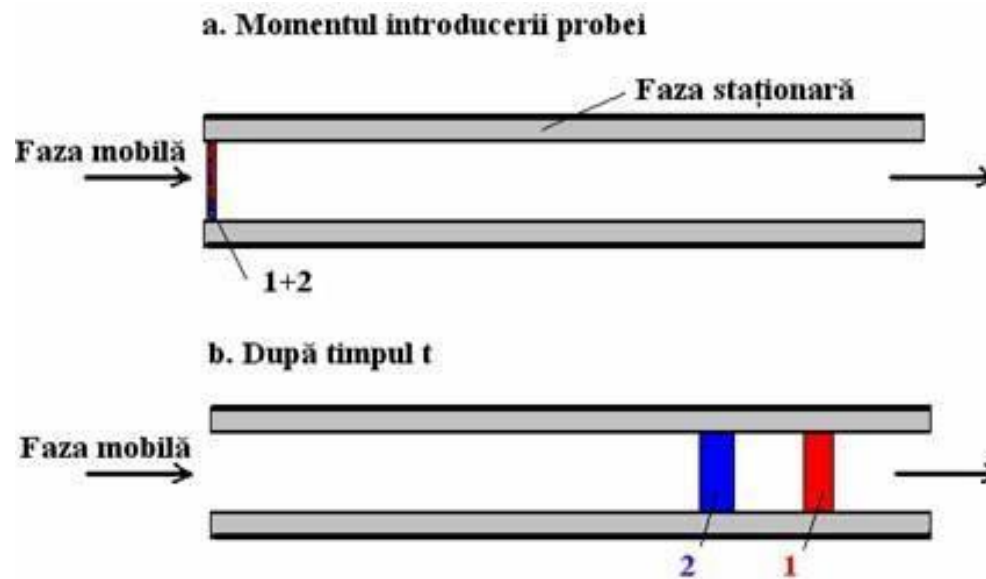
Cromatografia de excluzie (gel-cromatografia) (SEC)

Numită și “gel-permeation chromatography” (GPC), faza mobilă este un solvent și faza staționară este un material poros.

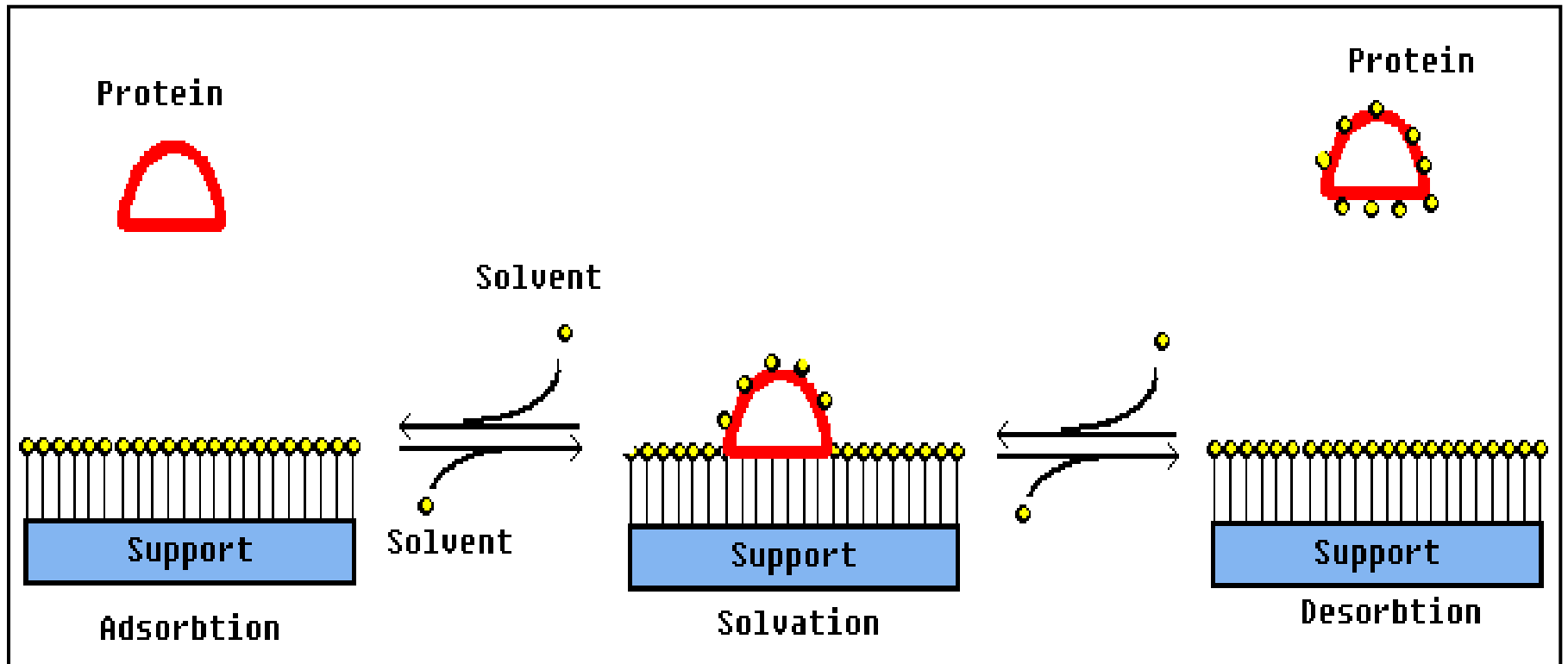
Cromatografia în strat subțire (TLC) -

O metodă simplă și rapidă de a monitoriza producția unei reacții sau de a verifica puritatea unor compuși organici. Faza mobilă este un solvent și faza staționară este un solid adsorbit pe un suport solid.

Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)

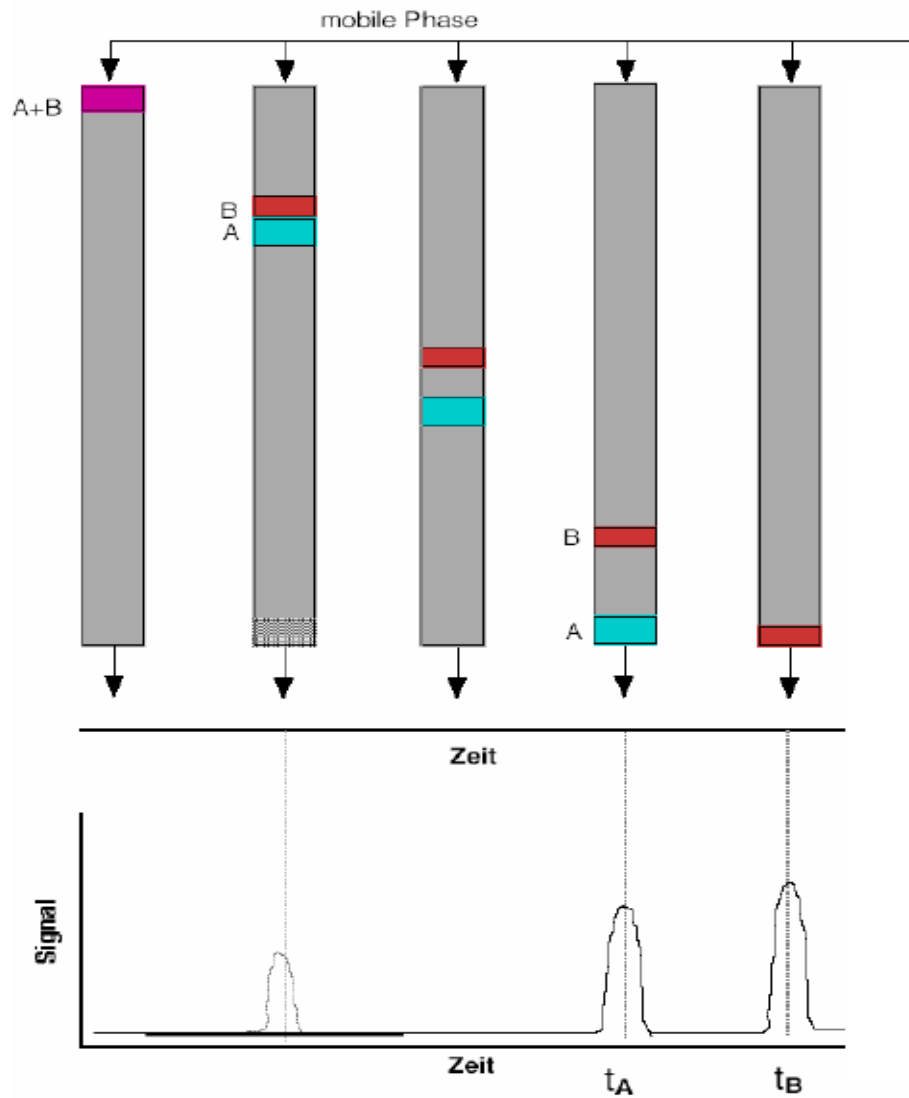


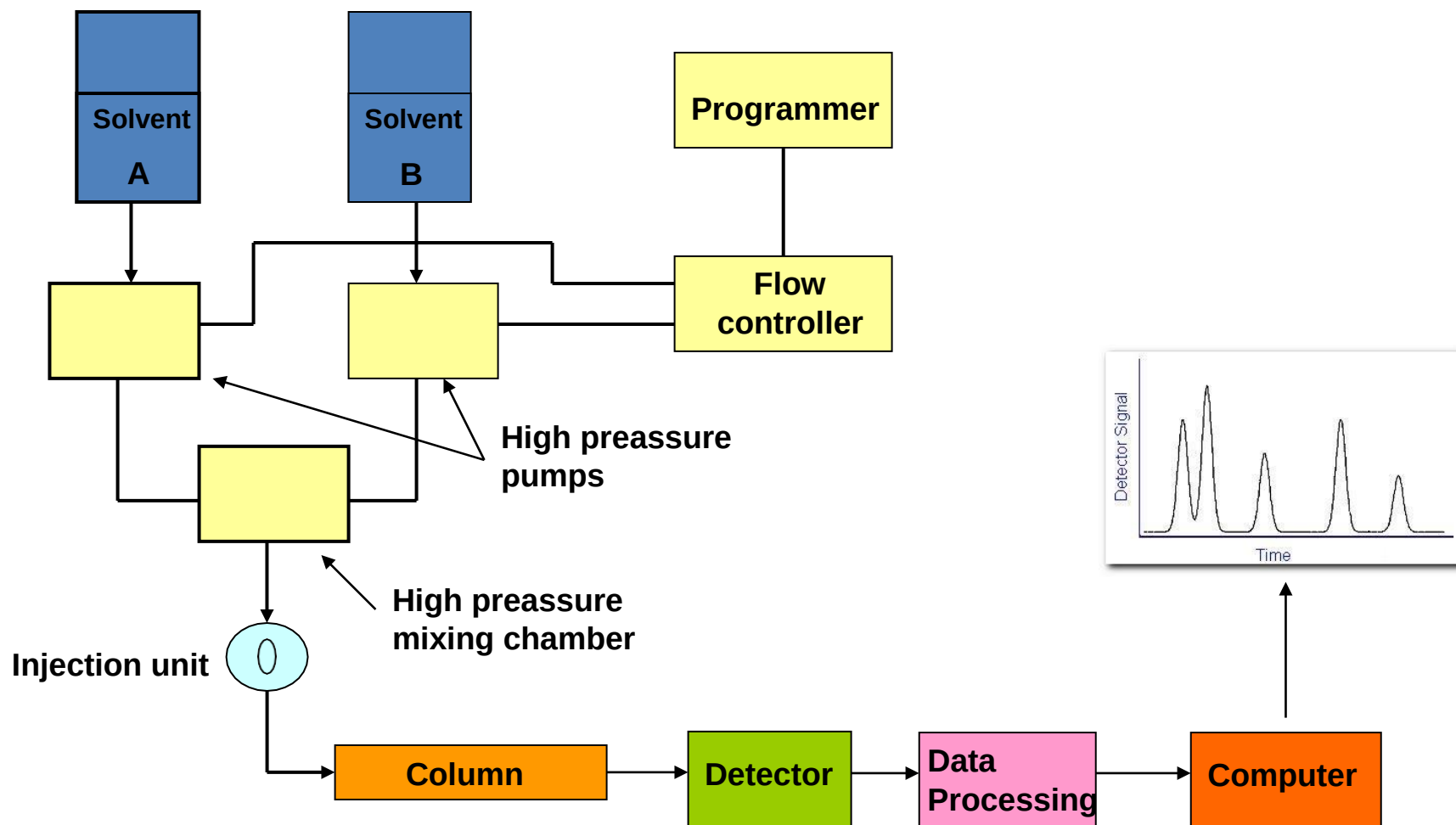
Adsorbția/ Desorbția în HPLC





Principiul de separare a doua componente





Instrumente HPLC

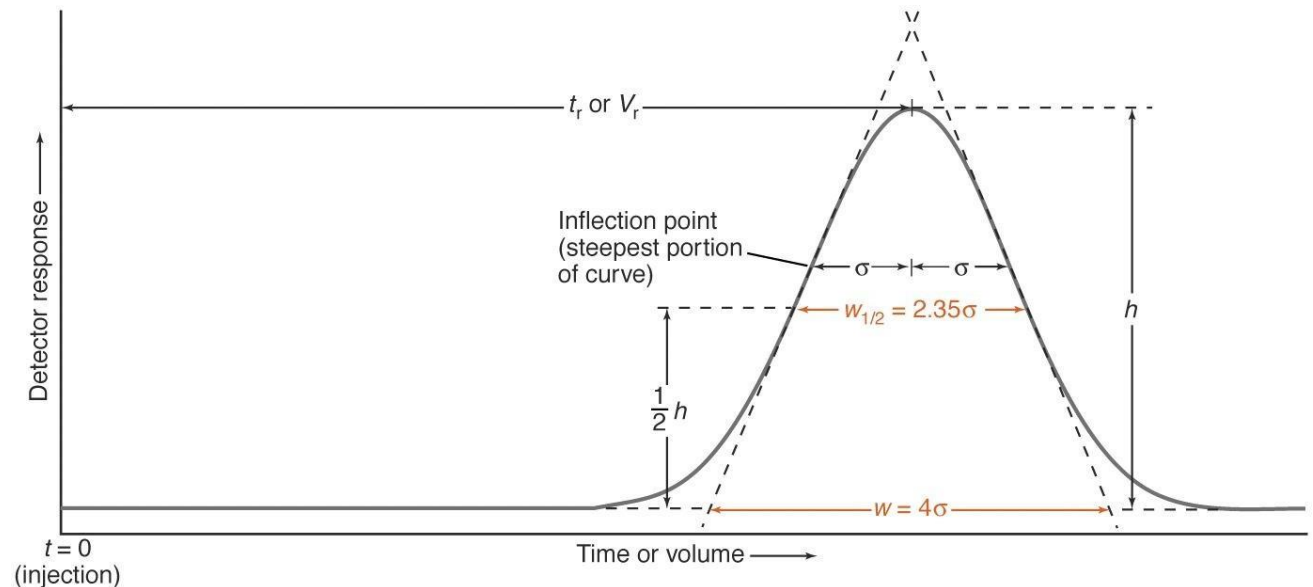


Principalele caracteristici ale unei cromatograme

Cromatogramă: diagrama semnal obținută în funcție de timp eluție al analitului:
forma “peak”-lui, poziția și rezoluția.

Peak –individual (semnal individual)

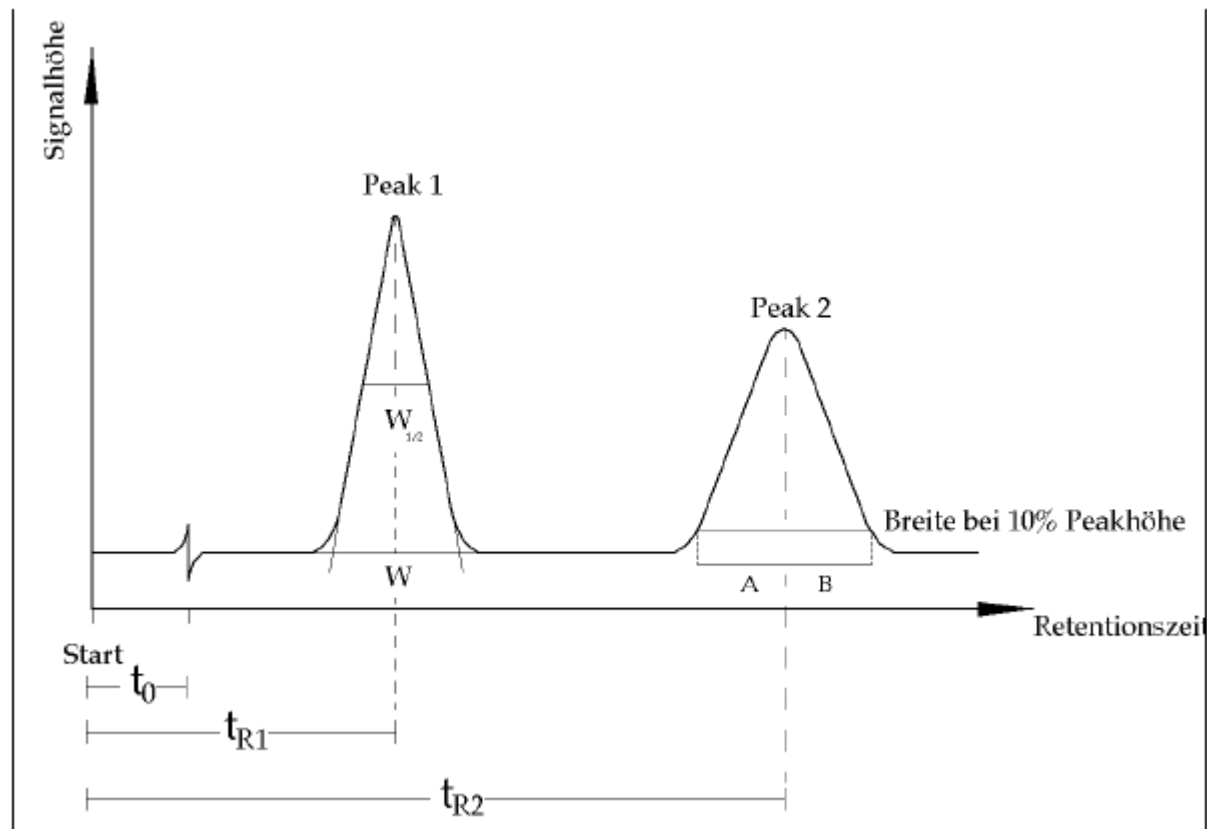
- a) Timpul de retenție(t_r) :
timpul necesar analitului de a ajunge la detector după introducerea lui in sistemul cromatografic.
- b) Un peak cromatografic ideal
⇒ forma **Gaussian** ($w_{1/2} = 2.35 \sigma$, $w = 4 \sigma$, $w_{0.67} = 2 \sigma$)



Principalele caracteristici ale unei cromatograme

Peak-uri multiple - Eficiența separării : doi factori contribuie la cat de bine sunt separate componentele unui amestec:

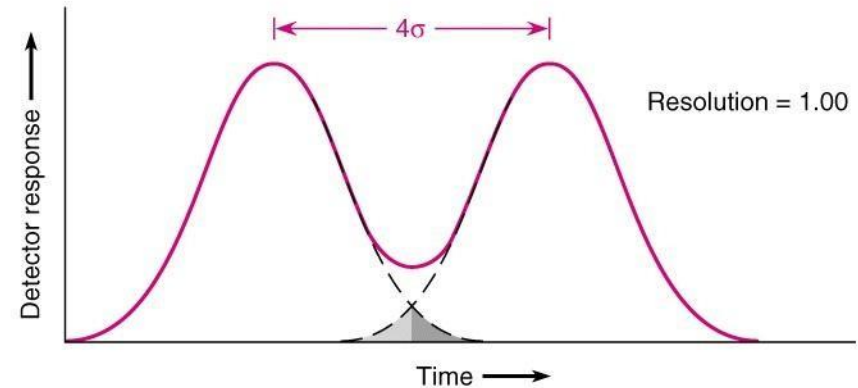
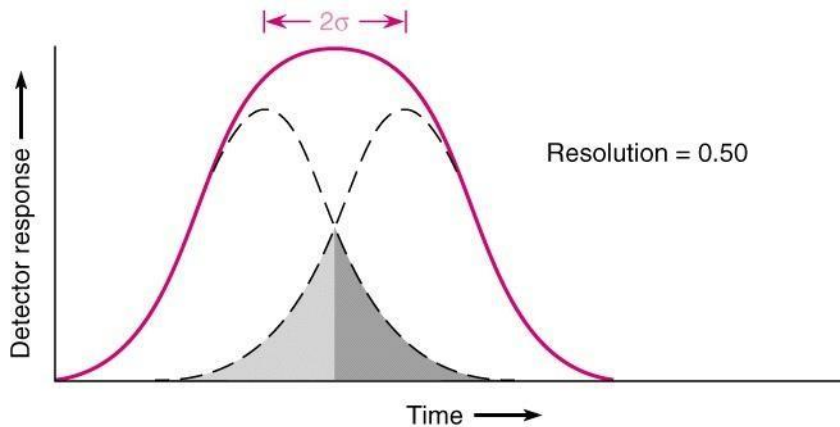
- latimea peak-ului (latime mare – separare insuficientă)
- spațiile de timp (spacing in time) (distanța mare – separare buna)



Principalele caracteristici ale unei cromatograme

Rezolutia

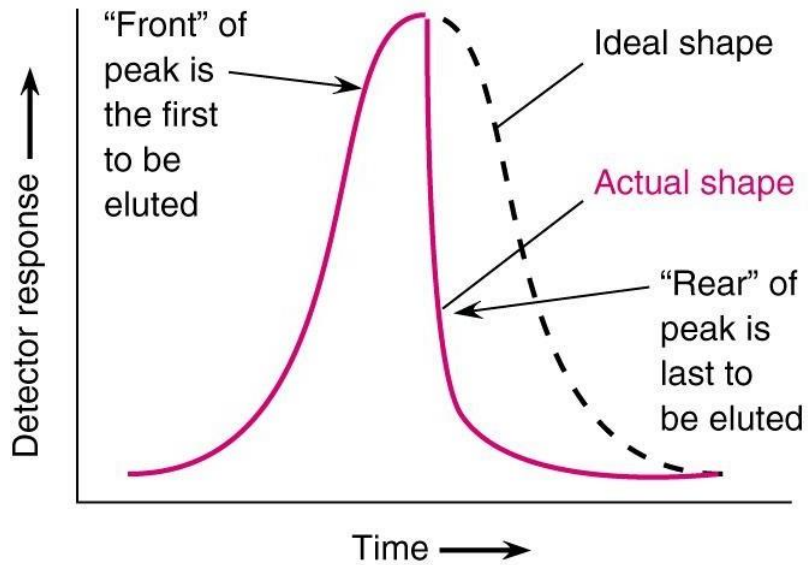
$$R_s = \Delta \frac{t_r}{w_{av}} = \frac{(t_{r_2} - t_{r_1})}{1/2(w_1 + w_2)} \propto \sqrt{L}$$



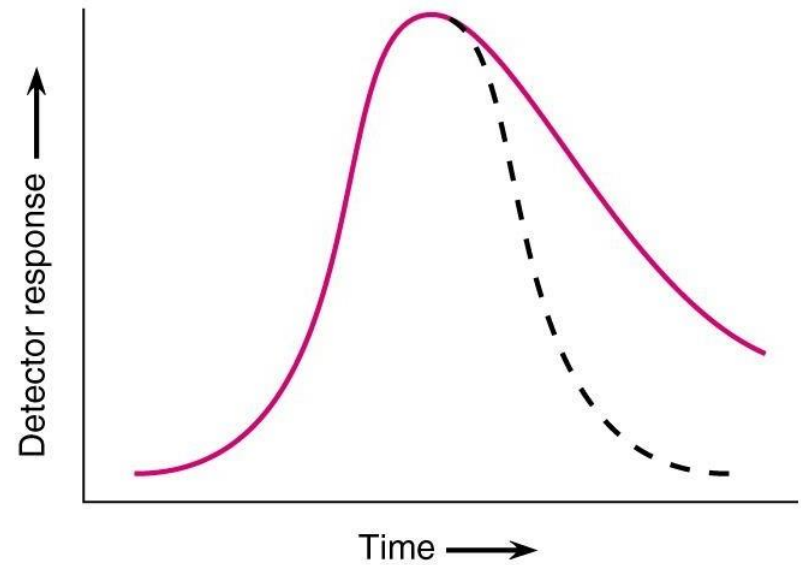
For quantitative analysis, $R_s \geq 1.5$

$2 \times \text{length of the s.p.} \Rightarrow \uparrow \sqrt{2} R_s$

Deviații de la cromatograma ideală



(a) Overloading



(b) Tailing

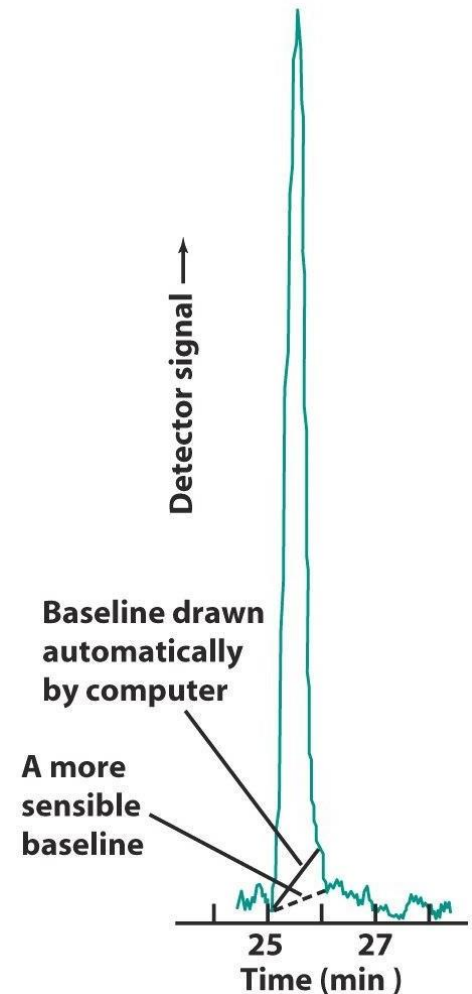
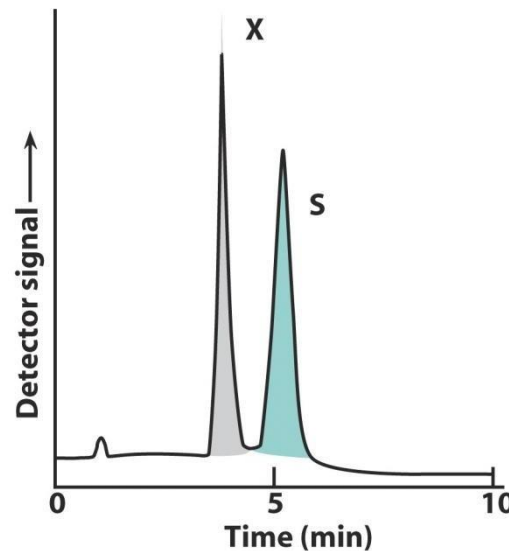
Determinarea calitativa și cantitativa prin metode cromatografice

Calitativ:

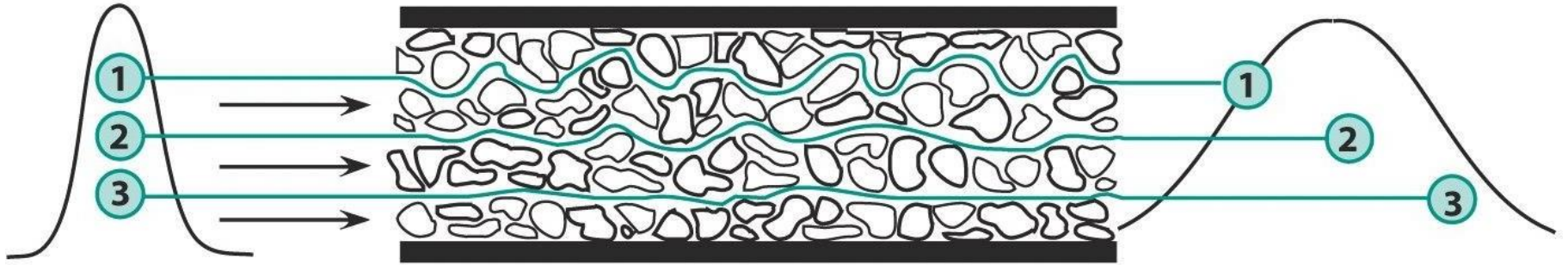
- Cromatografie
- Spectrometrie de masa
- Spectrometrie IR

Cantitativ:

- Aria peak-ului
- Standard intern



Separarea pe coloană



Separarea depinde de:

- Faza staționara (tipul de coloana)
- Faza mobila (solvent si gradient)

Coloane cromatografice

1. Coloane analitice - scala mica: **separare, identificare, sau măsurare.**
2. Coloane preparative – scala mare: **purificare**



Analitic $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$
Preparativ $15 - 20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

HPLC	
I.D.	2 - 5 mm
d_p	5 - 10 μm
Druck	bis 400 bar
H	< 0.1 mm
N	$10^4 - 10^5$
L	12.5, 25 cm

Coloane cromatografice – LC/ HPLC

Faza stationara:

Matrice suport:

- polimeri naturali (celuloza, dextran, agaroza)
- polimeri sintetici (alcooli polivinilici)
- materiale anorganice (silica, alumina, zirconia)

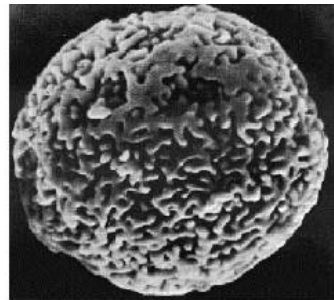
bonded phase (faza funcțională) :

- non-polara (C4, C8, C18)
- Polar (-NH₂, -CN)

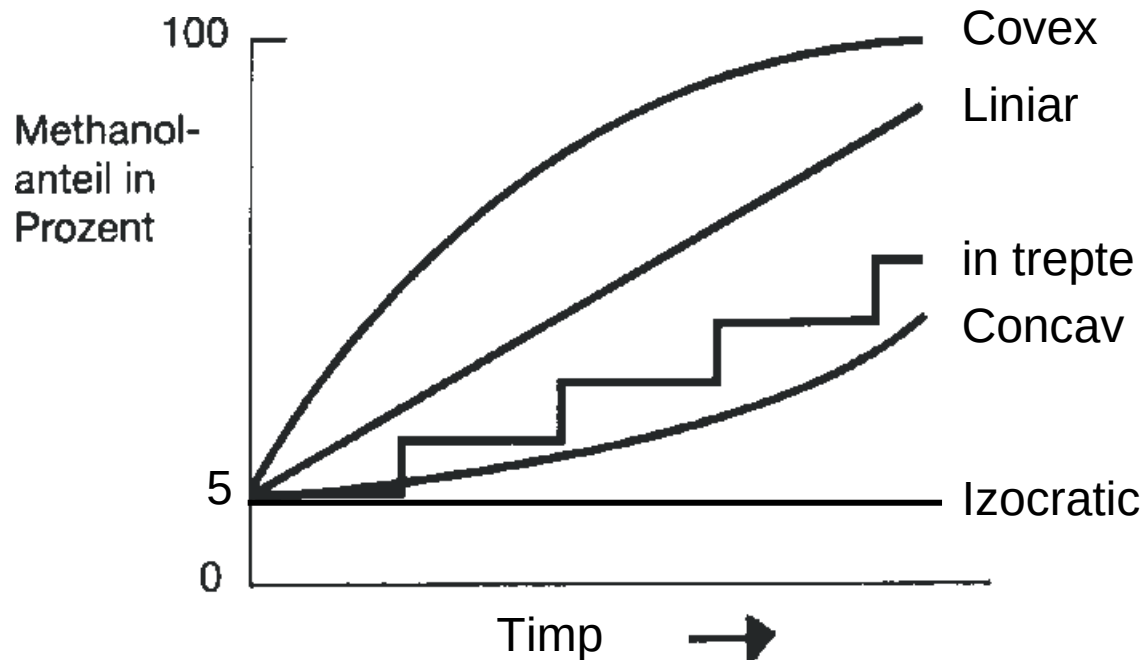
Faza mobila pre-conditii:

- miscibilă cu apa
- viscozitate mică
- detecție UV mică
- solubilitate bună
- ne-reactivă d.p.d.v. chimic

Eluția cromatografică – tipuri de gradiente



Macroporous spherical silica particle.
[K.K.Unger, Porous silica, Elsevier, 1979]



Elution procedure

Eluția cromatografică – tipuri de gradient

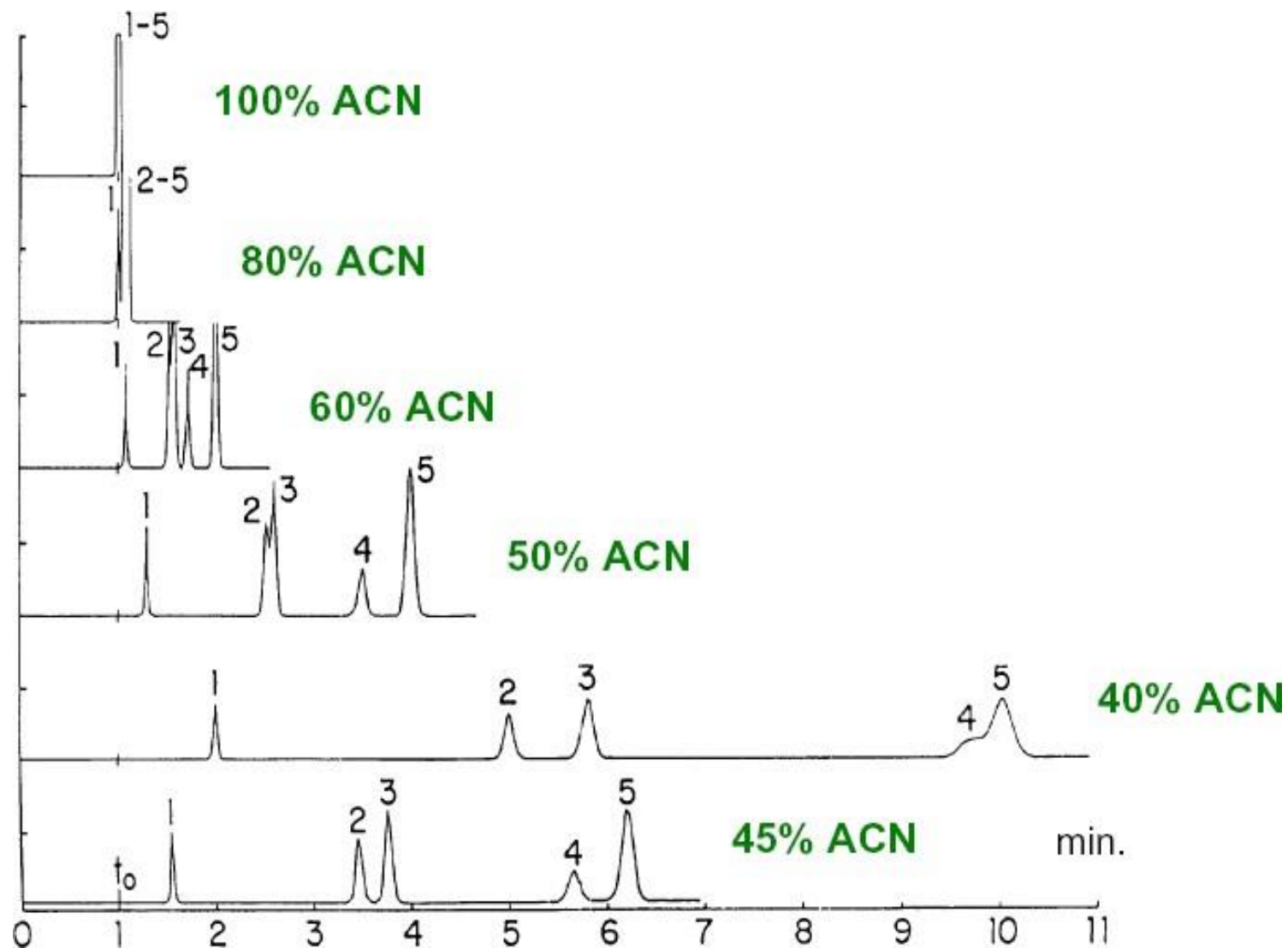
Reducând polaritatea fazei mobile permite desprinderea (eluția) moleculelor hydrophobic legate de faza staționara. Aceasta se face prin aducerea în sistem a unui solvent organic precum AcCN, metanol sau izopropanol.

TFA – ion pairing agent

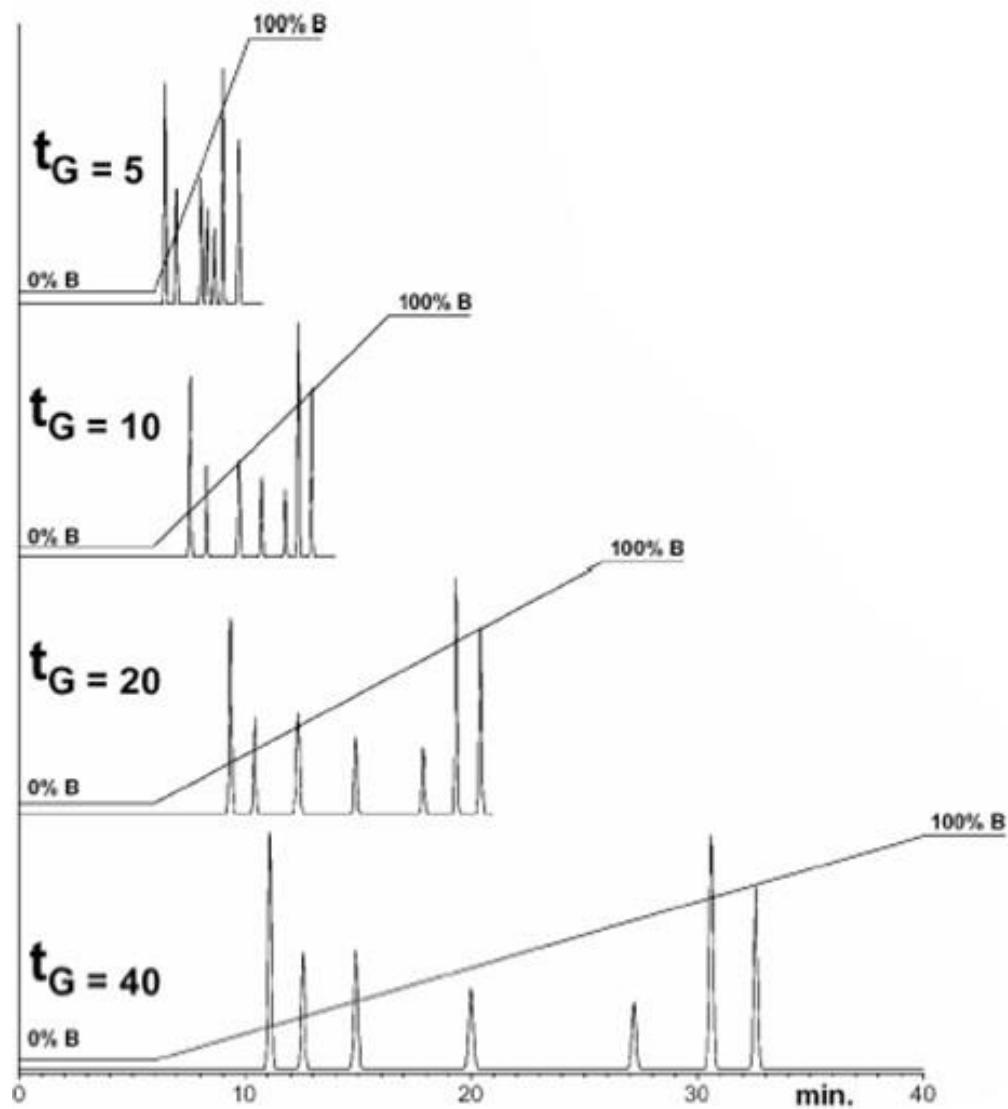
Faza mobila: **Eluent A:** 0.1% TFA in MilliQ

Eluent B: 80% AcCN, 0.1% TFA in MilliQ

Elutie izocratica cu diferite procente de solvent organic



Influența gradientului asupra separării



Stabilirea unui gradient pentru separarea cromatografica

Gradient A pentru *peptida X*.

Timp (min)	%A	%B	Flow (ml)
0	95	5	1
5	95	5	1
60	40	60	1
65	0	100	1

peptida X a eluat la un $R_t = 32$ min

Gradient B pentru *peptida X*.

Timp	%A	%B	Flow (ml)
0	75	25	1
5	75	25	1
25	55	45	1
30	0	100	1
35	0	100	1
38	80	20	1

peptida X elueaza la un $R_t = 17$ min

- Se consideră că o coloană este structurată într-un număr de celule sau talere, numite în cazul procesului cromatografic talere teoretice. Fiecare taler are o lungime finită, în care analitul se găsește (staționează) un anumit interval de timp.
- Se considera un echilibrul de repartiție cromatografică a unui analit X, între o fază mobilă (notată cu indicele m) și o fază staționară (s)

$$X_m \xrightleftharpoons{\quad} X_s \qquad K = \frac{[X]_s}{[X]_m} \qquad d[X]_s = K \cdot d[X]_m$$

Numarul de talere teoretice a unei coloane cromatografice a fost identificat cu eficienta ei.

Teoria talerelor își propune să stabilească o relație între concentrația analitului X în faza mobilă după parcurgerea a n talere din coloana cromatografică.

Teoria talerelor

In condiții de echilibru

$$dm = v_s d[X]_{s,p} + v_m d[X]_{m,p}$$

dm - variația de masă de analit din talerul p .

$$v = \frac{V}{v_t} = \frac{V}{v_m + K \cdot v_s} \Rightarrow dv = \frac{dV}{v_m + K \cdot v_s}$$

v_t - volumul talerului
 V - volumul coloanei
 v - numărul de talere



$$[X]_{m,p} = \frac{[X]_0 \cdot e^{-v} \cdot v^p}{p!}$$

$[X]_0$ - conc. inițială a analitului X

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

H - înălțimea unui taler
 N - nr. de talere teoretice
 L - lungimea coloanei

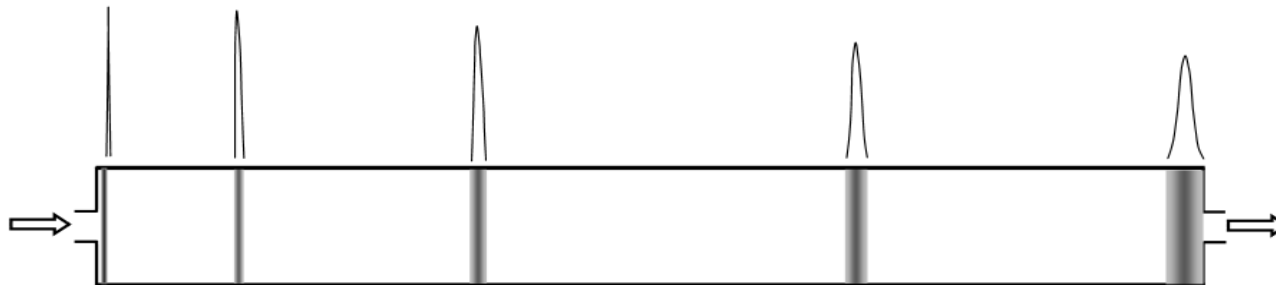
Taler (p-1)	Taler p	Taler (p+1)
Faza staționară v_s $[X]_{s,p-1}$	Faza staționară v_s $[X]_{s,p}$	Faza staționară v_s $[X]_{s,p+1}$
Faza mobilă v_m $[X]_{m,p-1}$	Faza mobilă v_m $[X]_{m,p}$	Faza mobilă v_m $[X]_{m,p+1}$

Reprezentarea a trei talere teoretice succesive dintr-o coloana.

* viteza de modificare a conc. unui analit în faza mobilă din talerul notat cu p la trecerea fazei mobile prin el. Soluția acestei ec. reda conc. analitului X în faza mobilă din talerul notat cu p pentru un număr de talere teoretice din coloana cromatografică notată cu v . În practică v este mult mai mare decât 100 iar ecuația finală devine una de tip Gauss în acord cu forma experimentală a picurilor cromatografice.

Teoria dispersiei frontului de analit în coloana cromatografică

Teoria talerelor exprima calitatea unei coloane prin nr. de talere teoretice atribuite procesului cromatografic pentru un anumit analit injectat în coloana, dar nu redă și o explicație a mecanismului ce stă la baza echilibrelor de distribuție ale analiților între faza mobilă și faza staționară



Reprezentarea lărgirii frontului de analit la trecerea prin coloana cromatografică.

Teoria dispersiei de pinde de:

- viteza transferului de masă între cele două faze participante la procesul cromatografic
- viteza de difuziune a moleculelor de analit (solut) de-a lungul coloanei și
- hidrodinamica fazei mobile.

Reprezentarea grafică a ecuației van Deemter.

$$H = d_p + \frac{2 \cdot \delta \cdot (1 - \delta)}{k_2} \cdot u + 2D \cdot \frac{1}{u}$$

ecuația van Deemter

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

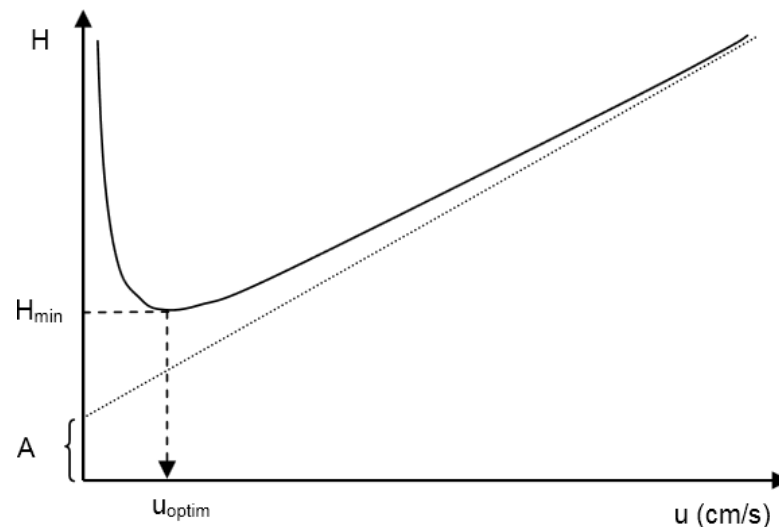
H - înălțimea talerului teoretic

A - constanta de difuziune turbulentă

B - constanta difuziei longitudinale

C - constanta transferului de masă al analitului în faza staționară

u - viteza fazei mobile

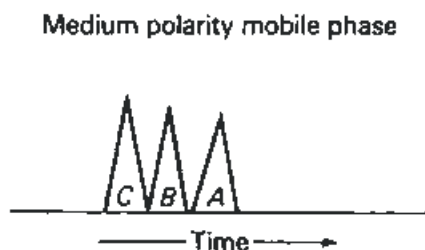
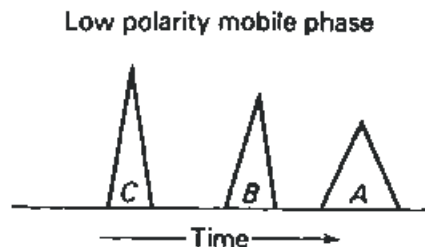


Faza normala si faza inversata în cromatografie

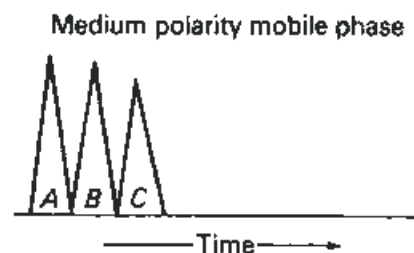
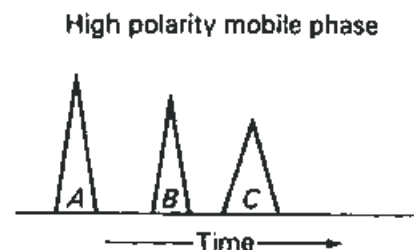
Reversed Phase Chromatographie (RP-HPLC): separa moleculele pe baza diferențelor în hidrofobicitate. In RP-HPLC polaritatea fazei staționare este mai mica decât cea a fazei mobile.

- „bonded phase“ este extrem de hidrofobica sau ne-polară.
- faza mobilă este polară, în mod uzual apă.

(a)
NORMAL-PHASE CHROMATOGRAPHY



(b)
REVERSED-PHASE CHROMATOGRAPHY



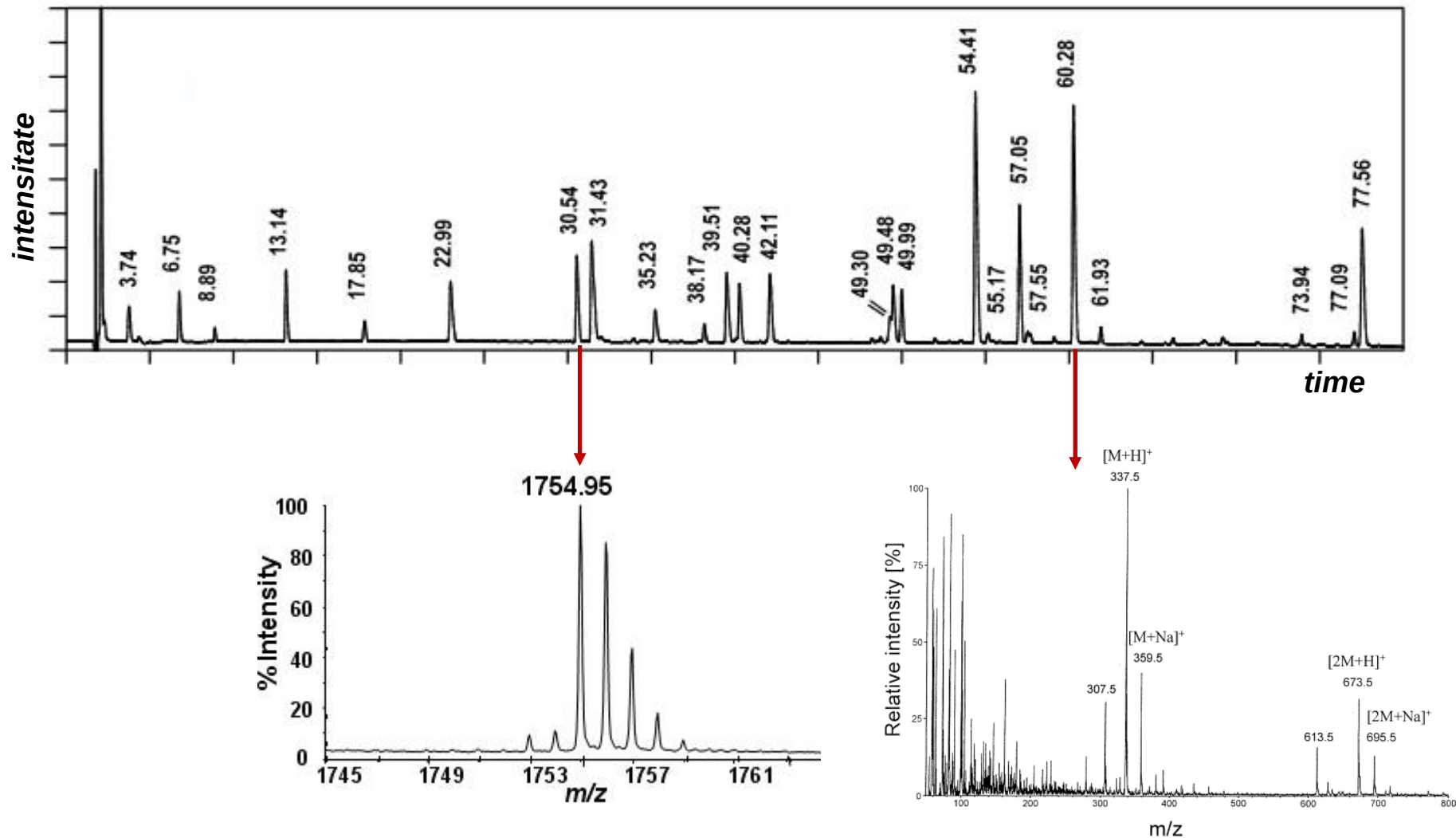
Detectori: detecția probelor introduse in sistemul cromatografic

Detector	Senzitivitate
Absorbție UV/VIS	100 pg – 1 ng
Fluorescența	1 – 10 pg
Spectrometrie de masa	100 pg – 1 ng
Electrochimic	10 pg – 1 ng
Index de refracție	100 ng – 1μg

Proteinele in soluție absorb lumina ultravioleta cu o absorbanta maximă la 200 nm si 280 nm.
Aminoacizii cu inele au o absorbanta maxima la 280 nm.
Legăturile peptidice dau o absorbanta maxima la 220 nm.
Structura secundară, terțiara, cuaternară, precum și factori, cum ar fi pH-ul, tăria ionică, etc pot modifica spectrul de absorbanta.

Peptide / proteine – detectie UV la 220 nm

Cromatogramă tipică în cromatografia de lichide cuplată cu detector masspectrometric LC/MS



Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

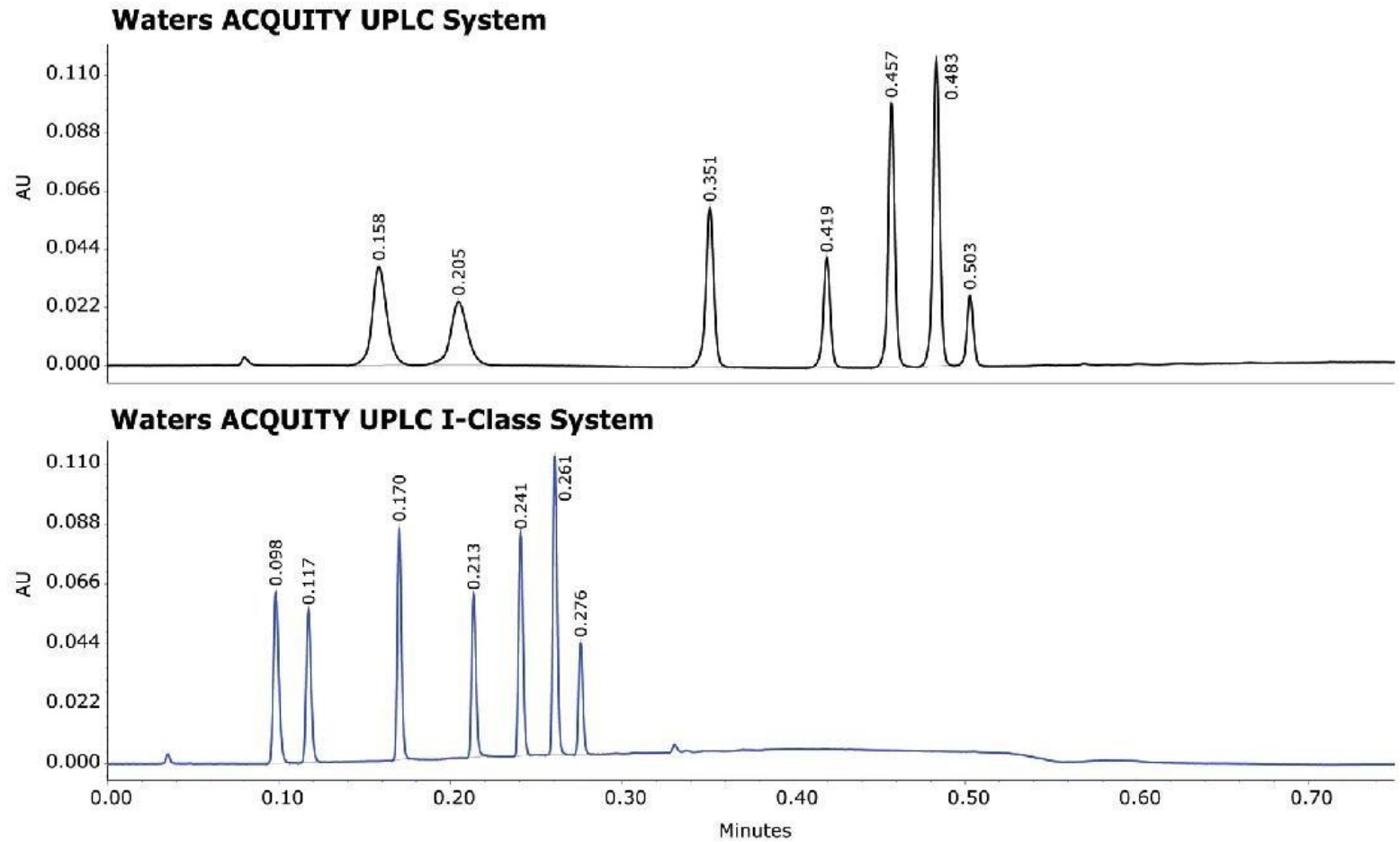
Viteza (timp mai scurt), sensibilitate și rezoluție mai mare

UPLC- foarte importantă în industria farmaceutică și identificarea proteinelor.

Prin folosirea unor particule mai mici ($1,7\ \mu\text{m}$, $2\ \mu\text{m}$), viteza și capacitatea de separare (numărul de peak-uri soluționate pe unitatea de timp) pot fi extinse la noi limite. Pentru a crea presiunea necesară în UPLC se folosesc pompe ce permit o presiune de 1000 bari.



UPLC - cromatogramme



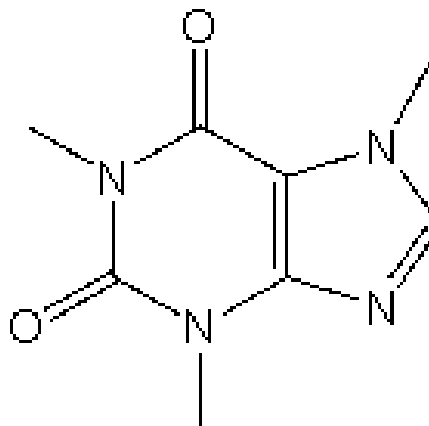
Determinarea cantitativa a cofeinei prin RP-HPLC

Concentrația Cofeinei (μg/μl)	Aria Peak-lui (mV×min ×10 ⁷)
0.25	2.2665
0.5	3.5074
0.75	5.5779
1	6.7391
1.25	8.1167
1.50	9.5658
2	12.5890
X1=	
X2=	

Vydac C₁₈ column

λ: 274 nm

Coffein Structure



Curba de calibrare standard a cofeinei

