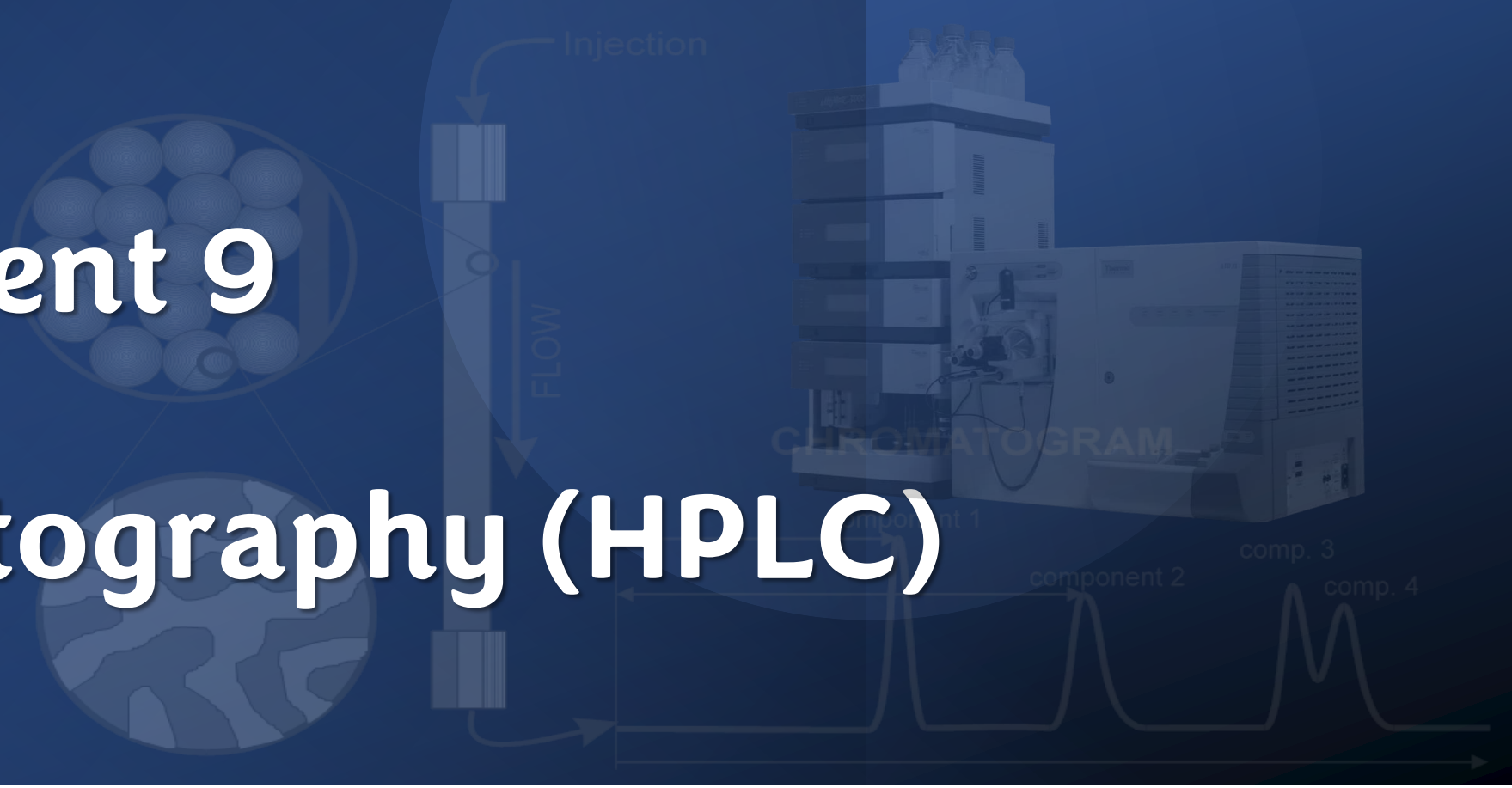
Experiment 9

Chromatography (HPLC)



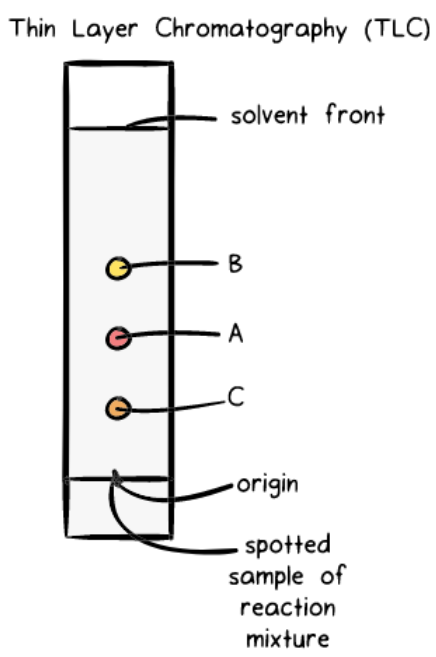
INTRODUCTION

الكروماتوغرافيا هي تقنية تحليلية لفصل خليط معقد من المواد الكيميائية إلى مكوناته الفردية، بحيث يمكن تحليل كل مكون بدقة.

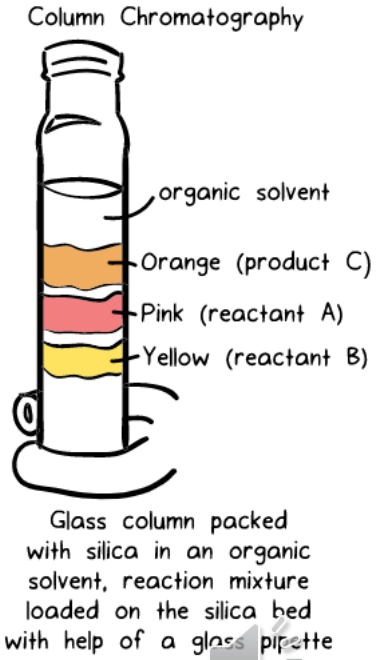
Chromatography is an analytical technique **for separation** of a complex **mixture** of chemical substances **into its individual components**, so that the individual components can be thoroughly analyzed.

- Its principle relies on the **differential affinities** of the individual substances for a gas or liquid **mobile medium** and for a solid or liquid **stationary medium** through which they pass. So, the components of the mixture will distribute unequally between the two immiscible phases.

> يعتمد مبدأها على اختلاف ميل كل مادة على حدة للوسط المتحرك (غاز أو سائل) وللوسط الثابت (صلب أو سائل) الذي تمر عبره. لذا، تتوزع مكونات الخليط بشكل غير متساوٍ بين الطورين غير القابلين للامتزاج.



- عينة موضعية من خليط التفاعل



عمود زجاجي معبأ بالسيليكا في مذيب عضوي، يتم تحميل خليط التفاعل على طبقة السيليكا بمساعدة فاصل لامع.

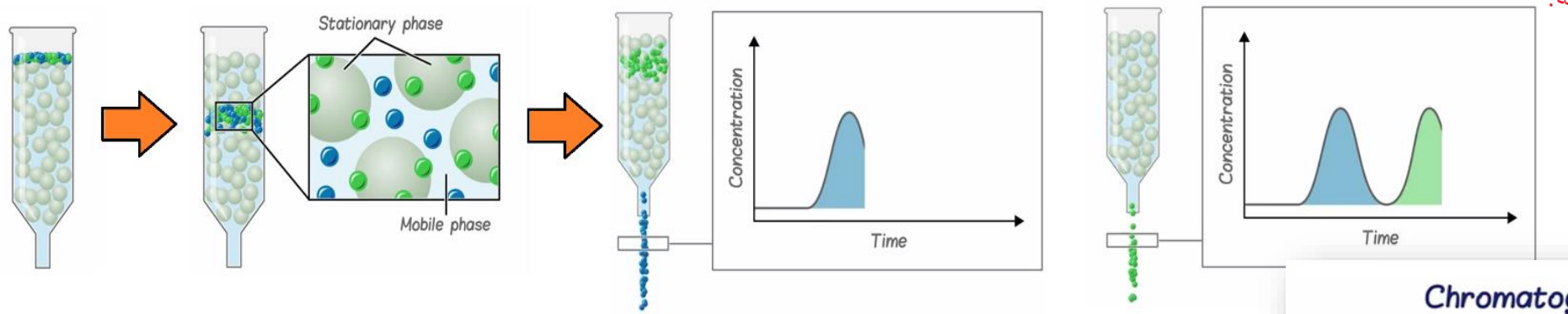
Purpose of Chromatography

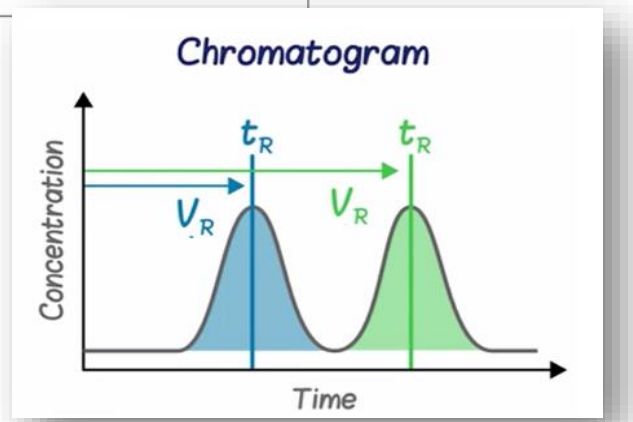
- **Analytical:** determine chemical composition of a sample (qualitatively and then quantitively).

التحليل: تحديد التركيب الكيميائي للعينة (نوعيًا ثم كميًا).

- **Preparative:** purify and collect one or more components of a sample.

التحضير: تنقية وجمع مكون واحد أو أكثر من مكونات العينة.



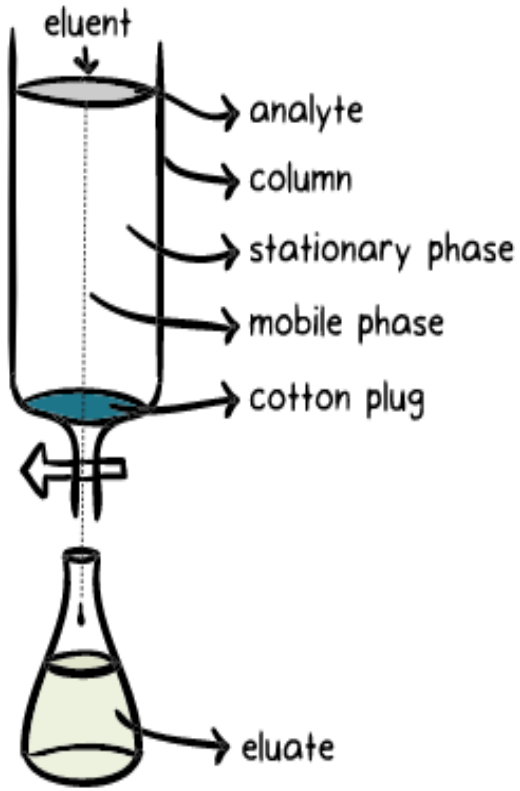


TERMS RELATED TO CHROMATOGRAPHY

- **Analyte:** The mixture of substances that are to be separated and analyzed during chromatography.

*المادة المراد تحليلها: خليط المواد المراد فصلها وتحليلها أثناء الكروماتوغرافيا.

- **Mobile Phase:** Liquid or gaseous solvent that flows over or through the stationary phase in a definite direction through the column.
- **Stationary Phase:** Solid or liquid or a mixture of solid/liquid medium which is immobilized (fixed) on the support particles or on the inner wall of the column tubing.
- **Eluent:** Fluid entering the column consist of mobile phase & analyte.
- **Effluent (Eluate):** Fluid leaving the column.



المُذيب: السائل الداخل إلى العمود يتكون من المحلول المتحرك والتحليلي.

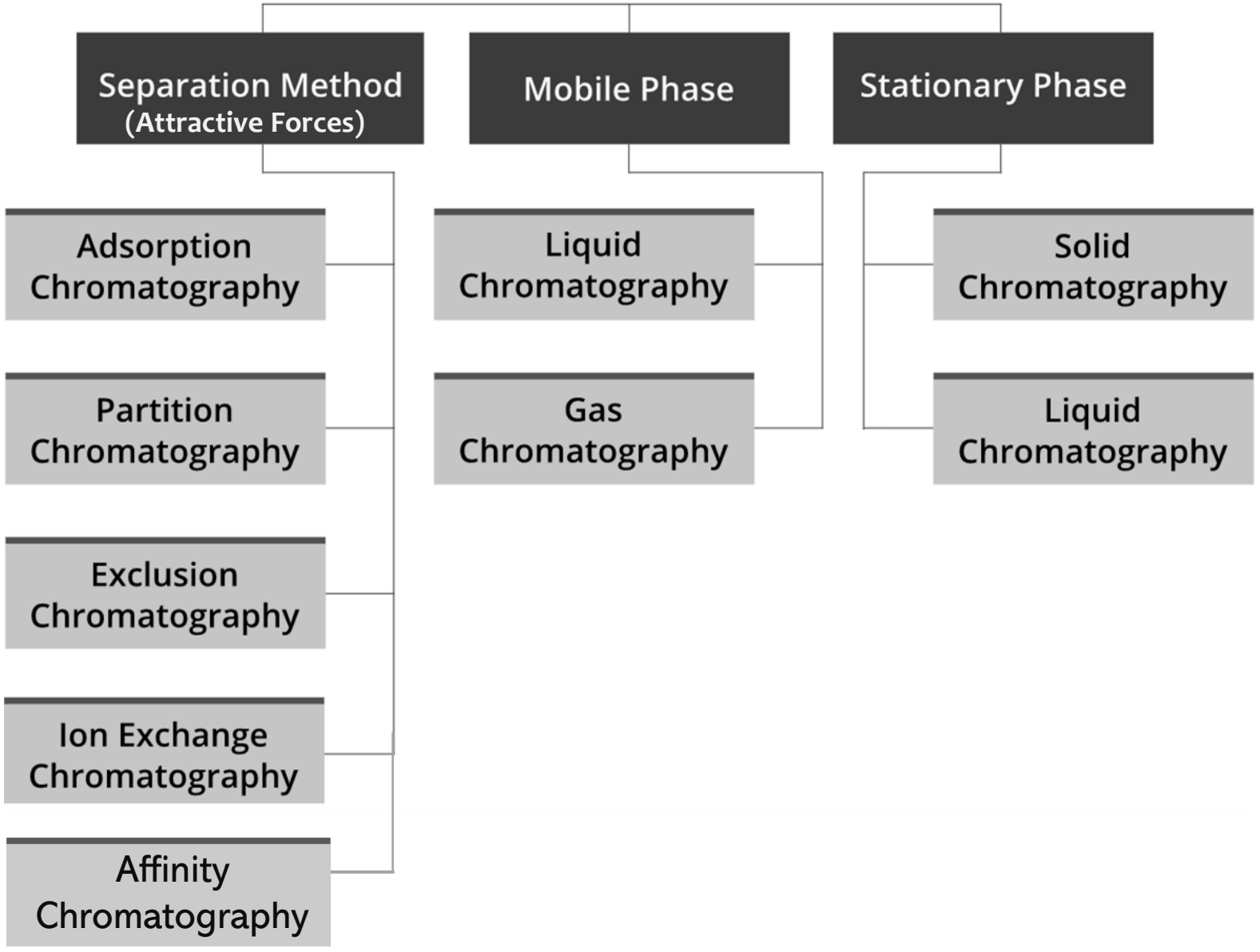
المُفرز (المُستخلص): السائل الخارج من العمود.

*الطور المتحرك: مذيب سائل أو غازي يتدفق فوق أو عبر الطور الثابت في اتجاه محدد عبر العمود.
الطور الثابت: وسط صلب أو سائل أو خليط من وسط صلب/سائل مثبت على جزيئات الدعم أو على الجدار الداخلي لأنبوب العمود.

Applications for Chromatography

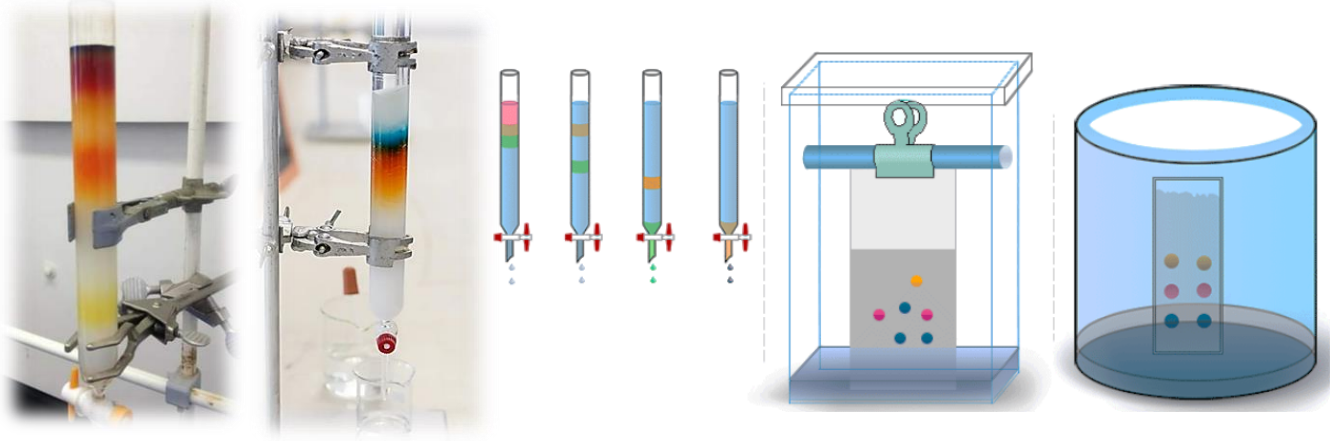
- **Pharmaceutical Company** – determine amount of each chemical found in new product
  - شركة أدوية - تحديد كمية كل مادة كيميائية موجودة في منتج جديد
- **Hospital** – detect blood or alcohol levels in a patient's blood stream
  - مستشفى - الكشف عن مستويات الدم أو الكحول في مجرى دم المريض
- **Law Enforcement** – to compare a sample found at a crime scene to samples from suspects
  - إنفاذ القانون - مقارنة عينة تم العثور عليها في مسرح الجريمة بعينات من المشتبه بهم
- **Environmental Agency** – determine the level of pollutants in the water supply
  - وكالة البيئة - تحديد مستوى الملوثات في إمدادات المياه
- **Manufacturing Plant** – to purify a chemical needed to make a product
  - مصنع تصنيع - تنقية مادة كيميائية لازمة لصنع منتج

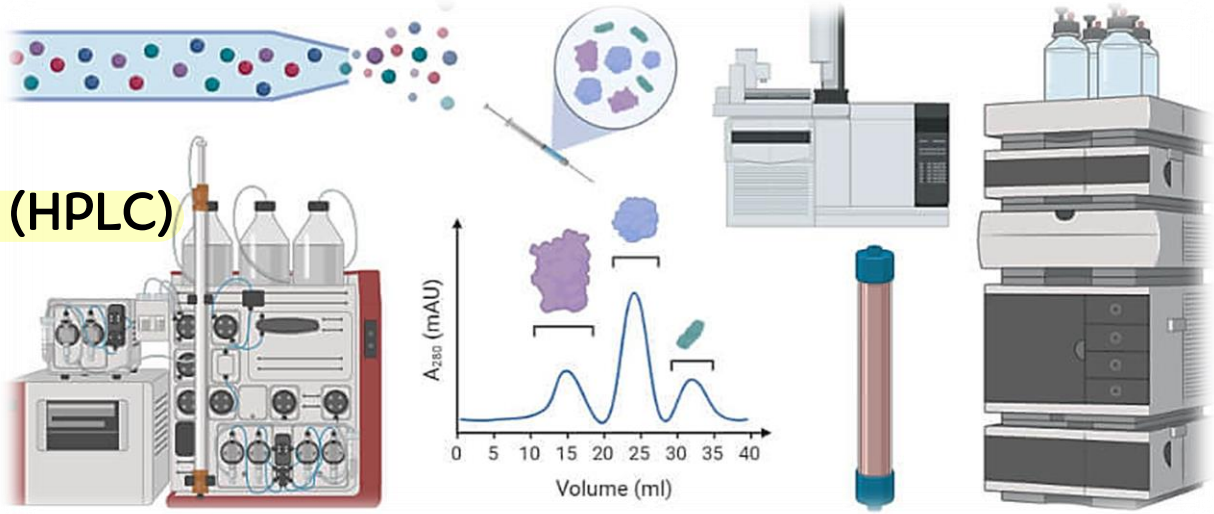
Classification of Chromatography



Types of Chromatography Methods

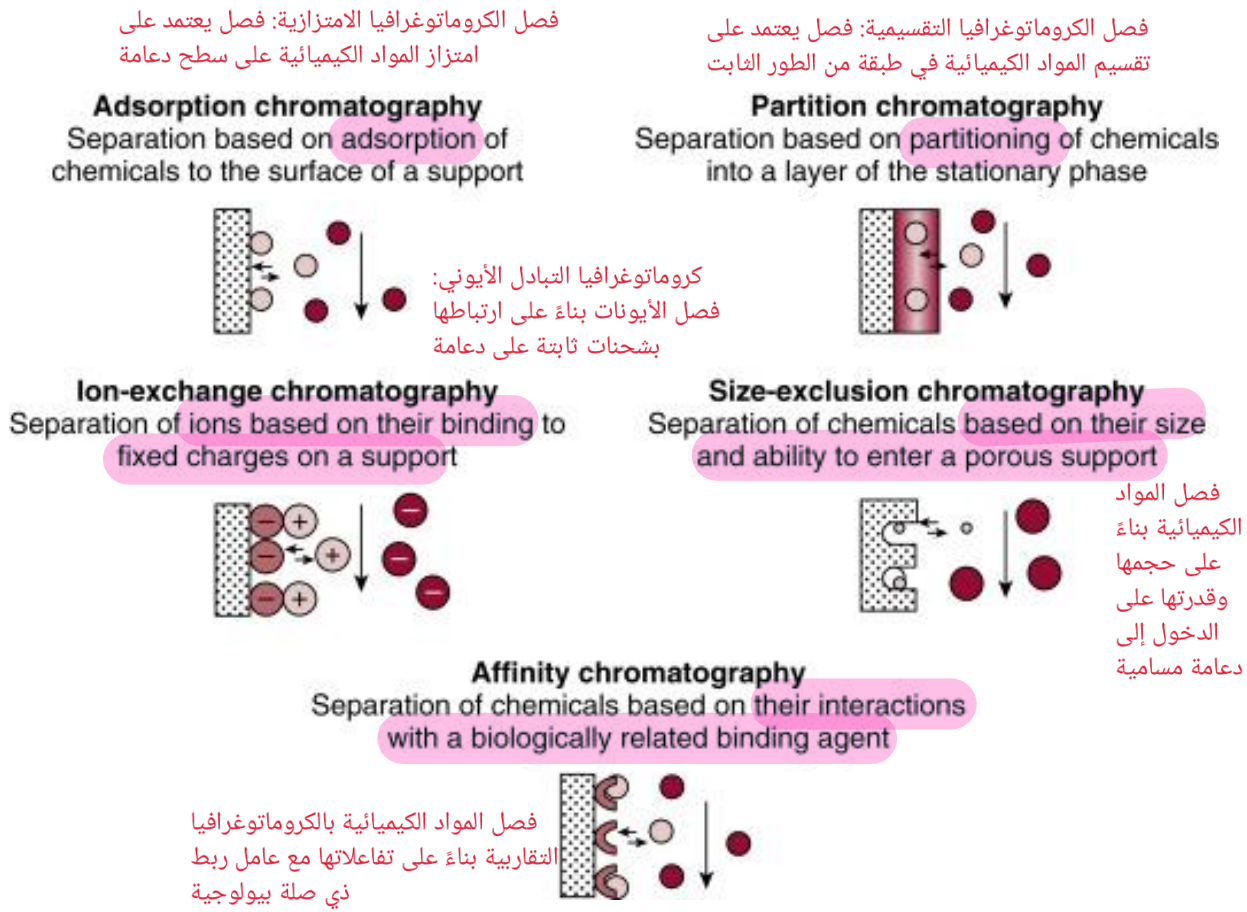
- Paper Chromatography
- Thin Layer Chromatography (TLC)
- Gas Chromatography (GC)
- Column Chromatography
- Liquid Chromatography (LC)
- High Performance Liquid Chromatography (HPLC)





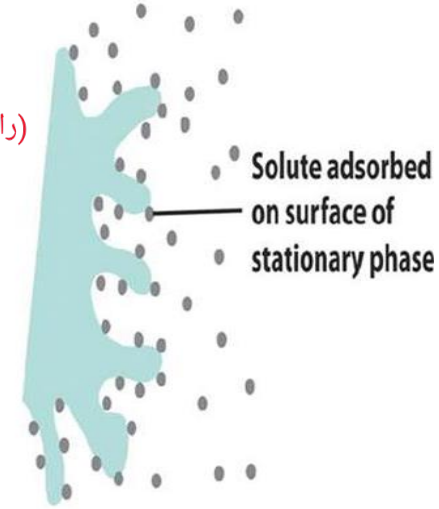
Classification based on Attractive Forces

1. Adsorption chromatography
2. Ion Exchange chromatography
3. Partition chromatography
4. Size Exclusion chromatography
5. Affinity chromatography



1. Adsorption Chromatography

الفصل القائم على امتزاز المواد على سطح مادة صلبة (الطور الثابت). يعتمد على تفاعلات غير قطبية مختلفة (رابطة هيدروجينية، أيونية، كارهة للماء، فان دير فالس...).



Separation based on their adsorption onto the surface of solid (stationary phase). Based on different non-covalent interactions (H-bond, ionic, hydrophobic, vander waal...).

< الفصل الطوري العادي: المواد التحليلية القطبية > تمتص بقوة > طور ثابت قطبي (مثل: السيليكا أو الألومينا) ← طور متحرك غير قطبي

- **Normal phase-separation: Polar analytes** → adsorbs strongly → Polar stationary phase (ex: Silica or Alumina) → Nonpolar mobile phase

لازم ال mobile يكون phase عكس خصائص ال stationery phase

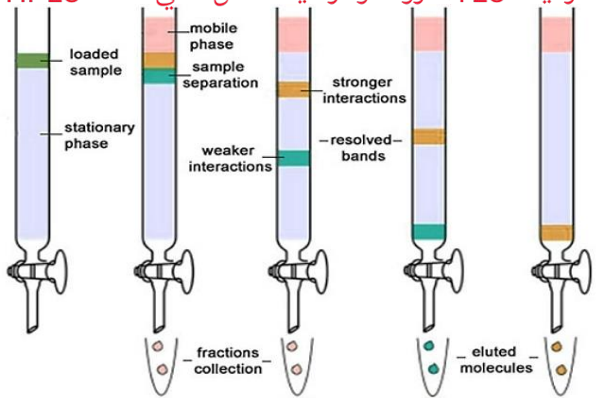
- **Reverse phase-separation: Non-polar analytes** → adsorbs strongly → Non-polar stationary phase (carbon chain bonded to silica) → Polar mobile phase

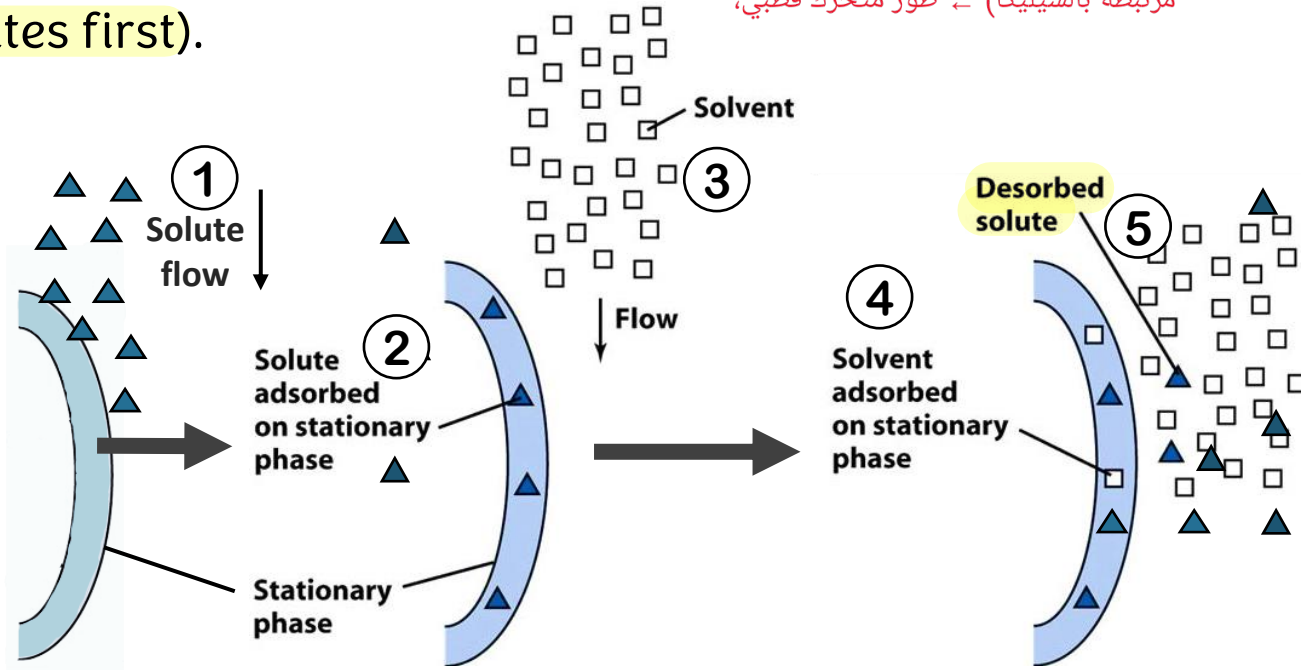
< فصل الطور العكسي: المواد التحليلية غير القطبية تمتص بقوة ← طور ثابت غير قطبي (سلسلة كربون مرتبطة بالسيليكا) ← طور متحرك قطبي،

Degree of adsorption (less tightly bound → elutes first).

Ex: Column chromatography CC, TLC, HPLC

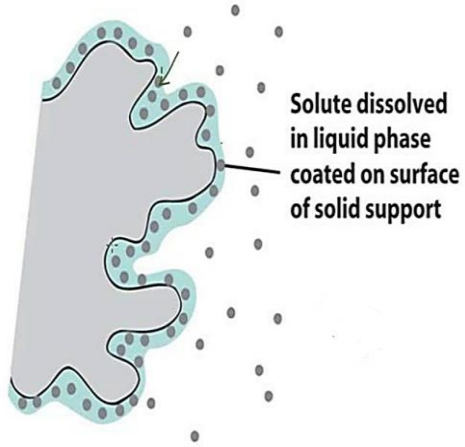
درجة الامتزاز (الارتباط الأقل قوة > يخرج أولاً). مثال: كروماتوغرافيا العمود CC، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC، كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء HPLC





2. Partition Chromatography

difference in solubility of solute in two faces



Solute are separated based on their partition (K_d) between a liquid mobile phase and a liquid stationary phase coated on a solid support.

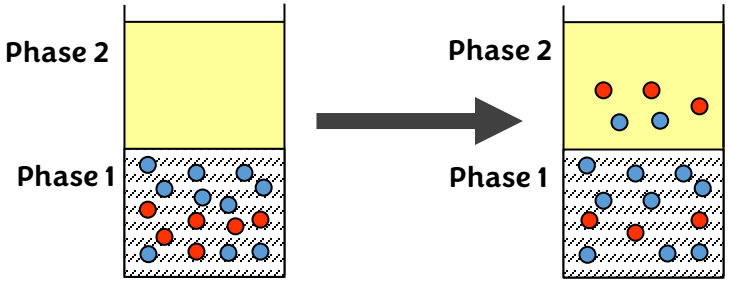
K_d → ratio of concentration of solute in two phases (Solubility differences).

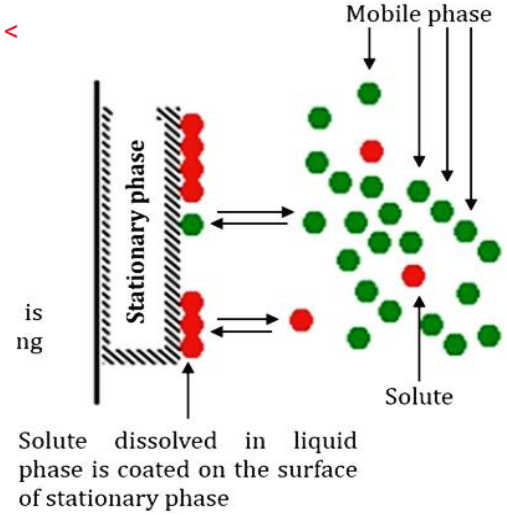
- **Normal** – analyte is nonpolar organic; stationary phase MORE polar than the mobile phase.
  Ex: TLC, Paper Chromatography

يتم فصل المذاب بناءً على توزيعه (K) بين طور متحرك سائل وطور ثابت سائل مغلف على دعامة صلبة. K > نسبة تركيز المذاب في الطورين (اختلافات الذوبانية). > عادي - المادة المراد تحليلها عضوية غير قطبية: الطور الثابت أكثر قطبية من الطور المتحرك. مثال: كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، كروماتوغرافيا الورق

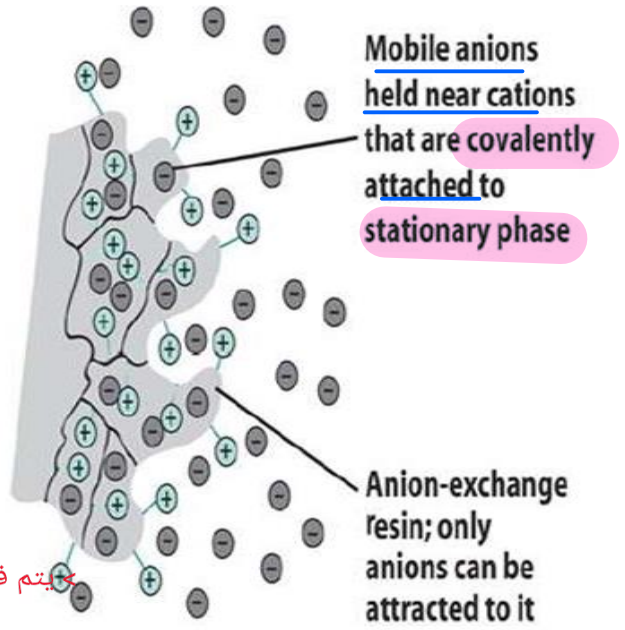
- **Reverse** – analyte is polar organic; stationary phase LESS polar than the mobile phase.
  Ex: HPLC

> عكسي - المادة المراد تحليلها عضوية قطبية: الطور الثابت أقل قطبية من الطور المتحرك. مثال: كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء





3. Ion Exchange Chromatography



Use ionic stationary phase (Ionic exchanger)

- ➢ ions separated based on their tendency to displace counter ions adsorbed on stationary phase (Depends on charge, hydration, "solubility").
- ➢ Used for analysis of proteins, nucleic acid, amino acids and its base pair.

استخدام طور ثابت أيوني (مبادل أيوني)
يتم فصل الأيونات بناءً على ميلها لإزاحة الأيونات المقابلة الممتصة على الطور الثابت (يعتمد على الشحنة، والترطيب، و"الذوبانية").
تُستخدم لتحليل البروتينات، والأحماض النووية، والأحماض الأمينية، وأزواج القواعد.

- **Anionic stationary phases:** the resin carries positive charges (**attracts anions**) and allows the removal/separation of positive charges.

الأطوار الثابتة الأنيونية: يحمل الراتنج شحنات موجبة (يجذب الأنيونات) ويسمح بإزالة/فصل الشحنات الموجبة. 100%

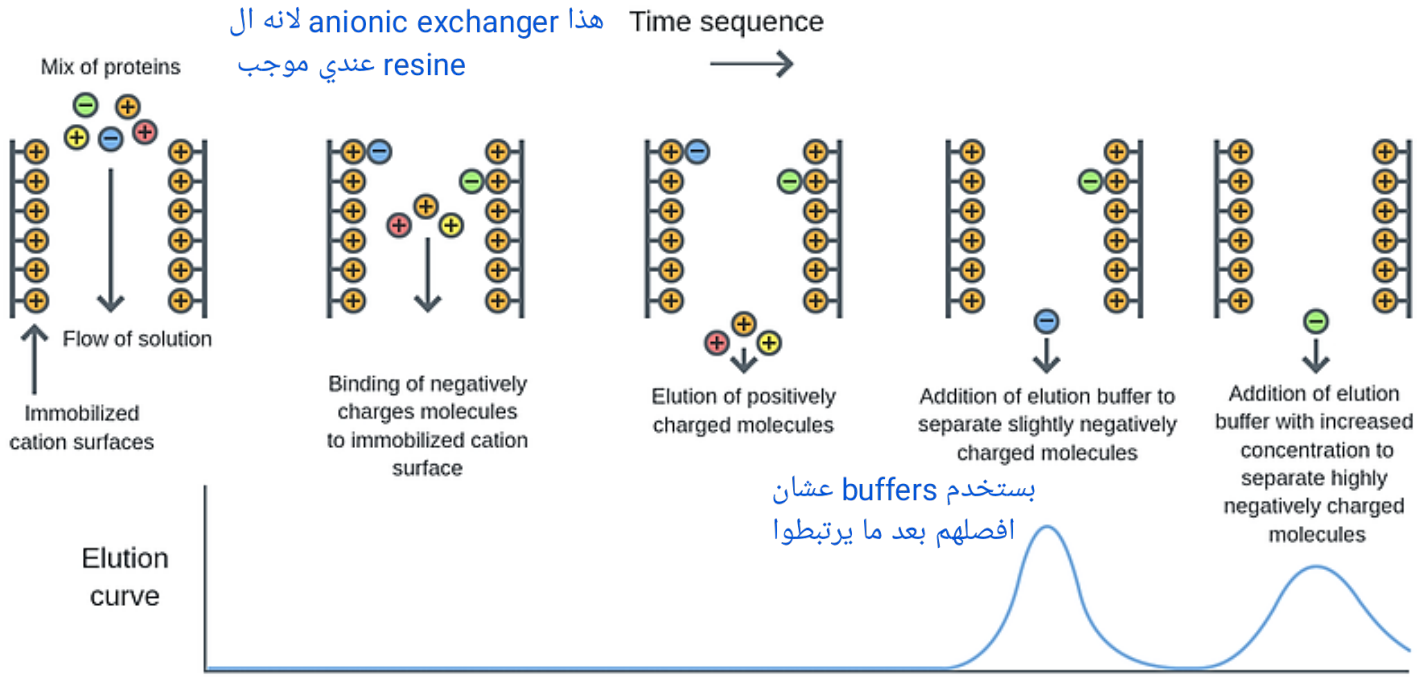
- **Cationic stationary phases:** the resin carries negative charges (**attracts cations**) and allows the removal/separation of negative charges.

الأطوار الثابتة الكاتيونية: يحمل الراتنج شحنات سالبة (يجذب الكاتيونات) ويسمح بإزالة/فصل الشحنات السالبة.

- **Ex:** GC, HPLC

مثال: GC، HPLC

➢ Example of Anionic Exchanger:



Resin Type	Cationic Exchanger	Anionic Exchanger
Charge of the resin (stationary phase)	−	+
Net charge of molecule of interest	+	−

هدفي انه افصلهم

4. Size (Molecular)Exclusion Chromatography

Separation is a result of “trapping” of molecules in the pores of the packing material

الفصل هو نتيجة "احتجاز" الجزيئات في مسام مادة التعبئة

solid ➢ Stationary phase is a porous matrix

> الطور الثابت عبارة عن مصفوفة مسامية

➢ Very large molecules can’t get into the pores – unretained

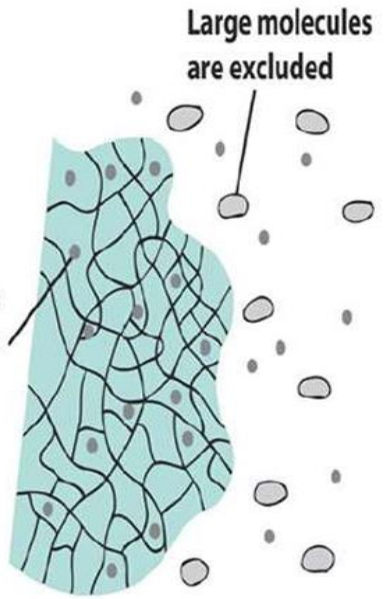
>الجزيئات الكبيرة جدًا لا تستطيع الدخول إلى المسام - غير محتجزة

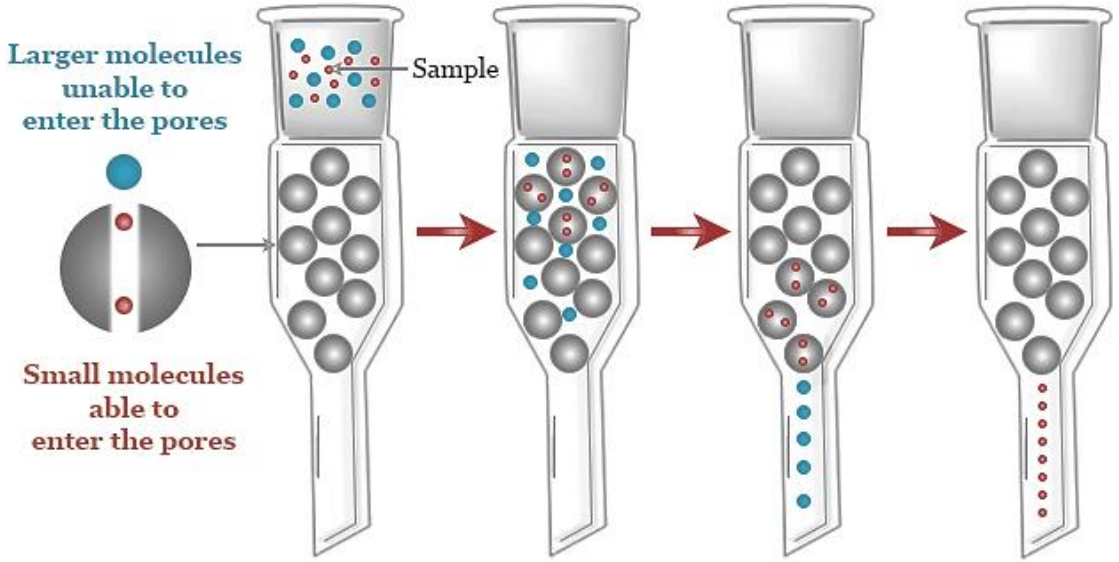
➢ Very small molecules get hung up into pores for a long time – most retained – longest retention time

>الجزيئات الصغيرة جدًا تعلق في المسام لفترة طويلة - معظمها محتجز لأطول وقت احتجاز

Ex: GC, HPLC

very large ما رح يدخلوا جوا ال pores
وبطلعوا مع ال mobile phase



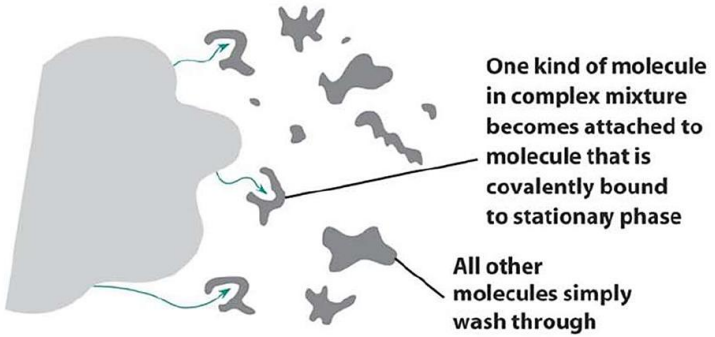


بستخدم انزيمات بحيث الموقع النشط لها مطابق لل analyte

5. Affinity chromatography

يتم فصل الخليط عندما يرتبط العنصر ذو الألفة تجاه الطور الثابت بالطور الثابت. في المقابل، يتم غسل المكونات الأخرى بالطور المتحرك.

The mixture are separated when the element having an affinity towards the stationary phase binds to the stationary phase. In contrast, other components are eluted with the mobile phase.



- The substrate/ ligand is bound to the stationary phase so that the reactive sites for the binding of components are exposed.

< يتم ربط المصلب/الليجاند بالمرحلة الثابتة بحيث تصبح مواقع التفاعل لربط المكونات مكشوفة.

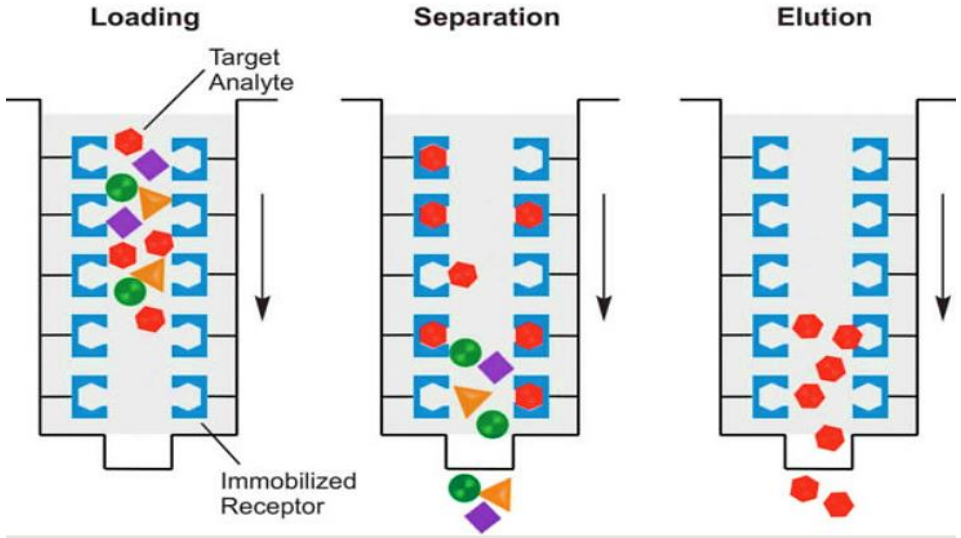
- Now, the mixture is passed through the mobile phase where the components with binding sites for the substrate bind to the substrate on the stationary phase while the rest of the components are eluted out with the mobile phase.

< الآن، يمر الخليط عبر الطور المتحرك حيث ترتبط المكونات التي تحتوي على مواقع ربط للركيزة بالركيزة على الطور الثابت بينما يتم غسل بقية المكونات بالطور المتحرك.

- The components attached to the stationary phase are then eluted by changing the pH, ionic strength, or other conditions.

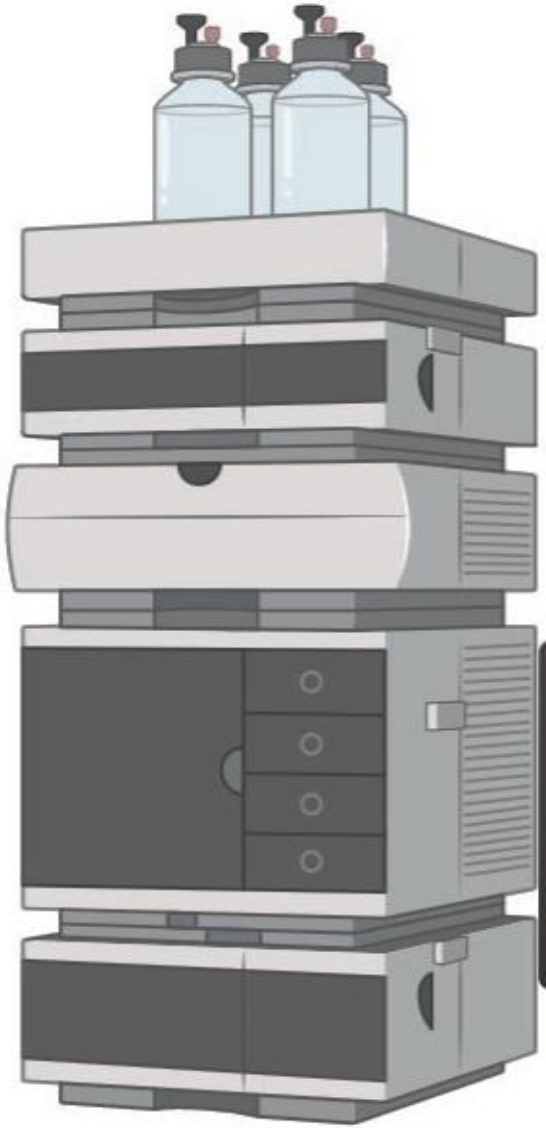
< ثم يتم غسل المكونات المرتبطة بالطور الثابت عن طريق تغيير الرقم الهيدروجيني أو القوة الأيونية أو غيرها من الظروف.

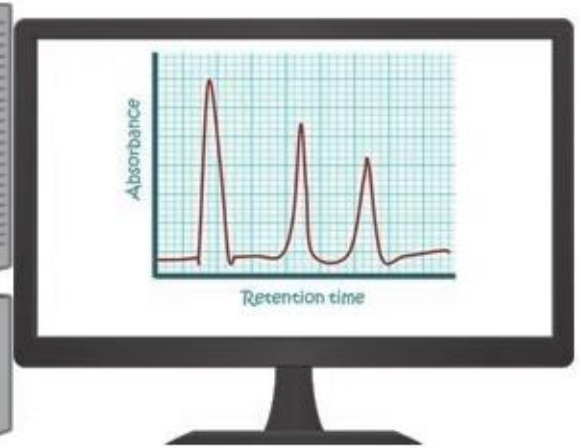
الي هي العوامل المؤثرة على نشاط الانزيمات

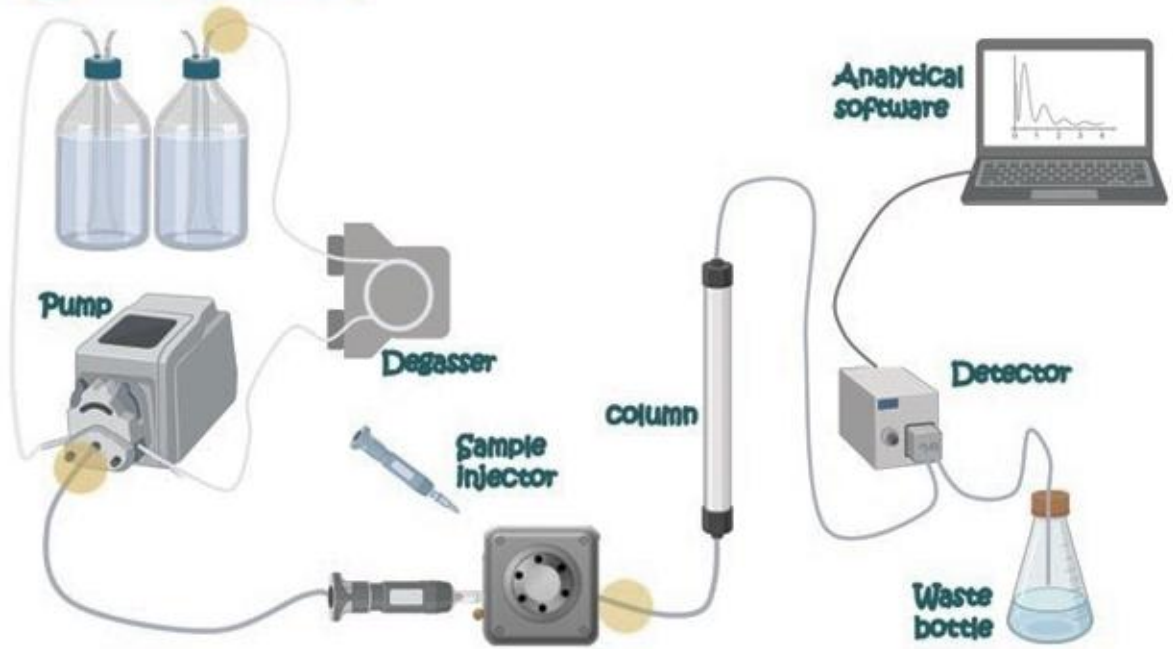


High Performance Liquid Chromatography

- High resolution power
- Mobile Phase is liquid







بقدر اتحكم بدرجات الحرارة والضغط وايضا ال wavelength

High-performance liquid chromatography (HPLC)

High-performance liquid chromatography (HPLC) is a modified form of column chromatography where the components of a mixture are separated based on their affinity with the stationary phase. It is an extension of conventional LC.

كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC) هي شكل معدل من كروماتوغرافيا العمود حيث يتم فصل مكونات الخليط بناءً على تقاربها مع الطور الثابت. وهي امتداد لكروماتوغرافيا السائل التقليدية.

- Very powerful technique (High resolution & High Pressure).

* تقنية فعالة للغاية (دقة عالية وضغط عال).

- The stationary phase is a granular material with very small porous are tightly particles packed in a separation column.

الطور الثابت عبارة عن مادة حبيبية ذات مسامية صغيرة جدًا، وجزيئات مُعبأة بإحكام في عمود الفصل.

Particles size is very small → larger surface area → higher interaction → Better separation of the molecules flowing through it.

حجم الجزيئات صغير جدًا > مساحة سطح أكبر > تفاعل أعلى > فصل أفضل للجزيئات المتدفقة عبرها

- The Eluent (liquid mobile phase) is forced through the column with extremely high pressure (up to 400 atm or 6,000 psi) by a pump

يتم دفع المذيب (الطور المتحرك السائل) عبر العمود بضغط عالٍ للغاية (يصل إلى 400 ضغط جوي أو 6000 رطل لكل بوصة مربعة) بواسطة مضخة

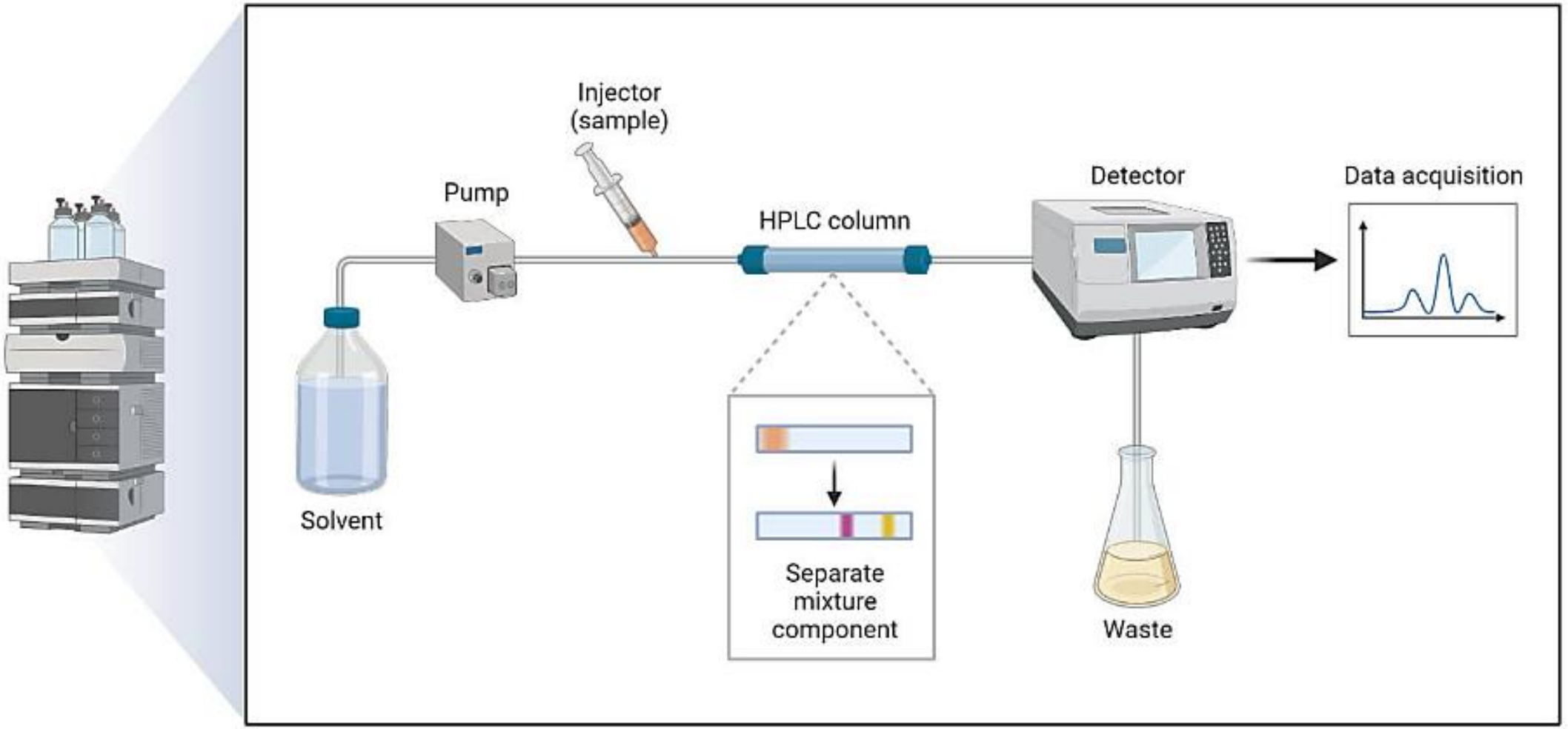
- separation time is highly reduced to few minutes rather than hours and days.

يتم تقليل وقت الفصل بشكل كبير إلى بضع دقائق بدلاً من ساعات وأيام.

HPLC Instrumentation Components

1. Solvent reservoir 2. Pump 3. Injector 4.Column 5.Detector 6.Recorder or Data system.

1. خزان المذيب 2. المضخة 3. الحاقن 4. العمود 5. الكاشف 6. المسجل أو نظام البيانات.



1. خزان المذيب: يُعرف أيضًا بخزان الطور المتحرك. يُنصح بتجنب استخدام المذيبات عالية اللزوجة لأنها تستغرق وقتًا أطول بكثير للمرور عبر العمود، كما يتطلب الأمر ضغطًا عاليًا. يؤدي ذلك إلى اتساع الذروة، لذا يُفضل عدم استخدام مثل هذه المذيبات.

liquid

1. **Solvent reservoir:** Solvent reservoir is also known as mobile phase reservoir.

نتجنبه قد ما نقدر

The high viscous solvent is discouraged to use as it takes much more time to travel through column, and high pressure is required for the viscous solvent. These leads to peak broadening, and hence better not to use such solvent.

- The choice of solvent depends on the nature of sample and the sensitivity of the detector.

يعتمد اختيار المذيب على طبيعة العينة وحساسية الكاشف.

كل ما زاد ال flow rate بزيد ال pressure

2. **Pump:** The pump's function is to propel the liquid mobile phase through the column at a set flow rate, which is measured in (mL/min). Which forces the mobile phase at a much a higher velocity than the gravity-flow columns.

- A pump can deliver a constant mobile phase composition (isocratic) or a rising mobile phase composition (gradient) during the chromatographic experiment.

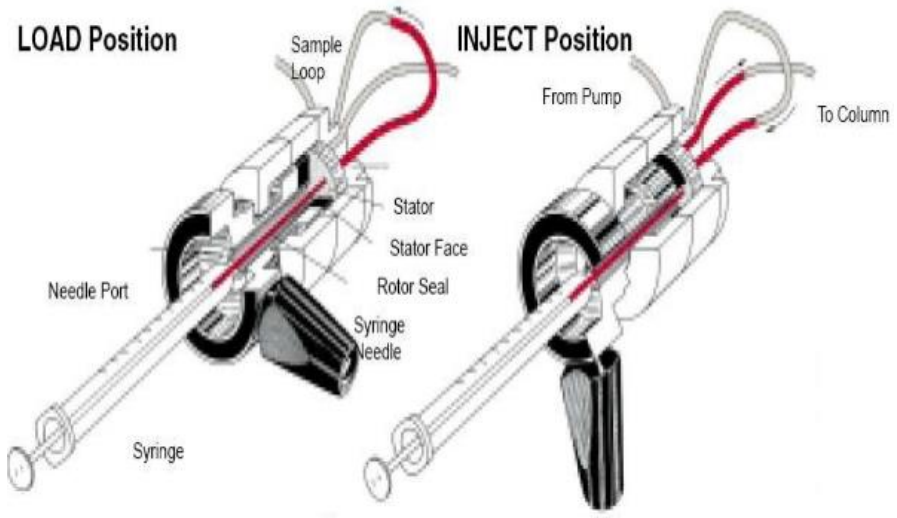
2. المضخة: وظيفة المضخة هي دفع الطور المتحرك السائل عبر العمود بمعدل تدفق محدد، يُقاس بوحدة (مل/دقيقة). مما يدفع الطور المتحرك بسرعة أعلى بكثير من أعمدة التدفق بالجاذبية. يمكن للمضخة توفير طور متحرك ثابت التركيب (متساوي التركيز) أو تركيب الطور المتحرك المتزايد (متدرج) أثناء التجربة الكروماتوغرافية.

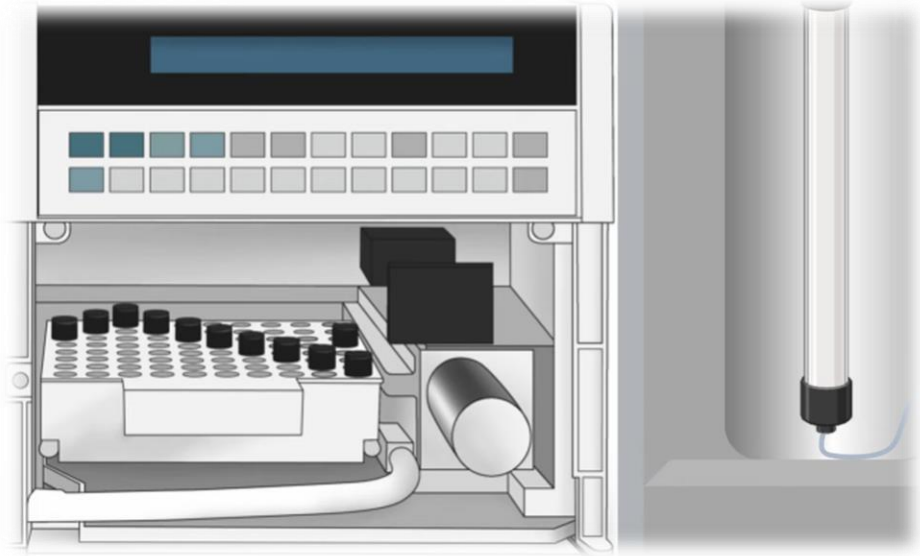
3. الحاقن: يُستخدم الحاقن لإدخال عينة السائل في تيار تدفق الطور المتحرك.

3. Injector: The injector is used to insert the liquid sample into the mobile phase's flow stream.

- Sample quantities range from 0.1 to 100 microliters (L) at high pressure.
- It is either done using a syringe or The use of the autosampler (auto-injector) system is also widely used that allows repeated injections in a set scheduled-timing.

> تتراوح كميات العينة من 0.1 إلى 100 ميكرولتر (لتر) تحت ضغط عالٍ. > يتم ذلك إما باستخدام محقنة أو باستخدام نظام أخذ العينات التلقائي (الحاقن التلقائي) الذي يُستخدم على نطاق واسع، والذي يسمح بالحقن المتكرر في توقيت مُجدول.



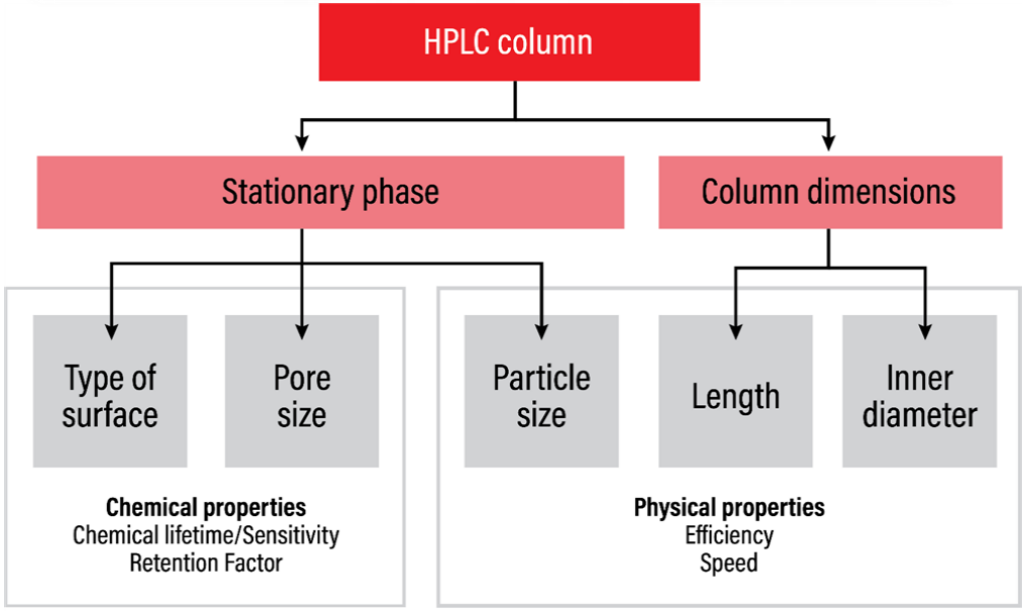


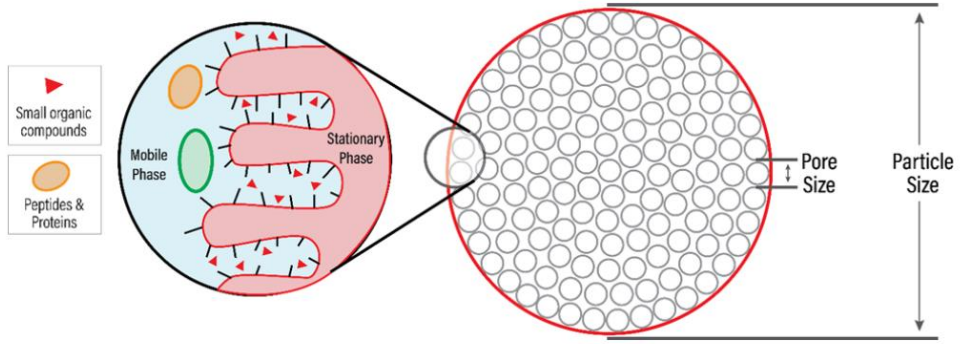
4. عمود HPLC: يُعرف بأنه قلب جهاز الكروماتوغرافيا. يُستخدم الفولاذ المقاوم للصدأ في الغالب كمواد لبناء الأنابيب (ضغط عال).
> يتراوح طول العمود عمومًا من 5 سم إلى 30 سم، ويتراوح قطره من 2 إلى 50 مم.
> تُستخدم جزيئات السيليكا والألومينا كمواد تعبئة. يتراوح حجم الجسيمات من 3 إلى 5 ميكرومتر. يُعد حجم المسام (من 80 إلى 120 أنغستروم) هو الأنسب للجزيئات الصغيرة ذات الوزن الجزيئي < 2000. أما بالنسبة للجزيئات الأكبر ذات الوزن الجزيئي > 2000، فإن حجم المسام الشائع للبروتينات هو 300 أنغستروم.

4. HPLC Column: It is known as the heart of the chromatograph. Mostly, stainless steel is used as materials for the construction of the tubing (High pressure).

- The column length generally varies from 5 cm to 30 cm, and its diameter ranges from 2-50 mm.
- Silica and alumina particle is used as packing materials. Particle size ranges from 3-5 µm. Pore size (pore size 80 to 120Å) are best for small molecules MW< 2000. For larger molecules with MW>2000, a popular pore size for proteins is 300Å.
- The mobile phase is aspirated from the solvent reservoir and forced through the system's column and detector by a pump.

> الطور المتحرك هو يتم سحب المذيب من خزان المذيب
ودفعه عبر عمود النظام وكاشفه بواسطة مضخة





Normal Phase HPLC

يكون الطور الثابت أكثر قطبية من الطور المتحرك (مثل التولوين كطور متحرك، والسيليكا كطور ثابت).

The stationary phase is more polar than the mobile phase (e.g. toluene as the mobile phase, silica as the stationary phase).

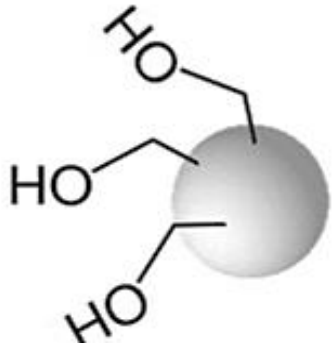
Non-polar will be eluted first

Polar analyte moves the slowest (eluted last)

هون ال polar رح يتأخر

Flow Direction

Stationary phase has polar heads



Reverse Phase HPLC

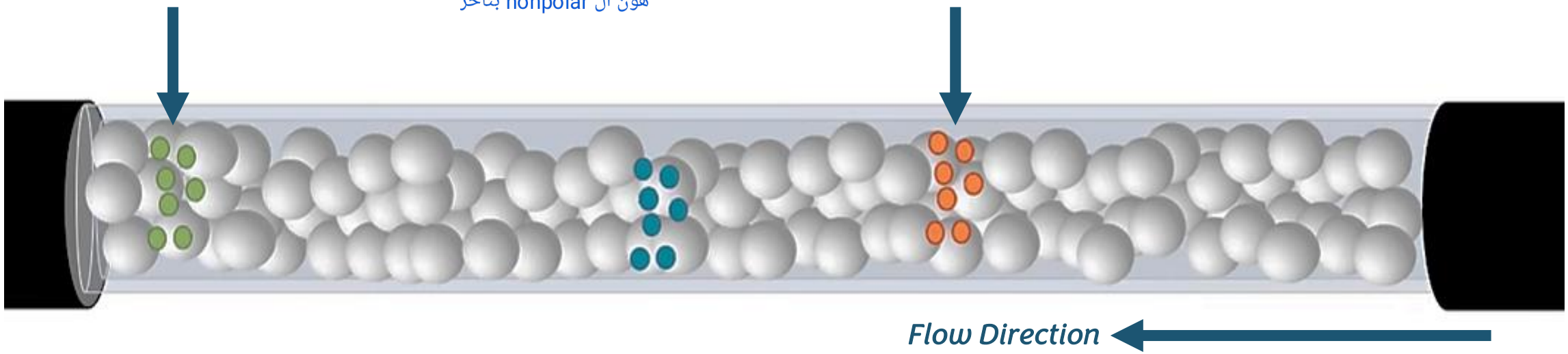
The stationary phase is less polar than the mobile phase (e.g., water-methanol mixture as the mobile phase, C18= octadecylsilyl (ODS) as the stationary phase).

الطور الثابت أقل قطبية من الطور المتحرك (على سبيل المثال، خليط الماء والميثانول كطور متحرك، Ci8= أوكتاديسيل سيليل (ODS) كطور ثابت).

Polar analyte will be eluted first

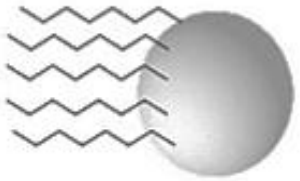
هون ال nonpolar بتأخر

Non-polar analyte moves the slowest (eluted last)



Flow Direction

Stationary phase has Hydrophobic alkyls groups

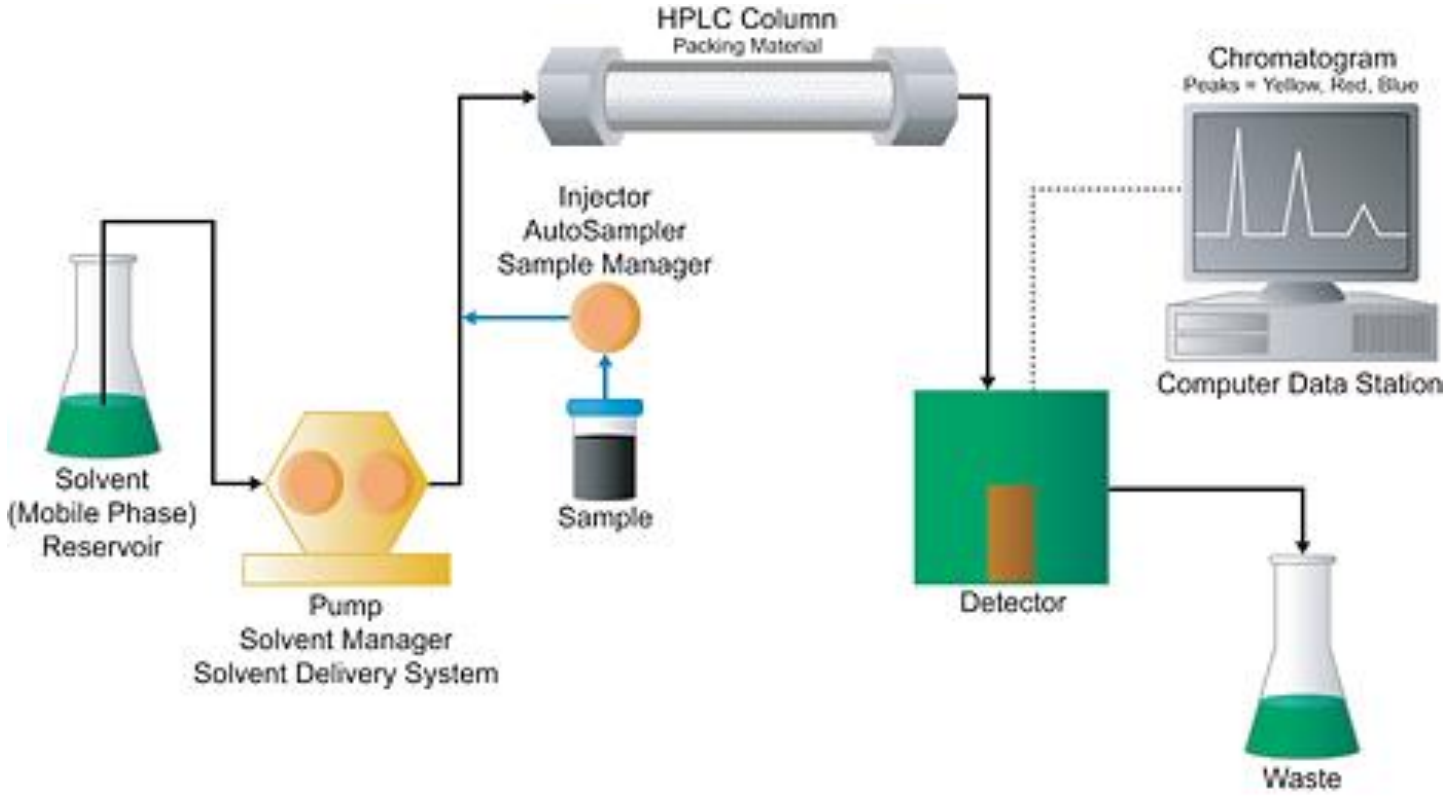


Elution Modes in HPLC:

A. Isocratic

الطور المتحرك إما مذيب نقي أو خليط، ويبقى ثابتًا طوال العملية.

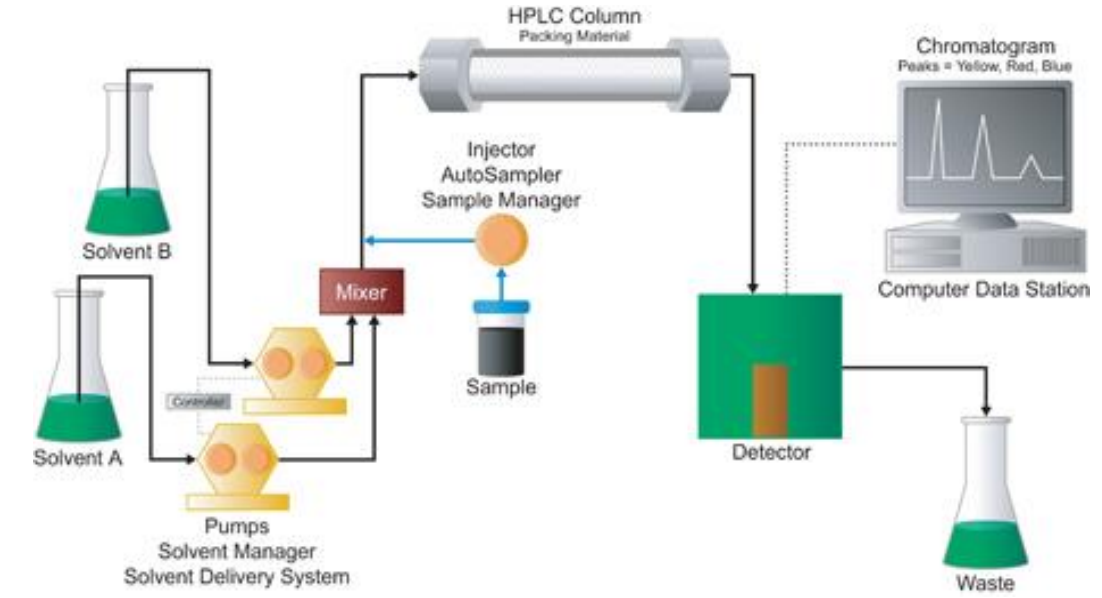
The mobile phase is either a pure solvent or a mixture *remains the same throughout the run.*

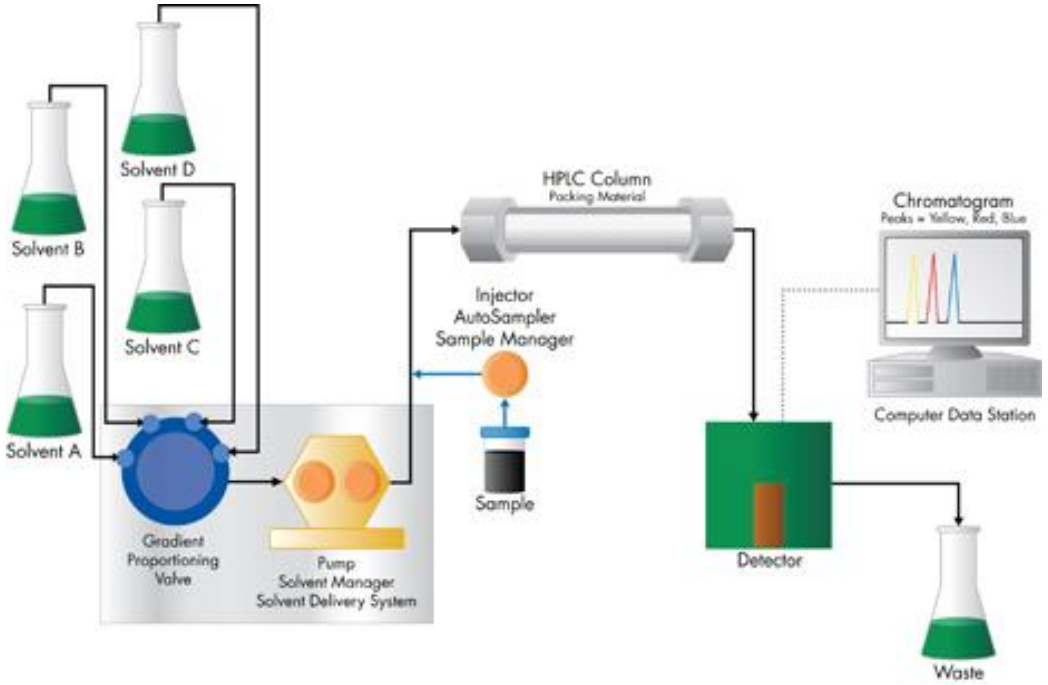


A. Gradient

The *mobile phase composition changes during the separation.*

يتغير تركيب الطور المتحرك أثناء الفصل.





5. الكاشف: يُستخدم لمراقبة المادة المفصولة عند خروجها من العمود. يكون تركيب المادة المفصولة ثابتًا عند عدم وجود المادة المراد تحليلها. بينما يؤدي وجود المادة المراد تحليلها إلى تغيير تركيب المادة المفصولة. ما يفعله الكاشف هو قياس هذه الاختلافات.

5. Detector: It is used to observe the obtained separated elute as it leaves the column. The composition of the eluent is consistent when no analyte is present. While the presence of analyte changes the composition of the eluent. What detector does is to measure these differences.

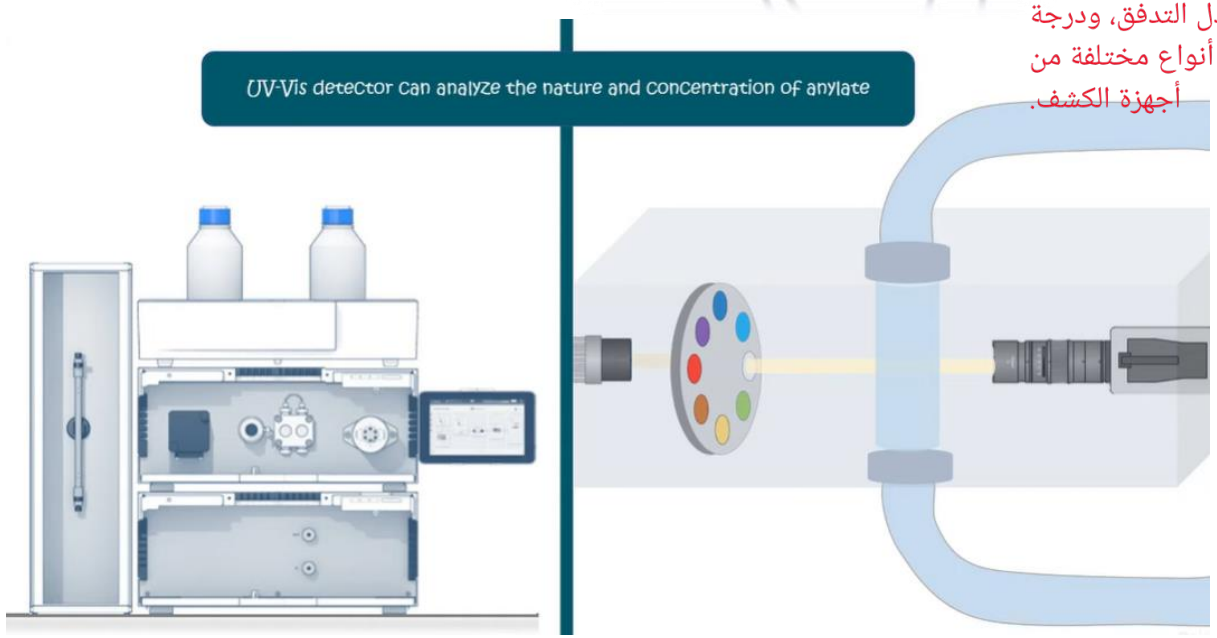
- This difference is monitored as a form of an electronic signal. This signal is proportional to the concentration of each separated component
- Crucial in trace elements (high sensitivity).
- Simplifies quantification
- Insensitive to changes in type of solvent, flow rate and temp.
- There are different types of detectors available

> يُرصد هذا الفرق على شكل إشارة إلكترونية. تتناسب هذه الإشارة مع تركيز كل مكون مفصول. > أمر بالغ الأهمية في العناصر النزرة (حساسية عالية). > يُبسط عملية التحديد الكمي. > غير حساس للتغيرات في نوع المذيب، ومعدل التدفق، ودرجة الحرارة. تتوفر أنواع مختلفة من أجهزة الكشف.

The most widely used detection methods

- Spectrophotometers
- Fluorometers
- Electrochemical detectors
- Mass spectrometer
- Refractive index detector

أكثر طرق الكشف استخدامًا:
أجهزة قياس الطيف الضوئي
• أجهزة قياس التألق
• الكواشف الكهروكيميائية
• مطياف الكتلة
• كاشف معامل الانكسار



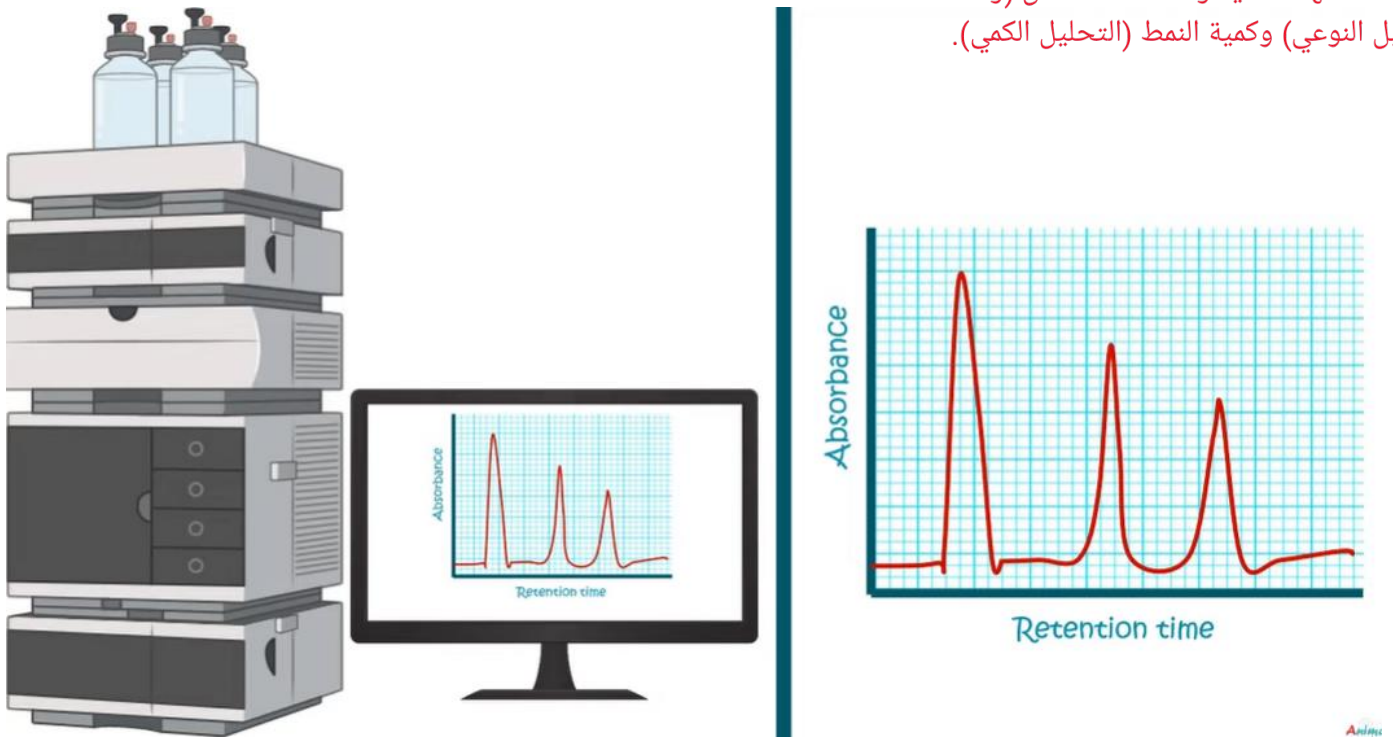
6. المسجل: يكون التغير في المذيب الذي يكشفه الكاشف على شكل إشارة إلكترونية، وبالتالي لا يزال غير مرئي للعين المجردة.

6. Recorder: The change in eluent detected by a detector is in the form of an electronic signal, and thus it is still not visible to our eyes.

< يُستخدم معالج بيانات حاسوبي (مكامل) لمعالجة أنواع مختلفة من البيانات.

- A computer-based data processor (integrator) is used to process various types of data.
- It takes the signal from the detector and makes use of it to decide the time of elution (retention time) of the sample components (qualitative analysis) and the quantity of pattern (quantitative analysis).

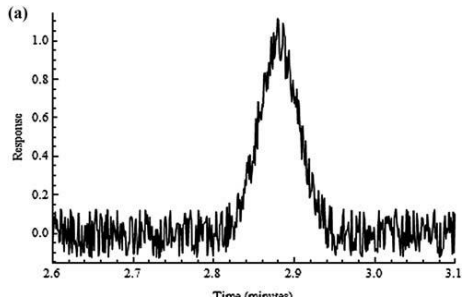
< يستقبل الإشارة من الكاشف ويستخدمها لتحديد وقت الاستخلاص (وقت الاحتفاظ) لمكونات العينة (التحليل النوعي) وكمية النمط (التحليل الكمي).

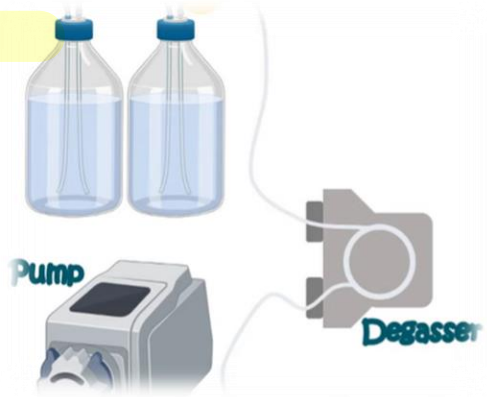


قد يحتوي المذيب المستخدم في تحليل LC على غازات مثل الأكسجين غير المرئية للعين المجردة. عند وجود هذه الغازات في المذيب، يتم الكشف عنها كضوضاء وتسبب عدم استقرار خط الأساس. يستخدم جهاز إزالة الغازات أنابيب غشائية بوليمرية خاصة لإزالة الغازات.

❖ Degasser

The eluent used for LC analysis may contain gases such as oxygen that are non-visible to our eyes. When gas is present in the eluent, this is detected as noise and causes an unstable baseline. Degasser uses special polymer membrane tubing to remove gases.





❖ Column Heater

The LC separation is often largely influenced by the column temperature. In order to obtain repeatable results, it is important to keep consistent temperature conditions. Also, for some analysis, such as sugar and organic acid, better resolutions can be obtained at elevated temperatures (50 to 80°C). Thus, columns are generally kept inside the column oven (column heater).

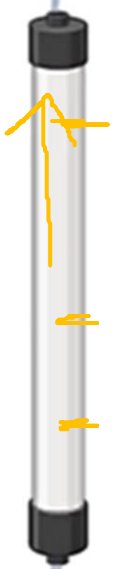
غالبًا ما تتأثر عملية الفصل في LC بدرجة حرارة العمود. وللحصول على نتائج قابلة للتكرار، من المهم الحفاظ على ظروف درجة حرارة ثابتة. أيضًا، بالنسبة لبعض التحليلات، مثل السكر والأحماض العضوية، يمكن الحصول على دقة أفضل عند درجات حرارة مرتفعة (من 50 إلى 80 درجة مئوية). لذلك، تُحفظ الأعمدة عادةً داخل خزان العمود (سخان العمود).

Solvent Reservoir

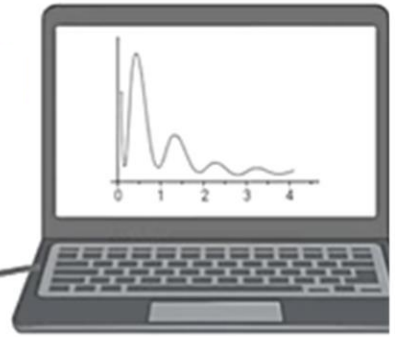
Pump

Degasser

Column



Analytical Software

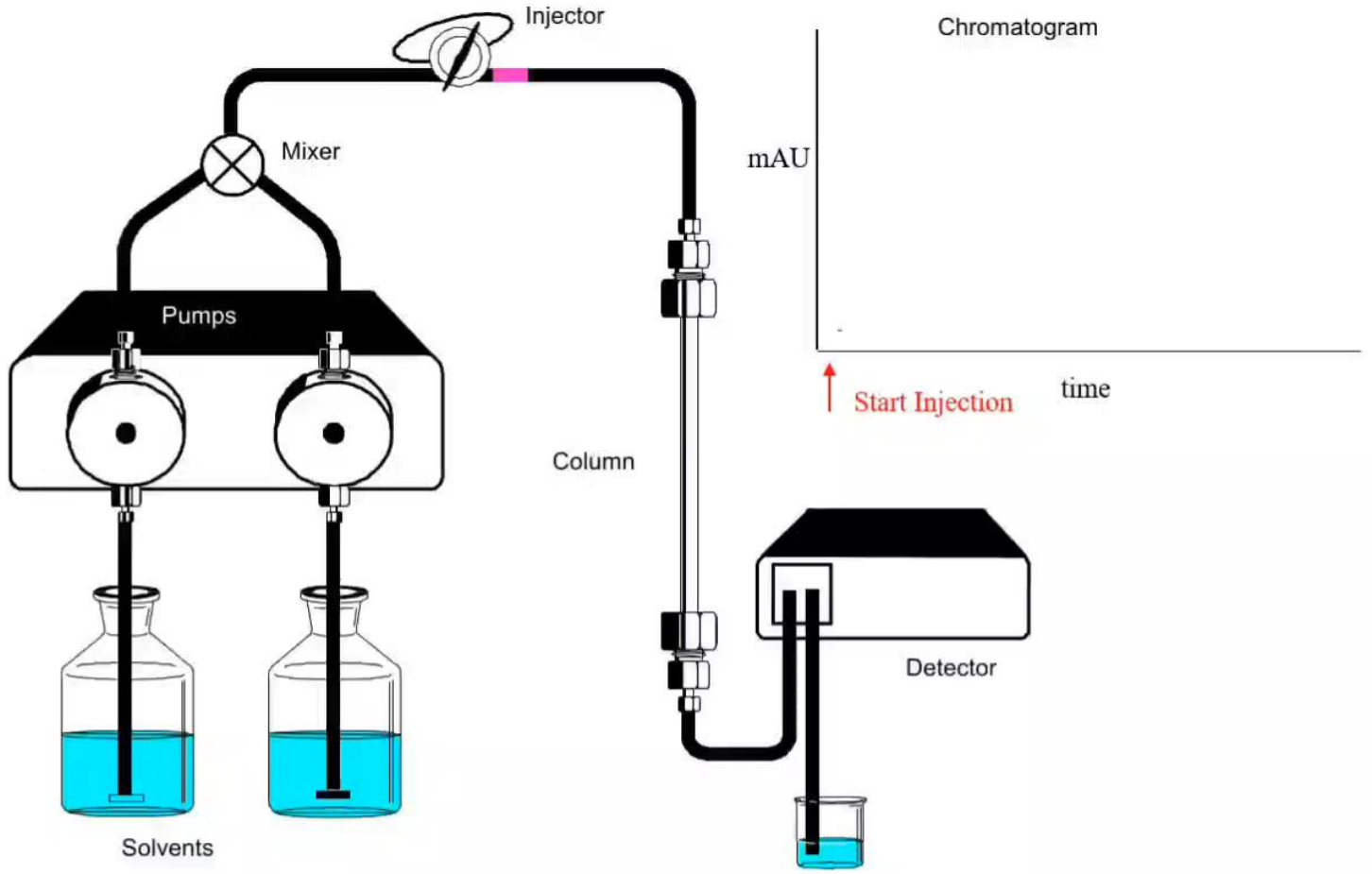


Detector

Sample Injector

Waste Bottle

Separation in HPLC

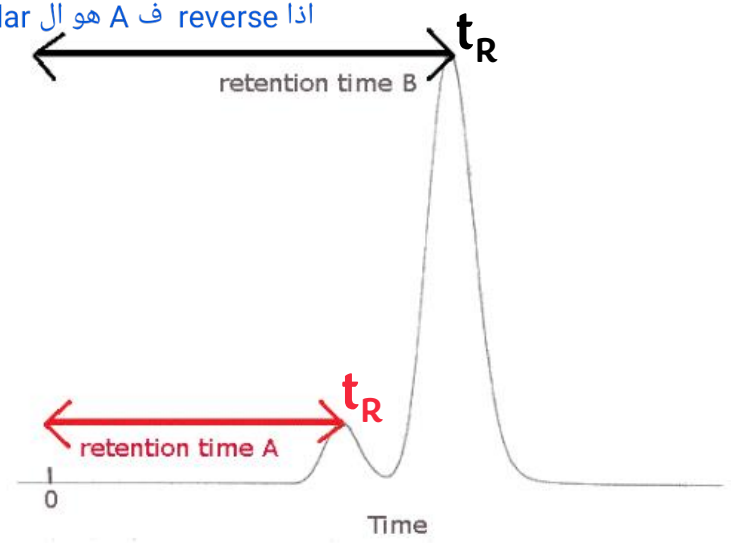


بقدر احدد من خلاله مين ال polar اكثر حسب
انا شو مستخدم
اذا normal ف B هو ال polar
اذا reverse ف A هو ال polar كمثال

The Retention Time (t_R)

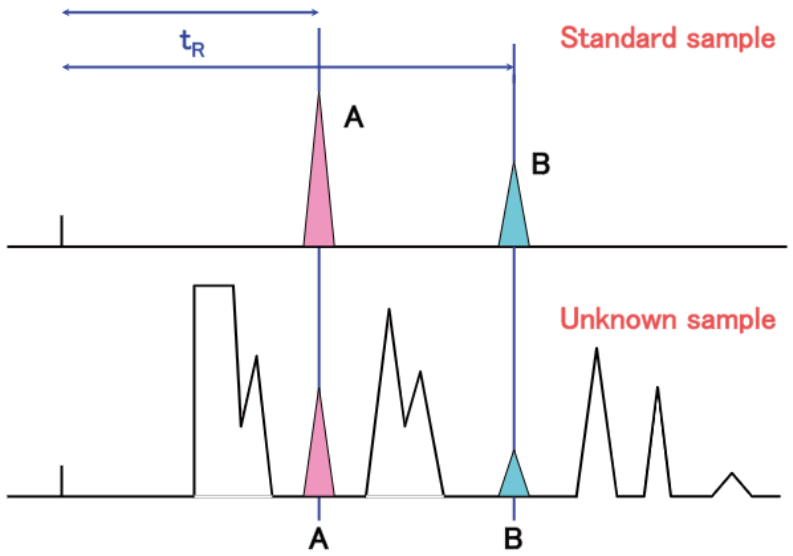
- The time taken for a particular compound to travel through the column to the detector

• الزمن اللازم لمركب معين للانتقال عبر العمود إلى الكاشف



- From the time at which the sample is injected to the point at which the display shows a maximum peak height for that compound.

• من وقت حقن العينة إلى النقطة التي تُظهر فيها الشاشة أقصى ارتفاع للذروة لهذا المركب.

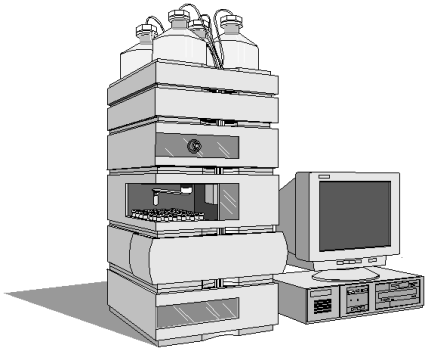


The Chromatogram

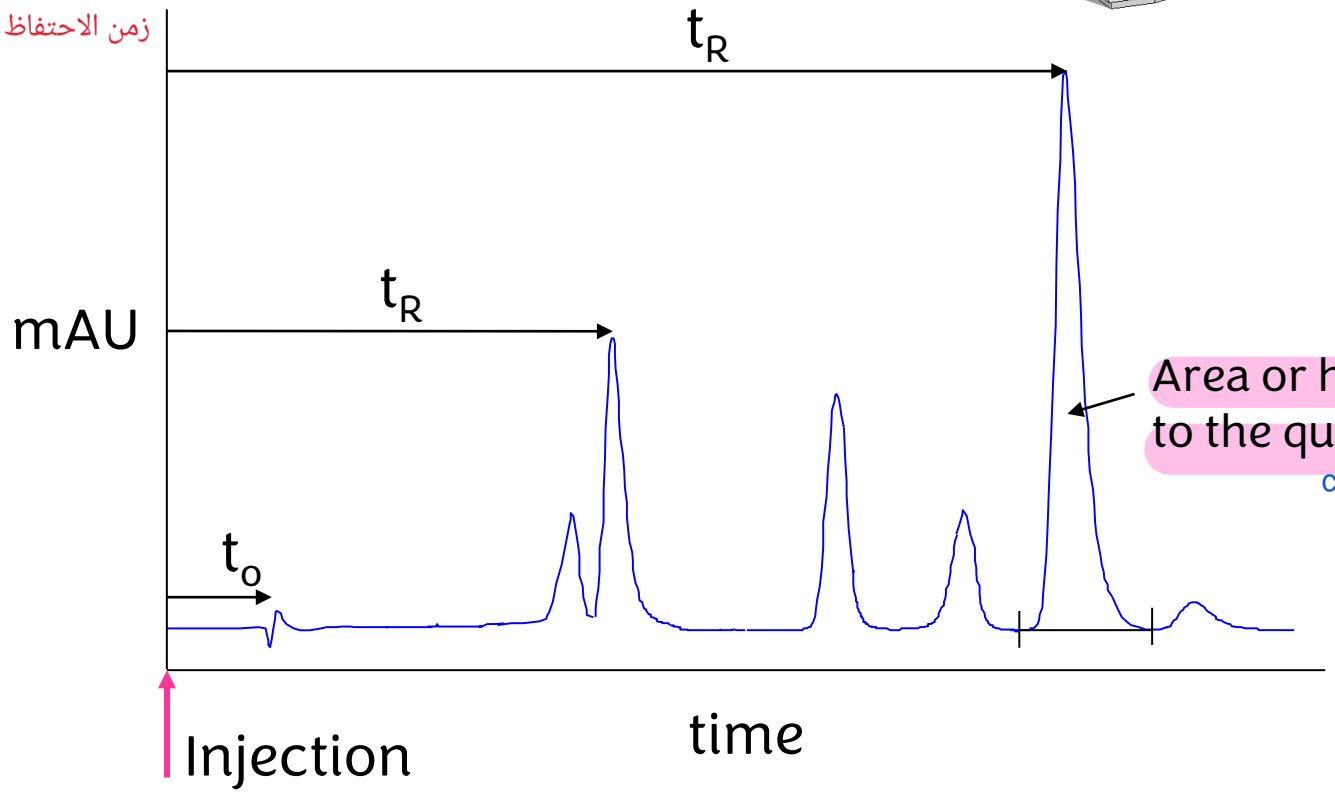
زمن استخلاص الذروة غير المحتجزة - t

t_o – elution time of unretained peak

t_R – retention time – determines sample identity



زمن الاحتفاظ - يحدد هوية العينة - t₂R



Area or height is proportional to the quantity of analyte.

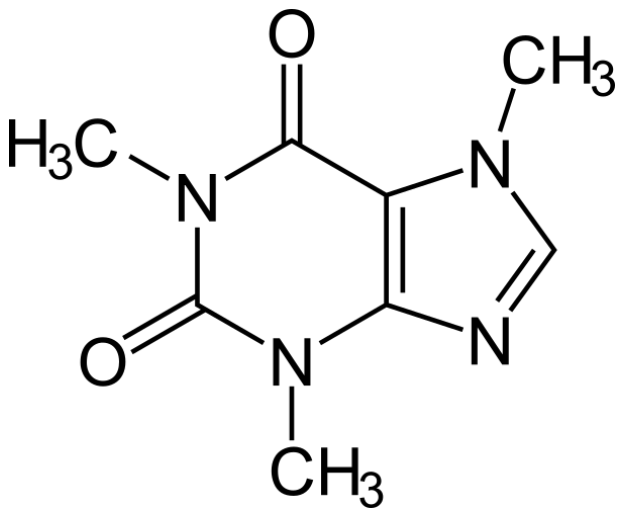
concentration

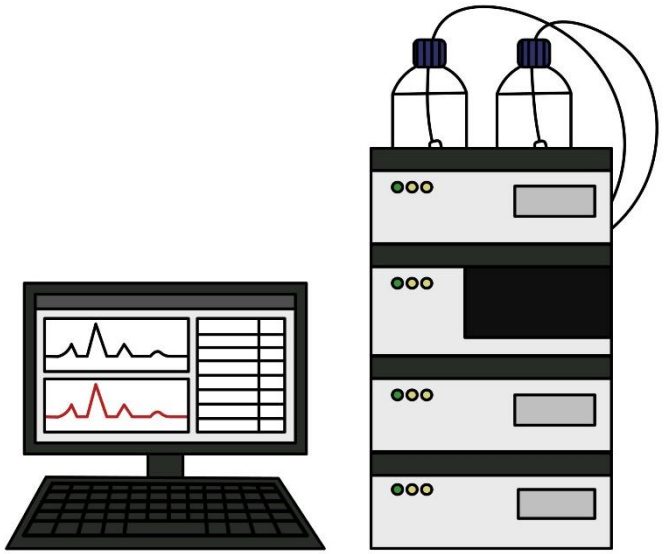
المساحة أو الارتفاع يتناسب مع كمية المادة المراد تحليلها

Practical Part

Objective

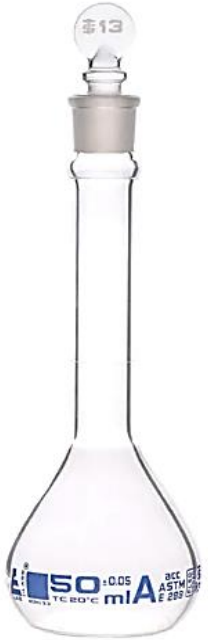
- Determination of **Caffeine sample assay (purity)** using HPLC.
- Get familiar with the HPLC instrument and its usage.





Glassware

Each group will be supplied by the following glassware:



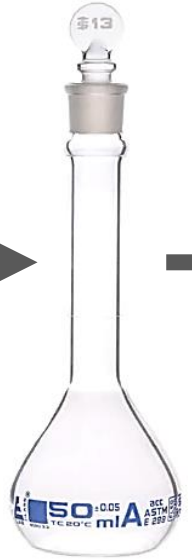
1 flask

1 flask

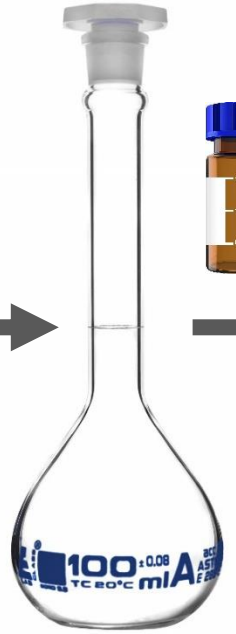
Procedure

Preparation of the Caffeine sample solution by dissolving the 25mg of the unknown powder in 50ml diluent. Then carrying a dilution of 5ml to 100ml diluent.

Weigh **25 mg** of the caffeine unknown sample then dissolve in **50 ml** diluent



Dilute **5 ml** to **100 ml** diluent

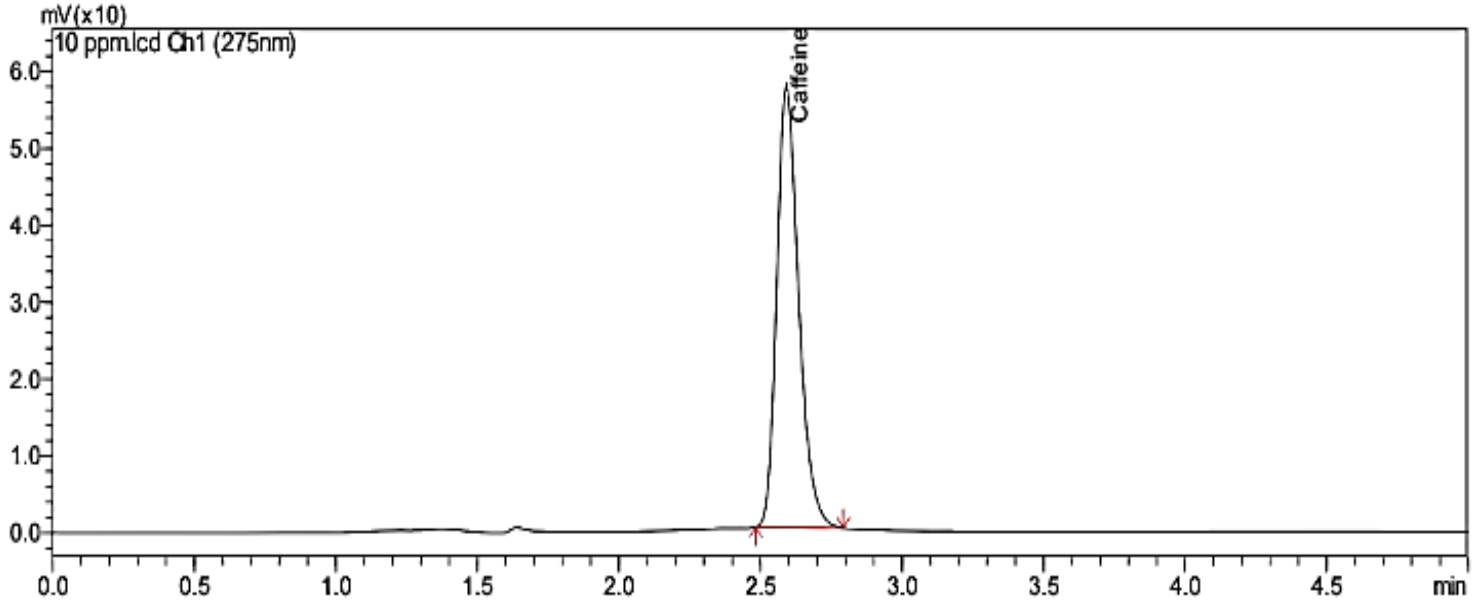


Instrumentation Method

Mobile Phase	Water: Methanol (60:40) both are HPLC grade
Column	Zorbax Eclipse Plus 18C Column Pore size: 5µ Internal diameter: 4.6nm Length: 150 mm. Reverse phase: ODS
Flow rate	1 ml/min
UV detection (λ)	275 nm
Sample injection volume	10 µl
Column Temperature	40°C
Run time	5 min

Data Interpretation

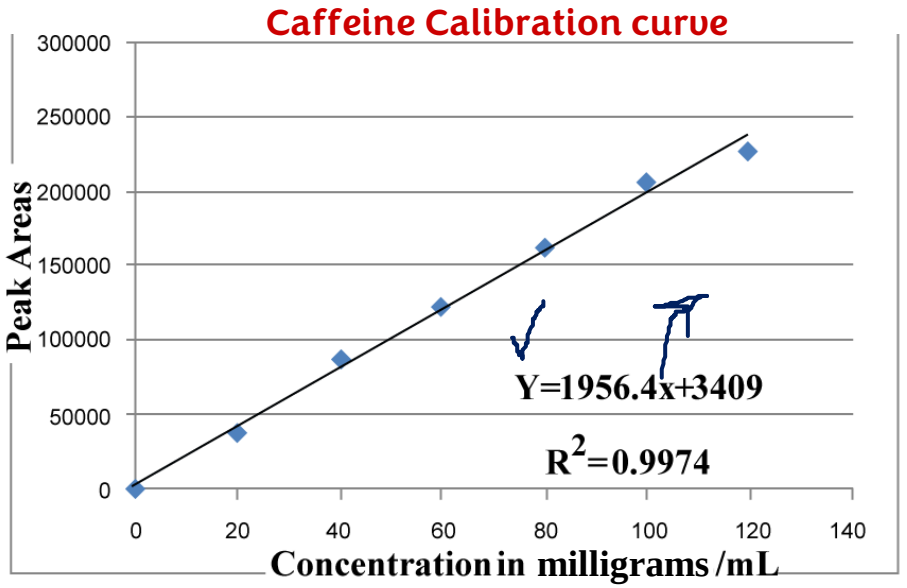
- ✓ *From the HPLC analysis the data will be obtained as an **area under the curve** (AUC), measured with (mV) unit.*
- ✓ *Students will be provided with a calibration curve data to make the needed calculations.*



Chromatogram of caffeine , Detector 275nm

- ✓ *After finishing measurements, students will obtain their **unknown sample area** from the device → then using the calibration curve you can calculate the concentration for your caffeine in the sample(D.f).*

- ✓ *From the calibration curve → find the concentration of your unknown caffeine sample → Multiplied by the volume used and D.f → Amount in (mg)*



- ✓ ***Then determine the Caffeine sample purity as follows:***

$$\% \text{ Purity} = \frac{\text{Actual Amount}}{\text{Theoretical Amount}} \times 100\%$$

MSc. Farah Hudaib