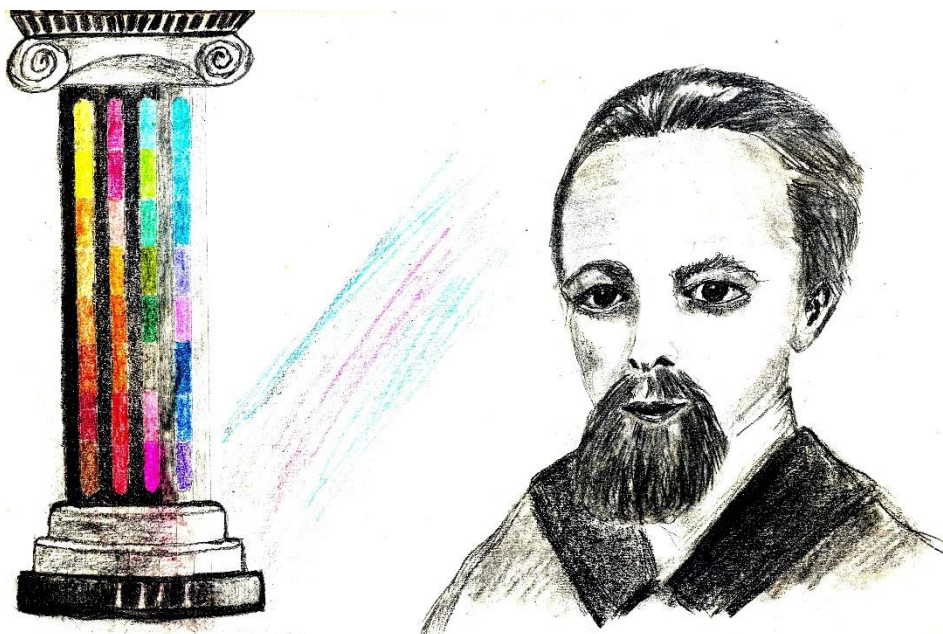




Michaił Semionowicz Cwiet (1872-1919)
Grafika ze zbioru autorów

Bronisław K. Głód

Paweł Piszcz

PODSTAWY WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAPHII CIECZOWEJ

Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach
Siedlce 2019

Autorzy:

dr hab. Bronisław K. Głód, prof. uczelni
dr Paweł Piszcz

Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

Recenzent:

dr hab. Wojciech Zapała, prof. uczelni
Politechnika Rzeszowska im. Ignacego Łukasiewicza

Komitet Wydawniczy: Andrzej Barczak, Mikołaj Bieluga, Andrzej Borkowski, Grażyna Anna Ciepiela, Janina Florczykiewicz (przewodnicząca), Robert Gałązkowski, Jerzy Georgica, Arkadiusz Indraszczyk, Beata Jakubik, Jarosław Kardas, Wojciech Kolanowski, Agnieszka Prusińska, Zofia Rzymowska, Sławomir Sobieraj, Stanisław Socha, Maria Starnawska, Grzegorz Wierzbicki, Waldemar Wysocki

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach, Siedlce 2019

Żaden fragment tej publikacji nie może być reprodukowany, umieszczany w systemach przechowywania informacji lub przekazywany w jakiegokolwiek formie – elektronicznej, mechanicznej, fotokopii czy innych reprodukcji – bez zgody posiadacza praw autorskich.

ISBN 978-83-7051-967-4



Wydawnictwo Naukowe
Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach
www.wydawnictwo-naukowe.uph.edu.pl

08-110 Siedlce, ul. Żytnia 17/19, tel. 25 643 15 20
Ark. wyd. 4,5. Ark. druk. 5,8.

Druk i oprawa: EXDRUK Spółka Cywilna, Włocławek

SPIS TREŚCI

PRZEDMOWA	7
1. PODSTAWY PROCESU	9
1.1. Definicja chromatografii	9
1.2. Rys historyczny	9
1.3. Znaczenie chromatografii	24
1.4. Mechanizm procesu	25
Literatura.....	35
2. PODZIAŁ TECHNIK CHROMATOGRAFICZNYCH.....	37
2.1. Ogólny podział chromatografii	37
2.2. Podział chromatografii cieczowej	41
2.3. Kolumnowa chromatografia cieczowa	43
Literatura.....	45
3. MECHANIZM PROCESU	46
3.1. Teoria półki chromatograficznej.....	46
3.2. Równanie bilansu masy	48
3.3. Opis empiryczny	53
3.4. Asymetria rozmycia próbki	61
Literatura.....	63
4. PARAMETRY RETENCJI I ZALEŻNOŚCI MIĘDZY NIMI.....	64
Literatura.....	78
5. UPLC – ULTRAWYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA	79
Literatura.....	81
6. APARATURA STOSOWANA W HPLC	82
Literatura.....	85
7. DETEKCJA	86
Literatura.....	93
SUMMARY.....	95

PRZEDMOWA

W monografii opisane zostały podstawy wysokosprawnej kolumnowej chromatografii cieczowej. Książka oparta została na wykładach prowadzonych w Uniwersytecie Przyrodniczo-Humanistycznym w Siedlcach oraz w ramach szkół chromatograficznych, podręczniku wydanym przez Instytut Chemii Fizycznej PAN pt.: *Wprowadzenie do wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, praca zbiorowa pod red. B.K. Głoda oraz cyklu szkoleń firmy Varian Analytical Instruments. Jest to rozszerzona wersja podręcznika wydanego przez Wydawnictwo UPH w 2009 r. Przedyskutowano w niej podstawowe parametry chromatograficzne i mechanizmy retencji, głównie wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Ze względu na jej podręcznikowy charakter odnośniki literaturowe uwzględniają jedynie prace monograficzne i pierwsze z danej dziedziny.

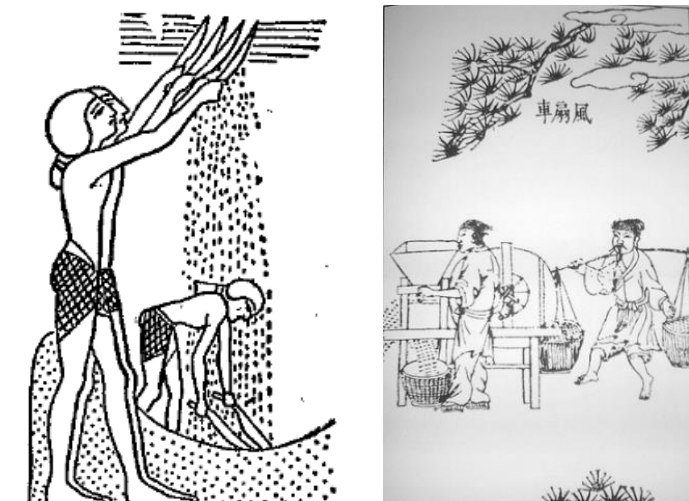
1. PODSTAWY PROCESU

1.1. Definicja chromatografii

Chromatografię (z greckiego *chrōma* lub *chrōmatos* – barwa i *gráphō* – pisać) najkrócej można zdefiniować jako rozdzielanie poprzez zetknięcie dwu faz będących we względnym ruchu, przy maksymalnie rozwiniętej powierzchni.

1.2. Rys historyczny

Rozdzielanie jest najstarszą grupą operacji jednostkowych, stosowanych na różnych polach działalności człowieka, począwszy od zbierania i segregacji żywności, poprzez prymitywną metalurgię, różne procesy wytwarzania w okresie manufaktury i następnie w okresie technicznej działalności ludzkości, w tym w chemii (początkowo w alchemii). Odwiewanie (do oczyszczania ziarna) stosowane było już w starożytnym Egipcie czy Chinach (rys. 1.1). Bardzo podobne konstrukcyjnie urządzenia są stosowane do chwili obecnej.



Rysunek 1.1. Odwiewanie ziarna, od lewej: w Egipcie i Chinach

Źródło: Wikipedia, na licencji CC-BY-SA 3.0, <<https://en.wikipedia.org/wiki/Winnowing>>, data dostępu: 23.10.2019.

Operacje i techniki rozdzielania stanowią obecnie odrębną dziedzinę wiedzy, której podstawy teoretyczne bazują na fizyce, fizykochemii i chemii. Znajdują bardzo liczne zastosowania zarówno w skali masowej (np. w technologii rafinacji ropy naftowej, petrochemii, technologii chemicznej, technologii żywności), jak i w mniejszej skali (w biotechnologii, biochemii), a także na znacznie mniejszą skalę, czasem w skali mikro- (w analityce: klinicznej, chemicznej, technicznej czy przemysłowej). Do nauki o rozdzielaniu należy zaliczyć następujące grupy operacji i/albo technik rozdzielania: adsorpcja – desorpcja, absorpcja – desorpcja, odparowanie w wielostopniowych bateriach wyparnych czy odparowanie próżniowe, suszenie i osuszanie, sublimację i liofilizację (odparowanie przy niskiej prężności pary wodnej, w warunkach sublimacji fazy stałej), różne techniki destylacji i rektyfikacji (frakcjonowanej destylacji), ekstrakcję ciecz – ciecz, a także ciecz – ciało stałe, rozdzielanie sitowe i analizę sitową, wszelkiego typu chromatografie kolumnowe, cienkowarstwowe w różnej skali i metodologii realizacji, wytrącanie i roztwarzanie, sedymentację, dekantację (rozdzielanie materiałów ziarnistych na drodze zróżnicowania prędkości sedymentacji w płynie), elutriację (rozdzielanie na drodze zróżnicowania prędkości przepływu płynu, najczęściej gazu w warunkach fluidyzacji), odwiwanie (należące do najprostszej postaci elutriacji), flokulację (koloidów i rozdzielanie zawiesiny od cieczy), demistery (osuszanie par), techniki elektroforezy, elektroosadzania, ewaporacji (parowania poprzez przegrodę porowatą albo membranę nieporowatą), techniki *zwykłej* i tzw. pseudofiltracji (filtracja *zwykła* zawiesin oraz mikro, ultra i nanofiltracja, zaliczane są do tzw. technik membranowych), osmozę, odwróconą osmozę, elektroosmozę, dializę, elektrodializę, flotację, frakcjonowane wymrażanie, krystalizację i rekrytalizację, nebulizację i rozdzielanie powstałej mgły od gazu nebulizującego, rozdzielanie magnetyczne, rozdzielanie strefowe, frakcjonowane, wirowanie w wirówce lub ultrawirowanie, rozdzielanie w cyklonach, czy hydrocyklonach, zatężanie podczas wypieniania i inne.

Początki nauk przyrodniczych w Polsce datują się na pierwszą połowę XVI wieku. Przede wszystkim należy tu wymienić prace Mikołaja Kopernika z astronomii, ale także i z matematyki (trygonometrii), ekonomii czy zielarstwa. Wcześniej pojawiły się pierwsze polskie podręczniki matematyki Tomasza Kłosa, Bernarda Wojewódki i Stanisława Grzebskiego. Z kolei Stefan Falimirz, botanik

i lekarz wojewody podolskiego Jana Tarczyńskiego, jest autorem pierwszego (1534) polskiego zielnika.

W tym czasie obserwuje się również rozkwit górnictwa i hutnictwa w Polsce. Zwłaszcza produkcja srebra wymagała rozwoju sztuki probierczej, którą nazwać można pierwociną chemii analitycznej i/albo nauki o rozdzielaniu. To spowodowało rozwój chemii i/albo alchemii. Pierwszym państwowym laboratorium chemicznym (i alchemicznym) była powołana do życia przez króla Zygmunta I Starego w 1517 r. na rynku w Krakowie Komora Górnicza (Pobiernicza) i związana z nią ***Camera Separatoria***. Rozwijana w niej była *nauka o rozdzielaniu*. Rozdzielano w niej złoto od srebra, oczyszczano siarkę, rtęć, antymon, glejtę (tlenek ołowiu) i ołów. Ponadto wytwarzano w niej kwas azotowy, siarkowy, saletrę, wodę królewską itd. Jej dyrektorem został krakowski mieszczanin Kasper Ber, słynny budowniczy kopalń i hut w Polsce i na Węgrzech, wspólnik Jana Turzona, który studiował we Florencji i Wenecji. Rudę do przerobu dostarczano z kopalni w Rabsztynie, Tarnowskich Górach oraz Olkusza. Srebro uzyskiwano z rud ołowiu. Srebro i złoto z rud miedzi w Mogile.

O dokładności badań w niej przeprowadzanych świadczy stały skład poszczególnych egzemplarzy ówczesnych monet. Na naukę sztuki probierczej przyjeżdżali do Bera uczniowie z całej centralnej Europy. Syn jego (Krzysztof) zarządzał hutami na Śląsku i kopalnią złota w, *nomen omen*, Złotym Stoku. Drugi syn Marcin był opatem klasztoru w Czerwonym Klasztorze. Ponadto był autorem szeregu pism alchemicznych. Przyczyniło się to do złej sławy otaczającej klasztor, słynący sztuką czarnoksiężką.

Nauka o rozdzielaniu utożsamiana była niekiedy z całą chemią. Świadczy o tym fragment *Tego uczy Chimia, albo właściwie Ars separatoria* z wydanej w 1797 r. książki ks. Krzysztofa Kluka (rys. 1.2).

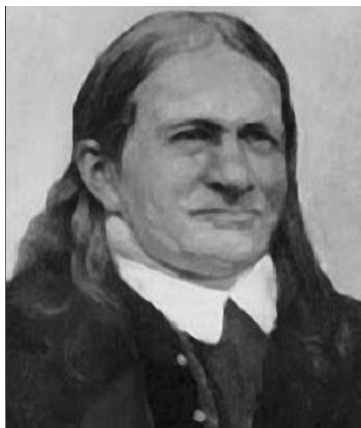


33. Z wymiarkowania, iakie rzeczy są spo-
ione, i wiele którey iest, wypada potrzeba umie-
iętności czyſtego i pożytecznego rzeczy kaźdey
oddzielania. Tego uczy *Chimia*, albo właſciwie
Ars ſeparatoria. W tym względzie wielorakie
są dzieła, a między temi: *imo. Stahl Chimia*
rationalis & experimentalis *zdo. Gellert Anfangs;*
gründe zur Metallurgischer Chymie.

Rysunek 1.2. Strona tytułowa i fragment książki X. Krzysztofa Kluka „Rzeczy kopalnych osobiwie zdatniejszych szukanie, poznanie i zażycie”

Źródło: Polona, <<https://polona.pl/item/rzeczy-kopalnych-osobiwie-zdatniejszych-szukanie-poznanie-i-zazycie-t-1-o-rzeczach,NjgyMjA3NjA/>>, data dostępu: 23.10.2019.

Prekursorem chromatografii jest Friedlieb Ferdinand Runge (1795-1867) (fot. 1.1). Wykładał m.in. technologię chemiczną na Śląskim Uniwersytecie im. Fryderyka Wilhelma (obecnie Uniwersytet Wrocławski). Jego dorobek obejmuje prace z różnych działów chemii organicznej. W 1850 r. ukazały się dwie jego książki o chromatografii bibułowej.



Fotografia 1.1. Friedlieb Ferdinand Runge (1795-1867)

Źródło: Wikipedia, na licencji CC-BY-SA 3.0, <https://pl.wikipedia.org/wiki/Friedlieb_Ferdinand_Runge#/media/Plik:Friedlieb_Ferdinand_Runge.jpeg>, data dostępu: 23.10.2019.

Za twórcę chromatografii uważa się powszechnie Michaiła Semionowicza Cwieta żyjącego w latach 1872-1919 (fot. 1.2 [1, 2]). Można go uznać za pełnego Europejczyka. Był on Rosjaninem urodzonym we Włoszech, studiował w Szwajcarii, najśłynniejsze prace (po francusku i niemiecku) opublikował, pracując w Warszawie, gdzie zmuszony został przez władze carskie do przeniesienia się. Rozdzielanie chromatograficzne odkryte przez niego zastało w 1903 roku. Początkowo pracował on na Wydziale Botaniki Uniwersytetu Warszawskiego (fot. 1.3), a następnie na Politechnice Warszawskiej. Pewnego razu chciał on oczyścić wyciągi roślinne na szklanej kolumnie wypełnionej kredą. Ze zdziwieniem stwierdził, że kolumna została zabarwiona na różnokolorowe pasma. W ten sposób dokonał on pierwszego w historii rozdzielania chromatograficznego pigmentów roślinnych i chlorofili. Technice tej nadał nazwę chromatografii, co po grecku oznacza malowanie kolorem. Przy okazji warto zwrócić uwagę na fakt, że jego nazwisko w języku rosyjskim oznacza właśnie kolor.

Spory wkład w rozwój chromatografii wnieśli również Polacy. Warto tu wymienić – działających w początkowym okresie jej rozwoju – Bogdana Kamieńskiego (detekcja potencjometryczna), a w szczególności Wiktora Kemulę (fot. 1.4) – detekcja polarograficzna, nazwana przez niego chromatopolarografią.



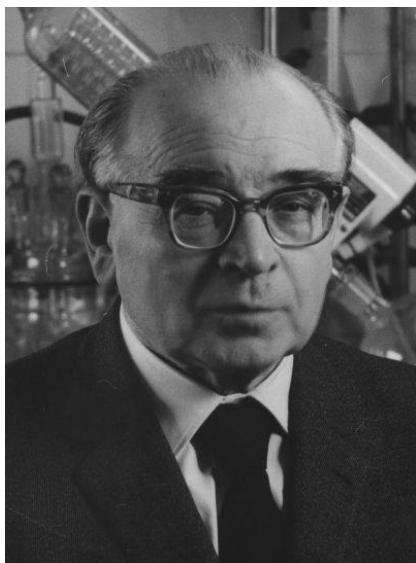
Fotografia 1.2. Michaił Semionowicz Cwiet (1872-1919).

Źródło: Wikipedia, na licencji CC-BY-SA 3.0, <https://pl.wikipedia.org/wiki/Michai%C5%82_Cwiet>, data dostępu: 23.10.2019.



Fotografia 1.3. Budynek główny Uniwersytetu Warszawskiego w 1902 r., w którym znajdowało się laboratorium Cwieta

Źródło: pocztówka St. Winiarskiego, Warszawa 1902, zbiór własny.



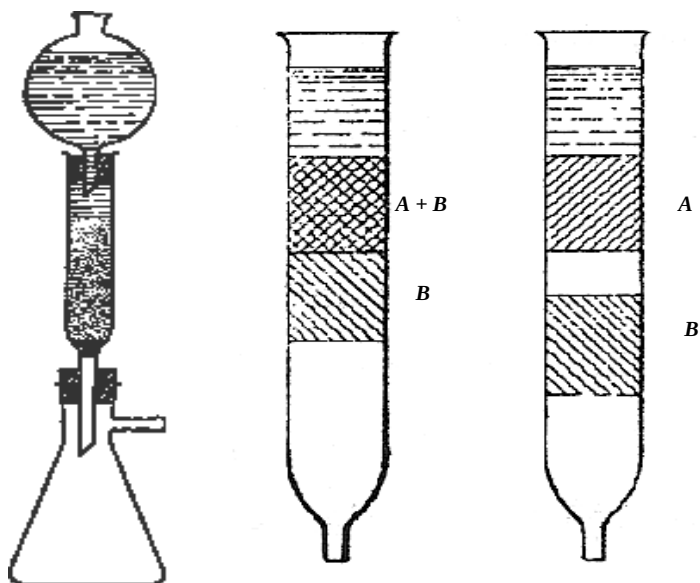
Fotografia 1.4. Wiktor Kemula (1902-1985).

Źródło: Strona internetowa Instytutu Chemii Fizycznej PAN, <<http://ichf.edu.pl/images/kemula.jpg>>, data dostępu: 23.10.2019.

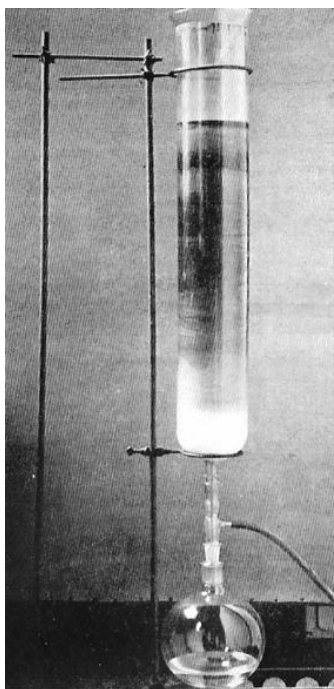
Najważniejsze wydarzenia z nauki o rozdzielaniu:

XV w.	– badanie złota metodą kupelacyjną (ogniową)
1791 – Faraday	– prawa elektrolizy
1841 – Fresenius	– schemat rozdzielania kationów (ze zmianami stosowany do dziś)
1850 – Runge	– dwie książki na temat chromatografii bibułowej
1852 – Quincke	– zjawiska elektrokinetyczne, potencjał przepływu
1877 – Helmholtz	– budowa podwójnej warstwy elektrycznej
1897 – Kohlraush	– zależność między ruchliwością, a stężeniem jonów
1903 – Cwiet	– początek chromatografii, rozdzielanie chlorofili
1905 – Ramsey	– rozdzielanie par i gazów
1906 – Thomson	– wyznaczenie m/z elektronu, spektrometr mas
1908 – Smoluchowski	– mechanizm efektów elektrokinetycznych
1910 – Guoy-Chapman	– budowa podwójnej warstwy elektrycznej
1910 – Grahame	– budowa podwójnej warstwy elektrycznej
1911 – Wien	– początki spektrometrii mas
1914 – Palmer	– zastosowania chromatografii
1922 – Aston	– spektrometria mas izotopów
1924 – Stern	– budowa podwójnej warstwy elektrycznej

1931 – Kuhn i Lederer	– zastosowania chromatografii
1938 – Izmailow i Schraiber	– chromatografia cienkowarstwowa
1938 – Reichstein	– pomiary ciągłe
1939 – Svenson	– elektroforeza strefowa i wypierania
1941 – Martin i Synge	– chromatografia podziałowa
1947 – Martin i Synge	– teoria chromatografii
1948 – Tiselius	– nagroda Nobla za prace nad elektroforezą
1950 – Horward i Martin	– chromatografia faz odwróconych
1951 – Martin i Synge	– chromatografia gazowa (nagroda Nobla)
1952 – Alma	– gradient elucji
1953 – Wheaton i Bauman	– chromatografia jonowo-wykluczająca
1955 – Kemula	– detekcja elektrochemiczna (chromatopolarografia)
1958 – Stahl	– monografia o chromatografii cienkowarstwowej
1958 – Stein i Moore	– automatyczna analiza aminokwasów
1958 – Hjerten	– analityczne zastosowanie elektroforezy (rurki 1 mm)
1959 – Porath i Flodin	– zastosowanie miękkich żeli polidekstranowych
1962 – Moore	– sztywne żywice polistyrenowe
1964 – Giddings	– dwie klasyczne książki teorii chromatografii cieczerwowej
1967 – Huber i Hulman	– szybka chromatografia podziałowa (HPLC)
1969 –	– <i>Journal of Chromatography</i>
1969 – Virtanen	– elektroforeza kapilarna (kapilary szklane 200 µm)
1970 – Everaerts	– izotachoforeza kapilarna (PTFE 0,5 mm)
1973 – Stein i Moore	– nagroda Nobla za prace nad chromatografią cieczerwą
1981 – Small	– chromatografia jonowa
1981 – Jorgenson i Lukacs	– elektroforeza kapilarna
1984 – Terabe	– micelarna chromatografia elektrokinetyczna
1985 – Hillenkamp, Karas	– MALDI TOF
1989 – Dehmelt, Paul	– kwadropolowa pułapka jonowa
2002 – Fenn	– elektrorozpylanie w MS



Rysunek 1.3. Prosty układ chromatograficzny [3]



Fotografia 1.5. Pierwszy prosty chromatograf [3]

Pierwsze chromatografy składały się po prostu z rurki szklanej (zwanej kolumną chromatograficzną) z usypaną w jej wnętrzu fazą stacjonarną (złożem chromatograficznym). Ciecz (faza ruchoma lub eluent) przepływała przez kolumnę grawitacyjnie (rys. 1.3). Później wprowadzono możliwość przyspieszenia procesu poprzez podciśnieniowe zaciąganie fazy ruchomej (fot. 1.5). Eluat (faza ruchoma po opuszczeniu kolumny chromatograficznej) zbierana była w małych pojemniczkach i poddawana analizie chemicznej w celu określenia składu próbki. Często stosowane było również wypychanie złoża z kolumny i jego rozdzielanie (fot. 1.6). Następnie próbka była ekstrahowana i poddawana analizie. W latach pięćdziesiątych pojawiła się możliwość detekcji próbki w trakcie przebiegu procesu chromatograficznego.



Fotografia 1.6. Rozdzielanie złoża na strefy [3]

Przez następne lata technika ta była nieco zapomniana, gdyż uważano ją za bardzo pracochłonną i długotrwałą. Z nielicznych autorów publikujących w tym czasie wymienić można: Ramsey'ą (1905, rozdzielanie par i gazów), Palmera (1914, zastosowania chromatografii) oraz Kuhna i Lederera (1931, zastosowania chromatografii), Izmailowa i Schraibera (1938, chromatografia cienkowarstwowa), Reichsteina (1938, pomiary ciągłe) czy też Tiseliusa (nagroda Nobla w 1948 roku za prace nad elektroforezą). Większe zainteresowanie chromatografią datuje się od prac Martina i Syngego z 1941 roku o chromatografii podziałowej i z 1947 roku o teorii chromatografii oraz Horwarda i Martina

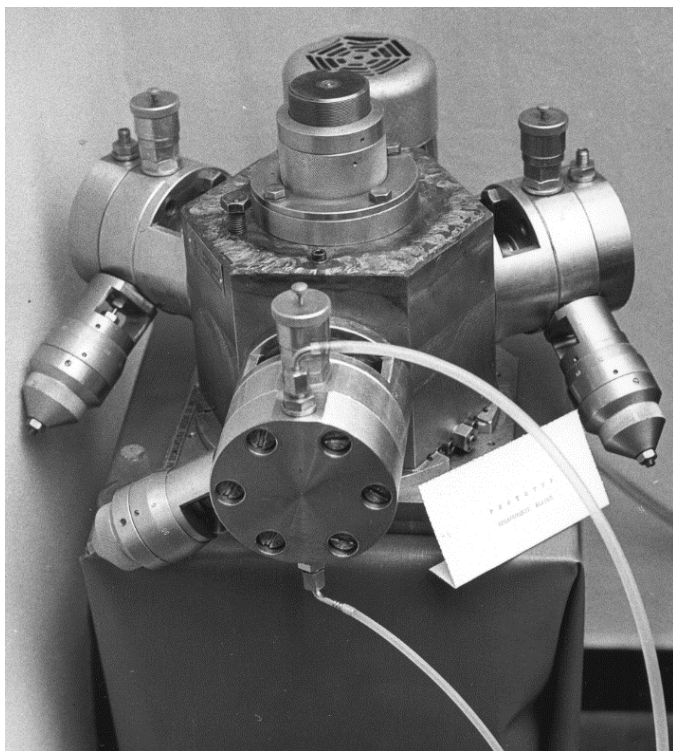
z 1950 roku o chromatografii faz odwróconych. Prawdziwy przełom został jednak dokonany w 1951 roku przez Martina i Syngego po wprowadzeniu chromatografii gazowej. Za prace te zostali oni uhonorowani nagrodą Nobla. Od tego momentu datuje się szybki rozwój chromatografii gazowej jako nowoczesnej, szybkiej i sprawnej techniki rozdzielania i analizy. Chromatografię cieczową w dalszym ciągu tradycyjnie uważano za mało skuteczną i długotrwałą. Do najważniejszych publikacji w tym okresie należą prace: Alma (1952) o gradiencie elucji, Wheatona i Bauman (1953) o chromatografii jonowo-wykluczającej, Kemuli (1955) o detekcji elektrochemicznej, Stahla (1958) o chromatografii cienkowarstwowej, Steina i Moore'a (1958) o automatycznej analizie aminokwasów, Hjertena (1958) o elektroforezie, Poratha i Flodina (1959) o zastosowaniu miękkich żeli polidekstranowych w chromatografii żelowo-permeacyjnej oraz Moore'a (1962) o sztywnych żywicach polistyrenowych. W latach sześćdziesiątych ukazały się również dwie klasyczne książki Giddingsa o teorii chromatografii cieczowej. W książkach tych zebrano w jedną spójną całość dotychczas znane prace teoretyczne opisujące tę technikę. Teoria chromatografii cieczowej oparta została na rozwiniętej wcześniej teorii chromatografii gazowej.

Przełom w chromatografii cieczowej nastąpił po 1967 roku, kiedy to Huber i Hulsman opisali szybką chromatografię podziałową. Okazało się bowiem, że po wymuszeniu przepływu wysokim ciśnieniem i zastosowaniu złożeń o małych średnicach cząsteczek można uzyskać szybkie rozdzielanie charakteryzujące się wysoką sprawnością. Stąd pochodzi nazwa techniki: wysokosprawna chromatografia cieczowa. Powszechnie używa się skrótu **HPLC**. Pochodzi on od angielskiego *High Pressure Liquid Chromatography* lub *High Performance Liquid Chromatography*, choć niektórzy wywodzą go od *High Price Liquid Chromatography*. W 1969 roku *Journal of Gas Chromatography* został przemianowany na *Journal of Chromatography*. W chwili obecnej jest to jedno z największych czasopism naukowych świata (dwie sekcje, abstrakty, seria konferencyjna oraz monograficzna *Journal of Chromatographic Library*). W 1973 roku Stein i Moore otrzymali nagrodę Nobla za prace w dziedzinie chromatografii cieczowej. W 1981 roku Small opisał chromatografię jonową. Przez lata osiemdziesiąte była to najintensywniej rozwijająca się technika chromatograficzna. W tym samym roku Jorgenson i Lukacs opisali po raz pierwszy elektroforezę kapilarną. Jest to w chwili obecnej jedna z najdynamiczniej rozwijających się metod chemii analitycznej.

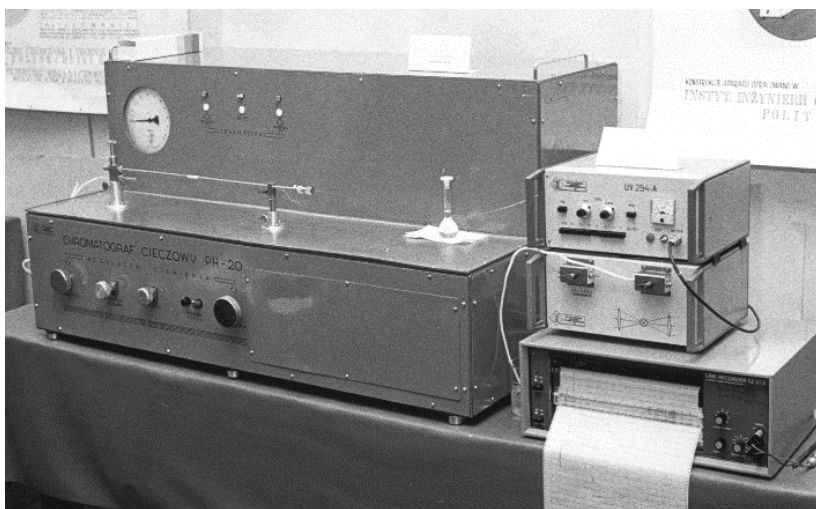
Pierwszy polski ciśnieniowy chromatograf ciekowy został opracowany w latach 1962-1964 w Instytucie Inżynierii Chemicznej i Technik Pomiarowych Politechniki Gdańskiej (PG) pod kierunkiem J.S. Kowalczyka (fot. 1.7) [4]. W jego konstrukcji uczestniczyli też pracownicy innych instytutów PG, Zakładów Mechaniki Precyzyjnej *Mera-Wag*, Zakładów Radiowych *Radmor* oraz Gdańskiej Stoczni Remontowej. W kolejnych latach wykonano szereg chromatografów serii SP, ZB i PH, a także detektorów UV-254 i Vis. Bezpompowe chromatografy (fot. 1.8) serii ZB (ZB-d i ZB-an) umożliwiały pracę do ciśnienia 60 atm., a serii SP (SP-20 i gradientowy SP-30) do 100 atm. (fot. 1.9). Przepływ cieczy (fazy ruchomej) kontrolowany był ciśnieniem (nie szybkością przepływu) i wymuszany parciem gazu obojętnego. Chromatografy pompowe (membranowe) PH-20, PH-30 i PH-31 umożliwiały pracę przy ciśnieniu do 400 atmosfer.



Fotografia 1.7. Pierwszy polski ciśnieniowy chromatograf ciekowy zbudowany w latach 1962-1964 [4]

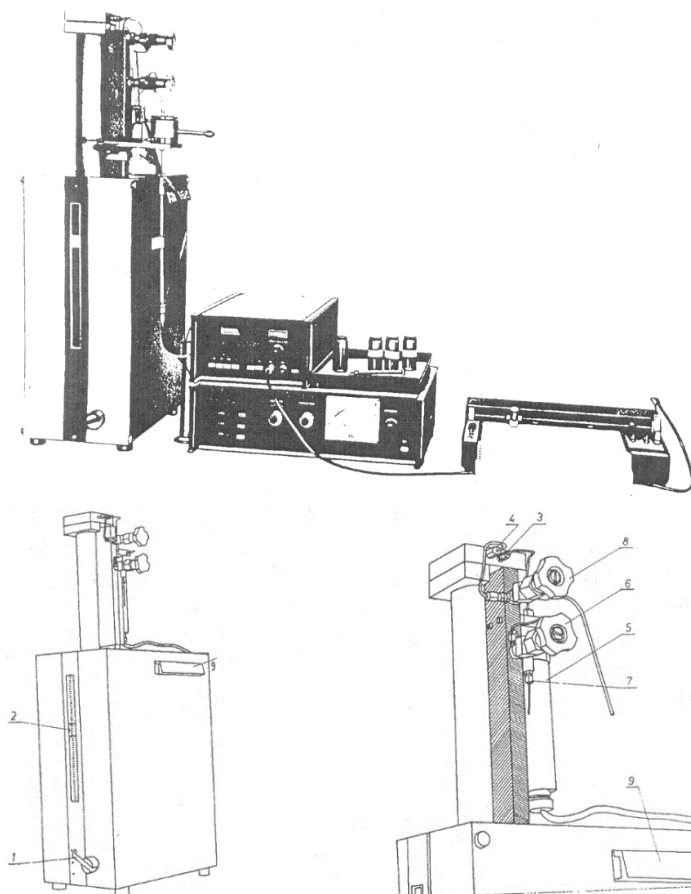


Fotografia 1.8. Pompa membranowa [4]



Fotografia 1.9. Bezpompowy chromatograf cieczowy SP-20 [4]

Seria wysokosprawnych chromatografów cieczowych opracowana została w Instytucie Chemii Fizycznej PAN (IChF) pod kierunkiem A. Byliny, a następnie B.K. Głoda [5]. Obejmowały one wysokosprawny chromatograf cieczowy T-302, mikrokolumnowy chromatograf T-310, półautomatyczny chromatograf mikrokolumnowy T-333 oraz automatyczny chromatograf T-340. Wszystkie chromatografy wyposażone były w pompy tłokowe umożliwiające pracę do 400 atm. (800 atm., przy nabijaniu kolumn) oraz detektory fotometryczne UV-254, UV-254/310, UV-254A, elektrochemiczny ED-1, elektrokinetyczny EK lub detektor z matrycą diodową (opracowany pod kierunkiem J. Koszewskiego i S. Malareckiego). Sprzęt ten produkowany był przez IChF, PPDRP *Techma-Robot*, Zakład Aparatury Elektronicznej *Elpan*, *Selko Industries Ltd*.



Rysunek 1.4. Wysokosprawny chromatograf cieczowy T-302 [5]

Chromatograf T-302 zbudowany był z pompy (konstrukcja A. Krupki) strzykawkowej zasilanej dużym silnikiem krokowym (rys. 1.4). Umożliwiał przepływ w zakresie $0 \div 6 \text{ mL/min}$ i ciśnienie maksymalne pracy 30 MPa . Zaopatrzony był w detektor UV-254 nm (kuwetka $10 \mu\text{L}$, $l = 1 \text{ cm}$) [5].

Zaletą mikrokolumnowych chromatografów T-310, pracujących z kolumną $1 \times 250 \text{ mm}$ (fot. 1.10), była możliwość samodzielnego nabijania kolumn, wykorzystując maksymalne ciśnienie pompy 80 MPa , komputerowy nabór i obróbka danych [5-9].

W IChF opracowane zostały ponadto różne typy detektorów elektrochemicznych, urządzenia do nabijania kolumn oraz chromatografy preparatywne (we współpracy z B. Śledzińską z PG).



Fotografia 1.10. Mikrokolumnowy chromatograf cieczowy T-310 [5]

1.3. Znaczenie chromatografii

Jak wynika z powyższego rysu historycznego chromatografia jest w chwili obecnej najszybciej rozwijającym się działem chemii analitycznej. Z danych publikowanych w różnych krajach płynie wniosek, że na techniki chromatograficzne przeznaczane są największe nakłady w stosunku do innych metod analitycznych. Wynika z tego, że w najbliższych latach należy oczekiwać dalszego dynamicznego ich wzrostu. Ciągłe również pojawiają się nowe techniki chromatograficzne: chromatografia elektrokinetyczna, elektrostatyczna, micelarna, płynowa, przemysłowa, w przeciwnym kierunku, plazmowa czy też rozdzielanie w przepływie w przyłożonym polu. Ze względu na możliwość szybkiego i selektywnego rozdzielania chromatografia staje się coraz bardziej jedną z głównych metod analitycznych. Ostatnio coraz większego znaczenia nabiera również możliwość jej zastosowania zarówno do celów preparatywnych, jak i do wyznaczania wartości różnych parametrów fizykochemicznych.

Jako metoda analityczna umożliwiła ona rozwój szeregu innych działów nauki. Wymienić tu można chociażby nauki biomedyczne, farmaceutyczne czy też z dziedziny ochrony środowiska. Rozwój nauk biomedycznych możliwy jest między innymi dzięki istnieniu szybkiej i pewnej metody analizy wszystkich aminokwasów oraz białek. W genetyce wykorzystuje się chromatografię w celu ustalenia składu DNA. Bardzo intensywnie rozwijane jest ostatnio również rozdzielanie enancjomerów. W wielu krajach wprowadza się ostatnio jako normę przebadanie wszystkich nowych leków na enancjoselektywność. Okazało się, że chromatografia oferuje najefektywniejsze metody rozdzielania i analizy enancjomerów. Nie do końca wykorzystana jest możliwość chromatograficznego rozdzielania izotopów.

Chromatografia umożliwiła również rozwój nauk związanych z ochroną środowiska. W szczególności opracowanie detektora wychwyty elektronów umożliwiło oznaczanie pestycydów na bardzo niskim poziomie. Pozwoliło to na poznanie ich długotrwałego oddziaływania (w tym rakotwórczego) na niskim poziomie na organizm ludzki. Dotyczy to również wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), polichlorobifenoli, dioksyn i furanów. Interesujące wyniki przyniosły ostatnie lata (m.in. po przecieku w Three Mile Islands). Okazało się bowiem, że niektóre z tych wyjątkowych trucizn produkowane są

przez same rośliny celem zwalczania konkurencji. Pozwoli to zweryfikować niektóre uproszczone poglądy na temat tzw. nauk alternatywnych, wpływu człowieka na środowisko i tzw. naturalnych środków leczniczych. Podobnym zaskoczeniem było wykrycie w ostatnim czasie, że izopren (wpływający między innymi na tworzenie ozonu w stratosferze) jest również wytwarzany przez rośliny. Okazało się, że w upalne dni jego ilość pochodząca od roślin przewyższa tę pochodzenia przemysłowego. Szczegółowe badania za pomocą chromatografii gazowej środowiska ziemskiego umożliwiły również wysunięcie koncepcji tzw. Gai. W skrócie wzięta się ona z obserwacji, że atmosfera ziemska znajduje się w stanie permanentnej nierównowagi termodynamicznej. Oznacza to, że jako całość można ją porównać do żywego organizmu. Wszelkie zakłócenia ustalonego stanu stacjonarnego mogą więc mieć dalekosiężne skutki. Na tej podstawie należy również oczekiwać, że podobna sytuacja występuje na wszystkich planetach, na których występują istoty żywe. W celu ustalenia, czy istnieje życie na Marsie, wystarczyło zbadać, czy gazy w jego atmosferze znajdują się w stężeniach równowagowych. Jeszcze przed wysłaniem statku na jego powierzchnię wiedziano, że są to stężenia równowagowe.

1.4. Mechanizm procesu

Spróbujmy teraz zrozumieć, jak to się stało, że w eksperymencie Cwieta doszło do rozdzielania pigmentów na kolumnie. Z procesem chromatograficznym związany jest przepływ fazy ruchomej przez kolumnę. Oznacza to, że mamy w tym przypadku do czynienia z procesem nierównowagowym, a więc nieodwracalnym. Zrozumienie procesu jest niezwykle trudne i nie ma w chwili obecnej jego dokładnego matematycznego opisu. Aby zrozumieć samą istotę procesu (bez szczegółowego jego opisu) spróbujmy przedstawić go sobie w sposób mnemotechniczny.

Wyobrazić go sobie możemy w ten sposób, że po ustaleniu się stanu stacjonarnego próbka, przechodząc przez kolumnę, pozostaje w stanie quasi równowagi termodynamicznej. Zgodnie więc z tzw. **modelem Craiga** kolumnę chromatograficzną możemy podzielić na szereg elementów (celek). Zakładamy, że w każdym z nich ustala się równowaga termodynamiczna. Oznaczmy przez p i q prawdopodobieństwo przebywania cząsteczki próbki odpowiednio w fazie

ruchomej i stacjonarnej. Prawdopodobieństwa te mogą być również interpretowane jako frakcje próbki w obu fazach. Ich suma równa jest jedności:

$$p + q = 1. \quad (1.1)$$

Zgodnie z tym, jeśli wprowadzimy do pierwszej celki kolumny próbkę o stężeniu jednostkowym, wówczas podzieli się ona między dwie fazy tak, że jej stężenia będą wynosiły odpowiednio p i q . Możemy wówczas wykonać eksperyment myślowy i rozdzielić proces chromatograficzny na dwa niezależne etapy: ustalanie się równowagi w celce i ruch fazy ruchomej wzdłuż kolumny o jedną celkę. Ruch fazy przeniesie więc próbkę (o stężeniu p) z pierwszej celki do drugiej. Po ustaleniu się równowagi stężenie próbki w fazie stacjonarnej drugiej celki wyniesie pq . W fazie ruchomej zaś p^2 . W następnym kroku próbka o tym stężeniu przeniesiona zostanie do celki trzeciej. Proces ten można dalej kontynuować tak jak to zostało przedstawione na rys. 1.5. W ostatniej jego kolumnie została podana całkowita ilość próbki w kolumnie. Na podstawie ilości próbki w poszczególnych celkach łatwo zauważyć, że całkowita jej ilość w kolumnie wynosi $(q + p)^r$:

$$(p+q)^r = 1, \quad (1.2)$$

gdzie: r oznacza ilość kroków (odpowiadających objętości retencji)

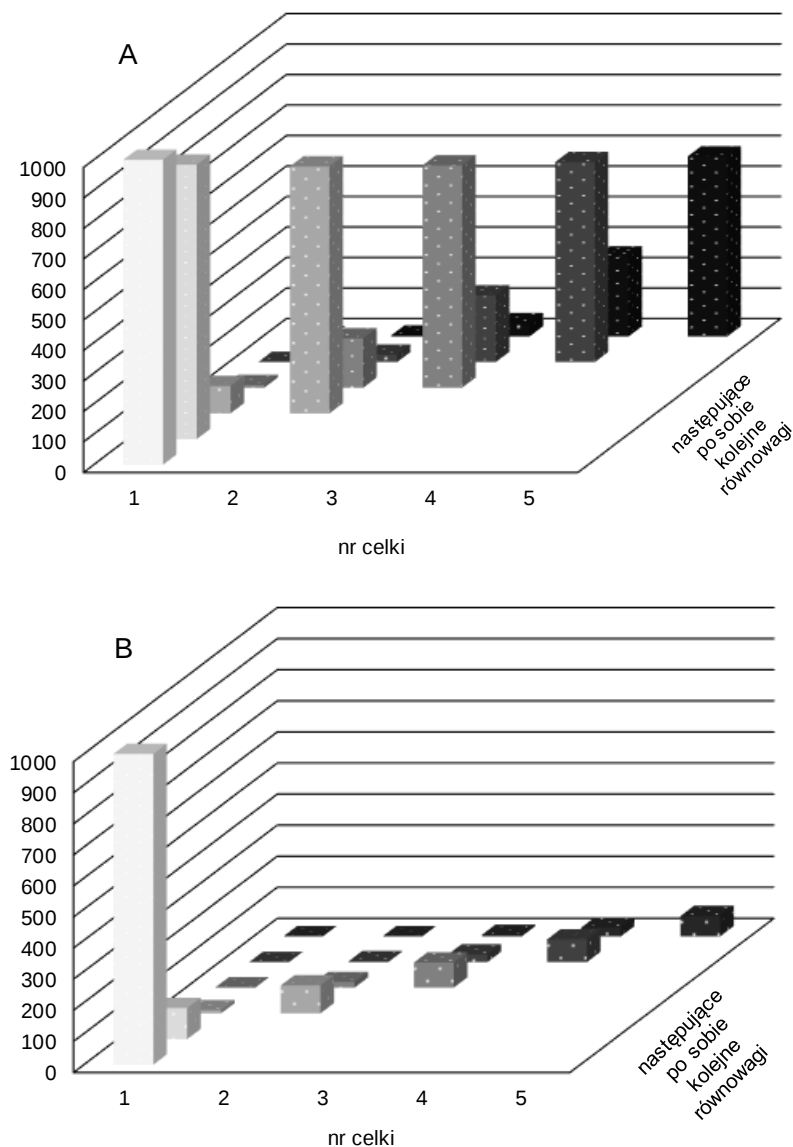
nr celki	0	1	2	3	4	5	ilość
r = 0	$c_i = 1$	1					1
		↓	↘				
r = 1		q	p				(q+p)
		↓	↘pq	↓pq	↘		
r = 2		q^2	2pq	p^2			$(q+p)^2$
		↓	↘ pq^2	↓ $2pq^2$	↘ $2pq^2$	↓ p^2q	↘
r = 3		q^3	$3pq^2$	$3p^2q$	p^3		$(q+p)^3$
		↓	↘ pq^3	↓ $3pq^3$	↘ $3p^2q^2$	↓ $3p^3q$	↘
r = 4		q^4	$4pq^3$	$6p^2q^2$	$4p^3q$	p^4	$(q+p)^4$

Rysunek 1.5. Schemat przebiegu procesu chromatograficznego [10]

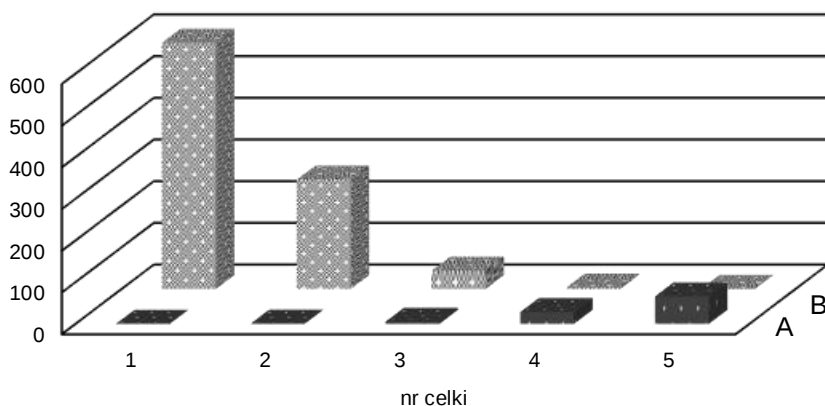
Łatwiej to będzie zrozumieć, jeżeli zamiast prawdopodobieństw rozważymy, jak będą się zmieniały stężenia próbki podczas jej przechodzenia przez kolumnę chromatograficzną. Rozkłady stężenia próbki (o początkowym, hipotetycznym, stężeniu 1000) po pierwszych pięciu krokach (przejściu pięciu celok) dla stałej podziału K (odpowiadającej stosunkowi p/q) 0,1 i 0,9 przedstawiono w tabeli 1. Lewa część tabeli odnosi się do stałej podziału K równej 0,1; prawa dla $K = 0,9$. Kolumny tabeli oznaczają poszczególne celki kolumny (zmienną przestrzenną procesu). Wiersze tabeli reprezentują zmienną czasową procesu chromatograficznego, ustalanie się równowag na poszczególnych celkach. W jasnych polach podano stężenia w częściach celok odpowiadających fazie ruchomej, w ciemnych polach podano stężenia w częściach celok odpowiadających fazie stacjonarnej. Sumaryczna ilość próbki na wszystkich celkach po każdym ustaleniu się równowagi musi wynosić 1000. Stężenia próbki w fazie ruchomej (wartości z jasnych pól tabeli 1) w poszczególnych celkach wzdłuż kolumny chromatograficznej i po ustaleniu się kolejnych równowag przedstawiono na rys. 1.6. Stężenia próbek w fazie ruchomej po ustaleniu się 6 równowag (symbolizuje to opuszczenie kolumny przez próbkę) na kolumnie chromatograficznej (wartości ostatnich wierszy jasnych pól z tabeli 1) dla dwóch próbek różniących się stałymi podziału przedstawiono na rys. 1.7. Oczywiście należy zdać sobie sprawę, że jest to model poglądowy, bardzo uproszczony. Zakłada on na przykład, że próbka zajmuje początkowo dokładnie jedną celkę, że objętości obu faz są sobie równe czy też, że próbka występuje tylko w jednej postaci. W rzeczywistości modele procesu retencji są dużo bardziej skomplikowane. Tym niemniej z tabeli 1 i rys. 1.6 i 1.7 wynika, że już po pięciu krokach następuje istotne rozdzielenie związków. Największe stężenie jednego z nich jest w pierwszej celce, drugiego w ostatniej. Ponadto można zaobserwować, że przechodząc przez kolumnę próbka rozmywa się, a jej stężenie maksymalne zmniejsza się. Chromatogramy uzyskane za pomocą modelowania metodą Craiga kwasów tłuszczowych rozdzielanych metodą chromatografii wykluczania jonowego oraz eksperymentalnie otrzymane chromatogramy pokazano na rys. 1.8 [11, 12]. Uzyskano wyjątkową, jak na warunki chromatograficzne, zgodność między eksperymentem a modelowaniem (eksperymentem komputerowym) opartym o teorię procesu retencji.

Tabela 1. Zmiany stężenia próbki o początkowym stężeniu równym 1000 hipotetycznych jednostek po przejściu pierwszych pięciu cielek kolumny (płytki) chromatograficznej
Opracowanie własne.

1000					1000				
900					100				
100					900				
0	900				0	100			
100	0				900	0			
90	810				90	10			
10	90				810	90			
0	90	810			0	90	10		
10	90	0			810	90	0		
9	162	729			81	18	1		
1	18	81			729	162	9		
0	9	162	729		0	81	18	1	
1	18	81	0		729	162	9	0	
0,9	24,3	218,7	656,1		72,9	24,3	2,7	0,1	
0,1	2,7	24,3	72,9		656,1	218,7	24,3	0,9	
0	0,9	24,3	218,7	656,1	0,0	72,9	24,3	2,7	0,1
0,1	2,7	24,3	72,9	0	656,1	218,7	24,3	0,9	0
0,09	3,24	43,74	262,44	590,49	65,61	28,16	4,86	0,36	0,01
0,01	0,36	4,86	28,16	65,61	590,49	262,44	43,74	3,24	0,09

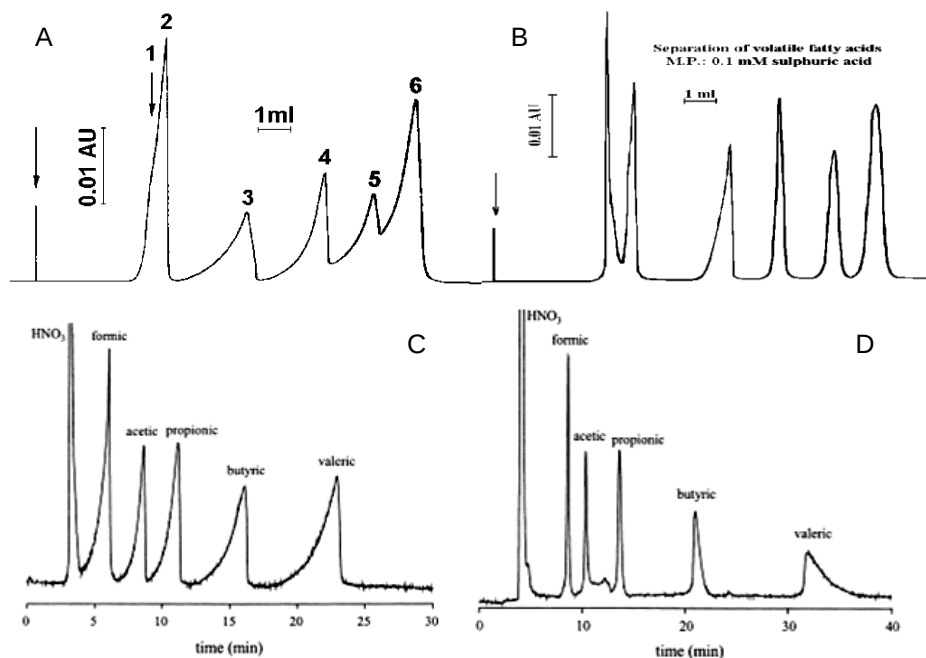


Rysunek 1.6. Stężenia próbki w fazie ruchomej w poszczególnych celkach wzdłuż kolumny chromatograficznej i po ustaleniu się kolejnych równowag dla próbki o $K = 0,1$ (A) i $K = 0,9$ (B)
Opracowanie własne.



Rysunek 1.7. Stężenia próbek w fazie ruchomej po 6 krokach dla dwóch próbek o $K = 0,1$ (A) i $K = 0,9$ (B)

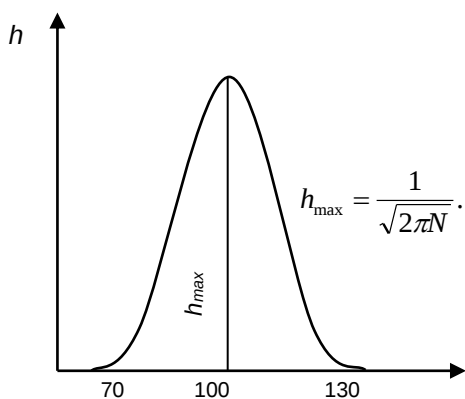
Opracowanie własne.



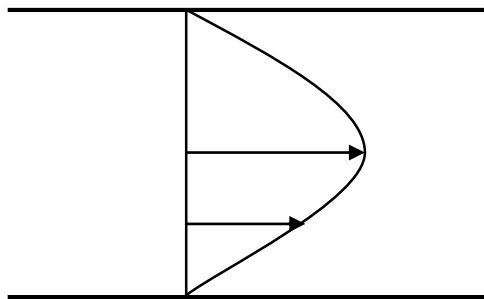
Rysunek 1.8. Chromatogramy uzyskane za pomocą modelowania metodą Craiga kwasów tłuszczowych rozdzielanych metodą chromatografii wykluczania jonowego. Faza ruchoma A – woda, B – 0,1 mM kwas siarkowy. Dla porównania na rysunkach C i D pokazano eksperymentalnie otrzymane chromatogramy [11, 12]

Ze schematu przedstawionego na rys. 1.5 otrzymać można rozkład stężenia próbki na kolumnie (równoważny rozkładowi w czasie próbki opuszczającej kolumnę i rejestrowanej przez detektor) przedstawiony na rys. 1.9. Z zasad kombinatoryki wynika, że prawdopodobieństwo, że cząsteczka po r krokach znajduje się w N celce wynosi:

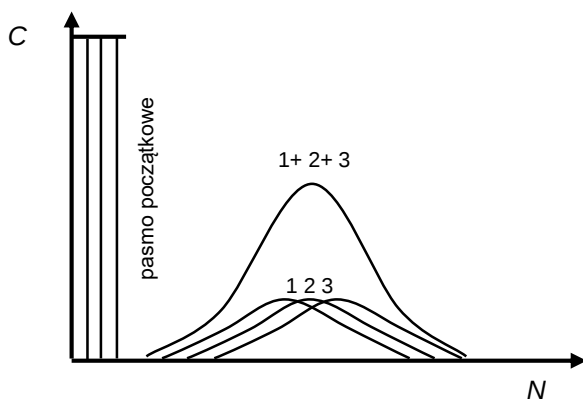
$$P_N^r = r!q^r - \frac{p^N}{N!(r-N)!}. \quad (1.3)$$



Rysunek 1.9. Krzywa rozmieszczenia próbki w kolumnie po „przemyciu” jej 100 krokami
Opracowanie własne.



Rysunek 1.10. Profil szybkości strumienia w rurze dla laminarnego przepływu lepkiego
Opracowanie własne.



Rysunek 1.11. Wypadkowa krzywa rozmycia próbki zajmującej początkowo trzy celki
Opracowanie własne.

Powyższy wzór wynika z faktu, że przy opisie procesu założono, iż próbka w sposób statystyczny może przebywać w fazie ruchomej lub stacjonarnej. W tym ujęciu p i q oznaczają więc wagi statystyczne. Wykres na rys. 1.9 przedstawia klasyczną krzywą dzwonową rozkładu statystycznego Gaussa. Na tej podstawie wiele osób intuicyjnie uważa, że w idealnych warunkach chromatograficznych powinno się otrzymać symetryczne piki. Ich asymetria zaś pojawia się w wyniku zniekształcenia tego procesu. Niestety nie jest to prawdą. Należy bowiem zauważyć, że na opisaną powyżej dyspersję próbki nakłada się przepływ cieczy. Przy przepływie laminarnym (rys. 1.10) ciecz w środku kanału lub kapilary porusza się szybciej niż przy ich brzegu. Oznacza to, że ogonowanie piku jest integralną częścią procesu chromatograficznego.

Rozmycie próbki w kolumnie (szerokość piku) określone jest przez wariancję σ^2 lub odchylenie standardowe σ .

$$\sigma^2 \equiv (x - \langle x \rangle)^2 = \langle x^2 \rangle - \langle x \rangle^2, \quad (1.4)$$

gdzie: x w warunkach chromatograficznych oznacza czas lub objętość retencji (odniesione są one do maksimum piku).

Wariancję w eksperymencie z rys. 1.5 opisuje równanie:

$$\sigma^2 = rpq. \quad (1.5)$$

Rozkład stężenia (ułamka próbki w N celce po r krokach) wzdłuż piku z rys. 1.9 opisuje:

$$c = \frac{1}{\sqrt{2\pi N}} e^{-\frac{p^2(r-N/p)^2}{2N}}. \quad (1.6)$$

Każda celka kolumny ma swoją objętość, więc zamiast krokami można się posługiwać objętością retencji (zatrzymania próbki na kolumnie). Zatem przesuwanie się ruchomych części celek symbolizuje przepływ fazy ruchomej. Stąd rozkład Gaussa przybiera postać:

$$c(V) = \frac{c_i V_i}{J} \cdot \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi N}} e^{-\frac{(V-V_R)^2}{2\sigma^2}}, \quad (1.7)$$

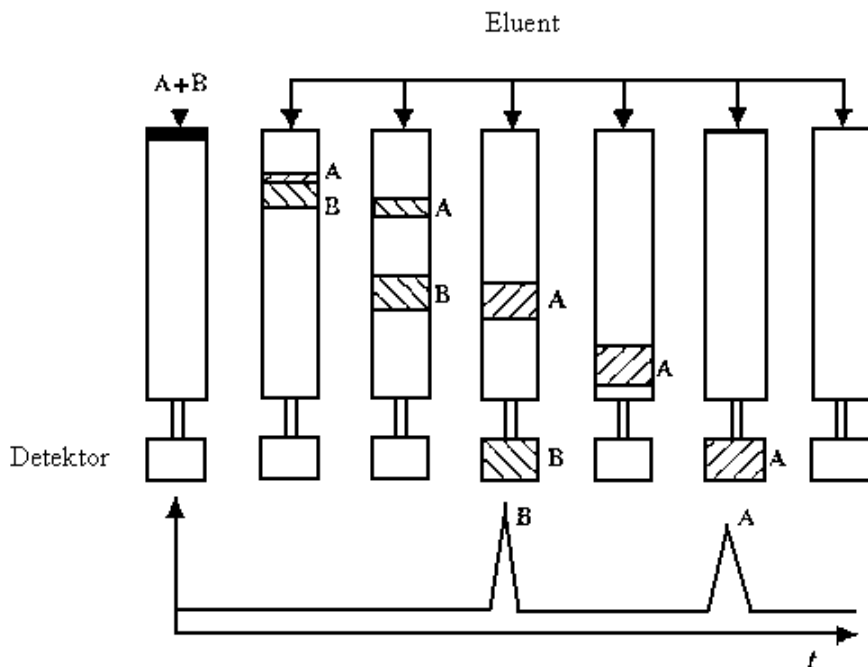
gdzie: c_i i V_i – stężenie i objętość próbki, J – objętościowa szybkość przepływu i V_R – objętość retencji.

Maksymalna wysokość piku w tym równaniu wynosi:

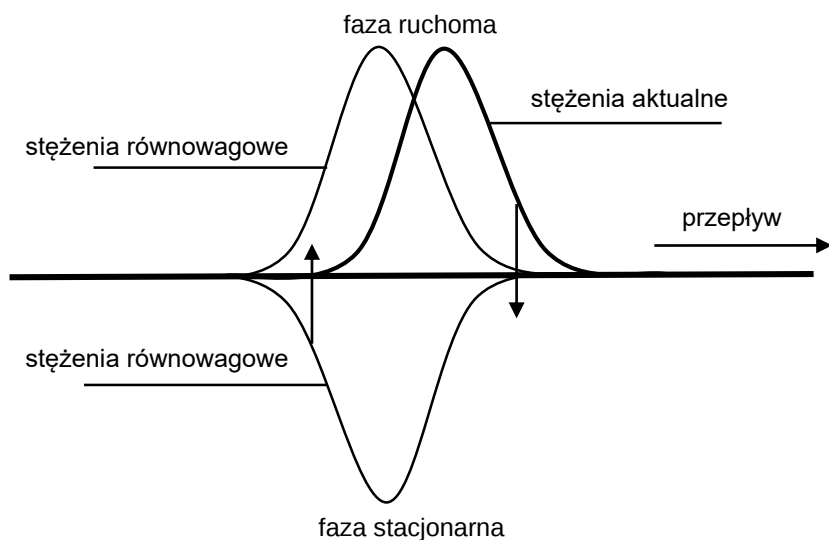
$$h_{\max} = \frac{1}{\sqrt{2\pi N}}. \quad (1.8)$$

W praktyce chromatograficznej wprowadzana próbka zajmuje więcej celek kolumny, tak jak to przedstawiono na rys. 1.11. Nie zmienia to jednak rozkładu próbek.

Różne związki chemiczne mają inne powinowactwo do obu faz. W naszym przypadku oznacza to odmienne wartości p i q . Spowodowane mogą być one różnymi, możliwymi do wyobrażenia, mechanizmami oddziaływania próbek z obu fazami: adsorpcją, podziałem, wymianą jonową, wykluczaniem sterycznym i jonowym itp. Dzięki temu uzyskuje się rozdzielanie związków o różnych wartościach stosunku p/q , tak jak to przedstawiono na rys. 1.12. Można z niego odczytać, że ze wzrostem długości kolumny zwiększa się rozdzielanie próbek oraz ich rozmycie (szerokość pasma), zmniejsza się natomiast ich stężenie. Istotne w tym jest to, że różnica objętości retencji jest wprost proporcjonalna do przebytej drogi przez próbkę. Poszerzenie pasma jest natomiast proporcjonalne do pierwiastka kwadratowego z tej drogi. To właśnie jest czynnikiem umożliwiającym podział substancji na kolumnie.



Rysunek 1.12. Rozdzielanie dwu substancji na kolumnie chromatograficznej w zależności od przebytej drogi [10]



Rysunek 1.13. Rozkład stężenia próbki w fazie ruchomej i stacjonarnej w stanie równowagi i przy przepływie cieczy
Opracowanie własne.

Omawiany rozkład analizowanej próbki występuje zarówno w fazie ruchomej jak i stacjonarnej (rys. 1.13). Wprawdzie stężenia próbki w obu fazach z reguły są różne (określone wartościami p i q), jednakże w stanie równowagi (brak przepływu) ich maksima się pokrywają. Przy przepływie fazy ruchomej następuje przesunięcie tej części próbki, która się w niej znajduje. Ze względu na to, że równowaga nie ustala się natychmiast maksima stężeń w obu fazach rozsuwają się. Powoduje to nadmiarowe stężenie próbki w fazie ruchomej na początku piku i nadmiarowe jej stężenie w fazie stacjonarnej na jego końcu. W wyniku tego na początku piku próbka przechodzi do fazy stacjonarnej, a na końcu ją opuszcza. Ten proces jest właśnie istotą procesu chromatograficznego. W skrócie można go nazwać stałą dążnością próbki do pozostawania w stanie równowagi termodynamicznej i ustawicznym jej zakłócaniem przez przepływ cieczy.

Literatura

- [1] M.S. Tswett, Warsaw Soc. Nat. Sci., Biol. Sect., 14, No. 6 (1903).
- [2] M.S. Tswett, Ber. Deut. Bot. Ges., 24, 234, 316, 384 (1906).
- [3] T.J. Williams, *An Introduction to Chromatography*, Blackie, London 1949.
- [4] J.S. Kowalczyk, red., *Opis serii prototypowych chromatografów cieczowych*, Politechnika Gdańska 1975.
- [5] B.K. Głód, red., *Wprowadzenie do wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, Wyd. IChF-PAN, Warszawa 1992.
- [6] B.K. Głód, A. Bylina, K. Leśniak, K. Pohorecki, *A Microcolumn Liquid Chromatograph*, Pol. Tech. Rev., 3 (1990) 2-4.
- [7] B.K. Głód, *An Electrokinetic Detector*, Pol. Tech. Rev., 4 (1990) 11-12.
- [8] B.K. Głód, K. Leśniak, M. Klekowski, G. Cichowska, K. Pohorecki, *Microcolumn Liquid Chromatographs*, Pol. Tech. Rev., 5 (1990) 9-10.
- [9] B.K. Głód, J. Klimkowski, A. Krupka, K. Leśniak, M. Klekowski, K. Pohorecki, *Mikrokolumnowy chromatograf cieczowy T-333*, *Pomiary, Automatyka, Kontrola*, 3 (1991) 58-60.
- [10] B.K. Głód, *Wybrane zagadnienia wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, Wyd. Candela s-ka z o.o., Warszawa 1996.

- [11] B.K. Głód, A.K. Piasecki, J. Stafiej, *Numerical Simulation of the Chromatographic Column Performance in Ion Exclusion Chromatography*, J. Chromatogr., 457 (1988) 43-53.
- [12] K.L. Ng, B.K. Głód, G.W. Dicoski, P.R. Haddad, *Retention modeling of electrostatic and adsorption effects of aliphatic and aromatic carboxylic acids in ion-exclusion chromatography. II. Calculations of adsorption coefficients in unbuffered eluents*, J. Chromatogr. A (13th International Ion Chromatography Symposium (IICS 2000), SEP 11-14, 2000 Nice, France), 920 (2001) 41-49.

2. PODZIAŁ TECHNIK CHROMATOGRAFICZNYCH

2.1. Ogólny podział chromatografii

Chromatografia jest jedną z technik rozdzielania. Zalicza się do nich (w kolejności alfabetycznej): adsorpcja, analiza sitowa, chromatografia, dekantacja, destylacja, ekstrakcja, elektroforeza, elutracja (sedymentacja płynów), filtracja (mikro-, ultra-, nano-), flokulacja (koloidów), flotacja, frakcjonowana destylacja, frakcjonowane wymrażanie, krystalizacja, nebulizacja, odparowanie, odwięzanie, odwrócona osmoza, osuszanie, rekrytalizacja, rozdzielanie magnetyczne, sedymentacja, strefowe rozdzielanie, sublimacja, suszenie, wirowanie (cyklo-nowe), wytrącanie, zatężanie. Do najważniejszych technik i metod rozdzielania, które znalazły zastosowania w analityce zalicza się przede wszystkim różne techniki i metody chromatografii, a także:

- rozdzielanie w polu sił – FFF (ang. *Field Flow Fractionation*),
- analizę wstrzykowo-przepływową – FIA (ang. *Flow Injection Analysis*),
- analizę w ciągłym przepływie – CFA (ang. *Continuous Flow Analysis*),
- hydrochromatografię,
- spektrometrię mas (MS),
- spektrometrię ruchliwości jonów (TOF),
- chromatografię w przeciwpądzie (CCC),
- elektrochromatografię (El-Chr),
- elektroforeza żelowa (GE) i kapilarna (CE),
- izotachoforeza (ITF),
- elektroogniskowanie (EI-F),
- chromatografię elektrokinetyczną (Ec-Chr).

Do technik rozdzielania zalicza się również niektóre metody elektrochemiczne, w których reakcja elektrodowa przebiega przy niezerowym prądzie Faradaya, czyli z przyłożonym do elektrod napięciem z zewnętrznego źródła prądu:

- kulometria, elektrograwimetria – elektroliza w całej masie roztworu,
- polarografia stałoprądowa, zmiennoprądowa, pulsowa, różnicowa,

- woltamperometria, woltamperometria cykliczna, z zatężaniem,
- amperometria,
- elektrodyka z niestacjonarnym procesem elektrodowym (chronoamperometria, chronopotencjometria, polarografia, woltametria),
- ze stacjonarnym procesem elektrodowym (woltametria w warunkach kontrolowanej konwekcji, miareczkowanie amperometryczne z dwiema elektrodami wskaźnikowymi, potencjometria z elektrodą polaryzowaną prądem stałym).

Jedną z technik rozdzielania jest również spektrometria mas. Generalnie można ją podzielić na cztery etapy: (1) generowanie cząsteczek w fazie gazowej z próbki (ciecz, roztwór, ciało stałe, itd.), (2) jonizacja tych cząsteczek, (3) rozdzielanie jonów na podstawie ich masy, (4) detekcja strumienia jonów.

Techniki rozdzielania znajdują szerokie zastosowanie nie tylko w analizie, ale także mają ogromne znaczenie dla przygotowania próbki do analizy, w tym jako techniki izolacji analitów i grup analitów z próbek stałych w postaci zawiesiny albo z dwufazowego układu niemieszających się płynów, do których można zaliczyć:

- ekstrakcję za pomocą strumienia gazu,
- ekstrakcję za pomocą cieczy,
- ekstrakcję za pomocą płynu w stanie nadkrytycznym (SFE),
- techniki destylacji zawiesiny,
- ekstrakcję za pomocą rozpuszczalnika w aparacie Soxhleta,
- ekstrakcję za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą ultradźwiękami (UAE),
- przyspieszoną ekstrakcję za pomocą rozpuszczalnika (ASE),
- ekstrakcję za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym (MAE),
- ekstrakcję do wiszącej kropli (HDE),
- ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem (MSPD).

Wszystkie techniki chromatograficzne można najogólniej podzielić ze względu na:

1. Stosowaną fazę ruchomą:

- chromatografia gazową,
- chromatografia cieczową,
- chromatografia płynową (w stanie nadkrytycznym).

Stosowana faza ruchoma determinuje najbardziej ogólny podział chromatografii. Spowodowane jest to tym, że stan skupienia fazy ruchomej w znaczący sposób wpływa na mechanizm procesu (np. poprzez zmianę udziału dyfuzji molekularnej) oraz powoduje konieczność stosowania całkowicie odmiennej aparatury.

2. Skalę procesu:

- chromatografia analityczna,
- chromatografia preparatywna,
- chromatografia przemysłowa.

3. Technikę wprowadzania analizowanej próbki:

- **Analiza czołowa**. W tej technice próbkę dodaje się do fazy ruchomej stosowanej następnie do rozwijania chromatogramu. W wyniku tego sygnały poszczególnych składników próbki dodają się do siebie i otrzymujemy chromatogram w postaci charakterystycznej wznoszącej się krzywej schodkowej.
- **Analiza elucyjna**. Próbka o małej objętości wprowadzana jest do kolumny i przemywana fazą ruchomą. Obecnie jest to najczęściej stosowana technika wprowadzania próbki.
- **Rugowanie próbki**. W technice tej skład fazy ruchomej przed i za próbką jest różny. Faza ruchoma za próbką zawiera składnik mający duże powinowactwo do fazy stacjonarnej i przyspieszający przez to wymywanie próbki.

4. Techniki pokrewne:

- **FFF** (ang. *Field Flow Fractionation*). Technika ta polega na analizowaniu próbki płynącej przez cienką rurkę przy przyłożonym z zewnątrz polu elektrycznym, magnetycznym lub grawitacyjnym (realizowanym przez szybki obrót rurki). Lepkościowy przepływ laminarny cieczy charakteryzuje się tym, że środek cieczy porusza się szybciej niż jej brzegi (patrz rys. 1.10). Składniki próbki, które pod wpływem pola zbliżyły się do ścianki rurki płyną przez nią wolniej, co umożliwia ich rozdzielanie.

- **FIA** (ang. *Flow Injection Analysis*). Jest to zespół technik, w których analizuje się próbki w przepływie. W celu analizy poszczególnych składników próbki wykorzystuje się w nich wysoce selektywne detektory. Dodatkowo w trakcie analizy można zmienić skład próbki lub szybkość poruszania się jej składników. W tym ujęciu chromatografia jest szczególnym ich przypadkiem.
- **CFA** (ang. *Continuous Flow Analysis*). Są to techniki podobne do FIA z tą różnicą, że poszczególne próbki i ciecz płuczająca rozdzielone są pęcherzykami gazu.
- **Hydrochromatografia**. W technice tej kolumną jest cienka, długa kapilara. Wielkocząsteczkowe składniki próbki (np. białka lub polimery) częściowo znajdują się w strefie przyściankowej i dlatego poruszają się wolniej. Umożliwia to ich rozdzielanie.
- **Spektrometria ruchliwości jonów** (chromatografia plazmowa). Jest to technika podobna nieco do spektrometrii masowej. Różnica polega na tym, że mierzy się w niej czas dojścia jonów w polu elektrycznym do detektora.
- **SPE** (ang. *Solid Phase Extraction*) **ekstrakcja na ciele stałym**. Po wprowadzeniu próbki na kolumnkę wypełnioną złożem przemywa się ją porcjami cieczy o różnej mocy elucyjnej. W ten sposób można ją oczyścić od matrycy i wstępnie zatężyć.
- **SFE** (ang. *Supercritical Fluid Extraction*) **ekstrakcja płynowa** (w stanie nadkrytycznym). Ekstrakcja, w której jako fazę ruchomą stosuje się płyn zamiast cieczy.
- **Chromatografia w przeciwpądzie**. Podział składników próbki między dwoma cieczami płynącymi w przeciwnym kierunku.
- **Elektrochromatografia**. Chromatografia, w której przepływ cieczy wymuszany jest zewnętrznym polem elektrycznym (elektroforeza).
- **Elektroforeza**. Rozdzielanie jonów w polu elektrycznym.
- **Izotachoforeza**. Rozdzielanie jonów w polu elektrycznym, gdy faza ruchoma przed próbką zawiera jony o większej ruchliwości, a faza ruchoma za próbką zawiera jony o mniejszej ruchliwości niż jony próbki.
- **Elektroogniskowanie**. Rozdzielanie związków dwujonowych w gradiencie pH pod wpływem pola elektrycznego. Przestają się one poruszać po osiągnięciu punktu izoelektrycznego. Wówczas złożę poddawane jest analizie.

- **Chromatografia elektrokinetyczna.** Faza ruchoma zawiera duże cząsteczki obdarzone ładunkiem (micelle lub związki inkluzyjne). Faza ruchoma przemieszcza się w kapilarze dzięki elektroosmozie. Duże, naładowane cząsteczki obdarzone są własną ruchliwością elektroforetyczną. Ich wypadkowa szybkość poruszania równa jest sumie (z odpowiednim znakiem) elektroosmozy i elektroforezy. Szybkość poruszania się analizowanych związków zależy od ich powinowactwa do micelli lub wartości ich stałej inkluzji. Technika tą można analizować również związki niezjonizowane.
- **Bloty.** Elektroforetyczne metody oznaczania DNA, RNA i białek.
- **Elektroforeza kapilarna.** Wyróżnić można następujące jej techniki:
 - kapilarna elektroforeza strefowa (CZE),
 - micelarna chromatografia elektrokinetyczna (MEKC),
 - elektrochromatografia kapilarna (CEC).

2.2. Podział chromatografii cieczowej

1. Ze względu na postać fazy stacjonarnej:

- kolumnowa,
- planarna: bibułowa (w tym krążkowa) i cienkowarstwowa (w tym dwuwymiarowa i nadciśnieniowa).

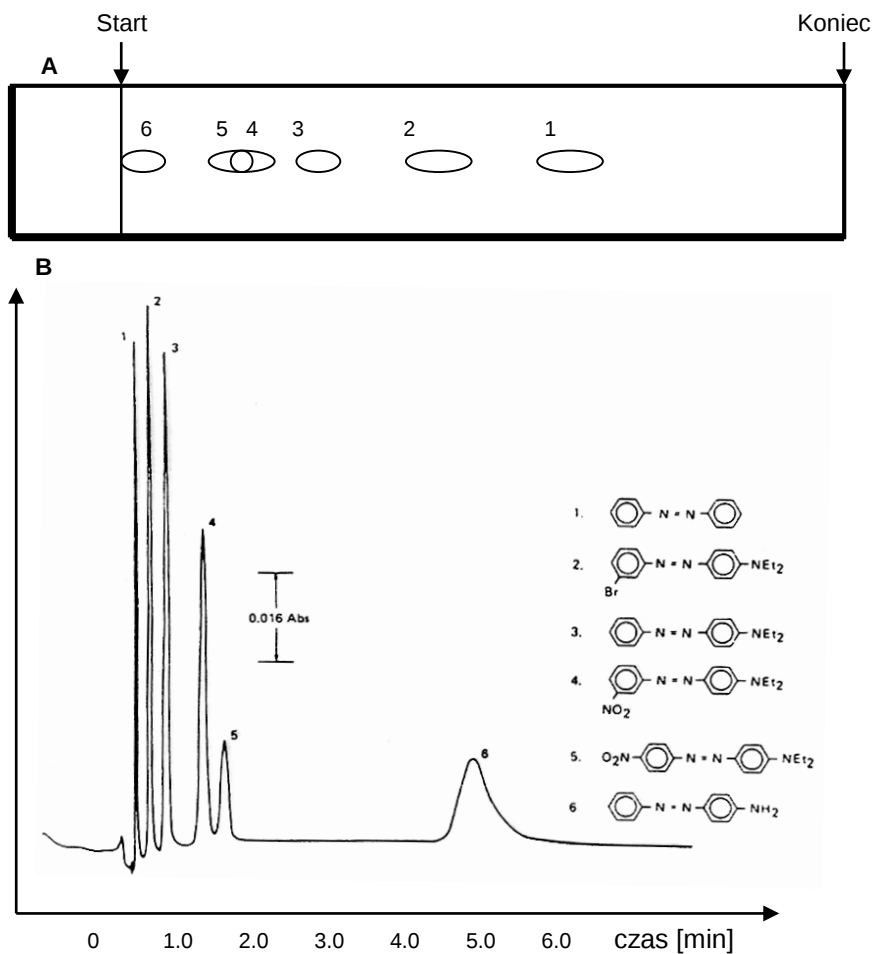
Porównanie chromatogramów uzyskanych oboma technikami przedstawiono na rys. 2.1.

2. Sposób analizowania próbki:

- ługowanie części złoża (patrz fot. 1.6),
- zbieranie eluatu (fazy ruchomej opuszczającej kolumnę) do oddzielnych pojemników i poddawanie ich osobnej analizie chemicznej,
- detekcja ciągła (detektor przyłączony jest bezpośrednio do końca kolumny).

3. Stosunek polarności fazy ruchomej do stacjonarnej:

- układ faz normalnych (prostych) – faza stacjonarna, tak jak w eksperymencie Cwieta, jest bardziej polarna niż ruchoma,
- układ faz odwróconych – bardziej polarną jest faza ruchoma.



Rysunek 2.1. Porównanie chromatogramów uzyskanych metodą chromatografii cienkowarstwowej (A) i kolumnowej (B) [1]. Kolumna: Micro-Pak SI-10, 2,1 x 15 cm, faza ruchoma: 10% chlorek metylenu w heksanie, szybkość przepływu: 132 mL/h [2]

4. Mechanizm retencji, podział na chromatografię:

- adsorpcyjną (w tym hydrofobową – wypychanie próbki przez fazę ruchomą),
- podziałową,
- jonowymienną (jonitową),
- wykluczania sterycznego (filtracyjną, sitową, ekskluzyjną, permeacyjną, żelową),
- jonowo-wykluczającą,

- jonowo-asocjacyjną (par jonowych),
- z zastosowaniem związków kompleksowych, chelatowych lub inkluzyjnych,
- powinowactwa (oddziaływanie próbki z enzymami, inhibitorami, hormonami, polinukleotydami, steroidami, związkami organortęciowymi),
- micelarna,
- immunochromatografia (oddziaływania próbki z antygenami, przeciwciałami),
- elektrochromatografia,
- wymiany ligandu (sorpcja na związanych metalach),
- ekstrakcyjna (podziałowa faz odwróconych),
- solubilizacyjna.

2.3. Kolumnowa chromatografia cieczowa

1. Stosowane ciśnienie:

- niskociśnieniowa (z grawitacyjnym przepływem cieczy, próbka zbierana jest w niej na ogół w postaci oddzielnych frakcji),
- średnociśnieniowa,
- wysokociśnieniowa (wysokosprawna).

2. Parametr kontrolujący przepływ fazy ruchomej:

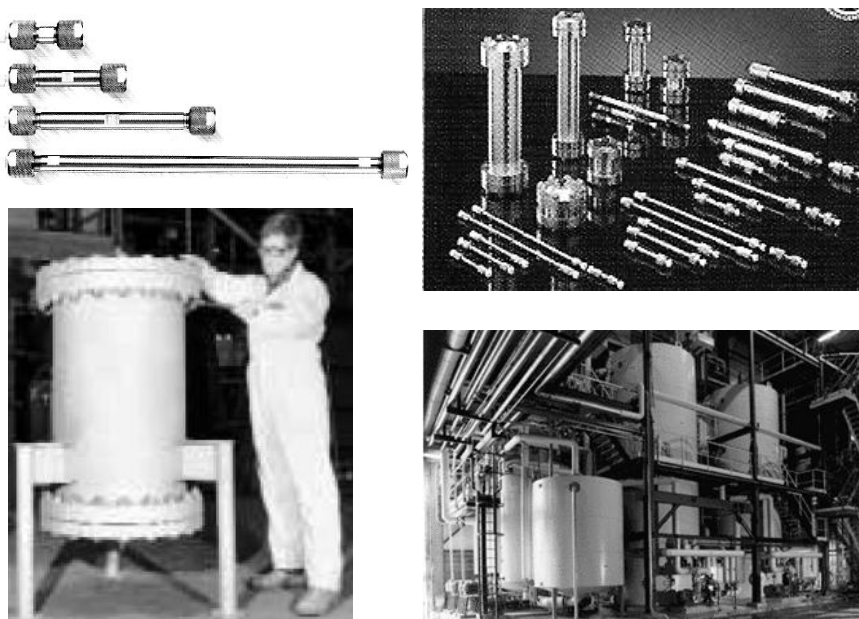
- ciśnienie,
- szybkość przepływu.

3. Stan skupienia fazy stacjonarnej, chromatografia w układzie:

- ciecz – ciało stałe,
- ciecz – ciecz,
- ciecz – żel.

4. Średnica kolumn:

- kapilarna (otwartokolumnowa i pakowana, średnica wewnętrzna $d_c \leq 500 \mu\text{m}$),
- mikrokolumnowa ($d_c = 0.5 \div 1 \text{ mm}$),
- minikolumnowa ($d_c = 1 \div 4 \text{ mm}$),
- klasyczna ($d_c = 4 \div 6 \text{ mm}$),
- semipreparatywna (o średnicy wewnętrznej od kilku do kilkunastu milimetrów),
- preparatywna (o średnicy od kilku do kilkudziesięciu centymetrów),
- przemysłowa (o średnicy powyżej metra).



Rysunek 2.2. Przykłady kolumn chromatograficznych [3]

Ponadto wymienić można jeszcze jedną odrębną technikę – *chromatografię jonową*. Jest to nazwa nieco już historyczna i oznacza ona chromatograficzną analizę jonów. Początkowo zarezerwowana ona była do układów składających się z kolumny jonowo-wymiennej, kolumny tłumiącej bufor (ang. *stripper* lub *suppressor column*) i detektora konduktometrycznego. W trakcie jej rozwoju całkowicie stopiła się z wysokosprawną chromatografią cieczową.

Czasami wyróżnia się jeszcze tzw. szybką chromatografię cieczową lub UPLC. Odnosi się ona do analiz wykonywanych na krótkich (kilkucentymetrowych) kolumnach wypełnionych złożem o średnicach cząsteczek nie większych niż 3 μm . Czas analizy jest wówczas zwykle mniejszy od 1 minuty.

W trakcie przebiegu chromatogramu wszystkie parametry przepływu fazy ruchomej mogą być stałe. Mówimy wówczas o chromatografii izokratycznej. W trakcie analizy skład fazy ruchomej, jej szybkość przepływu i temperatura mogą być zmieniane. Mówimy wówczas odpowiednio o gradiencie elucji, przepływu lub temperatury [4].

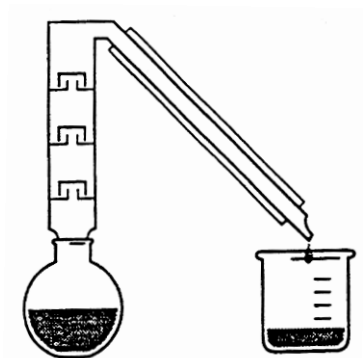
Literatura

- [1] E.L. Johnson, R. Stevenson, *Basic Liquid Chromatography*, Varian-Hansenway, Palo Alto 1978.
- [2] B.K. Głód, *Wybrane zagadnienia wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, Wyd. Candela s-ka z o.o., Warszawa 1996.
- [3] Materiały reklamowe firmy Knauer.
- [4] *Wprowadzenie do wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, B.K. Głód, red., Wyd. IChF-PAN, Warszawa 1992.

3. MECHANIZM PROCESU

3.1. Teoria półki chromatograficznej

Teoria półki chromatograficznej została „zapożyczona” do chromatografii przez Martina i Syngego w 1941 roku z destylacji. Jak wiadomo w celu rozdzielania ropy naftowej na składniki przeprowadza się jej frakcjonowaną destylację. Kolumna do jej destylacji składa się z szeregu *półek* skonstruowanych tak, że para może przez nie przechodzić w górę kolumny, a ciecz spływać na dół. Na każdej takiej półce ustala się stan równowagi między cieczą, a parą lub gazem. Schemat laboratoryjny takiego zestawu przedstawiono na rys. 3.1.



Rysunek 3.1. Laboratoryjny zestaw do destylacji frakcjonowanej [1]

Okazało się, że na zestawie tym można dokonywać frakcjonowanej destylacji również, gdy kolumna nie zawiera żadnych półek. Sprawność rozdzielania można znacznie zwiększyć po upakowaniu kolumny złożem o dużej powierzchni właściwej. W przypadku gdy rozdzielanie uzyskane na takiej kolumnie jest identyczne do rozdzielania uzyskanego na kolumnie z rzeczywistymi półkami, wówczas mówimy o niej, że posiada ona równoważną ilość *półek teoretycznych*.

Zgodnie z regułą Konowałowa półka teoretyczna jest minimalną objętością kolumny, w której ustala się równowaga między parą a cieczą.

Koncepcję półki teoretycznej zastosowano do opisu procesu chromatograficznego. W modelu tym **wysokość równoważna półce teoretycznej** (z ang. **HETP** – *height equivalent to theoretical plate*) oznacza długość kolumny, z której wypływający roztwór jest w równowadze ze średnim stężeniem w fazie stacjonarnej. Należy w tym miejscu zaznaczyć pewną umowność tej teorii. Nie należy bowiem sobie wyobrażać, że kolumna chromatograficzna istotnie składa się z małych elementów. Proces chromatograficzny jest z istoty swej związany z przepływem. Dlatego jest to proces nierównowagowy i nieodwracalny. Dalszy stopień abstrakcyjności pojawia się, gdy stosuje się ten model do elektroforezy kapilarnej. W tej technice z reguły nie mamy do czynienia z przejściami międzyfazowymi. W tym przypadku HETP oznaczać może jedynie bezwymiarowy parametr określający wielkość dyfuzyjnego rozmycia próbki. Porównywanie więc sprawności układów chromatograficznych i elektroforetycznych nie ma więc najmniejszego sensu.

Idea półki chromatograficznej w zasadzie opisana już została przy okazji omawiania mnemotechnicznego opisu procesu chromatograficznego. HETP można w przybliżeniu utożsamić z celką z rys. 1.5. Teoria półki wyprowadzana została przy następujących założeniach:

- podział próbki między fazy jest natychmiastowy, w praktyce oznacza to, że powinien on być dużo szybszy od przepływu tak, aby móc pominąć wpływ efektów kinetycznych,
- pomija się dyfuzję na półce i między półkami,
- zmiany stężenia próbki wzdłuż kolumny następują skokowo,
- zakłada się liniową izotermę podziału,
- brak wpływu innych składników próbki na współczynnik podziału,
- pomija się efekty temperaturowe procesu,
- w teorii nie uwzględnia się wpływu wielkości cząsteczek złoża na proces.

Jak widać na rys. 1.5 rozkład próbki na kolumnie opisuje dwumian Newtona. Dla dużego N (ilości pól teoretycznych), po zastosowaniu przybliżenia Stirlinga otrzymuje się rozkład Gaussa. Stąd:

$$N = 2\pi h^2 t_R^2 / S, \quad (3.1)$$

gdzie: h i S oznaczają odpowiednio wysokość i pole powierzchni pików.

Odchylenie standardowe (rozmycie próbki) wynosi wówczas:

$$\sigma = (HL)^{1/2}, \quad (3.2)$$

gdzie: L – długość kolumny, H – wysokość równoważna półce teoretycznej:

$$L = HN. \quad (3.3)$$

3.2. Równanie bilansu masy

Rozdzielanie chromatograficzne jest procesem bardzo złożonym. Model teoretyczny rozdzielania musi uwzględniać dużą grupę procesów w materiale porowatym, fazie ruchomej i stacjonarnej. Zalicza się do nich procesy termodynamiczne odpowiadające za selektywność układu oraz tzw. kinetyczne uwzględniające konwekcję, dyfuzję i kinetykę oddziaływań. Dokładny ich opis można uzyskać po rozwiązaniu układu równań opisujących prawo zachowania masy systemu. Dla układów przepływowych bilans masy można zapisać w postaci:

$$\frac{\partial \rho_i}{\partial t} = -\text{div} \rho_i u + r_i, \quad (3.4)$$

gdzie: ρ_i oznacza gęstość, u – liniową szybkość przepływu, a r_i ilość substancji tworzącej się lub powstającej w jednostce czasu.

W przypadku roztworów gęstość cieczy można zastąpić stężeniem składnika próbki:

$$r_i = M_i c_i, \quad (3.5)$$

gdzie: M_i – masa cząsteczkowa.

Wówczas:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -\text{div}_i u + \sum_{i,j} M_i \nu_{i,j} R_j, \quad (3.6)$$

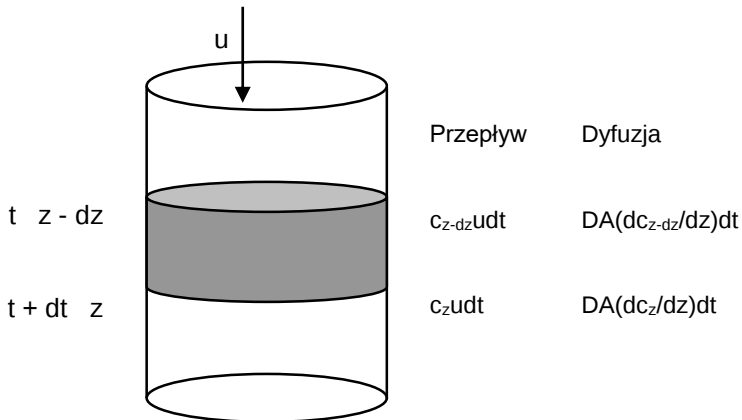
gdzie: ν – współczynnik stechiometryczny.

Równanie to jest w ogólności nierozwiązywalne. Analitycznie można je rozwiązać jedynie dla bardzo uproszczonych przypadków jednoskładnikowej próbki. Nieco bardziej skomplikowane układy można rozwiązywać metodami numerycznymi, modelującymi cykliczne przechodzenie próbki z fazy ruchomej do stacjonarnej i na odwrót.

Zakładając stałą i w przestrzeni liniową szybkość przepływu cieczy De Vault w 1943 roku przekształcił powyższe równanie do warunków chromatograficznych [2, 3]. Przepływ substancji następuje tylko wtedy, gdy znajdują się one w fazie ruchomej. Rozłożyć go można na trzy podstawowe składowe:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \left(\frac{\partial c}{\partial t} \right)_{\text{konwekcja}} + \left(\frac{\partial c}{\partial t} \right)_{\text{dyspersja/dyfuzja}} + \left(\frac{\partial c}{\partial t} \right)_{\text{przenoszenie_masy}}. \quad (3.7)$$

Dla układów przepływowych równania 3.6 i 3.7 oznaczają, że masa substancji wpływająca do małego plastra cieczy równa jest masie substancji wypływającej (rys. 3.2).



Rysunek 3.2. Prawo zachowania masy w układach przepływowych [3]

W przypadku konwekcji zmiana masy wzdłuż kolumny wynosi:

$$\Delta m_{konw.} = dzA(c_{t+dt} - c_t)_{konw.}, \quad (3.8)$$

gdzie: A – pole przekroju kolumny.

Dystans dz ciecz pokonuje w czasie dt . Masa substancji w tym obszarze równa jest różnicy stężenia w punktach z i $z-dz$ pomnożonym przez dystans wyrażony w czasie:

$$\Delta m_{konw.} = Jdt(c_{z-dz} - c_z)_{konw.}, \quad (3.9)$$

gdzie: J – objętościowa szybkość przepływu.

Z porównania równań 3.8 i 3.9 wynika:

$$dzA(c_{t+dt} - c_t) = Jdt(c_{z-dz} - c_z). \quad (3.10)$$

Stężenie substancji w punkcie $z-dz$ otrzymuje się rozwijając funkcję $c(z)$ w szereg Taylora. Z dwóch pierwszych wyrazów szeregu otrzymuje się:

$$c_{z-dz} = c_z - (\partial c / \partial z)_z dz. \quad (3.11)$$

Analogicznie otrzymać można:

$$c_{t+dt} = c_t + (\partial c / \partial t)_t dt. \quad (3.12)$$

Po wprowadzeniu równań 3.11 i 3.12 do 3.10 i przekształceniu otrzymujemy:

$$(\partial c / \partial t)_{konw.} = -J/A \cdot (\partial c / \partial z) = -u(\partial c / \partial z). \quad (3.13)$$

Udział dyfuzyjny przepływu próbki przez kolumnę opisuje pierwsze prawo Ficka:

$$dm = -DA(\partial c / \partial z)dt, \quad (3.14)$$

gdzie: D – współczynnik dyfuzji molekularnej.

Przeprowadzając rozumowanie analogiczne jak w przypadku konwekcji (rys. 3.2), otrzymuje się:

$$Adz(c_{t+dt} - c_t) = -DA \left(\frac{\partial c_{z-dz}}{\partial z} - \frac{\partial c_z}{\partial z} \right) dt. \quad (3.15)$$

Ponownie korzystając z rozkładu Taylora (równania 3.11 i 3.12), uzyskuje się drugie prawo dyfuzji Ficka:

$$(\partial c / \partial t)_{dyf.} = D \cdot (\partial^2 c / \partial z^2). \quad (3.16)$$

Dokładny opis przenoszenia masy jest o wiele bardziej skomplikowany. W ogólności stwierdzić można, że ilość substancji opuszczającej jedną fazę musi być równa jej ilości pojawiającej się w drugiej z faz:

$$(\partial c / \partial t)_{przen. \text{ masy}} = -1/\Phi \cdot (\partial s / \partial t), \quad (3.17)$$

gdzie: s – stężenie analizowanej substancji w fazie stacjonarnej, a Φ – stosunek objętości faz.

Podstawiając równania 3.13, 3.16 i 3.17 do równania 3.7 otrzymuje się:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -u \frac{\partial c}{\partial z} + D \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} + \frac{1}{\Phi} \frac{\partial s}{\partial t}. \quad (3.18)$$

Powyższe równanie można rozwiązać numerycznie metodą ciągłych zmiennych [3]. Zakłada się w niej (podobnie jak w przypadku rys. 1.5) natychmiastową równowagę na nieskończenie wąskim przekroju kolumny. W pewnym sensie przypomina ona nieco teorię półki. Podział kolumny ma w tym przypadku charakter czysto matematyczny i celką nie przypisuje się żadnych specjalnych własności fizykochemicznych. W samym procesie modelowania zamiast metody Craiga (rys. 1.5) stosuje się schemat Laxa spełniający warunek von Neumana:

$$\left| u \frac{\Delta t}{\Delta z} \right| \leq 1. \quad (3.19)$$

Modelowanie to pozwala przewidzieć retencję próbki oraz jej izotermę podziału lub adsorpcji.

Rozkład analizowanej substancji następuje względem współrzędnej przestrzennej (wzdłuż długości kolumny) i czasowej (równoważnej objętości przepływającej cieczy):

$$\left(\frac{\partial c}{\partial z}\right)_v + \left(\frac{\partial s}{\partial v}\right)_z = 0. \quad (3.20)$$

Do równania tego De Vault [2] wprowadził poprawkę na objętość (na jednostkę kolumny) cieczy między ziarnami, α :

$$\left(\frac{\partial c}{\partial z}\right)_v - \alpha \left(\frac{\partial c}{\partial v}\right)_z + \left(\frac{\partial s}{\partial v}\right)_z = 0. \quad (3.21)$$

W powyższym równaniu pominięta została dyfuzja i kinetyka. Można je rozszerzyć o izotermę adsorpcji lub podziału:

$$s = M(\partial s / \partial c), \quad (3.22)$$

gdzie: M – ilość adsorbentu na jednostkę długości kolumny.

Wówczas równanie 3.21 przyjmuje postać:

$$\left(\frac{\partial c}{\partial z}\right)_v + \left[\alpha + M \frac{\partial s}{\partial v}\right] \left(\frac{\partial s}{\partial v}\right)_z = 0. \quad (3.23)$$

Rozwiązaniem tego równania jest funkcja w postaci:

$$c(z, v) = \phi\{v - z[a + M(\partial s / \partial c)]\}, \quad (3.24)$$

gdzie: ϕ – funkcja zależna od warunków początkowych i końcowych.

W celu opisu rozkładu i propagacji kilku substancji przez kolumnę należy rozwiązać układ równań różniczkowych [3]. Jest bardzo trudne z matematycznego punktu widzenia, tym bardziej, że należałoby wówczas uwzględnić wzajemne oddziaływania składników próbki i ich konkurencyjną adsorpcję (w przypadku zajmowania tych samych centrów aktywnych).

3.3. Opis empiryczny

W 1940 roku Wilson zaobserwował poszerzanie się pasm chromatograficznych zarówno dla małych, jak i dużych szybkości przepływu fazy ruchomej. Przy dużym przepływie spowodowane to jest nienadążaniem sorpcji/desorpcji za przepływem. Przy małym mamy do czynienia z poszerzeniem (rozmyciem) dyfuzyjnym. W tym ostatnim przypadku im próbka dłużej przebywa na kolumnie tym większa jest jej dyfuzja. W 1956 roku van Deemter zaproponował równanie:

$$H = A + B/u + Cu, \quad (3.25)$$

wyrażające zależność wysokości równoważnej półki teoretycznej (HETP): H , od liniowej szybkości przepływu fazy ruchomej: u .

H jest w tym równaniu miarą rozmycia piku, im jest ono większe tym obserwowany pik jest szerszy. W tym miejscu należy ponownie podkreślić całą umowność pojęcia półki chromatograficznej. Wykorzystywane ono jest w tym przypadku niezgodnie z założeniami przyjętymi przy jego wyprowadzaniu. Przykładowo wymienić tu można w szczególności założenie o braku dyfuzji na poszczególnych półkach i między nimi. Oryginalnie równanie van Deemtera zostało zaproponowane do chromatografii gazowej. Bardzo często jest ono również wykorzystywane w chromatografii cieczowej. Mimo to zaproponowane również zostały analogiczne równania dedykowane specjalnie dla chromatografii cieczowej [4]:

$$H = C_s u + C_m u + (1/A + 1/C_m u)^{-1}, \quad (3.26)$$

gdzie: C_s i C_m oznaczają stałe eksperymentalne odnoszące się do przenoszenia masy odpowiednio w fazie stacjonarnej i ruchomej.

Dla dużych cząsteczek wypełnienia Snyder zaproponował równanie uproszczone:

$$H = Bu^{x(=0,2\div1)}. \quad (3.27)$$

Dosyć często stosowane jest równanie zaproponowane przez Knoxa i Gouichona:

$$h = a v^{1/3} + b/v + c v, \quad (3.28)$$

gdzie: h i v są tzw. parametrami zredukowanymi, zdefiniowanymi następująco:

$$h = H/d_p, \quad (3.29)$$

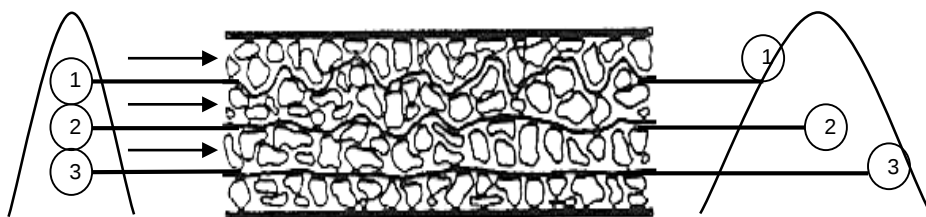
$$v = u d_p / D, \quad (3.30)$$

gdzie: d_p – średnica cząsteczek złoża, D – współczynnik dyfuzji molekularnej.

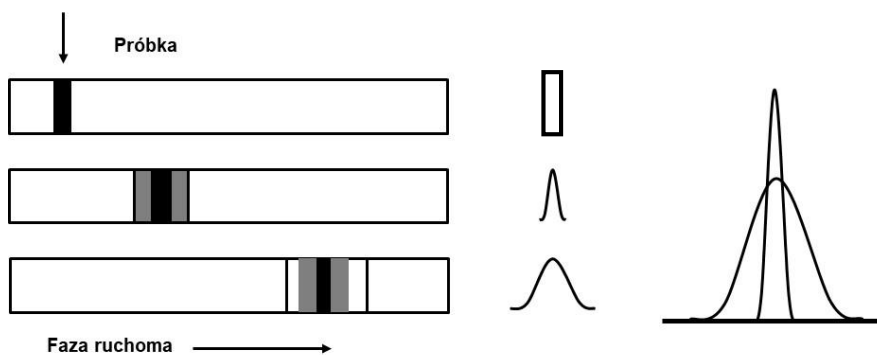
Zaletą tego równania jest możliwość porównywania kolumn o różnych średnicach cząsteczek złoża.

W równaniu van Deemtera na rozmycie próbki mają wpływ trzy główne efekty:

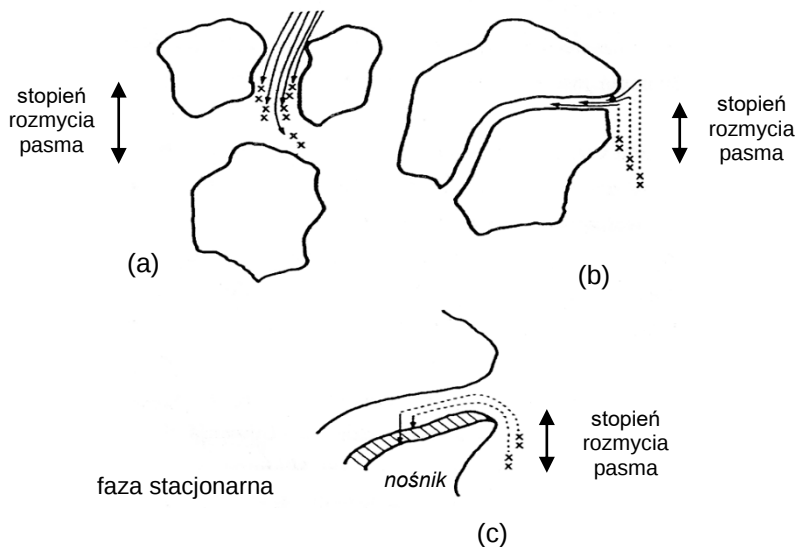
- A – hydrodynamiczny** – dyfuzja wirowa (niezależna od szybkości przepływu). Mechanizm dyfuzji wirowej został schematycznie przedstawiony na rys. 3.3. Widać na nim, że ten sam składnik próbki przebywa różną drogę na kolumnie. Spowodowane jest to tym, że czasami cząsteczki próbki mogą przejść na wylot przez ziarenka złoża, w innym przypadku muszą je omijać. Różnice te zwiększają się, gdy ziarna złoża różnią się znacznie wymiarami, są zaglomerowane lub gdy w kolumnie występują puste przestrzenie.
- B – dyfuzyjny** – dyfuzja molekularna zmniejszająca się ze wzrostem szybkości przepływu (większa szybkość oznacza krótszy czas przebywania próbki na półce). Dyfuzja nie wpływa na retencję analizowanego związku. Wpływa jednak na jego szerokość, tak jak to przedstawiono na rys. 3.4 (większej dyfuzji odpowiada szerszy pik).
- C – przenoszenia masy** – rośnie on ze wzrostem szybkości przepływu, gdyż ustalanie się równowagi nie nadąża za przepływem. Jego miarą jest rozsuniecie maksimów pików w obu fazach (rys. 1.13). Schemat rozmycia próbki wywołanego przenoszeniem masy przedstawiono na rys. 3.5.



Rysunek 3.3. Schemat rozmycia próbki wywołanego dyfuzją wirową [1]

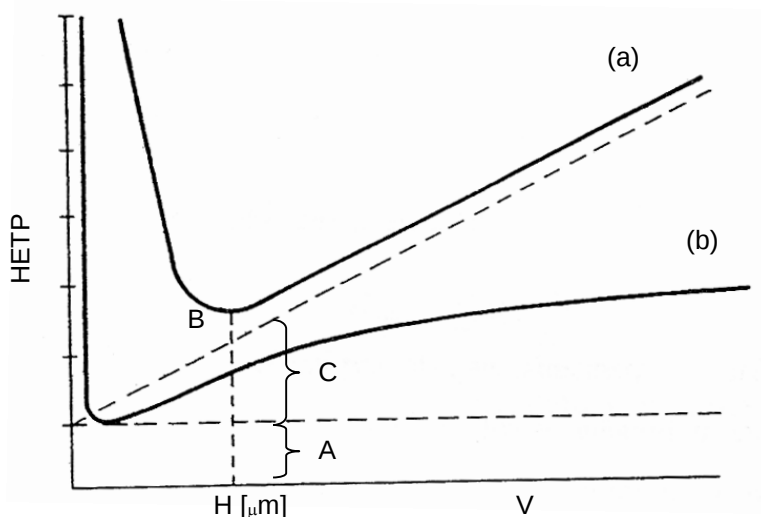


Rysunek 3.4. Rozmycie próbki wywołane dyfuzją molekularną
Opracowanie własne.



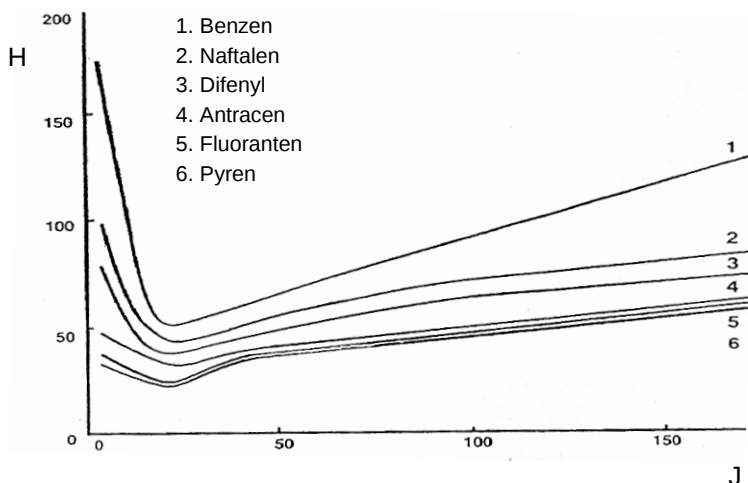
Rysunek 3.5. Schemat rozmycia próbki wywołanego przenoszeniem masy:
a – fazy ruchomej, b – w unieruchomionej fazy ruchomej i c – w fazie stacjonarnej [1]

Summary wykres zależności HETP od szybkości przepływu przedstawiono na rys. 3.6. Widać z niego, że istnieje pewna optymalna szybkość przepływu, przy której HETP uzyskuje wartość minimalną. Ze względu na to, że dyfuzja w cieczy jest znacznie mniejsza niż w gazie, szybkość optymalna w chromatografii cieczowej jest uzyskiwana przy znacznie mniejszych szybkościach przepływu w porównaniu z chromatografią gazową. Błędny jest jednak dosyć często pojawiający się w literaturze pogląd, jakoby w chromatografii cieczowej występowała tylko część wznosząca wykresu.

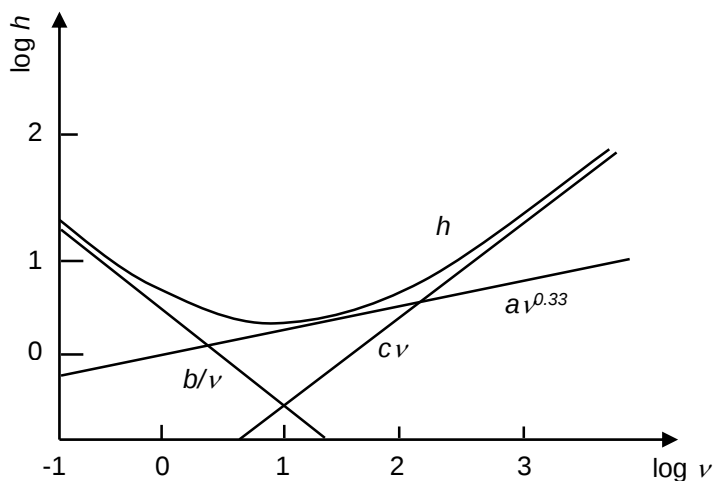


Rysunek 3.6. Zależność wysokości równoważnej płyty teoretycznej od szybkości przepływu fazy ruchomej dla chromatografii gazowej (a) i cieczowej (b) [1]

Na rys. 3.7 pokazano eksperymentalne krzywe uzyskane dla różnych węglowodorów aromatycznych rozdzielonych na kolumnie typu RP-18 [5]. Analogiczną zależność dla wielkości zredukowanych przedstawiono na rys. 3.8.



Rysunek 3.7. Eksperymentalnie uzyskana zależność wysokości równoważnej półki teoretycznej (H), od objętościowej szybkości przepływu fazy ruchomej (J), [1, 5].
Kolumna: LiChrosorb RP-18, 5 μm , 1 x 250 mm



Rysunek 3.8. Logarymiczna zależność zredukowanej wysokości półki (h), od zredukowanej liniowej szybkości przepływu (v) [1, 7]

Dokładny opis wszystkich zjawisk występujących na kolumnie jest niezwykle trudny. Problematyczna jest również jego weryfikowalność, gdyż szereg parametrów jest trudnych do wyznaczenia lub chociażby oszacowania. Dlatego

poniżej skrótowo podane zostaną równania opisujące najważniejsze czynniki wpływające na rozmycie próbki na kolumnie [6]:

A:

Dyfuzja wirowa:

$$H_{DW} = 2\lambda d_p, \quad (3.31)$$

gdzie: λ stała zależna od charakteru wypełnienia, zwykle przyjmuje się $\lambda = 0,5$.

Z powyższego wzoru wynika, że minimalna wysokość półki nie może być mniejsza od średnicy ziarna złoża. Ostatnio w literaturze pojawiły się doniesienia kwestionujące powyższe stwierdzenie. Potwierdza to jedynie tezę, że na obecnym etapie rozwoju teorii procesu chromatograficznego nie należy z prezentowanych tu wzorów wyciągać zbyt daleko idących wniosków.

Konwekcja poprzeczna (równanie Giddingsa):

$$H_{KP} = \left(\frac{1}{2\lambda d_p} + \frac{D}{d_p^2 u} \right)^{-1}. \quad (3.32)$$

B:

Dyfuzja molekularna w fazie ruchomej (równanie Einsteina):

$$H_{DM} = 2Dt_m/L = 2\gamma D, \quad (3.33)$$

gdzie: γ – współczynnik krętowości, zwykle zakłada się, że wynosi on 0,7,
 L – długość kolumny, t_m – czas przebywania analizowanego związku na półce.

C:

Przenoszenie masy w fazie stacjonarnej:

$$H_{PM} = 2ut_d k/(1 + k), \quad (3.34)$$

gdzie: t_d , zgodnie z modelem błędzenia przypadkowego, oznacza czas desorpcji, przebywania cząsteczki w fazie stacjonarnej, a k oznacza współczynnik retencji (pojemnościowy).

Zgodnie z równaniem Einsteina:

$$t_d = d^2/2D_s, \quad (3.35)$$

gdzie: d oznacza długość drogi dyfuzji (grubość nieruchomej warstwy cieczy), a D_s współczynnik dyfuzji molekularnej w fazie stacjonarnej.

Po podstawieniu równania 3.35 do 3.34 dostajemy:

$$H_{PM} = d^2 uk/D_s(1 + k)^2. \quad (3.36)$$

Dyfuzja radialna przez warstwy laminarne (równanie Giddingsa):

$$H_{DR} = \sum_i \varpi_i \frac{d_p^2}{D}, \quad (3.37)$$

gdzie: ϖ_i – bezwymiarowe stałe dyfuzji w kolumnie, porach złoza, między ziarnami itp.

Dyfuzja w stojącej fazie ruchomej (równanie Giddingsa):

$$H_{SR} = \frac{(1 - \phi + k)^2 d_p^2 u}{30(1 - \phi)(1 + k)^2 \gamma D}, \quad (3.38)$$

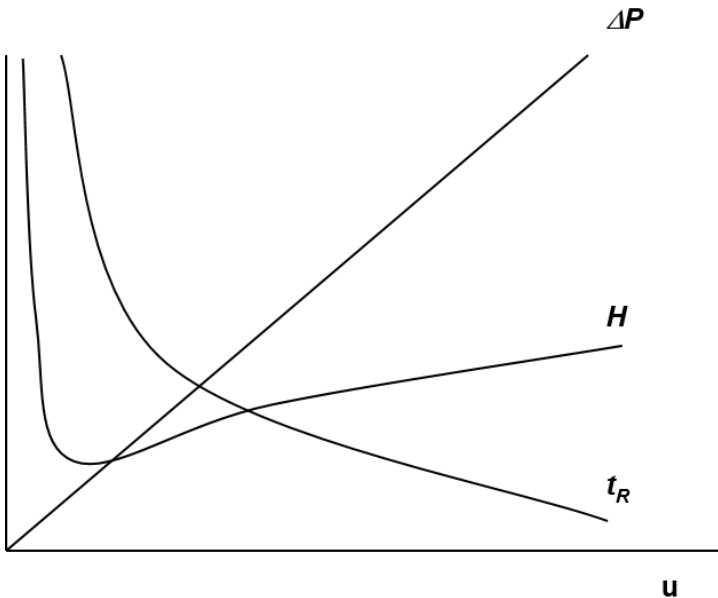
gdzie: ϕ oznacza ułamek fazy ruchomej w przestrzeni międzyziarnowej.

Z powyższych wzorów wynika, że rozmycie próbki na kolumnie składa się z szeregu addytywnych składników:

$$H = \frac{H_{DW} + H_{KP}}{A} + \frac{H_{DM}}{B} + \frac{H_{PM} + H_{DR} + H_{SR}}{C}. \quad (3.39)$$

Omawiane zależności znajdują praktyczne zastosowanie poprzez optymalizację szybkości przepływu fazy ruchomej tak, aby otrzymać maksymalną sprawność kolumny. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że szybkość przepływu ma wpływ na dwa inne bardzo ważne parametry chromatograficzne. Pierwszym jest czas analizy. Oczywiście, jak w każdej technice analitycznej, dąży się do jego

maksymalnego skrócenia. Maleje on hiperbolicznie ze wzrostem szybkości przepływu. Optymalna szybkość z tego punktu widzenia jest na początku plateau. Drugim jest ciśnienie. Wzrost szybkości przepływu realizowany jest poprzez przyłożenie większego ciśnienia na kolumnę. Jest to niekorzystne, gdyż wymaga stosowania droższej aparatury ze znacznie skuteczniejszym systemem uszczelnień. Ponadto wyższe ciśnienie skraca żywotność kolumny. Optymalizując więc szybkość przepływu należy brać pod uwagę te trzy efekty (rys. 3.9).



Rysunek 3.9. Wpływ szybkości przepływu fazy ruchomej (u) na wysokość płyty teoretycznej (H), czas analizy (t_R) i spadek ciśnienia na kolumnie (ΔP)

Opracowanie własne.

Z powyższej dyskusji wynika, że wzrost dyfuzji z jednej strony wpływa na dyfuzję aksjalną, niekorzystną z chromatograficznego punktu widzenia, z drugiej zaś na korzystną dla rozdzielania dyfuzję radialną. Ze względu na czas analizy zwykle pracuje się z szybkościami przepływu większymi od optymalnych z punktu widzenia rozmycia na kolumnie. Przy tych szybkościach dyfuzję aksjalną, znacznie mniejszą od konwekcji, można pominąć. Ze względu na zmniejszenie radialnego rozmycia próbki wzrost dyfuzji zmniejsza rozmycie próbki.

Dyfuzję można zmienić, wpływając na:

- próbkę, derywatyzacja próbki zwiększa jej wymiary, a przez to zmniejsza jej dyfuzję (prawo Stokesa),
- fazę ruchomą, dodatek rozpuszczalnika organicznego i wzrost temperatury zmniejszają lepkość roztworu, zwiększając tym samym dyfuzję,
- fazę stacjonarną, dyfuzję można zwiększyć, zmniejszając jej drogę. Osiągnąć to można, stosując ziarna złoża o małej średnicy. Powoduje to jednak wzrost ciśnienia na kolumnie i kłopoty z jej nabicie. Aby pogodzić krótką drogę dyfuzji z małym spadkiem ciśnienia na kolumnie, wprowadzono tzw. złoża powierzchniowo-porowate. Zbudowane one są z dużych cząsteczek na powierzchni, których unieruchomiona jest faza stacjonarna. Wadą ich jest mała pojemność względem pików, wywołana małą objętością fazy stacjonarnej. Charakteryzują się one bardzo łatwym pakowaniem kolumny metodą na sucho.

3.4. Asymetria rozmycia próbek

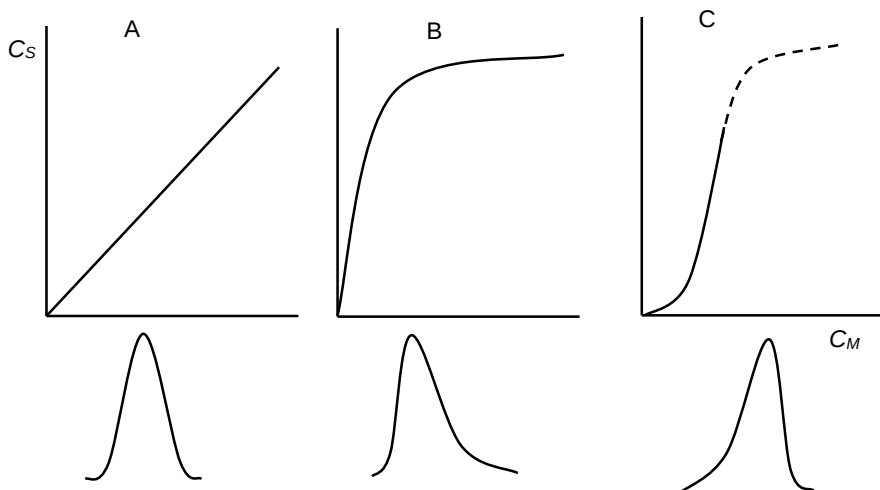
Niektóre efekty powodują nierównomierne rozmycie piku. Na chromatogramie otrzymuje się wówczas niesymetryczne piki. Spowodowane one mogą być przez:

- laminarny przepływ cieczy, powodujący nierównomierny przepływ różnych części próbki (patrz rys. 1.10),
- efekty kinetyczne,
- nierównomierne nabicie próbki,
- nieliniową izotermę adsorpcji lub podziału.

Nieco dokładniej omówiony zostanie ostatni przypadek, tzn. nieliniowa izoterma adsorpcji lub podziału. Związki charakteryzujące się liniową izotermą adsorpcji lub podziału tworzą symetryczne piki chromatograficzne (rys. 3.10 A). W chromatografii analitycznej dąży się do takiego właśnie ich kształtu. Wychodzi się tu z założenia, że dla małych stężeń próbki, każda izoterma jest w przybliżeniu liniowa.

Najczęściej występująca w przyrodzie izoterma Langmuira jest izotermą wypukłą. Przy jej wyprowadzaniu zakłada się, że na powierzchni sorbenta występuje pewna, skończona ilość tzw. centrów aktywnych. Przy pewnym stężeniu

próbki następuje ich wysycenie (rys. 3.10 B). Dalszy wzrost jej stężenia powoduje, że znajduje się ona głównie w fazie ruchomej. Z tego powodu ze wzrostem stężenia wzrasta szybkość jej propagacji wzdłuż kolumny chromatograficznej. Pik chromatograficzny odwzorowuje stężenie próbki, tzn. największe jej stężenie występuje w maksimum pików. Stąd porusza się ono szybciej niż końce pików. W rezultacie otrzymuje się pik z tzw. ogonem (rys. 3.10 B). Z kształtu pików można wyznaczyć izotermę adsorpcji. Jest to metoda wprawdzie stosunkowo mało dokładna, ale za to wyjątkowo szybka.



Rysunek 3.10. Różne kształty izoterm adsorpcji/podziału i odpowiadające im kształty pików chromatograficznych

Opracowanie własne.

Trzecim przypadkiem jest izoterma wklęsła (rys. 3.10 C). Należy tu zaznaczyć, że ten typ izotermy jest raczej nierzeczywisty. Tak jak widać to na rys. 3.10 C przy bardzo dużych stężeniach izoterma ta przechodzi w wypukłą. Z tym typem izotermy mamy na ogół do czynienia wtedy, gdy jeden związek występuje w dwóch postaciach (np. zdysocjowanej lub zasocjowanej). Z reguły obie te postaci mają różne powinowactwo do fazy stacjonarnej. Rozpatrzmy dla przykładu kwasy rozdzielane w układzie faz odwróconych. Z fazą stacjonarną znacznie silniej oddziałują niezdisocjowane, elektrycznie obojętne cząsteczki. Cząsteczki zdysocjowane są w zasadzie niezatrzymywane na kolumnie. W maksimum pików

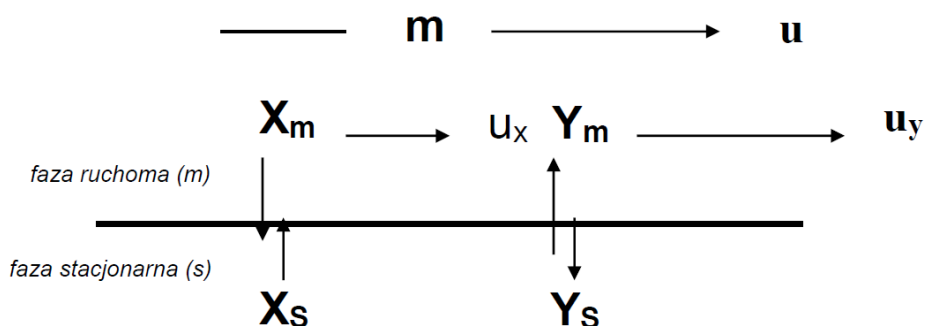
stężenie cząsteczek zdysocjowanych jest mniejsze, gdyż ze wzrostem stężenia zmniejsza się stopień dysocjacji. W związku z tym maksimum pików porusza się wolniej niż jego końce. W rezultacie na chromatogramie otrzymuje się frontalnie rozmyty pik (rys. 3.10.C). Oczywiście w obecności buforu stopień dysocjacji wzdłuż pików jest stały i rejestrowane piki są symetryczne.

Literatura

- [1] B.K. Głód, *Wybrane zagadnienia wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, Wyd. Candela s-ka z o.o., Warszawa 1996.
- [2] D. De Vault, *The Theory of Chromatography*, J. Am. Chem. Soc., 65 (1943) 532.
- [3] R. Nowakowski, *Wprowadzenie do wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, B.K. Głód, red., Wyd. IChF-PAN, Warszawa 1992, pp. 7-14.
- [4] *Współczesna chromatografia cieczowa*, J.J. Kirkland, red., PWN, Warszawa 1976.
- [5] *Wprowadzenie do wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, B.K. Głód, red., Wyd. IChF-PAN, Warszawa 1992.
- [6] J.C. Giddings, *Dynamics of Chromatography*, Marcel Dekker, New York 1965.
- [7] P.A. Bristov, J.H. Knox, *Standardization of test conditions for high performance liquid chromatography columns*, *Chromatographia*, 10 (1977) 279.

4. PARAMETRY RETENCJI I ZALEŻNOŚCI MIĘDZY NIMI

Proces chromatograficzny polega na dynamicznym różnicowaniu podziału składników analizowanej próbki między fazę ruchomą m i stacjonarną s (rys. 4.1). Przebieg procesu zostanie rozpatrzony na przykładzie dwóch substancji x i y .



Rysunek 4.1. Schemat wyjaśniający różną szybkość propagacji składników próbki
Opracowanie własne.

Z rys. 4.1 wynika, że większe powinowactwo do fazy stacjonarnej wykazuje substancja x . Składniki próbki poruszają się tylko wówczas, gdy znajdują się one w fazie ruchomej (ich propagacja w fazie stacjonarnej wpływa tylko na rozmycie piku). Szybkość ich przepływu przez kolumnę zależy więc od stopnia ich udziału w fazie ruchomej:

$$u_i = u \frac{n_i^m}{n_i^m + n_i^s}, \quad (4.1)$$

gdzie: u – szybkość przepływu fazy ruchomej a n_i – liczba moli składnika i .

Występujący w tym równaniu czynnik nosi nazwę współczynnika retardacji:

$$R_i = \frac{n_i^m}{n_i^m + n_i^s} = \frac{u_i}{u}. \quad (4.2)$$

Czas, po którym maksimum pików pojawia się w detektorze, nazywa się czasem retencji. Równy on jest drodze pokonywanej przez próbkę, czyli długości kolumny (L), podzielonej przez szybkość jej poruszania się:

$$t_R = L/u_i. \quad (4.3)$$

Po podstawieniu równania 4.1 do 4.3 otrzymuje się:

$$t_R = \frac{L}{u} \frac{n_i^m + n_i^s}{n_i^m}. \quad (4.4)$$

Z drugiej strony czas retencji równy jest czasowi przebywania próbki w fazie ruchomej i stacjonarnej:

$$t_R = t_m + t_s. \quad (4.5)$$

Gdy analizowana substancja przebywa tylko w fazie ruchomej wówczas mówimy, że jest ona wymywana (eluowana) w czasie retencji substancji nie zatrzymywanej przez fazę stacjonarną (dawniej – czas martwy kolumny) t_0 :

$$n_i^s = 0 \Rightarrow t_R = t_m = t_0. \quad (4.6)$$

Z porównania równań 4.4 i 4.6 wynika wówczas:

$$t_m = L/u. \quad (4.7)$$

Po podstawieniu równania 4.4 i 4.7 do równania 4.5 otrzymuje się:

$$t_s = t_R - t_m = \frac{L}{u} \frac{n_i^m + n_i^s}{n_i^m} - \frac{L}{u}. \quad (4.8)$$

Po wyciągnięciu L/u przed nawias i doprowadzeniu do wspólnego mianownika:

$$t_s = \frac{L}{u} \left(\frac{n_i^m + n_i^s}{n_i^m} - \frac{n_i^m}{n_i^s} \right) = \frac{L}{u} \frac{n_i^s}{n_i^m}. \quad (4.9)$$

Występujący w tym równaniu stosunek:

$$k = n_i^s/n_i^m \quad (4.10)$$

nosi nazwę współczynnika retencji (dawniej – pojemnościowego). Jest on związany ze współczynnikiem podziału analizowanej substancji:

$$k = c_s V_s / c_m V_m = K V_s / V_m, \quad (4.11)$$

gdzie: V_s i V_m oznaczają odpowiednio objętości fazy stacjonarnej i ruchomej kolumny. Ich stosunek nazywa się stosunkiem objętości faz:

$$\Phi = V_s / V_m. \quad (4.12)$$

W przypadku gdy analizowana substancja występuje w kilku postaciach, wówczas:

$$K = \frac{\sum_i c_i^s}{\sum_i c_i^m}. \quad (4.13)$$

Z powyższego równania wynika, że współczynnika podziału w ogólności nie należy utożsamiać ze stałą równowagi.

Po podstawieniu równań 4.7 i 4.9 do 4.5 otrzymamy:

$$t_R = L/u + L n_i^s / u n_i^m = L/u(1+k). \quad (4.14)$$

Stąd:

$$t_R = t_m(1+k). \quad (4.15)$$

Powyższe równanie jest jednym z podstawowych równań chromatograficznych. Wynika z niego, że większe powinowactwo do fazy stacjonarnej (większe k) oznacz większy czas retencji. Po przekształceniu można z niego wyznaczyć współczynnik pojemnościowy z czasu retencji:

$$k = (t_R - t_m)/t_m. \quad (4.16)$$

Zwykle w chromatografii operujemy współczynnikiem pojemnościowym zamiast czasem retencji, gdyż jest on mniej zależny od aktualnych warunków

pracy (szybkości przepływu fazy ruchomej, stopnia ubicia kolumny itp.). Zamiast czasem retencji możemy się również posługiwać, niezależną od szybkości przepływu, objętością retencji:

$$V_R = t_R J, \quad (4.17)$$

gdzie: J – objętościowa szybkość przepływu.

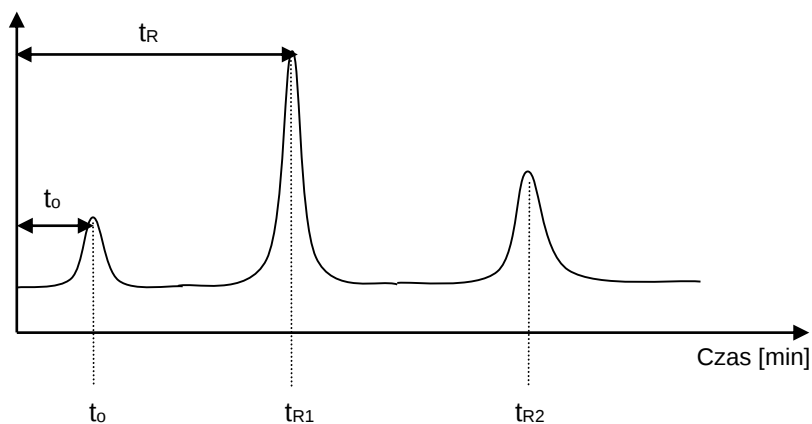
Wówczas:

$$V_R = V_m(1 + k). \quad (4.18)$$

Czasami stosuje się również tzw. znormalizowane czas i objętość retencji, np.:

$$V_N = V_R - V_m = KV_s. \quad (4.19)$$

Czas retencji oraz czas retencji substancji niezatrzymywanej przez fazę stacjonarną kolumny (czas martwy) można odczytać bezpośrednio z chromatogramu, tak jak to przedstawiono na rys. 4.2. W przypadku najczęściej obecnie stosowanej chromatografii w układzie faz odwróconych takimi związkami służącymi do wyznaczania czasu martwego mogą być: ciężka woda, metanol, azotan lub chromian [1, 2, 4].



Rysunek 4.2. Schematycznie przedstawiony chromatogram ilustrujący możliwość wyznaczenia z niego podstawowych parametrów retencji.

Opracowanie własne.

Stosunek współczynników pojemności dwóch sąsiednich pików chromatograficznych nazywa się selektywnością układu:

$$\alpha = k_2/k_1 = K_2/K_1. \quad (4.20)$$

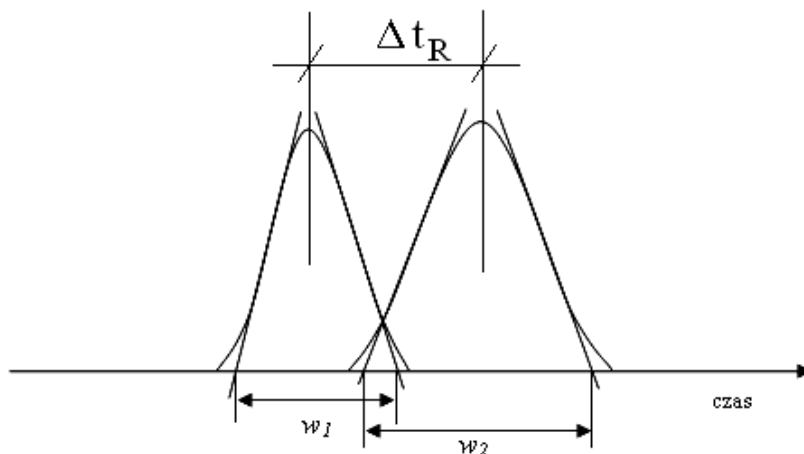
Rozdzielanie chromatograficzne następuje wtedy, gdy $\alpha > 1$. Współczynnik selektywności jest wielkością termodynamiczną:

$$-RT \ln \alpha = \Delta(\Delta G), \quad (4.21)$$

gdzie: $\Delta(\Delta G)$ jest różnicą potencjałów termodynamicznych (swobodnych entalpii) dwóch substancji.

Z temperaturowej zależności retencji i równania 4.21 wyznaczyć można zmiany entropii i entalpii adsorpcji lub podziału.

Asymetrię pików ilościowo opisuje współczynnik asymetrii: stosunek długości dwu części pików (wyznaczonych linią przechodzącą przez jego maksimum) na 1/10 jego wysokości.



Rysunek 4.3. Schematyczna ilustracja podstawowych parametrów chromatograficznych [1]

Celem chromatografii jest uzyskanie maksymalnie rozdzielonych substancji analizowanej próbki [1, 2, 4]. Oznacza to, że dąży się w niej do uzyskania

maksymalnej różnicy retencji przy minimalnym rozmyciu. Ilościowo opisuje to współczynnik rozdziału (R_S), który można graficznie wyprowadzić z rys. 4.3:

$$R_S = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\frac{1}{2}w_1 + \frac{1}{2}w_2} = 2 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_1 + w_2}. \quad (4.22)$$

Miarą zdolności rozmycia próbki na kolumnie jest jej *sprawność* wyrażona ilością pól teoretycznych układu:

$$N = L/H. \quad (4.23)$$

Większa sprawność oznacza węższy pik przy większym czasie retencji:

$$N = 16(t_R/w)^2. \quad (4.24)$$

Współczynnik proporcjonalności w powyższym równaniu wyznaczony został z rozkładu normalnego Gaussa (równanie 3.2). N wyznaczyć również można z szerokości pików mierzonych przy różnych jego wysokościach:

$$N = 5,54(t_R/w_{1/2})^2 = 16(t_R/w_{0,135})^2 = 11,2(t_R/w_{0,25})^2 = 4(t_R/w_{0,607})^2 = 1(t_R/w_{0,803})^2, \quad (4.25)$$

lub z jego wysokości (h), i pola powierzchni (A):

$$N = 2\pi(hV_R/A)^2. \quad (4.26)$$

Szerokość pików mierzona na wysokości $0,607h$ wynosi 2σ , stąd:

$$N = (t_R/\sigma)^2. \quad (4.27)$$

W przypadku pików asymetrycznych:

$$N = 41,7(t_R/w_{0,1})^2(1,25 + A/B), \quad (4.28)$$

gdzie: A/B jest współczynnikiem asymetrii pików.

Sprawność kolumny wyznaczana przy podstawie pików obarczona jest błędem wywołanym jego asymetrią. Wyznaczana zaś przy jego wierzchołku jest mało dokładna. Stąd przyjęto się ją wyznaczać z połówkowej szerokości pików.

Równanie 4.24 można przekształcić do postaci:

$$w = 4t_R/N^{1/2}. \quad (4.29)$$

Po wstawieniu równania 4.29 do 4.22 uzyskuje się:

$$R_S = \frac{2 t_{R_2} - t_{R_1}}{4 t_{R_2} + t_{R_1}} \sqrt{N}. \quad (4.30)$$

Do równania 4.30 wstawmy równanie 4.15:

$$R_S = 0,5 \frac{t_m(1+k_2-1-k_1)}{t_m(1+k_2+1+k_1)} \sqrt{N} = 0,5 \frac{k_2-k_1}{2+k_2+k_1} \sqrt{N}. \quad (4.31)$$

Licznik i mianownik podzielmy teraz przez k_1 i skorzystajmy z równania 4.20:

$$R_S = 0,5 \frac{\alpha-1}{2/k_1 + \alpha + 1} \sqrt{N}. \quad (4.32)$$

Teraz możemy w mianowniku wyciągnąć α przed nawias:

$$R_S = 0,5 \frac{\alpha-1}{\alpha \left(1 + \frac{2}{k_1 \alpha} + \frac{1}{\alpha} \right)} \sqrt{N}, \quad (4.33)$$

a następnie wstawić równanie 4.20:

$$R_S = 0,5 \frac{\alpha-1}{\alpha \left(1 + \frac{2}{k_2} \frac{k_1}{k_1} + \frac{k_1}{k_2} \right)} \sqrt{N}. \quad (4.34)$$

Po pomnożeniu licznika i mianownika przez k_2 otrzymujemy:

$$R_S = 0,5 \frac{(\alpha-1)k_2}{\alpha(k_2 + 2 + k_1)} \sqrt{N}. \quad (4.35)$$

W przypadku dwóch blisko siebie położonych pików możemy *założyć*:

$$k_1 \approx k_2. \quad (4.36)$$

Wówczas:

$$R_S \approx 0,25 \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \frac{k}{(1 + k)} \sqrt{N}. \quad (4.37)$$

Powyższe równanie jest podstawowym równaniem chromatograficznym. Zostało ono wyprowadzane w 1960 roku przez **Purnella**. Uzależnia ono zdolność rozdzielczą układu (R_S), od jego retencji (k), selektywności (α), i sprawności (N).

Często wprowadza się pojęcie tzw. efektywnej ilości póltek teoretycznych (umożliwiającej normalizację sprawności różnych związków rozdzielanych na tym samym układzie):

$$N_{ef} = N \left(\frac{k}{1 + k} \right)^2. \quad (4.38)$$

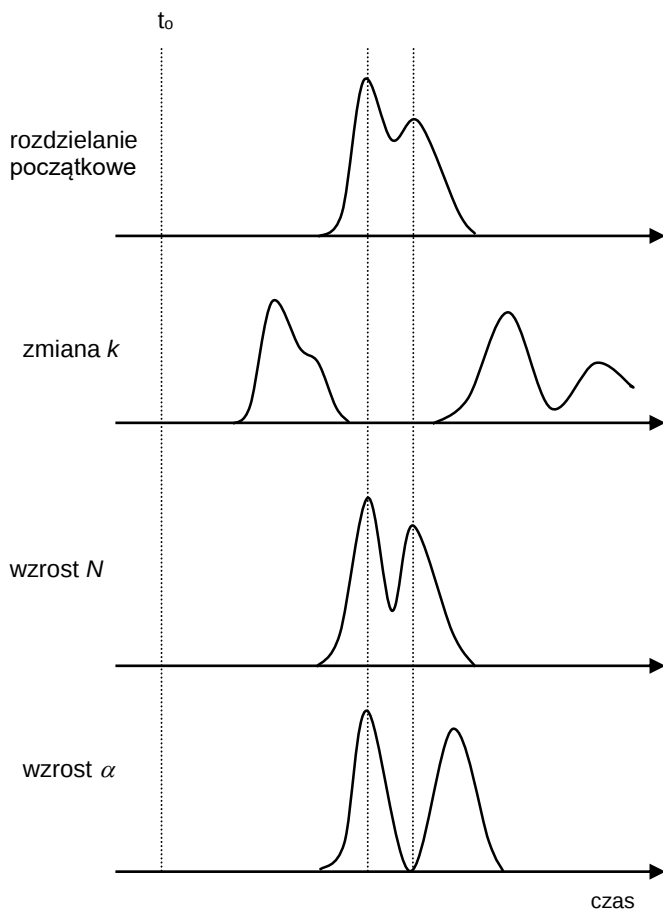
Po podstawieniu do równania 4.38 równań 4.16 i 4.24 uzyskujemy:

$$N_{ef} = 16 \left(\frac{t_R - t_m}{w} \right)^2. \quad (4.39)$$

Wówczas:

$$R_S \approx 0,25 \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \sqrt{N_{ef}}. \quad (4.40)$$

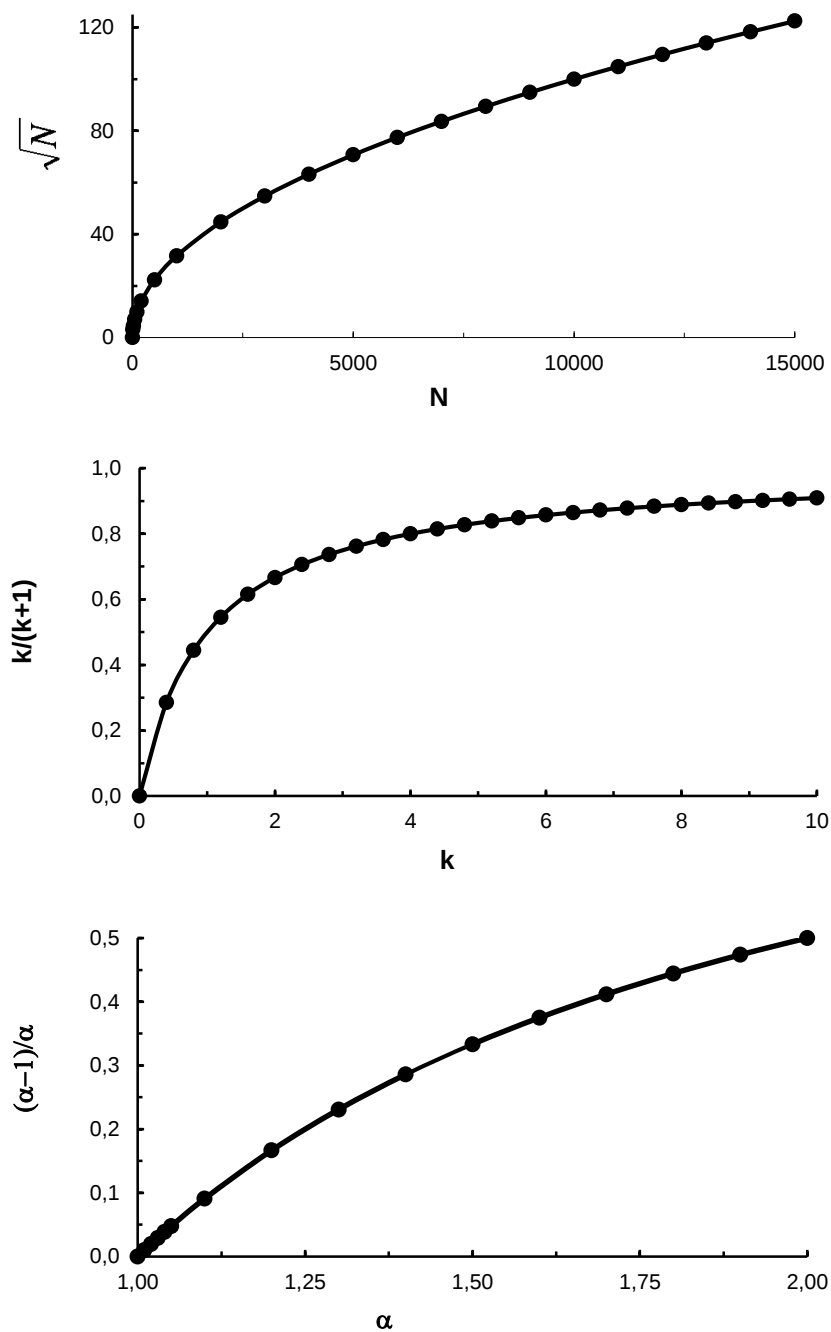
Z równania 4.37 wynika, że rozdzielanie chromatograficzne można polepszyć, zmieniając pojemność, selektywność lub sprawność układu. Schematycznie zobrazowano to na rys. 4.4. Zwiększając retencję układu, polepszamy wprowadzenie rozdzielanie, ale jednocześnie zwiększa się czas analizy i pogarsza detekcja. Wzrost sprawności zmniejsza rozmycie. Zwykle jednak chromatografista w niewielkim tylko stopniu może na nią wpływać. Bardzo efektywnie możemy natomiast wpływać na selektywność układu poprzez dodatek do fazy ruchomej różnych związków oddziałujących z próbką lub modyfikujących fazę stacjonarną.



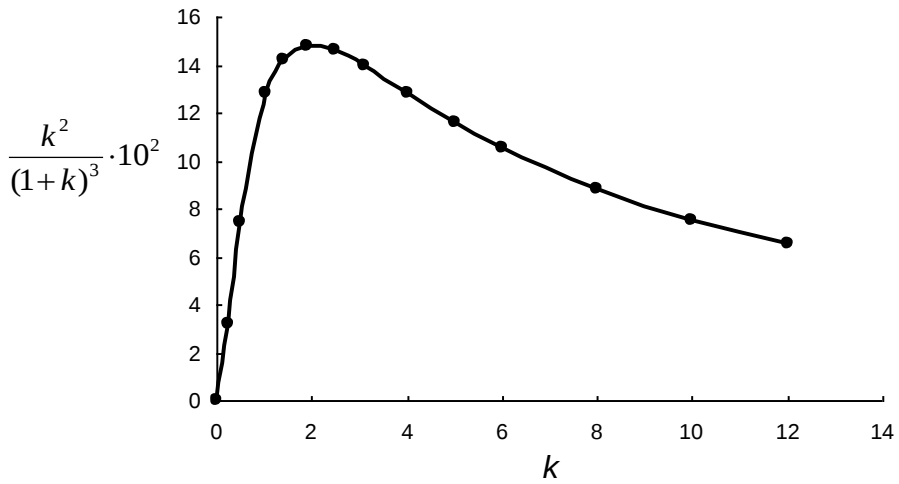
Rysunek 4.4. Schematyczny wpływ pojemności, sprawności i selektywności układu na rozdzielanie chromatograficzne
Opracowanie własne na podstawie [1].

Zależności obrazujące wpływ tych trzech parametrów na rozdzielanie przedstawiono na rys. 4.5 [1, 3]. Widać z niego, że ze wzrostem retencji i sprawności układu dochodzi się szybko do stanu nasycenia. Optymalna wielkość współczynnika pojemności wynosi około 2. Jego wzrost powyżej 10 zwiększa czas analizy, niewiele wpływając na rozdzielanie. Dodatkowo pogarsza to detekcję. Dlatego wygodnie jest operować efektywną ilością pól na jednostkę czasu:

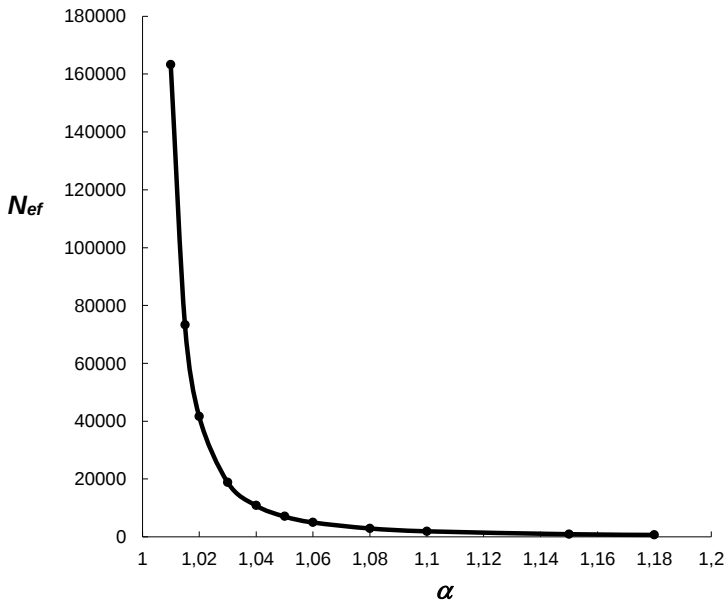
$$\frac{N_{ef}}{t} = \frac{u}{H} \frac{k^2}{(1+k)^3}. \quad (4.41)$$



Rysunek 4.5. Wpływ trzech czynników równania 4.37 na współczynnik rozdziłu
Opracowanie własne na podstawie [1]



Rysunek 4.6. Wpływ pojemności układu na jego efektywną sprawność na jednostkę czasu [3]



Rysunek 4.7. Wpływ współczynnika selektywności (α), na efektywną ilość pól teoretycznych (N_{ef}), potrzebnych do uzyskania $RS = 1$

Opracowanie własne.

Wykres tej zależności przedstawiono na rys. 4.6. Widać z niego, że jego maksimum występuje przy $k = 2$. Z rys. 4.5 wynika natomiast, że bardzo małe zmiany selektywności efektywnie wpływają na rozdzielanie. Korzystając ze wzoru 4.40, można przedstawić zależność efektywnej sprawności (efektywności) układu od jego selektywności dla zadanej wartości współczynnika rozdziału, tak jak to przedstawiono na rys. 4.7. Widać z niego, że taki sam wpływ na rozdzielanie ma niewielka zmiana selektywności, jak i zmiana sprawności układu o kilka rzędów wielkości. Tak duże zmiany sprawności są na ogół niemożliwe do uzyskania. Przykładowo, z równania 4.40 można wyliczyć, że aby uzyskać $R_S = 1$, przy $\alpha = 1,01$ powinniśmy dysponować kolumną o $N_{ef} = 160\ 000$. Kolumny o takich sprawnościach są po prostu niedostępne. Dla $\alpha = 1,05$ N_{ef} powinno wynosić 6 800. Taką sprawność zapewnia większość kolumn analitycznych. Gdybyśmy potrafili zwiększyć α do 1,2 wówczas to samo rozdzielanie uzyskalibyśmy dla $N_{ef} = 575$. Kolumnę o takiej sprawności jest w stanie upakować nawet zupełnie niedoświadczona osoba. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że dzięki cykliczności procesu chromatograficznego można efektywnie rozdzielać związki charakteryzujące się bardzo małym współczynnikiem selektywności (poniżej progu selektywności, np. elektrod jonoselektywnych).

Rozdzielanie chromatograficzne można uzyskać poprzez wpływ na:

– **pojemność:**

- próbka poprzez jej derywatyzację (upochodnięcie),
- faza ruchoma przez dodanie różnych składników modyfikujących, oddziaływanie próbki z fazą stacjonarną (np. dodatek rozpuszczalnika organicznego) lub zmieniających postać próbki (np. dodatek związków kompleksujących lub inkluzyjnych albo buforu zmieniającego stopień jej dysocjacji),
- faza stacjonarna możemy ją modyfikować podobnie jak fazę ruchomą albo podczas jej wytwarzania albo poprzez dodatek do fazy ruchomej odczynników oddziałujących ze złożem i zmieniających jego własności;

– selektywność:

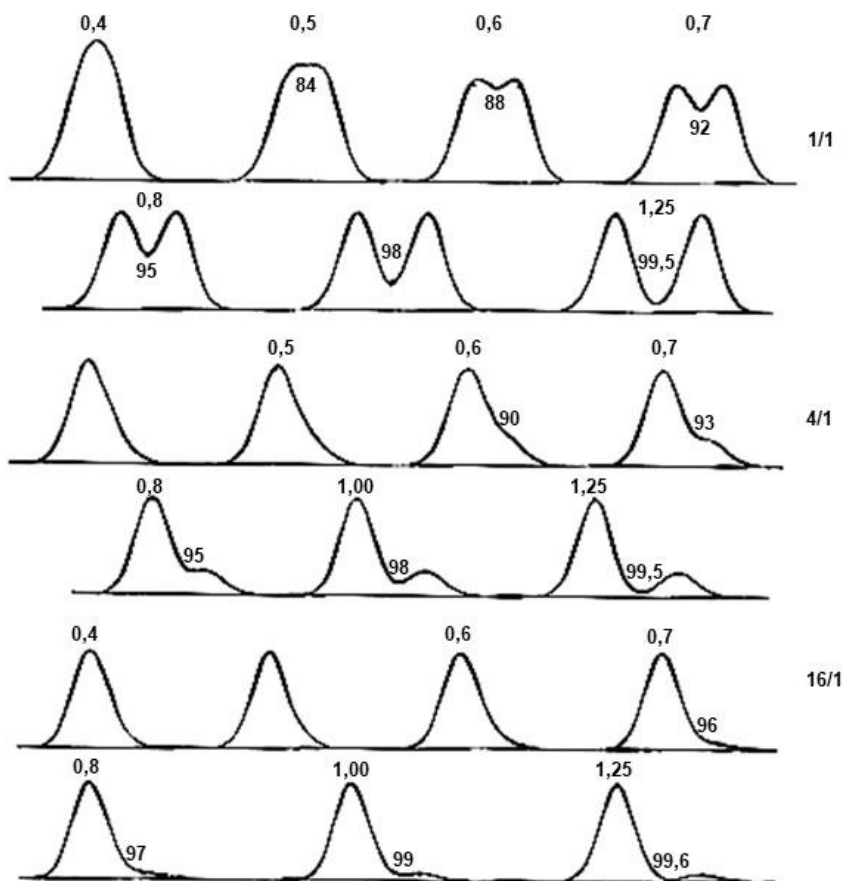
- próbka tak jak na pojemność,
- faza ruchoma tak jak na pojemność,
- faza stacjonarna tak jak na pojemność,
- temperatura zmniejszenie temperatury zwiększa selektywność układu (patrz równanie 4.21);

– sprawność:

- próbka derywatywacja próbki z reguły pogarsza sprawność,
- faza ruchoma stosowanie faz charakteryzujących się mniejszą lepkością,
- złożę stosowanie złożów o małych średnicach ziarna lub powierzchniowo-porowatych,
- przepływ stosowanie optymalnych szybkości przepływu (równanie van Deemtera),
- kolumna wzrost długości kolumny zwiększa wprost proporcjonalnie czas retencji i sprawność układu. Stąd współczynnik rozdzielania jest proporcjonalny do pierwiastka z długości kolumny. Oznacza to, że jest to metoda mało efektywna. Zamiast wydłużania kolumny można też stosować łączenie kilku kolumn,
- temperatura wzrost temperatury zmniejsza lepkość fazy ruchomej zwiększają tym samym sprawność układu w zakresie dużych szybkości przepływu,
- upakowanie większa jednorodność upakowania i wymiarów cząsteczek złoża zwiększa sprawność kolumny.

Na rys. 4.8 zobrazowano, jak wyglądają na chromatogramie dwa sąsiednie piki przy różnych wartościach współczynnika rozdziału i różnych ich względnych wysokościach [5]. Widać z niego, że w przypadku, gdy oba piki są tej samej wysokości wówczas bardzo dobre rozdzielanie (obejmujące 95% objętości piku) otrzymać można przy $R_S = 0,8$. Rozdzielanie praktycznie do linii bazowej uzyskuje się dla $R_S = 1,25$. Pogarsza się ono znacznie ze wzrostem różnicy wysokości pików. Gdy stosunek ich wysokości wynosi 1:16 i $R_S = 0,8$ wówczas na chromatogramie

widac jedynie ogonowanie pików [5]. Dopiero przy $R_s = 1,25$ uzyskać wówczas można satysfakcjonujące rozdzielanie chromatograficzne. Stąd w literaturze spotkać można opinie, że dobre rozdzielanie można uzyskać dla współczynnika rozdziálu w granicach od 0,8 do 1,25.



Rysunek 4.8. Schematyczny obraz dwóch sąsiednich pików uzyskanych przy różnych wartościach współczynnika rozdzielenia i różnych stosunkach ich wysokości: 1:1, 1:4 i 1:16 [5]

Literatura

- [1] B. Walczak, *Wprowadzenie do wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, B.K. Głód, red., Wyd. IChF-PAN, Warszawa 1992,
- [2] B. Walczak i J. Śliwiok, *Wysokosprawna chromatografia cieczowa*, Wyd. UŚ, Katowice 1989.
- [3] *Współczesna chromatografia cieczowa*, J.J. Kirkland, red., PWN, Warszawa 1976.
- [4] Z. Witkiewicz, *Podstawy chromatografii*, WNT, Warszawa 1992.
- [5] *IscoTables, A handbook of data for biological and physical scientists*, eighth edition, 1985.

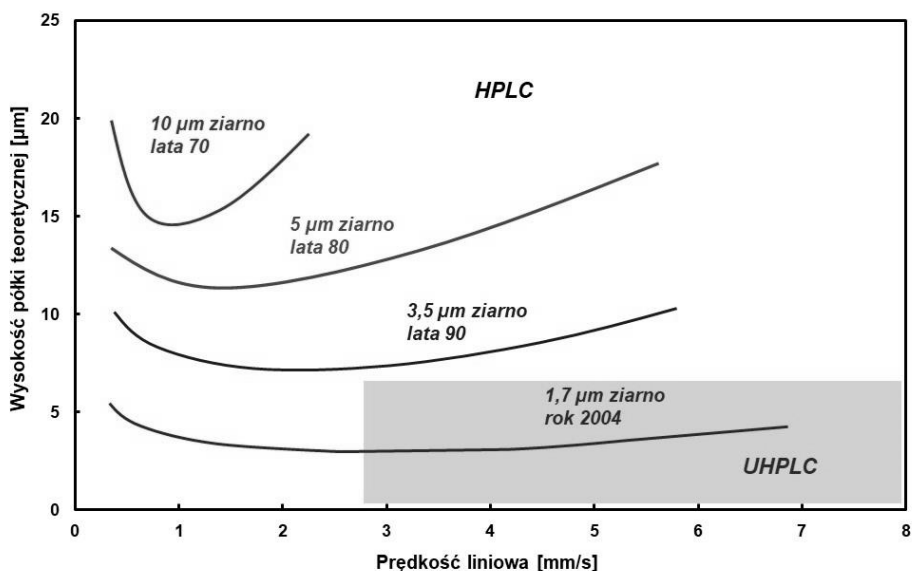
5. UPLC – ULTRAWYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA

Z teorii pólki chromatograficznej wynika, że dyfuzja w dwojaki sposób wpływa na sprawność układu chromatograficznego. Dla małych szybkości przepływu fazy ruchomej dyfuzja aksjalna wzdłuż kolumny chromatograficznej zmniejsza sprawność. Dla dużych szybkości przepływu dyfuzja radialna do ziaren złoża polepsza sprawność układu. Ten drugi przypadek jest bardziej interesujący, gdyż ze względu na krótszy czas analizy z reguły występuje w praktyce analitycznej. Zwiększoną dyfuzję można uzyskać zwiększając współczynnik dyfuzji próbki (np. poprzez wzrost temperatury i/lub obniżenie lepkości fazy ruchomej) lub zmniejszając drogę dyfuzji. Stąd zmniejszenie średnicy ziaren złoża chromatograficznego powoduje zwiększenie sprawności układu. Zależności wysokości równoważnych pólkom teoretycznym od szybkości przepływu fazy ruchomej przedstawiono na rys. 5.1. Wynika z niego jeszcze jedna zależność, nieopisywana przez teorię Giddingsa. Dla ziaren o mniejszych średnicach minimum zależności (równania van Deemtera) pojawia się przy większych szybkościach przepływu. Dla złożeń o bardzo małych średnicach ($1,5 \div 2 \mu\text{m}$) ziarna złoża pojawiają się jeszcze jeden efekt. W dużym zakresie szybkości przepływu fazy ruchomej wysokość pólki jest od niej niezależna. Okazuje się, że optymalna średnica zawiera się w granicach $1,3 \div 1,7 \mu\text{m}$. Dalsze zmniejszanie średnicy znacznie zwiększa stosowane ciśnienie (uniemożliwia to stosowanie aparatury przystosowanej do UPLC) niewiele polepszając sprawność układu [1, 2].

Złoża chromatograficzne o bardzo małych średnicach ziarna opisano po raz pierwszy w połowie lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku. Jednak dopiero 20 lat później wprowadzono pojęcie ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej (UPLC lub UHPLC od ang. *ultra performance liquid chromatography* lub *ultra high performance liquid chromatography*). Zaletą tej techniki jest przede wszystkim wspomniana niezależność wysokości pólki od szybkości przepływu, a także bardzo niska wysokość pólki oraz przesunięcie minimum równania van Deemtera

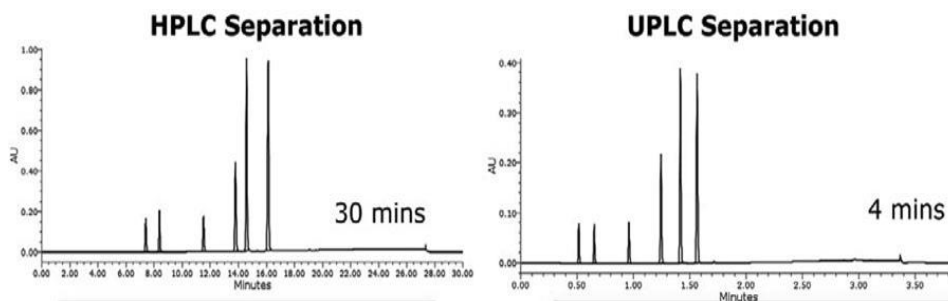
w kierunku większych szybkości przepływu fazy ruchomej. Powoduje to możliwość (w przeciwieństwie do HPLC) pracy przy dużych szybkościach przepływu fazy ruchomej bez straty sprawności układu chromatograficznego. Skraca to znacznie czas analizy, jej koszt oraz zwiększa sprawność układu. Pozwala to też na stosowanie kolumn o mniejszych rozmiarach. Niestety małą średnicą ziaren złoża i duże szybkości przepływu wymuszają stosowanie wysokich ciśnień (powyżej 800 atm.). Oznacza to, że nie można w tej technice stosować chromatografów przystosowanych do HPLC.

Na rys. 5.2 [3] przedstawiono typowe chromatogramy tych samych związków rozdzielanych (analizowanych) za pomocą HPLC i UPLC. Okazuje się, że w tym przypadku zastąpienie HPLC przez UPLC pozwala o 83% zaoszczędzić czas analizy, fazę ruchomą oraz próbkę.



Rysunek 5.1. Zależność wysokości równoważnej półki teoretycznej (H) od liniowej szybkości przepływu fazy ruchomej (u), uzyskane dla różnych średnic ziaren złoża chromatograficznego (d)

Opracowanie własne na podstawie [3]



Rysunek 5.2. Przykładowe chromatogramy tych samych związków rozdzielanych (analizowanych) za pomocą HPLC i UPLC [3]

Literatura

- [1] J. Cielecka-Piontek, P. Zalewski, A. Jelińska, P. Garbacki, *UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography*, Chromatogr. 76 (2013) 1429-1437.
- [2] S. Hussain, T. Shaikh, *Ultra High Performance Liquid Chromatography (UPLC): a new trend in analysis*, World J. Pharmaceutical Res. 5 (2016) 387-394.
- [3] M. Dawson, *Effective UPLC Implementation*, American Laboratory, April 2011.

6. APARATURA STOSOWANA W HPLC

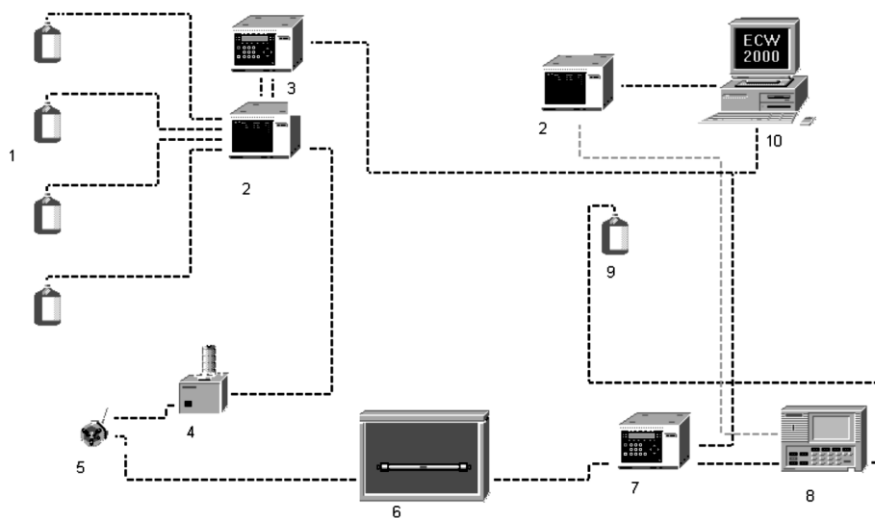
Cechą charakterystyczną aparatury stosowanej w HPLC jest jej modułowa budowa. Typowy układ składa się ze zbiorników eluentu, odgazowywacza pompy (lub pomp) z elektrozaworami umożliwiającymi gradient elucji, mieszalnika składników fazy ruchomej, dozownika lub autosamplera, prekolumn i kolumn chromatograficznych (mogących się znajdować w termostacie), detektorów chromatograficznych, zbiornika eluatu oraz rejestratora, integratora lub zestawu komputerowego (rys. 6.1). Oprócz tego układ taki może zamierać dodatkowe elementy składowe, takie jak kolumny tłumiące (w chromatografii jonowej), kolumny nasycające czy pre- i postkolumnowe derywatyzatory. Wszystkie elementy powinny być bardzo odporne chemicznie (jako fazy ruchome stosowane są różne rozpuszczalniki oraz roztwory mocnych kwasów i zasad), a dodatkowo te znajdujące się między pompą a kolumną powinny wytrzymywać ciśnienie do 400 atm. Dlatego chromatograf zbudowany jest głównie ze stali kwasoodpornej oraz odpornych mechanicznie pochodnych PTFE (politetrafluoroetyleny), PEEK (polieteroeteroketonu), kwarcu (okienka detektora fotometrycznego), rubinu (kulki zaworów nurników pompy) i szafiru (tłoki i złoże zaworów). Najmniej odpornym chemicznie elementem układu chromatograficznego jest złoże chromatograficzne [1].

Wszystkie elementy układu chromatograficznego połączone są zazwyczaj za pomocą kapilar o średnicy zewnętrznej 1,6 mm. Połączenia te (należy zadbać, aby nie było w nich tzw. objętości martwych), detektory i inne elementy układu wpływają na tzw. pozakolumnowe rozmycie próbki. Oznacza to, że składniki próbki rozdzielone na kolumnie chromatograficznej mogą z powrotem się zmieszać na zbyt dużych objętościach pozakolumnowych. Pod względem formalnym podobny efekt uzyskuje się przy zbyt dużych czasach odpowiedzi układów elektronicznych.

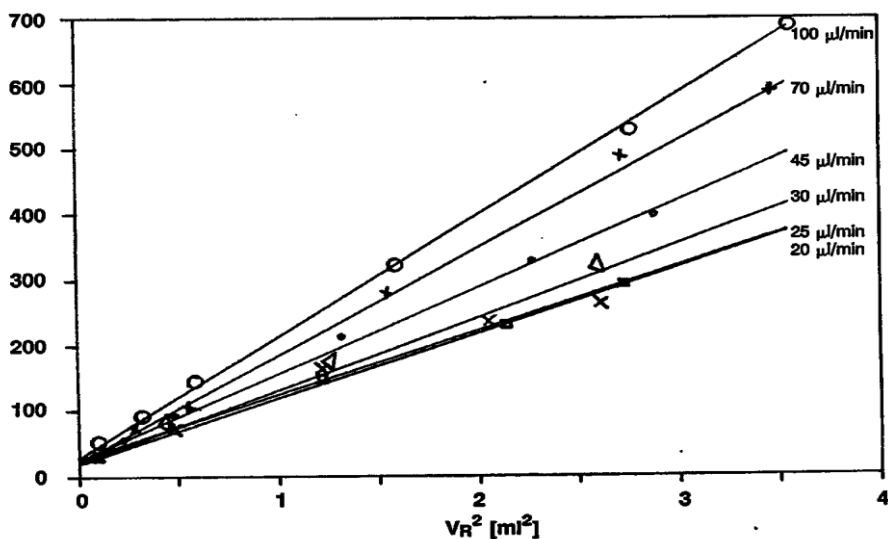
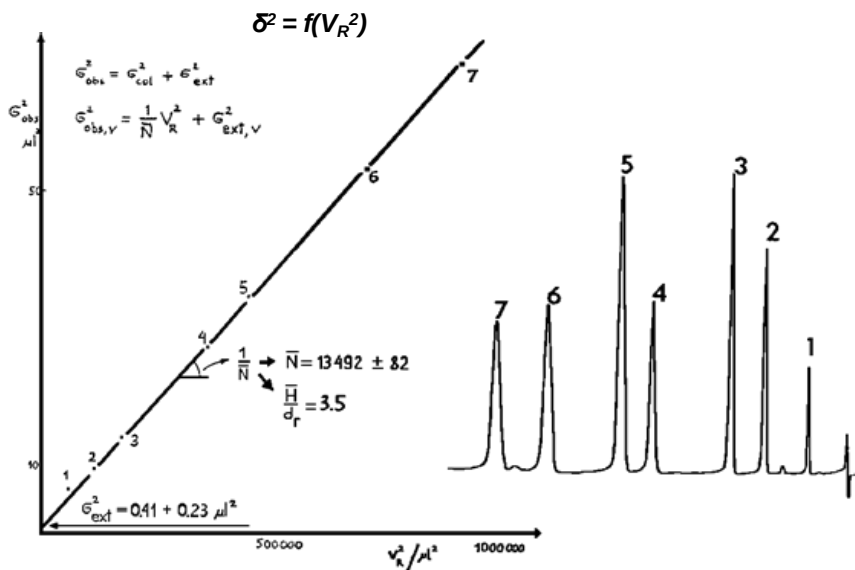
Przyjmuje się, że objętości pozakolumnowe nie powinny być większe niż 10% objętości piku chromatograficznego. Oczywiście jest to najtrudniejsze do

spełnienie dla początkowych (najwęższych) pików. Przykładowo dla kolumny o długości $L = 15$ cm, średnicy wewnętrznej $d = 4,6$ mm i sprawności $N = 1500$ pozakolumnowa objętość nie powinna przekraczać $8,3 \mu\text{L}$. Jest to możliwe do uzyskania. Dla kolumny o długości $L = 25$ cm, średnicy wewnętrznej $d = 1,0$ mm i sprawności $N = 25\ 000$ pozakolumnowa objętość nie powinna przekraczać $9,3 \mu\text{L}$. Niestety większość chromatografów nie spełnia tego warunku. Stąd, w przypadku stosowania kolumn o dużych sprawnościach, należy oczekiwać, że pierwsze piki chromatograficzne będą się charakteryzowały mniejszymi sprawnościami niż by to wynikało z zastosowanej kolumny. Przykładowo, dla $k = 1$, $N = 15\ 000$ i $V_{pk} = 15 \mu\text{L}$ oraz kolumny o $d = 4,6$ mm i $V_M = 1,5$ mL ta strata wynosi 1%. Natomiast dla kolumny o $d = 1,0$ mm i $V_M = 0,071$ mL ta strata wynosi już 71% i jest już zauważalna [1].

Objętość pozakolumnową można wyznaczać z zależności wariancji pików od kwadratu objętości retencji. Przykładowo przedstawiono to na rys. 6.2 [3-4].



Rysunek 6.1. Schemat blokowy typowego chromatografu HPLC, 1 – butle ze składnikami fazy ruchomej, 2 – interfejs, 3 – pompa, 4 – mieszadło, 5 – dozownik, 6 – termostat z kolumną, 7 – detektor spektrofotometryczny, 8 – detektor fluorescencyjny, 9 – butla na ścieki i 10 – komputer [2]



Rysunek 6.2. Zależność wariancji szerokości piku (σ^2), od kwadratu objętości retencji (V_R), dla kilku szybkości przepływu fazy ruchomej. Kolumna: 250 x 1 mm ID, LiChrosorb RP-18, 5 μm , faza ruchoma: metanol/woda (80:20 v/v) [3-5]

Literatura

- [1] *Chromatografia cieczowa*, M.A. Kamiński, R. Kartanowicz, red., Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Gdańsk 2004.
- [2] Materiały edukacyjne firmy Knauer, 2008.
- [3] B.K. Głód, A. Bylina, K. Leśniak, K. Pohorecki, *A Microcolumn Liquid Chromatograph*, Pol. Techn. Rev., 3 (1990) 2-4.
- [4] B.K. Głód, J. Klimkowski, A. Krupka, K. Leśniak, M. Klekowski, K. Pohorecki, *Mikrokolumnowy chromatograf cieczowy T-333*, Pomiary, Automatyka, Kontrola, 3 (1991) 58-60.
- [5] K. Leśniak, A. Bylina, B.K. Głód, *Mikrokolumnowy chromatograf cieczowy T-310. Badanie efektu pozakolumnowego rozmycia próbki*, B.K. Głód, red., Wyd. IchF-PAN, Warszawa 1992, pp. 61-70.

7. DETEKCJA

Datujący się od końca lat sześćdziesiątych szybki rozwój wysokosprawnej chromatografii cieczowej nastąpił dzięki urzeczywistnieniu za jej pomocą szybkich rozdzielen, które poprzednio uważano za nieosiągalne. Osiągnięcia te w dużym stopniu można przypisać polepszeniu sprawności kolumn i zastosowaniu dużych szybkości przepływu fazy ruchomej. Jednakże jednym z głównych czynników, które przyczyniły się do tak szybkiego rozwoju HPLC był postęp w rozwoju technik detekcyjnych. Wydaje się, że są one również głównym czynnikiem umożliwiającym dalszy jej rozwój idący w kierunku poprawy sprawności i miniaturyzacji. Przy czym detekcja w chromatografii cieczowej jest znacznie trudniejsza niż w rozwiniętej wcześniej chromatografii gazowej. Próbkę nie modyfikuje tak znacznie cieczy jak gazu, którego własności zazwyczaj w istotny sposób różnią się od własności substancji rozpuszczonych przechodzących przez układ. W związku z tym w chromatografii cieczowej nie istnieje tak uniwersalny detektor jak w chromatografii gazowej np. detektor płomieniowo-jonizacyjny czy pomiaru przewodnictwa cieplnego. Często okazuje się, że, niestety, najlepsze warunki chromatograficznego rozdzielania nie są optymalne z punktu widzenia detekcji. Powoduje to konflikt i konieczność wyboru rozwiązania kompromisowego. Zmniejszenie średnicy ziarna nośnika i średnicy kolumny stwarzają coraz to ostrzejsze wymagania stawiane detektorom. W zależności od stopnia złożoności aparatury i sprawności dopasowuje się wówczas detektor do chromatografu lub na odwrót.

Rozwój detektorów dokonuje się obecnie w pięciu głównych kierunkach:

1. Budowy detektorów „uniwersalnych”, zdolnych do monitorowania chromatogramów różnych klas związków. Obecnie sądzi się, że zbudowanie takiego detektora nie jest możliwe. Dlatego w tym przypadku chodzi raczej o zbliżenie się do ideału detektora o szerokim spektrum działania.
2. Budowy nowych detektorów specyficznych, reagujących na pewne związki lub klasy związków, nieczułe natomiast na inne. Umożliwiają one selektywną analizę substancji nierozdzielonych na kolumnie.

3. Budowy detektorów przestrajalnych. Łączą one w sobie własności obu pierwszych klas detektorów. Ponadto pewne ich rozwiązania umożliwiają uzyskanie trójwymiarowych chromatografów (techniki łączone). Tym samym zastępują one pracę wielu detektorów jednocześnie.
4. Budowy detektorów wielofunkcyjnych. Kilka różnych detektorów przyłączonych jest do wspólnej celki pomiarowej.
5. Rozwoju przed- i pokolumnowej derywatywacji próbek. Dodatkowo derywatywacja próbek często usprawnia rozdzielanie.
6. Detekcji pośredniej.

Zadaniem detektora w chromatografii jest ciągła analiza zmiany składu eluentu w momencie opuszczania przez niego kolumny. W tym celu zmienia on pewną wielkość fizyczną pozostającą w funkcji stężenia próbki w eluacie na wielkość elektryczną dogodną do rejestracji.

W pierwszych analizach chromatograficznych Cwiet w roli detektora zastosował wizualną obserwację chromatogramu. Metoda ta stosowana jest obecnie jeszcze w chromatografii bibułowej i cienkowarstwowej. Posiada ona jednak szereg istotnych ograniczeń. Przede wszystkim nadaje się ona tylko do detekcji związków barwnych. Ponadto, ze względu na nieliniowość odpowiedzi, raczej do analizy jakościowej.

W późniejszych latach stosowano zbieranie frakcji eluatu, a następnie jego analizę różnymi metodami. Postępowanie to było bardzo pracochłonne i mało efektywne. Idea stosowania detektora w przepływie pojawiła się na początku lat czterdziestych. Pierwszym takim detektorem był detektor refraktryczny opisany przez Tiseliusa [1].

W początkowym okresie rozwoju wysokosprawnej chromatografii cieczowej stosowano w niej detektory bezpośrednio przeniesione z bardziej rozwiniętej wówczas chromatografii gazowej. Szczególnie dużą rolę odegrały wówczas detektory transportowe. Później rozwinęły się techniki detekcyjne dostosowane do specyfiki HPLC [2-4].

Idealny detektor HPLC powinien charakteryzować się porównywalnymi parametrami w stosunku do detektorów stosowanych w chromatografii gazowej. Oznacza to wykrywalność rzędu pikomoli oraz liniowość odpowiedzi w zakresie sześciu rzędów wielkości. Detektor taki powinien być również czuły na wszystkie analizowane związki, jednocześnie będą nieczuły na zmiany składu

i własności fazy ruchomej. Ostatnia własność umożliwia stosowanie technik gradientowych.

Detektory rozpatruje się z punktu widzenia szeregu kryteriów. Podstawowymi parametrami charakteryzującymi detektor są: liniowość odpowiedzi, poziom szumu, próg wykrywalności oraz rozmycie próbki.

Z analitycznego punktu widzenia najbardziej korzystna jest liniowa odpowiedź detektora. Oznacza to liniową zależność odpowiedzi detektora (wysokości lub pola powierzchni piksu), R od stężenia próbki c :

$$R = kc, \quad (7.1)$$

gdzie: k – czułość detektora.

Detektor taki dokładnie odwzorowuje kształt piksu. W rzeczywistości żaden detektor nie jest w pełni liniowy. Dlatego też ogólnie odpowiedź detektora opisuje równanie:

$$R = R_0 + kc^r, \quad (7.2)$$

gdzie: r – indeks odpowiedzi, a R_0 – sygnał resztkowy.

Prawdziwie liniowy detektor charakteryzuje się $r = 1$. W praktyce za liniowe uważa się detektory o indeksie odpowiedzi w granicach od 0,98 do 1,02. Często korzysta się również z detektorów o innym indeksie odpowiedzi, o ile jest ona znana i możliwa do elektronicznego lub komputerowego skorygowania. Detektory nieliniowe nie znajdują szerszego zastosowania.

Z zagadnieniem liniowości związany jest liniowy zakres dynamiki odpowiedzi, L_D . Zdefiniowany on jest jako zakres stężeń badanego związku, w którym odpowiedź detektora jest liniowa (dla założonego zakresu indeksu odpowiedzi). Odróżnić go należy od dynamiki odpowiedzi detektora, D_R , zdefiniowanej jako zakres stężeń próbki, dla którego odpowiedź detektora jest zależna od stężenia. Dolny zakres obu parametrów odpowiada stężeniu, dla którego odpowiedź detektora jest n razy większa od poziomu szumów (na ogół zakłada się $n = 3$). Górny zakres dynamiki odpowiedzi odpowiada stanowi nasycenia na krzywej kalibracyjnej. Z powyższych definicji wynika:

$$L_D \leq D_R. \quad (7.3)$$

Szumem detektora, N_L , nazywa się wszelką zmianę sygnału wyjściowego detektora, której nie można przypisać analizowanej próbce, tzn. przypadkowe sygnały przeszkadzające w pomiarze. Przyczyną szumu może być układ elektro-niczny, fluktuacje temperatury, napięcia zasilania, szybkości przepływu eluentu itp. Określa on w sposób pośredni wykrywalność detektora. W zależności od częstotliwości rozróżnia się szum wysokoczęstotliwościowy (poszerza on szerokość linii bazowej), niskoczęstotliwościowy i dryft. Najbardziej szkodliwy okazuje się drugi z szumów, o częstotliwościach zbliżonych do częstotliwościach zbliżonych do pików chromatograficznych, gdyż nie można go zlikwidować przy pomocy filtrów.

Minimalna ilość lub stężenie próbki powodujące rozróżnienie pików chromatograficznego od szumu (zazwyczaj przyjmuje się, że wysokość pików powinna być trzykrotnie większa od poziomu szumu) jest wykrywalnością (progiem wykrywalności), D_L , detektora. Termin ten dość często mylony jest z czułością, tangensem nachylenia krzywej kalibracyjnej:

$$k = h/c_i, \quad (7.4)$$

gdzie: c_i oznacza stężenie analizowanego związku, a h wysokość pików.

Obie te wielkości są ze sobą powiązane:

$$D_L = 3N_L/k. \quad (7.5)$$

Próbka podczas analizy ulega rozcieńczeniu na kolumnie:

$$c_{\max} = \frac{c_i v_i}{V_R} \sqrt{\frac{N}{2\pi}}, \quad (7.6)$$

gdzie: $c_{\max}$ – stężenie w maksimum pików, v_i – objętość wstrzykiwanej próbki.

Wysokość pików jest proporcjonalna do stężenia próbki w maksimum pików, $c_{\max}$, a stąd do ilości lub masy wstrzykiwanej próbki, $c_i v_i$. Dlatego też w tych wielkościach powinno się wyrażać wykrywalność. Jeśli czułość przedstawimy w postaci:

$$k = h/c_{\max}, \quad (7.7)$$

wówczas:

$$D_L(c_{\max}) = \frac{3N_L c_i v_i}{hV_R} \sqrt{\frac{N}{2\pi}}. \quad (7.8)$$

Czasami zamiast wykrywalności używa się pojęcia minimum detekcji, M_D . Odnosi się ono do wykrywalności wyznaczonej bez kolumny. Obie wielkości można porównać po uwzględnieniu rozcieńczenia próbki na kolumnie:

$$M_D = \frac{3N_L V_R}{k} \sqrt{\frac{2\pi}{N}}. \quad (7.9)$$

Z powyższych wzorów wynika, że na wykrywalność detektora ma wpływ, oprócz parametrów samego detektora, szereg parametrów charakteryzujących kolumnę i rozdzielanie. Generalnie większe rozmycie próbki i większa retencja pogarszają wykrywalność. Detektor i jego połączenia nie powinny wpływać na uzyskany na kolumnie stopień rozdzielania pasm. Całkowita wielkość poszerzenia strefy chromatograficznej jest sumą kilku udziałów i wyrażona jest za pomocą wariancji szerokości pików, σ^2 :

$$\sigma^2 = \sigma_i^2 + \sigma_k^2 + \sigma_p^2 + \sigma_d^2 + \sigma_w^2 + \sigma_r^2, \quad (7.10)$$

gdzie: kolejne wariancje odnoszą się do dozownika, kolumny, przewodów łączących, detektora, wzmacniacza i rejestratora.

Jeśli toleruje się 5% stratę zdolności rozdzielczej spowodowaną detektorem wówczas:

$$\sigma_k^2 + \sigma_d^2 = (1,05\sigma_k)^2. \quad (7.11)$$

Stąd:

$$\sigma_d^2 = 0,1025\sigma_k^2. \quad (7.12)$$

Oznacza to, że rozmycie pików w detektorze nie przekracza 10% rozmycia w kolumnie. Po pierwiastkowaniu otrzymuje się:

$$\sigma_d = 0,32\sigma_k. \quad (7.13)$$

Wariancję rozmycia na kolumnie opisuje:

$$\sigma_k = V_R/N^{1/2}. \quad (7.14)$$

Po podstawieniu równania 7.14 do 7.13 otrzymamy:

$$\sigma_d = 0,32V_R/N^{1/2}. \quad (7.15)$$

Wpływ na rozmycie pików w detektorze mają jego objętość oraz własności przepływu. Przyczyną tego rozmycia jest mieszanie się cieczy podczas jej przepływu przez detektor. Jego wielkość trudno jest określić ze względu na nieznaną dokładnego profilu przepływu cieczy. Z danych empirycznych wynika:

$$\sigma_d^2 = aV_d^2, \quad (7.16)$$

gdzie: V_d – objętość detektora, a – współczynnik proporcjonalności równy $1/12^{1/2}$ dla przepływu laminarnego i 1 dla przepływu turbulentnego (idealny mieszalnik).

Z równań 7.15 i 7.16 otrzymuje się zależność na maksymalną objętość detektora spełniającą warunek zawarty w równaniu 7.11:

$$V_d = bV_R/N^{1/2}, \quad (7.17)$$

gdzie: $b = 0,32 \div 1,11$.

Dla uproszczenia rozważań często przyjmuje się, że objętość detektora powinna być równa jednej dziesiątej objętości pików. Zakładając, że pik ma rozkład Gaussa:

$$V_p = 4\sigma_k = 4V_R/N^{1/2}, \quad (7.18)$$

gdzie: V_p – objętość pików.

Stąd:

$$V_d = 0,4V_R/N^{1/2}. \quad (7.19)$$

Z równania 7.19 wynika, że objętość detektora powinna być tym mniejsza, im bardziej sprawna jest kolumna i krótsza retencja. Zależy więc ona od wymiarów kolumny i złoża oraz szybkości przepływu eluentu. Rozmycie próbki zależy nie

tylko od objętości celki detektora, ale również od jej kształtu. Dla cienkich, długich rurek o promieniu, R_d , i długości L_d , wariację rozmycia opisuje równanie:

$$\sigma_d^2 = \frac{\pi R_d^4 L_d J}{24D}. \quad (7.20)$$

Z równań 7.19 i 7.20 otrzymuje się równanie:

$$R_d = \sqrt[4]{\frac{2,4DV_R^2}{\pi N J L_d}}, \quad (7.21)$$

Z którego wynika, że dla tej samej objętości detektora korzystniej jest stosować kapilary cieńsze i dłuższe.

Wariację wywołaną czasem relaksacji (τ), wzmacniacza detektora opisuje:

$$\sigma_d = \tau J. \quad (7.22)$$

Z równań 7.16 i 7.22 otrzymuje się równanie opisujące maksymalny czas relaksacji wzmacniacza detektora spełniającego warunek 7.11:

$$\tau = \frac{0,32V_R}{J\sqrt{N}}. \quad (7.23)$$

Ze względu na rodzaj odpowiedzi rozróżnia się detektory liniowe, całkowe i różniczkowe. Detektorem liniowym jest, jak sama nazwa wskazuje, detektor, którego sygnał wyjściowy jest wprost proporcjonalny do stężenia próbki.

Detektor może być czuły bądź na ilość, bądź na stężenie próbki. Oznacza to, że odpowiedź detektora może być pewną funkcją ilości próbki przepływającej przez niego na jednostkę czasu lub ilości próbki na jednostkę objętości fazy ruchomej.

Ponadto wyróżnia się dwie podstawowe grupy detektorów. Detektory działające na zasadzie różnicowego pomiaru własności wspólnej próbki i fazy ruchomej oraz detektory działające na zasadzie pomiaru własności charakterystycznej tylko dla próbki. Oczywiście klasyfikacja nie jest ścisła i niektóre typy detektorów mogą należeć raz do jednej raz do drugiej grupy w zależności od

aktualnych warunków chromatograficznych. Do pierwszej grupy detektorów zalicza się detektor refraktometryczny, dielektryczny, konduktometryczny, densometryczny, viskozymetryczny czy przewodnictwa cieplnego. Detektory te charakteryzują się ograniczoną wykrywalnością, bezpośrednio związaną z zasadą ich działania. Z tego powodu odznaczają się również ograniczonym zakresem dynamiki liniowej, zwykle niższym niż dwa rzędy wielkości. Ich potencjalny zakres dynamiki jest duży, lecz ograniczony z powodu ich słabej wykrywalności. Detektory te są czułe na zmiany temperatury, szybkości przepływu i składu fazy ruchomej. Są one dodatkiem do innych detektorów, gdy wystarczająca jest słaba wykrywalność, a korzystna duża uniwersalność. Ponadto znajdują częste zastosowanie w chromatografii preparatywnej, gdzie duże stężenia próbek przekraczają zakres normalnych detektorów. Do drugiej grupy detektorów zalicza się detektor fotometryczny, fluorometryczny, polarograficzny, radiochemiczny, fotoakustyczny czy spektroskopii atomowej. Charakteryzują się one z reguły lepszą wykrywalnością i szerszym zakresem dynamiki liniowej [5].

Literatura

- [1] Tiselius, D. Glaesson, *Arkiv. Kemi Mineral. Geol.*, 15B (No. 18) 1942.
- [2] R.P. Scott, *Liquid Chromatography Detectors*, Elsevier, Amsterdam 1977.
- [3] B.K. Głód, w *Wprowadzenie do wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, Wyd. IChF-PAN, Warszawa 1992.
- [4] N.A. Parris, *Instrumental Liquid Chromatography*, Journal Chromatography Library 5, Elsevier, Amsterdam 1976.
- [5] *Chromatografia cieczowa*, M.A. Kamiński, R. Kartanowicz, red. Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Gdańsk 2004.

Summary

Basics of the high performance liquid chromatography

The monograph describes the basics of the high performance liquid chromatography (HPLC). The book was based mainly on lectures at the Siedlce University of Natural Sciences and Humanities. It discusses the fundamentals of chromatography including its history (containing chromatographs produced in Poland), the mechanism of the process (explaining why different substances move at different speeds along a chromatographic column or plate) and the division of chromatographic techniques. Then, the mechanism of the process was discussed based on the theory of chromatographic plate, mass balance equation in flow systems and empirical description (van Deemter equation). The next chapter discusses the basic chromatographic parameters and relationships between them, and derivation of the Purnell equation. Finally, the construction of the chromatographic apparatus is briefly discussed.

Keywords:

chromatography, high performance liquid chromatography, retention, elution, stationary/mobile phase, van Deemter equation

