

„Zastosowanie chromatografii żelowej w skali preparatywnej do otrzymywania nisko-dyspersyjnych frakcji polimerów”

Wprowadzenie

Oznaczanie średniej wartości masy molekularnej może być wykonane kilkoma różnymi metodami (patrz podręcznik chemii fizycznej, albo technologii polimerów), jednak wyznaczenie rozkładu masy molekularnej jest z zastosowaniem większości tych metod niemożliwe, albo szczególnie pracochłonne. Chromatografia żelowa, zwana też czasem chromatografią filtracji żelowej (GPC – Gel Permeation Chromatography), albo chromatografią wykluczania (SEC – Size Exclusion Chromatography) jest w tym celu praktycznie jedyną efektywną techniką analityczną. Bardzo często kalibracja odbywa się w odniesieniu do polistyrenu, tzn. jest wykonywana z zastosowaniem nisko – dyspersyjnych standardów polistyrenu, o stosunku najwyższej do najniższej masy molekularnej na poziomie 1.25, albo poniżej. Wtedy, jednak, nie jest wyznaczany rzeczywisty rozkład masy molekularnej badanego polimeru, a tylko jego odniesienie (miara) względem rozkładu masy molekularnej polistyrenu. Bardziej poprawne jest stosowanie do kalibracji nisko – dyspersyjnych frakcji tego samego polimeru, którego rozkład masy molekularnej ma zostać wyznaczony. Wówczas otrzymane wyniki mają wartość realnego rozkładu masy molekularnej badanego polimeru. Postępowanie takie wymaga, jednak posiadania możliwie wielu nisko-dyspersyjnych frakcji badanego polimeru o znanej wartości średniej masy cząsteczkowej i o znanym rozkładzie tejże. Takie standardy są niezwykle kosztowne, natomiast z zastosowaniem żelowej chromatografii cieczowej w skali preparatywnej można je otrzymać we własnym zakresie oraz można by też w ten sposób wykonywać ich produkcję.

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest eksperymentalne zbadanie warunków otrzymywania nisko – dyspersyjnych standardów polimeru (na przykładzie polistyrenu), z zastosowaniem cieczowej chromatografii żelowej w skali preparatywnej, wyodrębnienie ich oraz ocena jakości oraz możliwości zastosowania do kalibracji w warunkach chromatografii żelowej w skali analitycznej.

Materiały, Aparatura, Wyposażenie

Eluenty i rozpuszczalniki próbek i wsadów: Czerowodorofuran (Tetrahydrofuran – THF, do HPLC, dowolnego producenta);

Próbki kalibracyjne i roztwory dozowane do kolumny preparatywnej: Roztwory odpowiednich nisko – dyspersyjnych frakcji kalibracyjnych polistyrenu o średnich wartościach masy molekularnej (541, 1020, 2450, 10600, 32000, 86000, 124000, 360000, 1200000, 2560000) o stężeniu łącznym ok. 0.-1 do 0.25 g/10 ml THF; roztwory szeroko – dyspersyjnego polimeru polistyrenowego, rozdzielany w celu otrzymania frakcji nisko – dyspersyjnych – stężenie wsadu do kolumny preparatywnej: 0.2, 1.0 i ewentualnie 2.0 g/10 ml THF, objętość dozowania 0.1ml do 10 ml.

Fazy stacjonarne i kolumny: faza stacjonarna: LichroGel PS MIX (Merck – Niemcy, kopolimer styrenu i winylobenzenu o szerokim spektrum rozkładu średniej wielkości porów, przeznaczony do rozdzielania w bardzo dużym zakresie masy molekularnej – od 100 do 10 milionów); kolumna ‘semi-preparatywno – analityczna’ - 250 x 7 mm oraz preparatywna – 250 x 25,4 mm; obie o średniej wielkości ziaren wypełnienia 5 um.

Aparatura, wyposażenie:

- Analityczny chromatograf żelowy do chromatografii w warunkach izokratycznych z pompą strzykawkową, dozownikiem zaworowym o wielkości pętli 20 ul, z detektorem refraktometrycznym (RI), z regulacją przepływu eluentu od 0.01 do 2.00 ml/min, maksymalne ciśnienie pracy do 450 bar (45 MPa) i z rejestratorem pisakowym Y-t;

- Preparatywny chromatograf cieczowy z pompą tłokową o posuwisto – zwrotnym ruchu tłoka i o wydajności tłoczenia eluentu 0.05 do 1 dcm³/min, maksymalne ciśnienie do 100 bar (10 MPa), z detektorami - refraktometrycznym i fotoabsorpcyjnym UV-254, połączonymi szeregowo, z dozownikiem zaworowym o pojemności pętli dozującej do 5 ml i z rejestratorem Y-t.,

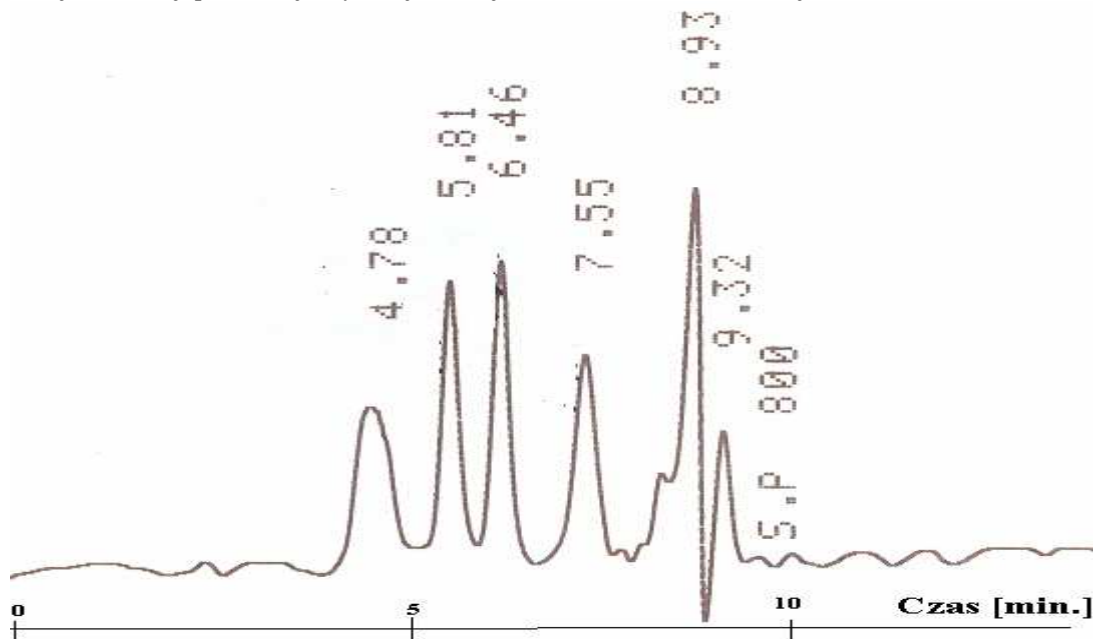
- Odparowywacze próżniowe oraz urządzenie do odparowywania w strumieniu azotu, strzykawki, cylindry miarowe, naczynia laboratoryjne.

Metodyka:

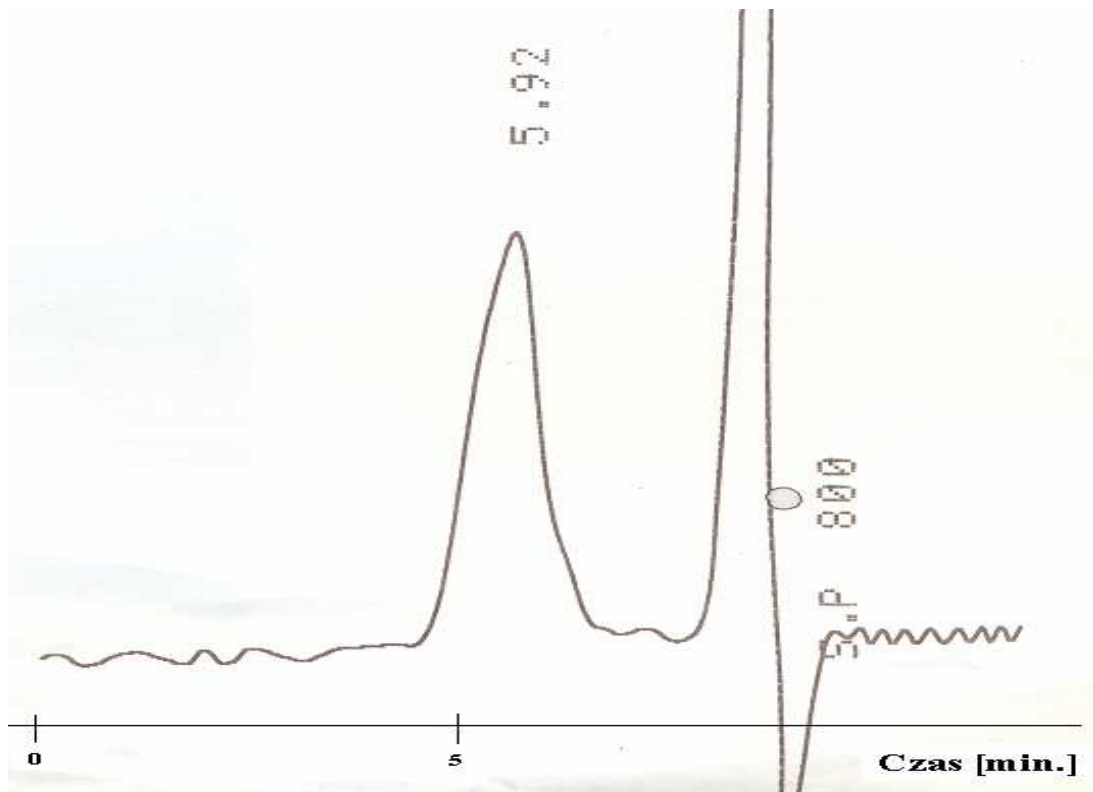
Wykonać kalibrację w skali semipreparatywno – analitycznej ($\log M = f(V_e)$), na podstawie $\log M = f(t_e)$ oraz dokonać w tej skali (jako skali modelowej) doboru optymalnych warunków rozdzielania dla skali preparatywnej (dobór objętości i stężenia roztworu wsadu do kolumny preparatywnej, natężenia przepływu eluentu i punktów zbierania frakcji).

Po wykonaniu odpowiednich przeliczeń wykonać rozdzielanie i zbieranie frakcji w skali preparatywnej, do wytarowanych naczyń szklanych o pojemności potrzebnej dla zebrania poszczególnych frakcji.

Odparować eluent z kilku naczyń z zebranymi frakcjami, zważyć otrzymane frakcje i rozcieńczyć je do odpowiedniego stężenia i z zastosowaniem kolumny analityczno – semipreparatywnej zbadać rozkład masy molekularnej trzech zebranych frakcji (o niskiej, przeciętnej i wysokiej średniej wartości masie cząsteczkowej).



Rys. 1. Przykładowy chromatogram roztworu kalibracyjnego zawierającego polimery o masach: 1260000, 120000, 30300, 2450 Da. Kolumna: LiChrogel PS MIX, eluent: tetrahydrofuran, przepływ: 0,8 ml/min, temperatura: pokojowa.



Rys. 2. Przykładowy chromatogram roztworu polimeru polistyrenowego. Warunki analizy chromatograficznej jak na rys. 1.

Opracowanie wyników i zalecenia dotyczące sprawozdania
Sprawozdanie powinno zawierać:

- w części przygotowanej przez każdą z podgrup: streszczenie mechanizmu separacji żelowej oraz zasad wykorzystania chromatografii żelowej do badania średniej wartości oraz rozkładu masy molekularnej; wyniki kalibracji wykonanej przez podgrupę, wyniki rozdzielania preparatywnego, wykonanego przez podgrupę, wnioski wynikające z przebiegu ćwiczenia i wyników otrzymanych przez podgrupę

- w części podsumowującej, przygotowanej przez całą grupę: podsumowanie wyników badań wszystkich podgrup oraz wnioski i zalecenia dla innych grup, dotyczące optymalnych warunków rozdzielania i zbierania frakcji z zastosowaniem chromatografii żelowej w celu otrzymania z jak największą wydajnością, jak „najwęższych” frakcji polistyrenu.

Do sprawozdania powinny być dołączone oryginalne wykresy i chromatogramy uzyskane w czasie trwania ćwiczenia (kopie nie będą przyjmowane), wykresy i diagramy oraz przykłady obliczeń wykonane w celu sformułowania wniosków, zarówno do sprawozdań podgrupy, jak i do sprawozdania całej grupy. Będzie przyjmowane tylko całe sprawozdanie grupy laboratoryjnej, zawierające również sprawozdania podgrup.

Literatura

M. Kamiński (ed.), „Chromatografia cieczowa”, CEEAM, Gdańsk, 2004., (szczególnie rozdział 7 i 13)

D. Berek, M. Dressler, M. Kubin, K. Marcinka, „Chromatografia żelowa”, PWN, Warszawa 1989.

„Zasady stosowania kolumnowej chromatografii cieczowej do rozdzielania i otrzymania substancji”

Cel ćwiczenia

Poznanie w praktyce zasad powiększania skali rozdzielania substancji z zastosowaniem kolumnowej elucyjnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-P-HPLC), albo normalnych (NP-P-HPLC) oraz operacji jednostkowych, stosowanych w technologii wykorzystania chromatografii do rozdzielania i otrzymania substancji. Przekonanie studentów o celowości ewentualnego stosowania w przyszłości tej przyjaznej środowisku naturalnemu techniki separacyjnej do produkcji czystych substancji, zwłaszcza ze źródeł naturalnych.

Wprowadzenie

1. Etapy powiększania skali rozdzielania i produkcji substancji z zastosowaniem elucyjnej kolumnowej chromatografii cieczowej
 - 1.1. Etapy realizowane w skali modelowej:
 - dobór optymalnego układu chromatograficznego, tzn. dobór rodzaju fazy stacjonarnej, optymalnego składu eluentu, albo programu elucji (*dążymy do maksymalnej selektywności – maksymalizacja α substancji rozdzielanej i najbliższych „towarzyszących” jej pików przy zachowaniu warunków braku przeładowania kolumny oraz: $k_1 > 1$ oraz $k_n < 8$ (do 12), gdzie k_1 - współczynnik retencji substancji otrzymania, albo poprzedzającej pik substancji otrzymania oraz k_n – współczynnik retencji substancji tworzącej ostatni pik na chromatogramie rozdzielanej mieszaniny*);
 - dobór: wielkości ziaren wypełnienia (dp) (*dążymy do minimalnej wartości*), długości kolumny (L_c) (*dążymy do optymalnej wartości*), prędkości przepływu eluentu (u) (*dążymy do optymalnej wartości*);
 - dobór rozpuszczalnika, stężenia i objętości roztworu dozowanego (*dążymy do stosowania maksymalnego stężenia roztworu dozowanego i minimalnej jego objętości, w formie rozpuszczalnika stosujemy eluent, albo ciecz o mniejszej sile elucyjnej od eluentu, w szczególnych przypadkach stosujemy ciecz o większej sile elucyjnej od eluentu, jednak, zawsze dbamy o to aby nie miało miejsca wytrącanie się substancji rozdzielanych w chwili dozowania ! lepkość roztworu dozowanego nie powinna być nadmierna, im jest ona wyższa tym większa powinna być prędkość wprowadzania tego roztworu do kolumny, aby zapewnić korzystną dyspersję roztworu dozowanego w eluencie*);
 - dobór optymalnych punktów zbierania frakcji (w przypadku sporadycznego rozdzielania dążymy „wycinania” jak najmniejszej „między-frakcji”, w przypadku rozdzielania procesowego dążymy do „wycinania” optymalnej „między-frakcji”, która podlega zawracaniu do roztworu „wsadu” - dążymy wówczas do maksymalizacji jednostkowej produktywności kolumny (P_t^{max}));
 - dobór optymalnych warunków detekcji (zapewniających detekcję wszystkich substancji rozdzielanych z wystarczającą czułością oraz zachowanie liniowości odpowiedzi detektora; W razie potrzeby zmniejszamy długość drogi optycznej detektora fotoabsorpcyjnego oraz wybieramy taką długość fali detekcji, która odpowiada niewielkiej intensywności absorpcji światła przez substancje rozdzielane
 - Przeliczenie parametrów i warunków skali modelu na parametry i warunki skali preparatywnej, albo procesowej z zachowaniem zasady podobieństwa geometrii kolumn, warunków hydrodynamicznych i podobieństwa fizycznego warunków procesu rozdzielania: ($dp, L_c, u, C_i, tr, k, Pt = const; w, Vi = (dc^p)^2 / (dc^m)^2$)
 - 1.2. Etapy realizowane w skali technicznej / procesowej.
 - Przygotowanie kolumny preparatywnej o średnicy dc^p , długości L_c o sprawności $N_o^p = N_o^m - a$ więc o takim samym stopniu upakowania złoża i o takim samym profilu przepływu eluentu w przekroju poprzecznym kolumny preparatywnej/ procesowej, jak w kolumnie modelowej – bywa to czasem bardzo trudne do osiągnięcia i wymaga dużego doświadczenia, albo znacznych zasobów finansowych).
 - Realizacja rozdzielania w skali preparatywnej / procesowej, zbieranie frakcji, kontrola ich czystości, izolacja substancji w postaci krystalicznej, przeprowadzanie do postaci „docelowej”, pakowanie, magazynowanie, dystrybucja, sprzedaż, fakturowanie, księgowanie, obliczanie i dystrybucja zysków.
2. Argumenty uzasadniające pro-środowiskowe cechy kolumnowej elucyjnej chromatografii cieczowej, jako techniki rozdzielania:

Realizowana z zachowaniem odpowiednich zasad postępowania i reguł technologicznych nie tworzy żadnych odpadów i umożliwia otrzymywanie substancji z zapewnieniem niewielkiego zużycia energii - możliwa i konieczna jest ze względów ekonomicznych recykulacja 100% używanych składników eluentu, możliwe jest stosowanie nietoksycznych dla środowiska sorbentów, albo ich utylizacji w przypadku całkowitego zużycia, poprzez spalenie fazy stacjonarnej i otrzymanie całkowicie nieszkodliwego popiołu.

3. Przebieg ćwiczenia

Omówienie problemu rozdzielczego i alternatywnych sposobów jego rozwiązania, dobór optymalnej selektywności układu chromatograficznego i korzystnych warunków detekcji do preparatywnego rozdzielania substancji / kontroli czystości zbieranych frakcji, doświadczalny dobór maksymalnego przeładowania kolumny i optymalnych „położeń” punktów zbierania frakcji, wykonanie obliczeń produktywności kolumny modelowej, przeliczenie warunków rozdzielania ze skali modelowej do skali preparatywnej dla podanej przez prowadzącego wydajności otrzymywania substancji A i B, wykonanie rozdzielania w skali preparatywnej w warunkach przeładowania kolumny z zebraniem frakcji, kontrola czystości zebranych / zebranej frakcji, wyodrębnienie rozdzielonych substancji w postaci krystalicznej z zastosowaniem odparowywacza próżniowego i ewentualna kolejna kontrola ich czystości, zapoznanie się z technologią wypełniania kolumn metodami „na mokro” i „na sucho”, omówienie możliwości zastosowania innych technik separacji i innych sposobów postępowania dla wyodrębnienia substancji zawartych w zebranych frakcjach eluatu.

Materiały, Aparatura, Wyposażenie

Eluenty i rozpuszczalniki próbek i wsadów: Metanol do HPLC dowolnego producenta, woda demineralizowana;

Próbki kalibracyjne i roztwory dozowane do kolumny preparatywnej: Roztwory substancji A i B w eluencie (metanol woda 6:4) o stężeniach każdego składnika: 0.1, 0.5, 2.5, 12 mg/ml, objętość dozowania 20 ul do 5 ml.

Fazy stacjonarne i kolumny: Kolumna modelowa 125 x 4 mm Lichrospher RP 18 5 um (Merck – Niemcy), Kolumna preparatywna 125 x 32 mm Nucleosil C18 7 um.

Aparatura, wyposażenie:

- Analityczny chromatograf HPLC z pompą tłokową o ruchu posuwisto zwrotnym, z dozownikiem zaworowym o wielkości pętli 100 ul, z detektorem UV-DAD i refraktometrycznym (RI), z regulacją przepływu eluentu od 0.1 10 ml/min, maksymalne ciśnienie pracy do 450 bar (45 MPa) i z rejestratorem pisakowym Y-t;

- Preparatywny chromatograf cieczowy z pompą tłokową o posuwisto – zwrotnym ruchu tłoka i o wydajności tłoczenia eluentu 0.05 do 1 dcm³/min, maksymalne ciśnienie do 100 bar (10 MPa), z detektorami - fotoabsorpcyjometrycznym UV-254 i refraktometrycznym, połączonymi szeregowo, z dozownikiem zaworowym o pojemności pętli dozującej do 5 ml i z rejestratorem Y-t.,

- Odparowywacze próżniowe oraz urządzenie do odparowywania w strumieniu azotu, strzykawki, cylindry miarowe, naczynia laboratoryjne.

Metodyka:

Wykonać kalibrację w skali analitycznej $Spiku = f(c_i)$ oraz dokonać w tej skali (jako skali modelowej) doboru optymalnych

warunków rozdzielania dla skali preparatywnej (dobór objętości i stężenia roztworu wsadu do kolumny preparatywnej,

liniowej prędkości i natężenia przepływu eluentu oraz punktów zbierania frakcji).

Po wykonaniu odpowiednich przeliczeń wykonać rozdzielanie i zbieranie frakcji w skali preparatywnej, do wytarowanych naczyń szklanych o pojemności potrzebnej dla zebrania poszczególnych frakcji. Zbadać czystość frakcji z zastosowaniem analitycznego aparatu HPLC.

Odparować eluent, zważyć otrzymane frakcje i rozcieńczyć je do odpowiedniego stężenia i z zastosowaniem kolumny analitycznej zbadać ich czystość.

Opracowanie wyników i zalecenia dotyczące sprawozdania

Sprawozdanie powinno zawierać:

- w części przygotowanej przez każdą z podgrup: streszczenie mechanizmu rozdzielania substancji A i B w warunkach braku przeładowania oraz opis zmian warunków rozdzielania w przypadku stężeniowego przeładowania kolumny; wyniki kalibracji wykonanej przez podgrupę, warunki i wyniki rozdzielania preparatywnego wykonanego przez podgrupę, wnioski wynikające z przebiegu ćwiczenia i wyników otrzymanych przez podgrupę
- w części podsumowującej, przygotowanej przez całą grupę: podsumowanie wyników badań wykonanych przez wszystkie podgrupy z zastosowaniem różnych warunków przeładowania kolumny oraz wnioski i zalecenia dla innych grup, dotyczące optymalnych warunków rozdzielania i zbierania frakcji.

Do sprawozdania powinny być dołączone oryginalne wykresy i chromatogramy uzyskane w czasie trwania ćwiczenia (kopie nie będą przyjmowane), wykresy i diagramy oraz przykłady obliczeń wykonane w celu sformułowania wniosków,

zarówno do sprawozdań podgrup, jak i do sprawozdania całej grupy. Będzie przyjmowane tylko całe sprawozdanie grupy laboratoryjnej, zawierające sprawozdania poszczególnych podgrup.

Literatura

M. Kamiński (ed.), „Chromatografia cieczowa”, CEEAM 2004, (szczególnie rozdział 3 i 13),
Z. Witkiewicz, „Podstawa chromatografii”, WNT, Wa-wa 2000, albo 2004;

Dodatek uzupełniający

Od początku stosowania chromatografii była ona wykorzystywana dwukierunkowo jako metoda analityczna jako sposób na rozdzielanie mieszanin substancji i wydzielenie z mieszaniny interesującego składnika (lub składników). Wprowadzenie detektorów przepływowych i rejestratorów, a później mikroprocesorów i komputerów do rejestracji chromatogramu i sterowania procesem rozdzielania oraz kolekcji frakcji wyraźnie rozdzieliło obszar analitycznych i preparatywnych lub procesowych zastosowań chromatografii. W chromatografii analitycznej celem jest uzyskanie rozdzielania interesujących (ewentualnie wszystkich) substancji w jak najkrótszym czasie, z wartościami R_s ok. 1. W celu oszczędności często kosztownych składników eluentu dąży się do zmniejszenia skali rozdzielania przez zmniejszenie wymiarów kolumny, dbając równocześnie o jej wysoką sprawność. Ze względu na dobrą jakość detektorów ilość dozowanej mieszaniny jest bardzo mała, a eluat, jako ściek, jest kierowany do utylizacji.

Chromatografia służąca otrzymywaniu czystych substancji ma dwie nazwy - chromatografia preparatywna, gdy ilości otrzymywanych substancji są niewielkie, lub substancje są otrzymywane sporadycznie, albo procesowa (produkcyjna, przemysłowa), gdy proces prowadzony jest systematycznie, w sposób cykliczny lub ciągły, a ilość produktu jest znacznie większa (np. otrzymywanie produktu handlowego). Wydajność otrzymywania substancji z zastosowaniem chromatografii preparatywnej, a szczególnie procesowej, charakteryzowana jest najkorzystniej za pomocą produktywności kolumny (P_t) odniesionej do jednostki przekroju poprzecznego jej wypełnienia :

$$P_t = \frac{Q_r}{Q_i} * \frac{Q_i}{t_c A} \quad \left[\frac{kg}{h * m^2} \right] \quad (1)$$

gdzie: P_t - wydajność wyrażona jako masa substancji otrzymana w ciągu jednostki czasu z jednostki powierzchni przekroju kolumny, Q_i - masa substancji wprowadzona do kolumny, Q_r - masa substancji otrzymana z kolumny, t_c - czas trwania jednego cyklu rozdzielania, A - powierzchnia przekroju poprzecznego kolumny. Wyrażenie Q_r/Q_i nazwane jest stopniem odzysku i po uproszczeniu $P_t = Q_r/t_c A$.

P_t nie uwzględnia wszystkich parametrów wpływających na koszty procesu otrzymywania substancji, do których należą także czas i koszt regeneracji eluentu, koszty związane z bezpowrotnym zużyciem tej części eluentu, która nie została zregenerowana i zawrócona do procesu, czas i koszt usuwania eluentu z frakcji na drodze odparowywania, albo liofilizacji oraz koszt wykonywania co jakiś czas regeneracji powierzchni sorpcyjnej kolumny i jej ponownej reaktywacji.

Celem chromatografii preparatywnej (lub procesowej) jest otrzymanie potrzebnej ilości substancji. Dąży się, więc, do zwiększenia skali procesu rozdzielania, w wyniku czego osiąga się wzrost wydajności.

Wzrost stężenia „próbki” przy zachowaniu względnie małej objętości dozowania (V_i) powoduje poszerzenie pasma, a jego kształt zależy od rodzaju izotermy sorpcji (która w warunkach chromatografii jest najczęściej typu Langmuira). W nieliniowym zakresie izotermy sorpcji, czyli przy dużej masie mieszaniny substancji wprowadzonej do kolumny, wartość współczynnika retencji (k) maleje ze wzrostem stopnia przeładowania sorbentu. Część pasma, gdzie stężenie jest wyższe wędruje szybciej. Pasma staje się niesymetryczne, w kształcie trójkąta, ze stromym frontem. Wzrost stężenia próbki powoduje wzrost wysokości maksimum piku i poszerzenie się pasma przez zmniejszenie objętość elucji frontu. Tył piku pozostaje w przybliżeniu w tym samym miejscu co tył piku analitycznego. Taki rodzaj przeładowania kolumny nazywamy przeładowaniem stężeniowym. W przypadku dozowania wysokich objętości rozcieńczonego roztworu (w przypadku bardzo niskiej rozpuszczalności rozdzielanych substancji w eluencie) otrzymuje się szerokie symetryczne piki posiadające plateau i taki typ przeładowania kolumny nosi nazwę objętościowego.

Do najważniejszych parametrów, które mają istotny wpływ na wydajność procesu rozdzielania substancji z zastosowaniem chromatografii preparatywnej należą: średnica i długość kolumny, wielkość ziaren wypełnienia, natężenie przepływu eluentu (tzn., wartość liniowej prędkości eluentu), ilość dozowanej substancji (tzn. stężenie i objętość roztworu wprowadzanego do kolumny), powierzchnia właściwa materiału stanowiącego wypełnienie kolumny, wartość współczynnika retencji i współczynnika selektywności otrzymywanej substancji i najbliższych pików „towarzyszących” jej na chromatogramie, zastosowana zasada zbierania frakcji, żądana czystość produktu, stopień doskonałości wypełnienia kolumny i w konsekwencji profil przepływu cieczy w kolumnie preparatywnej i procesowej oraz niekiedy też inne parametry. Każdy wymaga oddzielnego rozpatrzenia. Jednocześnie optymalne warunki rozdzielania są różne dla różnych konkretnych problemów rozdzielczych.

Istnieje kilka ważnych zasad ogólnych, aktualnych dla wszystkich zastosowań chromatografii w skali preparatywnej i procesowej. Są one następujące:

- zdecydowanie bardziej korzystne jest zachowanie warunków stężeniowego niż objętościowego przeładowania kolumny preparatywnej i procesowej (korzystne dozowanie stosunkowo wysoko stężonych roztworów i małej ich

objętości zamiast roztworów rozcieńczonych i dużej objętości), stąd należy dążyć do stosowania eluentu o dobrej rozpuszczalności substancji rozdzielanych, ograniczeniem jest rozpuszczalność składników mieszaniny, która z reguły maleje ze wzrostem retencji składnika;

- średnica ziaren wypełnienia ma zasadniczy wpływ na sprawność kolumny. Niezbędną liczbę pól do rozdzielania mieszaniny można osiągnąć zmieniając długość i/lub średnicę kolumny. przy zmianie skali procesu z jednoczesną zmianą długości kolumny i wielkości ziaren wypełnienia ważna jest nie sama długość kolumny L_c , lecz stosunek L_c/d_p^2 ;
- najkorzystniej stosować wypełnienia kolumn preparatywnych o jak najmniejszych ziarnach, tylko ograniczona wartość maksymalnego ciśnienia pracy pompy oraz kolumny może powodować, że bardziej optymalne są wypełnienia o ziarnach większych; ostatnio szczególną przydatność do rozdzielania w skali preparatywnej stwierdzono dla tzw. Monolitycznych kolumn preparatywnych HPLC;
- z długością kolumny L_c proporcjonalnie rośnie masa wypełnienia, lecz liczba pól teoretycznych jest proporcjonalna do $\sqrt{L_c}$ (na wylocie z dłuższej kolumny pasma substancji są, co prawda, bardziej rozmyte i większy jest opór przepływu, jednak w poprawnie wypełnionej kolumnie względny stopień rozmycia stref spada ze wzrostem długości kolumny); wzrost długości kolumny (bez zmiany średnicy) umożliwia wzrost wydajności otrzymywania substancji, lecz zależność jest nieliniowa, osiąga się pewną długość kolumny, powyżej której dalszy wzrost długości warstwy złoża jest nieopłacalny; jednocześnie, kolumny preparatywne powinny być znacznie dłuższe niż odpowiednie kolumny analityczne do rozdzielania tej samej mieszaniny substancji i względnie tym dłuższe, im większymi ziarnami zostały wypełnione; istnieje optymalna długość kolumny preparatywnej, albo procesowej i jest ona znacznie większa niż „krytyczna” długość kolumny preparatywnej (odpowiadająca optymalnej długości kolumny analitycznej, zapewniająca wartość $Rs=1$ dla otrzymywanej substancji i towarzyszących jej pików, uzyskaną w warunkach braku przeładowania);
- wzrost prędkości przepływu fazy ruchomej powoduje skrócenie czasu trwania procesu i tym samym wzrost wydajności; równocześnie wpływa ujemnie na sprawność kolumny powodując poszerzenie się pasm, co przy założonej czystości wydzielanej substancji wymusza konieczność zmniejszenia masy dozowanej mieszaniny rozdzielanych substancji, albo zmniejszenie objętości zbieranych frakcji; spadek sprawności kolumny powoduje też zmniejszenie się stężenia substancji w eluacie; należy też brać pod uwagę możliwość uzyskiwania odpowiedniego ciśnienia na wlocie do kolumny; zależność wydajności rozdzielania od szybkości przepływu nie jest liniowa, a wzrost prędkości przepływu eluentu powyżej pewnej wartości nieopłacalny;
- istnieje optymalna prędkość liniowa przepływu eluentu w kolumnie procesowej, zapewniająca maksymalna wartość P_t i jest ona wielokrotnie wyższa od prędkości liniowej zapewniającej maksymalną wartość liczby pól teoretycznych kolumny; tylko maksymalne dopuszczalne ciśnienie pracy aparatury procesowej, albo wysokie wartości masy molekularnej rozdzielanych substancji (powyżej ok. 10 tys. daltonów i bardzo niskie w związku z tym wartości ich współczynników dyfuzji w eluencie) mogą powodować, że w/w optymalna prędkość przepływu eluentu nie może zostać zastosowana;
- silna retencja składników mieszaniny jest niekorzystna ze względu na duże zużycie rozpuszczalników niezbędnych do elucji. Ponadto, dla dwu substancji o różnej retencji szerokość pasma rośnie szybciej wraz z ilością dozowanej próbki dla substancji o większej retencji. Uważa się, że odpowiednia wartość parametru retencji dla pierwszego składnika nie powinna przekraczać wartości 2, a dla ostatniego pików w mieszaninie powinna być tak mała jak to możliwe. Ponieważ wzrost selektywności czyli odległości między interesującymi pikami jest najważniejszym parametrem umożliwiającym wzrost wydajności, konieczny jest więc kompromis pomiędzy selektywności i retencją;
- zwiększenie powierzchni właściwej sorbentu jest zawsze korzystne w warunkach chromatografii preparatywnej i procesowej, ale reguła ta może nie dotyczyć chromatografii jonowymiennej, gdy rozdzielane są substancje wykazujące znaczną retencję.
- maksymalną objętość próbki, którą można dozować w celu zwiększenia wydajności procesu można oszacować z chromatogramu próbki dla warunków dolnej granicy przeładowania kolumny. Jest to odległość pomiędzy pikami substancji, które są celem rozdzielania, zmierzona na poziomie linii podstawowej i wyrażona w jednostkach objętości;
- dobór optymalnych warunków preparatywnego rozdzielania substancji powinien być wykonywany z zastosowaniem kolumny „modelowej” o niewielkiej średnicy, o długości takiej, jaką będzie miała kolumna preparatywna oraz wypełnionej tym samym sorbentem; gdy dwie kolumny tej samej długości, wypełnione tym samym materiałem pracują w tych samych warunkach, wówczas wzrost średnicy kolumny umożliwia wzrost wydajności rozdzielania zgodnie z wyrażeniem:

$$m_2 = m_1 * \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \quad (2)$$

m_2 - masa próbki dozowanej do kolumny o średnicy d_{c2} (do kolumny preparatywnej)

m_1 - masa próbki dozowanej do kolumny o średnicy d_{c1} (do kolumny modelowej).