

Walenty Szczępaniak
"Metody instrumentalne
w analizie chemicznej,"

PWN 2010,

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII LEKÓW
adiunkt

dr Jadwiga Maniewska

ROZDZIAŁ 14

Wprowadzenie do metod chromatograficznych

Związki chemiczne występują w przyrodzie w postaci mieszanin i w takiej też postaci są najczęściej otrzymywane drogą syntezy. Zagadnienie rozdzielania mieszanin związków chemicznych jest więc podstawowym problemem nauk chemicznych. W procesie rozdzielania mieszanin wykorzystuje się różne właściwości fizyczne, fizykochemiczne i chemiczne rozdzielalnych składników. Opracowano wiele metod rozdzielania substancji, i to zarówno na skalę mikro, jak i na skalę makro. Do metod tych należą także metody chromatograficzne. Chromatografia jest metodą rozdzielania mieszanin, w której rozdzielane składniki ulegają podziałowi między dwie fazy, z których jedna jest fazą **nieruchomą (stacjonarną)**, a drugą **fazą ruchomą (mobilną)** układu chromatograficznego. Fazą stacjonarną może być ciało stałe, ciecz na nośniku lub żel, a fazą ruchomą — gaz, ciecz i gaz lub ciecz w stanie nadkrytycznym (fluid). Zdefiniowanie chromatografii jako metody rozdzielania, nie oddaje w pełni możliwości jej zastosowań. Należy dodać, że jest to nie tylko metoda rozdzielania, ale i analizy (jakościowej i ilościowej) mieszanin. Obecnie chromatografia jest najbardziej rozpowszechnioną metodą analityczną i w połączeniu z metodami spektroskopowymi stwarza szerokie możliwości analizy skomplikowanych mieszanin, w szczególności związków organicznych.

14.1. Klasyfikacja metod chromatograficznych

Metod chromatograficznych jest wiele i można je klasyfikować według różnych kryteriów. Podstawę klasyfikacji metod chromatograficznych mogą stanowić:

1) Stan skupienia fazy ruchomej

Wyróżnić tu można:

- chromatografię gazową,
- chromatografię cieczową,
- chromatografię fluidalną.

2) Stan skupienia fazy stacjonarnej

Fazą stacjonarną może być ciecz na nośniku lub ciało stałe. Można zatem wyróżnić chromatografię w układzie:

- gaz–ciecz (ang. *gas-liquid chromatography* — GLC)
- ciecz–ciecz (ang. *liquid-liquid chromatography* — LLC)
- gaz–ciało stałe (ang. *gas-solid chromatography* — GSC)
- ciecz–ciało stałe (ang. *liquid-solid chromatography* — LSC)

Ciało stałe może mieć różny charakter. Może to być adsorbent, wymieniacz jonowy lub sito molekularne. Stąd wynikają nowe podziały związane z naturą zjawisk stanowiących podstawę procesu chromatograficznego.

3) Natura zjawisk będących podstawą procesu chromatograficznego

Zjawiska decydujące o procesie rozdzielania chromatograficznego mają różny charakter i należą do oddziaływań na granicy faz. W procesach chromatograficznych są wykorzystywane: adsorpcja, podział substancji między dwie nie mieszające się ciecz, wymiana jonowa, powinowactwo chemiczne, a także efekty sitowe. W ten sposób można wyróżnić:

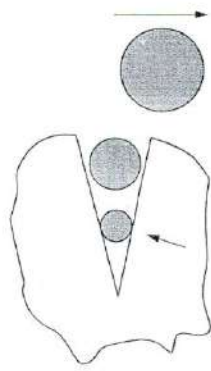
- Chromatografię adsorpcyjną.** Rozdzielanie mieszanin jest uwarunkowane różnym powinowactwem adsorpcyjnym składników mieszaniny do odpowiednio dobranej powierzchni fazy stacjonarnej, zwanej **adsorbentem**.

- Chromatografię podziałową.** Rozdzielanie mieszanin jest oparte na różnicach w wartościach współczynnika podziału składników mieszaniny między dwie nie mieszające się fazy, z których jedna jest fazą stacjonarną (ciecz) osadzoną na nośniku, a drugą fazą ruchomą (ciecz, fluid, gaz).

- Chromatografię jonowymienną.** Podstawę rozdzielania stanowią reakcje wymiany jonowej między jonami z roztworu a jonami związanymi z fazą stacjonarną, którą stanowią jony. **Jonity** są to nierozpuszczalne substancje wielocząsteczkowe o budowie jonowej, zdolne do wymiany jonów w myśl reakcji:



Reakcja (14.1) jest to reakcja wymiany kationów, a jonit nazywa się **kationitem**, natomiast reakcja (14.2) jest reakcją wymiany anionów, a jonit nazywa się **anionitem**. Indeks „j” oznacza fazę jonitu, a indeks „r” fazę roztworu.



Rys. 14.1. Mechanizm sączenia molekularnego

- Chromatografię sitową** (sączenie molekularne — chromatografia żelowa). W chromatografii żelowej o rozdzielaniu substancji decydują rozmiary cząstek. Wypełnienie kolumn stanowią żele o zdefiniowanych średnicach porów, zbliżonych do rozmiarów cząstek analizowanych substancji. W kolumnie wypełnionej takim żelem substancje rozdzielane, o dużych rozmiarach cząstek, większych od średnicy porów wypelnienia,

przesuwają się wzdłuż kolumny i przechodzą do wycieku (nie penetrują ziaren wypelnienia). Natomiast cząsteczki o małych rozmiarach wnikają w pory żelu. Im mniejsze są rozmiary cząstek, tym głębiej penetrują one ziarna żelu, a tym samym wolniej migrują wzdłuż kolumny. Rozdzielanie zachodzi zatem na skutek różnicy mas cząsteczkowych rozdzielanych związków. Mechanizm rozdzielania przedstawiono na rys. 14.1.

4) Techniki eksperymentalne

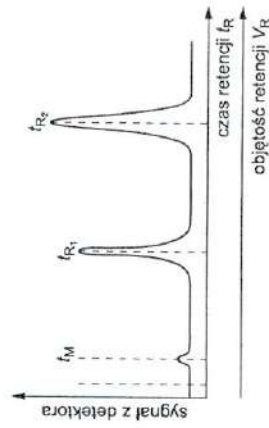
Proces chromatografowania prowadzi się można:

- techniką kolumnową, stosowaną we wszystkich metodach chromatograficznych;
- techniką planarną, możliwą tylko w chromatografii cieczowej, którą dzieli się na chromatografię cienkowarstwową i bibułową.

14.2. Podstawy teoretyczne procesu chromatograficznego

14.2.1. Podstawowe pojęcia i definicje

Podstawowymi pojęciami w chromatografii są parametry retencyjne. Rozdzielanie składników mieszanin metodami chromatograficznymi prowadzi się najczęściej techniką elucyjną (wymywania). Jak wspomniano wyżej, od góry kolumny wprowadza się próbkę analizowanej mieszaniny, a następnie przepuszcza się fazę ruchomą (gaz, ciecz, gaz w stanie nadkrytycznym), która gra rolę czynnika wymywającego. Efekt rozdzielania chromatograficznego jest wykreślany w postaci **krzywej elucji** (czyli **chromatogramu**). Chromatogram przedstawia wykres zależności wskaźnika czasu od czasu lub objętości fazy ruchomej. Typowy chromatogram mieszaniny dwuskładnikowej przedstawiono na rys. 14.2.



Rys. 14.2. Chromatogram elucyjny

Całkowity czas retencji t_R danego składnika to czas liczony od momentu wprowadzenia próbki (iniekcji) do momentu pojawienia się na chromatogramie maksimum pików, tzn. do momentu pojawienia się na wyjściu z kolumny maksymalnego stężenia wymywanego związku. **Całkowita objętość retencji** V_R danego składnika to objętość fazy ruchomej potrzebna do wymycia składnika, mierzona od momentu wprowadzenia próbki do momentu pojawienia się na chromatogramie maksimum danego pików:

$$V_R = F_0 t_R \quad (14.3)$$

gdzie F_0 oznacza objętościową prędkość wypływu fazy ruchomej z kolumny (w cm^3/min).

Zerowy czas retencji t_M to czas przebywania w kolumnie substancji, która nie oddziałuje z fazą stacjonarną (w chromatografii gazowej np. He). Zerową objętość retencji otrzymujemy ze wzoru:

$$V_M = F_0 t_M \quad (14.4)$$

Zredukowany czas retencji t'_R jest różnicą między całkowitym czasem retencji i zerowym czasem retencji

$$t'_R = t_R - t_M \quad (14.5)$$

podobnie zredukowana objętość retencji V'_R

$$V'_R = V_R - V_M \quad (14.6)$$

Zredukowany czas retencji i zredukowana objętość retencji charakteryzują zatrzymywanie się próbki na fazie stacjonarnej i są wielkościami charakterystycznymi dla danej substancji.

Względny czas retencji jest równy

$$t_{i,w} = \frac{t'_{R_i}}{t'_{R_w}} \quad (14.7)$$

gdzie indeks „ i ” oznacza dowolną substancję, a „ w ” substancję wzorcową.

Współczynnik retencji k (określany dawniej jako współczynnik pojemnościowy kolumny) zdefiniowany jest wzorem:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (14.8)$$

lub

$$k = \frac{\text{liczba moli X w fazie stacjonarnej}}{\text{liczba moli X w fazie ruchomej}} = \frac{n_s}{n_m} = \frac{c_s V_s}{c_m V_m} \quad (14.9)$$

gdzie: c_s, c_m — stężenie składnika X w fazie stacjonarnej i ruchomej; V_s, V_m — objętość fazy stacjonarnej i ruchomej.

Współczynnik selektywności α jest zdefiniowany jako

$$\alpha = \frac{t'_{R_B} - t_M}{t'_{R_A} - t_M} = \frac{k_B}{k_A} \quad (14.10)$$

t'_{R_A}, t'_{R_B} — czasy retencji substancji A i B, k_A, k_B — współczynniki retencji substancji A i B.

Zdolność rozdzielcza kolumny R_s jest wyrażona wzorem:

$$R_s = 2 \frac{t'_{R_2} - t'_{R_1}}{w_1 + w_2} \quad (14.11)$$

gdzie: t'_{R_1}, t'_{R_2} są to czasy retencji składników 1, 2, w_1, w_2 — szerokości pików mierzone przy podstawie. Istnieje zależność między zdolnością rozdzielczą kolumny R_s a współczynnikiem retencji k , względną retencją, czyli współczynnikiem selektywności

α i liczbą pólek teoretycznych N odniesionych do drugiego składnika (pojęcie pólki teoretycznej zdefiniowano w p. 14.2.4):

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) (N_2)^{\frac{1}{2}} \quad (14.12)$$

Indeks retencji dowolnej chromatografowanej substancji X wyznacza się w stosunku do retencji n -alkanów, jednego o z atomach węgla w cząsteczce, eluowanego z kolumny przed substancją, i drugiego o $(z+1)$ atomach węgla w cząsteczce, eluowanego z kolumny po substancji, czyli $t'_{R_z} < t'_{R_{z+1}} < t'_{R_{z+1}}$. Indeks retencji n -alkanu uzyskuje się, mnożąc liczbę atomów węgla przez 100, czyli np. dla n -pentanu indeks retencji wynosi 500, a dla n -oktanu 800.

Indeks retencji Kovátsa dla substancji X obliczamy według wzoru:

$$I_X = 100z + 100 \frac{\log t'_{R_X} - \log t'_{R_z}}{\log t'_{R_{z+1}} - \log t'_{R_z}} \quad (14.13)$$

14.2.2. Podstawy teoretyczne

Zjawiska decydujące o rozdzielaniu chromatograficznym mają różny charakter, dlatego poszczególne metody chromatograficzne oparte są na różnych podstawach teoretycznych. W przypadku chromatografii jonowymiennej i chromatografii powinowactwa u podstaw rozważań teoretycznych są stałe równowagi reakcji chemicznych, a w przypadku chromatografii sitowej — efekty związane z rozmiarami cząsteczek. Uniwersalny charakter ma chromatografia podziałowa, oparta na podziale substancji między dwie nie mieszające się fazy, i chromatografia adsorpcyjna. Poniższe uwagi dotyczą tych dwóch metod chromatograficznych.

Podstawą rozdzielania chromatograficznego jest fakt, że poszczególne składniki próbki w niejednakowym stopniu ulegają podziałowi między dwie nie mieszające się fazy — fazę ruchomą [gaz, ciecz, gaz (ciecz) w stanie nadkrytycznym] i stacjonarną (ciecz). Prędkość poruszania się składników próbki w kolumnie u_x jest funkcją podziału tych składników w dwu pozostających w stanie równowagi fazach, przy czym składniki wykazujące większe powinowactwo do fazy stacjonarnej poruszają się wolniej niż składniki wykazujące większe powinowactwo do fazy ruchomej. A zatem rozdzielanie jest wynikiem różnych szybkości migracji, spowodowanej różnymi wartościami współczynnika podziału K .

Współczynnik podziału można wyrazić równaniem Nernsta:

$$K = \frac{c_s}{c_m} \quad (14.14)$$

w którym c_s i c_m oznaczają stężenie substancji X w fazie stacjonarnej i ruchomej. A zatem substancja X porusza się wzdłuż kolumny wolniej (u_x) aniżeli faza ruchoma (u_m), a stosunek tych dwóch szybkości nosi nazwę **współczynnika spowolnienia R** :

$$R = \frac{u_x}{u_m} \quad (14.15)$$

zastępczy próbkę poruszają się wzdłuż kolumny tylko wtedy, gdy są w fazie ruchomej. Ilość szybkość poruszania się próbki zależy od liczby cząsteczek w fazie ruchomej możemy napisać:

$$R = \frac{\text{zawartość próbki w fazie ruchomej}}{\text{zawartość próbki w fazie ruchomej} + \text{zawartość próbki w fazie stacjonarnej}} \quad (14.16)$$

przyjmując, że n_s i n_m oznaczają liczbę moli próbki w fazie stacjonarnej i ruchomej, możemy napisać:

$$R = \frac{n_m}{n_m + n_s} = \frac{1}{1 + n_s/n_m} \quad (14.17)$$

losunek n_s/n_m jest to zdefiniowany wcześniej (14.9) współczynnik retencji k , a zatem:

$$R = \frac{1}{1 + k} \quad (14.18)$$

atem po przekształceniu równ. (14.15) otrzymujemy

$$u_m = u_x(1 + k) \quad (14.19)$$

ła kolumny długości L prędkość u_x poruszania się próbki X wynosi L/t_R , gdzie t_R to czas retencji, a zatem

$$u_x = \frac{L}{t_R} \quad u_m = \frac{L}{t_M} \quad (14.20)$$

o podstawieniu tych wartości do równania (14.19) otrzymujemy

$$\frac{L}{t_M} = \frac{L}{t_R}(1 + k) \quad (14.21)$$

$$t_M = t_R(1 + k) \quad (14.22)$$

iczbę moli n_s i n_m można wyrazić równaniami:

$$n_s = c_s V_s \quad (14.23)$$

$$n_m = c_m V_m \quad (14.24)$$

ę c_s i V_m są to objętości fazy stacjonarnej i ruchomej, czyli

$$k = \frac{n_s}{n_m} = \frac{c_s V_s}{c_m V_m} \quad (14.25)$$

powieważ

$$\frac{c_s}{c_m} = K \quad (14.26)$$

$$k = K \frac{V_s}{V_m} \quad (14.27)$$

o podstawieniu tych wartości do równania (14.22) otrzymujemy

$$t_R = t_M \left(1 + K \frac{V_s}{V_m} \right) \quad (14.28)$$

Po podstawieniu za t_M z równania (14.28) $\frac{L}{u_m}$ równanie to można przedstawić także w postaci

$$t_R = \frac{L}{u_m} \left(1 + K \frac{V_s}{V_m} \right) \quad (14.29)$$

Czas retencji można zastąpić objętościami retencji i otrzymamy równanie

$$V_R = V_m \left(1 + K \frac{V_s}{V_m} \right) \quad (14.30)$$

lub

$$V_R = V_m + K V_s \quad (14.31)$$

Jest to podstawowe równanie chromatografii podziałowej, łączące objętość retencji próbki V_R , objętość fazy stacjonarnej V_s i ruchomej V_m z funkcją termodynamiczną, jaką jest współczynnik podziału K . Z przedstawionych równań wynika, że:

- 1) Wzrost wartości współczynnika podziału K powoduje wzrost czasu retencji t_R .
- 2) Wzrost objętości fazy stacjonarnej V_s powoduje wzrost czasu retencji t_R . Zmiana objętości fazy stacjonarnej V_s wykorzystuje się np. w chromatografii gazowej do regulacji czasu retencji. Objętość fazy stacjonarnej w stosunku do nośnika wynosi najczęściej 10% mas. Gdy chcemy wydłużyć czas retencji dla związków bardzo lotnych (na przykład rozdzielanie propanu i butanu), możemy zwiększyć objętość fazy stacjonarnej do 25% mas. Natomiast dla związków o długich czasach retencji (np. rozdział steroidów na fazach trypitylosililowych) można czas retencji skrócić, redukując objętość fazy stacjonarnej do 3% mas.

- 3) Czas retencji t_R zależy także od prędkości przepływu fazy ruchomej u_m . Zwiększenie prędkości przepływu fazy ruchomej powoduje skrócenie czasu retencji, gdyż czas t_R jest odwrotnie proporcjonalny do u_m

$$t_R \propto \frac{1}{u_m}$$

- 4) Czas retencji t_R zależy od długości kolumny L .

W przypadku chromatografii adsorpcyjnej zamiast współczynnika podziału występują oddziaływania próbki z powierzchnią adsorbenta. Dlatego równanie (14.31) przybiera postać:

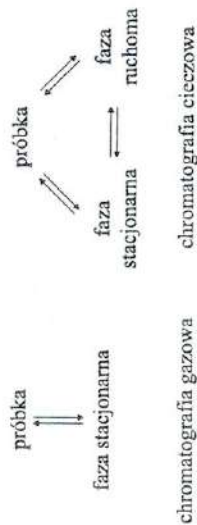
$$V_R = V_m + A K_A \quad (14.32)$$

gdzie A jest wielkością powierzchni adsorbenta, a K_A — współczynnikiem adsorpcji. O ile powierzchnię adsorbenta łatwo wyznaczyć, o tyle ściśle określenie współczynnika adsorpcji następuje trudności, gdyż wartość jego zależy od obecności różnych centrów adsorpcyjnych, trudnych do matematycznego określenia.

14.2.3. Oddziaływania międzycząsteczkowe

Zrozumienie zjawisk towarzyszących retencji próbki w procesie chromatograficznym łączy się ze zrozumieniem natury sił działających między cząsteczkami próbki a cząsteczkami fazy stacjonarnej i ruchomej. Te oddziaływania mają inny charakter

w przypadku chromatografii gazowej i chromatografii cieczerwowej, jak to przedstawiają schematy:



Można wyróżnić następujące rodzaje oddziaływań między cząsteczkami:

- 1) Siły kulombowskie występujące między jonami. Są to silne oddziaływania występujące głównie w chromatografii jonowymiennej.
- 2) Siły wynikające z oddziaływań między cząsteczkami mającymi trwałe moment dipolowy (oddziaływanie dipol-dipol).
- 3) Siły wynikające z oddziaływań między cząsteczkami o trwałym momencie dipolowym i cząsteczkami, w których dipol jest indukowany przez sąsiadujące cząsteczki (oddziaływanie dipol-dipol indukowany).
- 4) Siły wynikające z oddziaływań między jonami i cząsteczkami z indukowanym przez jony dipolem (oddziaływanie jon-dipol indukowany).
- 5) Siły oddziaływań między obojętnymi atomami lub cząsteczkami (siły dyspersyjne). Siły dyspersyjne pojawiają się jako skutek wzajemnego oddziaływania poruszających się elektronów dwóch sąsiednich układów elektronowych. Siły dyspersyjne występują we wszystkich cząsteczkach, a w przypadku połączeń niepolarnych jedynie te siły powodują oddziaływanie międzycząsteczkowe.
- 6) Oddziaływania związane z tworzeniem wiązań wodorowych. Jest to specjalna forma oddziaływań typu dipol-dipol. Występuje między wodorem a atomem elektroujemnym, np. O, N, F (rys. 14.3). Oddziaływania typu 2, 3 i 5 często określamy wspólnym terminem oddziaływania van der Waalsa.



Rys. 14.3. Tworzenie wiązania wodorowego

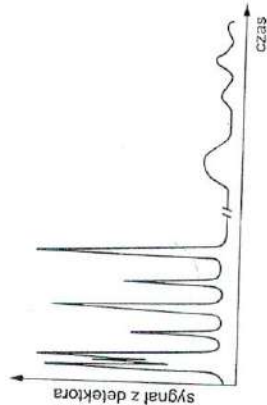
- 7) Oddziaływania donorowo-akceptorowe (ang. *charge transfer*), które występują pomiędzy składnikami zawierającym układ π -elektronowy i wykazującym niewielką energię jonizacji a drugim składnikiem układu o dużym powinowactwie do elektronu (na przykład kationem metalu przejściowego).

Oddziaływania międzycząsteczkowe powodują, że rozdzielane substancje w różnym stopniu są zatrzymywane przez fazę stacjonarną. A zatem większe powinowactwo substancji do fazy stacjonarnej skutkuje większą wartością współczynnika podziału K lub wyższą wartością współczynnika adsorpcji K_A i stąd późniejsze opuszczenie kolumny przez tę substancję, czyli większa wartość jej czasu retencji t_R .

14.2.4. Jakość rozdzielania chromatograficznego

Na rysunku 14.4 przedstawiono typowy chromatogram złożonej mieszaniny i widzimy, że:

- na początku chromatogramu piki są ostre, ale nie rozdzielone,
- w miarę wzrostu czasu retencji piki są ostre i rozdzielone,
- przy dalszym wzroście t_R piki są rozdzielone, ale rozmyte.

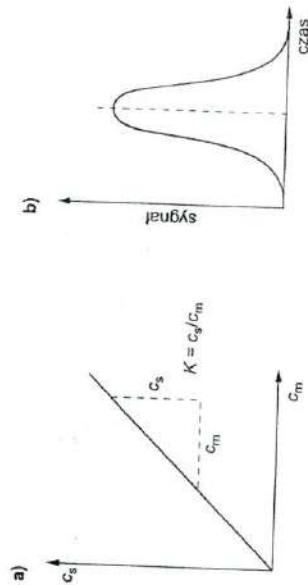


Rys. 14.4. Zależność kształtu piku od czasu retencji

Z analitycznego punktu widzenia najbardziej interesują nas piki całkowicie rozdzielone i ostre. O jakości rozdzielania chromatograficznego decyduje wiele czynników, ale szczególnie należy zwrócić uwagę na: kształt izoterm sorpcji i sprawność kolumny.

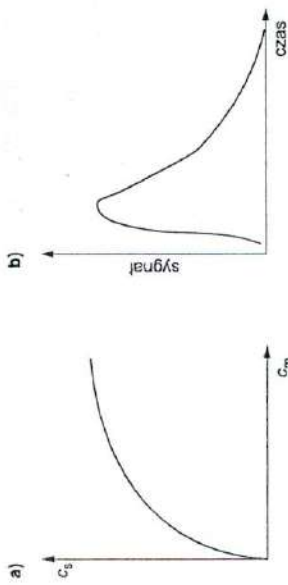
14.2.4.1. Izoterm sorpcji a kształt pików chromatograficznych

Izoterm sorpcji przedstawiają zależność między stężeniem sorbatu (substancji chromatografowanej) w fazie stacjonarnej c_s i stężeniem sorbatu w fazie ruchomej c_m . Można wyróżnić trzy przypadki:



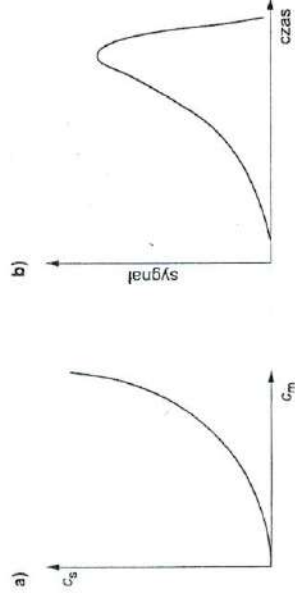
Rys. 14.5. Liniowa izoterma sorpcji (a) i odpowiadający jej symetryczny kształt piku chromatograficznego (b)

- 1) Izoterma jest liniowa (rys. 14.5), wówczas kształt piku jest symetryczny i przyjmuje postać krzywej dzwonowej Gaussa.

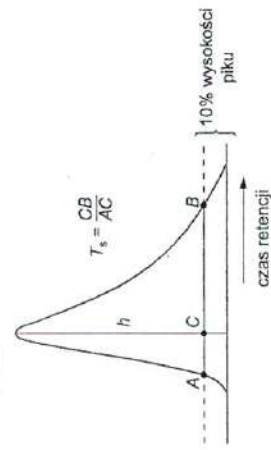


Rys. 14.6. Izoterma sorpcji typu Langmuira (a) i odpowiadający jej kształt piku chromatograficznego (b)

- 2) Izoterma sorpcji jest typu izotermy Langmuira (rys. 14.6) i wówczas pik chromatograficzny jest niesymetryczny, ma ostre „czoło” i rozmyte „ogon”.
- 3) Izoterma sorpcji jest typu antyLangmuirskiego (rys. 14.7) i wówczas pik chromatograficzny jest niesymetryczny, ma rozmyte „czoło” i ostry „ogon”.



Rys. 14.7. Izoterma sorpcji typu antyLangmuirskiego (a) i odpowiadający jej kształt piku chromatograficznego (b)



Rys. 14.8. Asymetryczność piku

Asymetryczność piku T_s określa się za pomocą współczynnika asymetryczności A_s , tak jak to przedstawiono na rys. 14.8.

14.2.4.2. Sprawność kolumn chromatograficznych

O tym, czy pik chromatograficzny jest ostry, czy też rozmyty, decyduje tzw. sprawność kolumny. Natomiast o sprawności kolumny mówi tzw. **wysokość równoważna półce teoretycznej (WRPT)** [ang. *height equivalent to a theoretical plate (HETP)*]. Pojęcie to wprowadzono w tzw. teorii półtek w procesie chromatograficznym. Przez pojęcie **półki teoretycznej** należy rozumieć objętość kolumny, w której zostaje osiągnięty stan równowagi między stężeniami substancji chromatografowanej w fazie ruchomej i nieruchomej. Kolumna chromatograficzna składa się z N hipotetycznych półtek teoretycznych, czyli

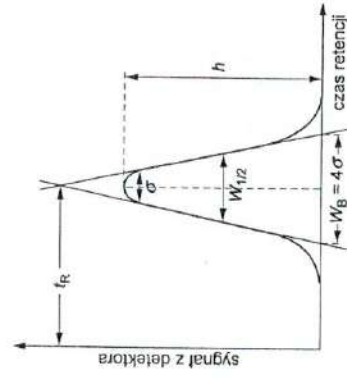
$$L = NH \quad (14.33)$$

gdzie L oznacza długość kolumny, H (czyli WRPT) — wysokość równoważną półce teoretycznej. Zatem N można obliczyć ze wzoru:

$$N = \frac{L}{H} \quad (14.34)$$

Po wprowadzeniu substancji na „pierwszą półkę” kolumny ulega ona podziałowi między fazę ruchomą i stacjonarną, zgodnie z wartością współczynnika podziału K . Rozkład stężeń substancji chromatografowanej po przejściu przez N kolejnych półtek stanowiących kolumnę opisuje funkcja:

$$y = h \cdot \exp \left[-\frac{(x - m)^2}{2\sigma^2} \right] \quad (14.35)$$



Rys. 14.9. Wyznaczenie liczby półtek teoretycznych N z kształtu piku

gdzie h to wysokość piku, σ — parametr kształtu krzywej, zwany też odchyleniem standardowym krzywej, m — współczynnik położenia krzywej ($m = t_R$), x — dowolny czas retencji. Wykresem tej funkcji jest krzywa Gaussa przedstawiona na rys. 14.9. Liczbę półtek teoretycznych, czyli sprawność kolumny, można z tego wykresu obliczyć

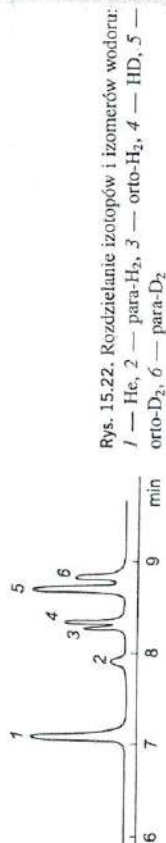
się nawet z kilkuset składników. Metoda chromatografii gazowej znalazła szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach chemii. Stosuje się ją do:

- 1) Identyfikacji związków, w tym lotnych substancji nieorganicznych i szerokiej gamy lotnych związków organicznych.
- 2) Ilościowego oznaczania składników w próbce.
- 3) Kontroli procesów technologicznych — jest podstawowym elementem układu automatyzacji procesów technologicznych.
- 4) Wyznaczenia niektórych stałych fizykochemicznych, np. współczynników aktywności, entalpii i ciepła właściwego roztworów, masy molowej, współczynników dyfuzji roztworów, ciepła i entropii adsorpcji, powierzchni właściwych ciał stałych, stałych równowagi różnych reakcji chemicznych.
- 5) Badań kinetyki reakcji katalitycznych.

Chromatografia gazowa największe sukcesy odnosi w analizie związków organicznych i umożliwia:

- a) analizę lotnych związków organicznych, których temperatury wrzenia nie przekraczają 400°C;
- b) analizę substancji trudno lotnych bądź nielotnych (polimery) z zastosowaniem technik specjalnych, np. pirolitycznej chromatografii gazowej.

Wysoka sprawność metod GC pozwala na rozdzielanie bardzo skomplikowanych mieszanin. Metodą GC można rozdzielić każdą mieszaninę, o ile jej składniki różnią się chociażby jednym mało istotnym parametrem. Na rysunku 15.22 przedstawiono dla przykładu rozdzielanie izotopów i izomerów wodoru.



Rys. 15.22. Rozdzielanie izotopów i izomerów wodoru: 1 — He, 2 — para-H₂, 3 — orto-H₂, 4 — HD, 5 — orto-D₂, 6 — para-D₂

Metodą GC rozdzielono także izomery optyczne różnych klas związków, w tym np. izomery optyczne aminokwasów. We współczesnych laboratoriach analitycznych chromatografy gazowe należą do najczęściej używanych przyrządów i to zarówno w laboratoriach przemysłowych, jak i np. w laboratoriach związanych z kontrolą żywności czy z kontrolą zanieczyszczeń środowiska. W tej właśnie dziedzinie chromatografia gazowa odniosła wiele spektakularnych sukcesów. Do takich można zaliczyć np. analizę pozostałości pestycydów w wodach, w żywności i w glebie, analizę polichlorobifenyli, a także opracowanie metod oznaczania w środowisku bardzo toksycznych substancji, jakimi są chlorowane dibenzo-*p*-dioksyny i chlorowane dibenzofurany.

ROZDZIAŁ 16

Wysokosprawną chromatografia cieczowa

Najstarsza z metod chromatograficznych, klasyczna kolumnowa chromatografia cieczowa, przeżywa obecnie swój renesans dzięki nowym rozwiązaniom, skracającym czas analizy i zwiększającym zdolność rozdzielczą. Nazwa chromatografia cieczowa obejmuje te metody, w których fazą ruchomą jest ciecz. W zależności od rodzaju fazy stacjonarnej wyróżniamy:

- 1) Chromatografię ciecz-ciało stałe (LSC).
- 2) Chromatografię ciecz-ciecz (LLC); ta technika jest rzadko stosowana ze względu na wzajemną rozpuszczalność cieczy. Dlatego stosowana jest odmiana tej techniki, w której cieka faza stacjonarna jest chemicznie związana z nośnikiem (ang. *bonded phases*). Ten rodzaj chromatografii odgrywa dominującą rolę i ocenia się, że 75% wszystkich rozdzielonych metodą HPLC wykonywanych jest na tych fazach.
- 3) Chromatografię jonowymienną (IC).
- 4) Chromatografię żelową.
- 5) Chromatografię powinowactwa.

Współczesną chromatografię cieczową określamy w różny sposób:

- wysokosprawną chromatografię cieczową (ang. *high performance liquid chromatography* — HPLC),
- wysokociśnieniową chromatografię cieczową (ang. *high pressure liquid chromatography* — HPLC),
- szybka chromatografia cieczowa (ang. *high speed liquid chromatography*),
- chromatografia cieczowa o dużej zdolności rozdzielczej (ang. *high-resolution liquid chromatography*).

Określenia te uwypuklają najistotniejsze cechy współczesnej chromatografii cieczowej, którymi są: wysoka sprawność, dobra rozdzielczość, duża szybkość procesu i stosowanie wysokich ciśnień. Te korzystne parametry współczesnej chromatografii cieczowej (HPLC) osiągnięto dzięki instrumentacji metody i wprowadzeniu nowych faz stacjonarnych. Współczesna HPLC, wprowadzona w 1960 r., okazała się nieprzejętą rozwijającą się techniką chromatograficzną i znalazła szerokie zastosowanie w analizie preparatów farmaceutycznych, w analizie biochemicznej, klinicznej i środowiskowej.

W tabelicy 16.1 zestawiono niektóre parametry charakteryzujące klasyczną chromatografię cieczową (LC), chromatografię gazową (GC) i HPLC.

Tablica 16.1. Zestawienie niektórych parametrów GC, LC, HPLC

Parametr	Chromatografia		
	GC	LC	HPLC
Średnica ziaren wypełnienia kolumny [μm]	200	75-600	5-50
Długość kolumny [cm]	50-1600	10-100	10-35
Średnica kolumny z wypełnieniem [cm]	0,1-0,6	2-5	0,1-0,2
Cisnienie wejściowe kolumny [MPa]	1	0,1	2-34
Sprawność kolumny [liczba półek/m]	10^2-10^4	2-50	10^3-10^5
Masa próbki [g]	$10^{-14}-10^{-6}$	0,1-10	$10^{-8}-10^{-2}$
Czas analizy	od kilku s do kilkunastu min	1-20 h	1-60 min

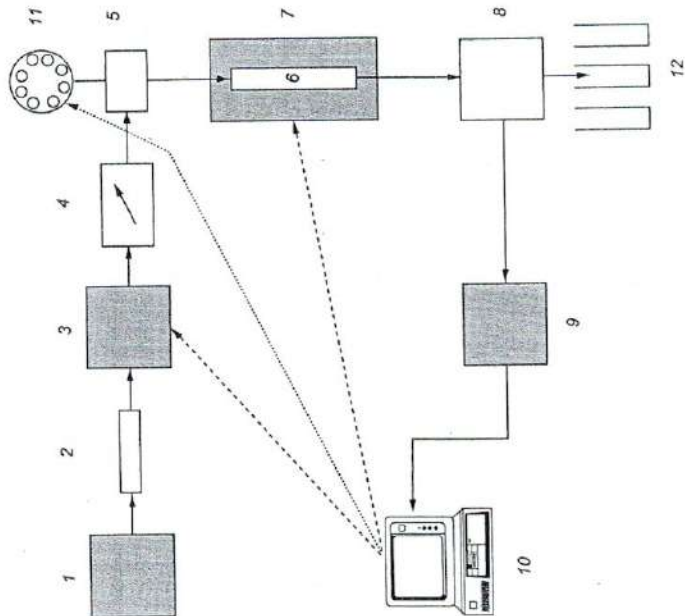
16.1. Aparatura

W klasycznej kolumnowej chromatografii cieczowej posługujemy się kolumnami szklanymi, a wyciek analizujemy za pomocą konwencjonalnych metod analizy. Analizę mieszanin techniką HPLC wykonujemy przy użyciu chromatografów cieczowych. W urządzeniach tych fazę ruchomą ze zbiornika (lub zbiorników) pompuje się (po filtracji i odgazowaniu) przez kolumnę chromatograficzną. Analizowaną próbkę wstrzykuje się na szczyt kolumny. Składniki próbki rozdzielają się w kolumnie i na wyjściu z niej są wykrywane przez detektor. Sygnał z detektora jest zapisywany na taśmie rejestratora oraz (lub) mierzony integratorem i przekazywany w postaci zapisu cyfrowego. Jest też komputerowa obróbka danych. Ideowy schemat chromatografu cieczowego przedstawia rys. 16.1. Podstawowe części chromatografu cieczowego to:

- 1) zbiornik (zbiorniki) fazy ruchomej,
- 2) filtr,
- 3) pompa,
- 4) manometr,
- 5) dozownik,
- 6) kolumna,
- 7) termostat,
- 8) detektor,
- 9) wzmacniacz,
- 10) rejestrator, komputer,
- 11) automatyczny dozownik.

16.1.1. Zbiorniki fazy ruchomej

Są to najczęściej butle szklane służące do przechowywania fazy ruchomej. Czyszczenie wbudowane są w pompy, np. w przypadku pomp sizykawkowych. Zaopatrzone są w układ filtracyjny z filtrami o średnicy poniżej $0,5 \mu\text{m}$, układ odgazowania umożliwiający usuwanie powietrza (tlenu) przez ultrasonifikację, gotowanie lub przepłukiwanie helem.



Rys. 16.1. Schemat blokowy chromatografu cieczowego; 1 — zbiornik fazy ruchomej, 2 — filtr, 3 — pompa, 4 — manometr, 5 — dozownik, 6 — kolumna, 7 — termostat, 8 — detektor, 9 — wzmacniacz, 10 — komputer, 11 — automatyczne dozowanie, 12 — kolektor frakcji

16.1.2. Pompy

Pompy są ważnymi częściami chromatografu cieczowego, ponieważ w sposób ciągły odtwarzają i z optymalną prędkością powodują przepływ fazy ruchomej przez kolumnę. Dobre pompy powinny się charakteryzować:

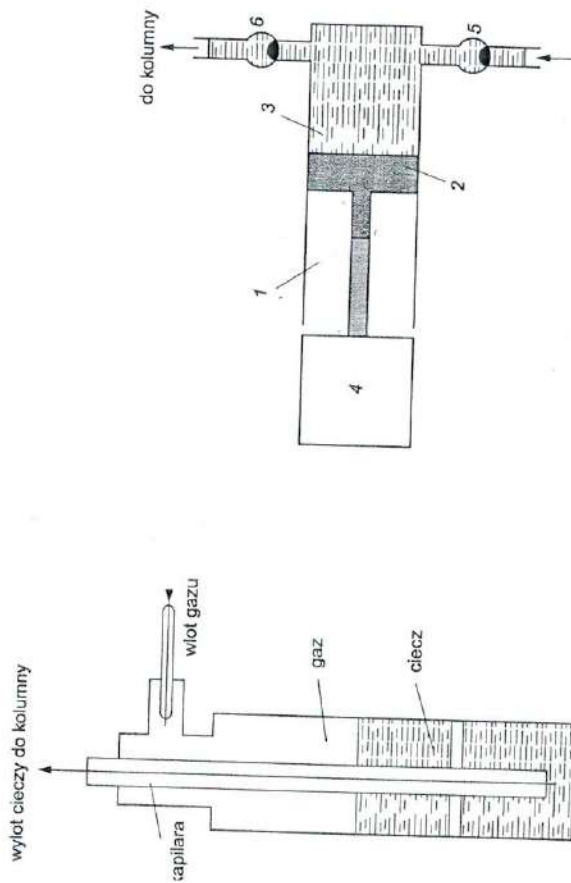
- stałym przepływem fazy ruchomej z możliwością regulacji w granicach $0,5-10 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$,
- odpornością chemiczną materiału pompy na fazę ruchomą,
- małą objętością wewnętrzną,
- bezpulsacyjnym przepływem,
- możliwością uzyskania ciśnień roboczych do 35 MPa.

W HPLC mają zastosowanie dwie kategorie układów pompujących:

- stałociśnieniowe,
- stałoprzepływowe.

Pompy stalocisnieniowe są dzisiaj rzadziej stosowane w HPLC, są nimi:

- pompy wyporowe,
 - pompy z tłokami o różnej średnicy z napędem pneumatycznym.
- Żaletą tych pomp jest prosta konstrukcja i brak pulsacji ciśnienia, a wadą możliwość niepożądaných zmian przepływu fazy ruchomej. Te zmiany mogą być wynikiem np. zmiany lepkości cieczy wywołanej zmianą temperatury. Schemat pompy wyporowej przedstawiono na rys. 16.2. W pompach wyporowych wytwarza się ciśnienie w zbiorniku floczy ją przez kolumnę. Ciśnienie, które można wytwarzać w takich pompach, jest niskie i nie przekracza 20 MPa.



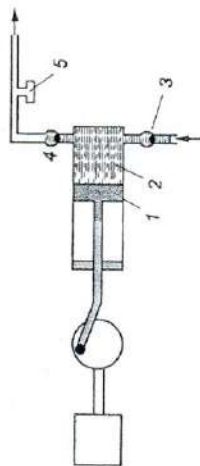
16.2. Schemat pompy wyporowej

Rys. 16.3. Schemat pompy strzykawkowej: 1 — cylinder, 2 — tłok, 3 — zbiornik cieczi, 4 — silnik, 5, 6 — zawory

We współczesnych chromatografiach cieczowych stosuje się powszechnie pompy strzykawkowe. Jest kilka typów tych pomp:

- pompy strzykawkowe,
 - pompy tłokowe — z jednym, dwoma lub rzadziej z trzema tłokami.
- Pompy strzykawkowe pracują bezpulsacyjnie, a ich wadą jest stosunkowo mała ilość ruchomej zużywanej w jednym cyklu pracy (może wynosić 250–500 cm³). Stąd konieczność przerywania chromatografowania w celu napełnienia cylindra rozpuszczalnikiem. Schemat pompy strzykawkowej przedstawiono na rys. 16.3. Najpowszechniej w HPLC są stosowane pompy tłokowe. Są to najczęściej pompy dwunym lub dwoma tłokami. Tłoki przesuują się w cylindrach o małej objętości

(0,03–1 cm³). Ruch tłoków jest zsynchronizowany z otwieraniem i zamykaniem zaworów kulkowych, które kontrolują przepływ fazy ruchomej. Objętościowa prędkość przepływu regulowana jest albo wielkością skoku tłoka, albo częstotliwością ruchu tłoka. Można uzyskać przepływy w granicach 0,1–30 cm³·min⁻¹, a wytwarzane ciśnienia mogą osiągać wartość do 50 MPa. Schemat pompy jednołtokowej przedstawiono na rys. 16.4.



Rys. 16.4. Schemat pompy jednołtokowej: 1 — tłok, 2 — cylinder z cieżką, 3, 4 — zawory, 5 — tłumienie pulsacji

Wadą pomp tłokowych może być pulsacja cieczy powodująca niestabilność linii zerowej. Pulsację można jednak zmniejszyć przez:

- a) zmniejszenie objętości cieczy pompowanej w jednym cyklu tłoka przez zastosowanie cylindrów o małej objętości i zwiększenie prędkości ruchów tłoka;
- b) zastosowanie pomp dwutłokowych współdziałających w cyklu przesuniętym o 180°.

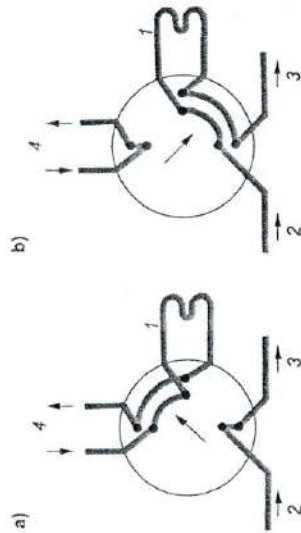
16.1.3. Dozowniki

Przy omawianiu chromatografii gazowej stwierdzono, że próbkę do kolumny należy wprowadzać w postaci bardzo wąskiego pasma. Warunek ten jest istotniejszy w HPLC aniżeli w GC, gdyż to tzw. pozakolumnowe poszerzenie pasma ma duży wpływ na wartość współczynnika retencji *k* w HPLC. Dlatego bardzo ważną rolę odgrywa dozownik próbek. Wyróżnić można kilka typów dozowników:

- typu strzykawkowego,
- typu zaworów z pętlą,
- typu pętli ze strzykawką.

Dozowniki typu strzykawkowego umożliwiają wprowadzenie próbki strzykawką bezpośrednio do kolumny. Mogą one być z uszczelnkami (rys. 15.2) i bez uszczeltek. Dozownik z uszczelką działa na tej samej zasadzie co w GC. Materiał uszczelki musi być odporny na rozpuszczalnik fazy ruchomej. W systemie bezuszczelkowym stosuje się trójdrożny zawór, który w momencie wprowadzenia próbki pozwala zmienić kierunek przepływu fazy ruchomej.

Powszechnie w HPLC są stosowane zawory dozujące podobne do tych, które mają zastosowanie w GC (rys. 15.3). Kierunek przepływu fazy ruchomej zależy od położenia zaworu, może omijać zawór lub przechodzić przez niego. Istnieją dwa typy pętli: zewnętrzna (wymienialna o zmiennej objętości od 0,01 do 0,5 cm³) i wewnętrzna o stałej małej objętości próbek rzędu kilku tysięcznych cm³. Zawory z pętlą umożliwiają wprowadzanie próbek w szerokim zakresie objętości i z dobrą odtwarzalnością. Przykład dozownika typu zaworu z pętlą przedstawiono na rys. 16.5.



Rys. 16.5. Dozownik typu zaworu z pętlą: a) napelnianie pętli, b) wszytywanie do kolumny; 1 — pętla, 2 — wlot fazy ruchomej, 3 — wylot fazy ruchomej do kolumny, 4 — wprowadzenie próbki

16.1.4. Kolumny

Kolumna wraz z wypełnieniem stanowi element układu chromatograficznego, w którym zachodzi właściwy proces rozdzielania. W zależności od wielkości próbki możemy wybrać dla HPLC mikrokolumny, kolumny analityczne i kolumny preparatywne. Do celów analitycznych z reguły stosujemy kolumny analityczne. Są to najczęściej rurki ze stali nierdzewnej o wypolerowanej powierzchni wewnętrznej i długości od 5 do 35 cm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm. Długość kolumny zależy od średnicy ziaren wypełnienia. Im ziarno mniejsze, tym kolumna krótsza.

Kolumny są zamknięte z dwóch końców filtrami (najczęściej ze stali nierdzewnej o średnicy porów 0,5–2 μm) i łącznikami do połączenia z dozownikiem i detektorem. Końcówki łączące powinny mieć minimalną objętość „martwą”.

Napelnianie kolumn do HPLC wymaga dobrego przygotowania i profesjonalnego oprzyrządowania. Dlatego laboratoria wolą używać kolumn z wypełnieniem. Kolumny można napelniać techniką suchą i mokrą. Lepsze efekty przy małych ziarnach dają techniki mokre. Ich zasada polega na tym, że sporządza się zawiesinę wypełnienia w rozpuszczalniku o gęstości zbliżonej do wypełnienia i zawieszoną taką pompuje się przez kolumnę, stosując wysokie ciśnienie w granicach 50–100 Mpa. W opracowaniach specjalistycznych można znaleźć dokładne przepisy na temat napelniania kolumn.

16.1.5. Detektory

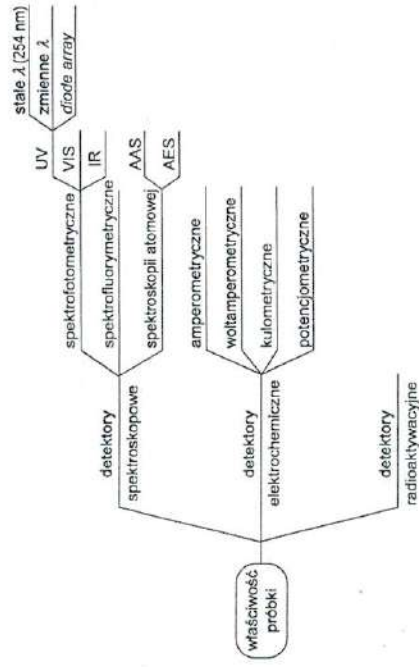
Dobry detektor do HPLC powinien charakteryzować się:

- dużą czułością i małą wartością granicy oznaczalności,
- uniwersalnością wskazań dla dużej liczby substancji lub selektywnością w stosunku do ograniczonej liczby substancji,
- szerokim zakresem liniowości wskazań,
- małą objętością,
- niewrażliwością na zmiany temperatury i zmiany prędkości przepływu fazy ruchomej,
- łatwością obsługi i niezawodnością działania.

Detektory do HPLC można podzielić na 2 rodzaje:

- detektory, w których następuje pomiar właściwości charakterystycznej dla próbki,
- detektory, w których następuje różnicowy pomiar właściwości wspólnej dla próbki i fazy ruchomej.

Klasyfikację detektorów należących do tych grup przedstawiają schematy na rys. 16.6 i 16.7. Schematy te wskazują, że wysokoprężna chromatografia cieczowa ma do dyspozycji wiele detektorów. Jednakże tylko kilka z nich znajduje powszechne zastosowanie. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę wybranych detektorów.

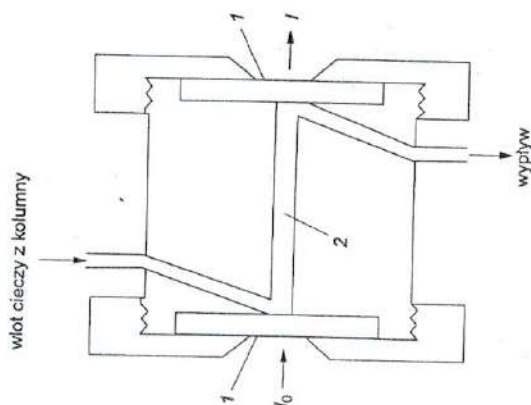


Rys. 16.6. Podział detektorów, w których następuje pomiar właściwości charakterystycznej dla próbki

Rys. 16.7. Podział detektorów, w których następuje pomiar różnicowy właściwości próbki i fazy ruchomej

Detektory spektrometryczne UV działają na zasadzie absorpcji promieniowania UV. Firmy produkujące chromatografy oferują trzy rodzaje detektorów UV:

- pracujące przy jednej długości fali $\lambda = 254 \text{ nm}$ — promieniowanie UV o tej długości fali absorbuje wiele substancji organicznych,
- pracujące w bliskim nadfiolecie i zakresie widzialnym (190–600 nm) z płynnym nastawianiem mierzonej długości fali,
- detektory z matrycą diod (ang. *diode array detector* — DAD). Z wymienionymi detektorami stosowana jest przepływowa komora pomiarowa (rys. 16.8) o długości drogi optycznej wynoszącej 10 mm i objętości 10^{-2} cm^3 .



Rys. 16.8. Schemat przepływowej komory pomiarowej detektora UV-Vis; 1 — okienka kwarcowe, 2 — droga optyczna

Detektor spektrofluorymetryczny jest detektorem selektywnym i jest bardzo czuły wobec związków wykazujących właściwości fluorescencyjne. Właściwości takie wykazuje wiele związków występujących w środkach spożywczych i w preparatach farmaceutycznych. W chromatografach detektor fluorymetryczny łączy się z detektorem absorpcyjnym UV, gdyż w obydwu przypadkach potrzebne jest źródło promieniowania nadfioletowego. Granica oznaczalności detektora fluorescencyjnego jest ok. 100-krotnie niższa niż absorpcyjnego UV.

Detektory refraktometryczne są, po detektorze spektrofotometrycznym, najczęściej stosowane w HPLC. Detektor ten mierzy w sposób ciągły różnice współczynników załamania czystej fazy ruchomej i eluentu z kolumny. Jest to detektor uniwersalny, ale mniej czuły aniżeli detektor UV i bardzo wrażliwy na zmiany temperatury.

Krótką charakterystykę wybranych detektorów przedstawiono w tabelicy 16.2.

Tabela 16.2. Parametry niektórych detektorów stosowanych w wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej

Detektor	Rodzaj detektora	Czułość oznaczenia	Objętość komórki pomiarowej [10 ⁻³ cm ³]	Wrażliwość na zmiany temperatury
Absorpcyjny UV	selektywny	4 · 10 ⁻⁹ g/cm ³	10	nieznaczna
Refraktometryczny	uniwersalny	7 · 10 ⁻⁷ g/cm ³	7	10-4°C
Adsorpcyjny (mikrokalorymetr)	uniwersalny	10 ⁻⁹ g/s	9	5 · 10 ⁻³ °C
Polarograficzny	selektywny	10 ⁻⁹ g/cm ³	10	1,5%/°C
Fluorymetryczny	selektywny	10 ⁻¹⁰ g/cm ³	10	—

16.2. Wypełnienia kolumny — fazy stacjonarne w wysokosprawnej chromatografii cieczowej

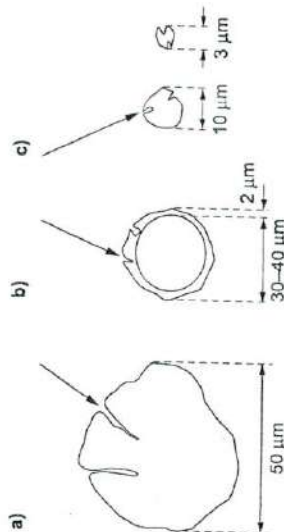
W HPLC stosowane są w sposób powszechny dwa typy wypełnień:

- wypełnienia krzemionkowe,
- wypełnienia wykorzystujące żywice porowate.

Większość rozdzielających prowadzi się z użyciem wypełnień pierwszego typu, dlatego napełnienia krzemionkowe zwrócimy tutaj szczególnej uwagę.

Ze względu na stosowanie wysokich ciśnień i szybki przebieg procesów w HPLC niezmiernie wagi nabiera sprawa rozmiaru ziaren i ich kształtu. Historycznie rzecz ujmując, możemy wyróżnić trzy rodzaje wypełnień stosowanych w HPLC:

- wypełnienia o dużych ziarnach z głębokimi szerokimi porami,
- wypełnienia powierzchniowo porowate, z cienką warstwą adsorbpcyjną umieszczoną na nieprzenikliwym rdzeniu,
- wypełnienia o bardzo małej średnicy ziaren i mikroporach w całej masie ziarna



Rys. 16.9. Ziarna krzemionki stosowane w HPLC: a) duże ziarno porowate w całej masie, b) krzemionka z powierzchniową warstwą porowatą, c) małe ziarno porowate w całej masie

Na rysunku 16.9 przedstawiono schematycznie te trzy typy ziaren krzemionki. Pierwszy rodzaj ziaren nie ma obecnie zastosowania w analitycznej HPLC, a wypełnienia powierzchniowo porowate mają tylko ograniczony zakres zastosowań. Praktycznie w nowoczesnej HPLC stosuje się małe ziarna, porowate w całej masie, o nominalnej średnicy: 3 µm, 5 µm i 10 µm. Silikazele o małej średnicy ziaren są wykorzystywane w HPLC jako:

- adsorbenty,
- matryca dla faz chemicznie związanych,
- wypełnienia dla chromatografii sitowej.

16.2.1. Fazy chemicznie związane na bazie krzemionki

Obecnie klasyczne wypełnienia z cieczą osadzoną na nośniku są w HPLC bardzo rzadko stosowane. Układ taki został zastąpiony fazami chemicznie związanymi z nośnikiem. Podstawowym nośnikiem jest mikroporowata krzemionka o małych ziarnach

3 μm , 5 μm lub 10 μm . Fazy chemicznie związane z krzemionką mogą mieć różny charakter chemiczny i dlatego proces rozdzielania chromatograficznego może przebiegać według różnych mechanizmów. Najczęściej są stosowane wypełnienia:

- 1) Z niepolarnymi grupami — jest to **chromatografia w odwróconym układzie faz** (ang. *reversed phase liquid chromatography* — RP-LC) — w takim układzie faza stacjonarna jest mniej polarna aniżeli faza ruchoma.
- 2) Z polarnymi grupami — jest to **chromatografia w normalnym układzie faz** (ang. *normal phase liquid chromatography* — NP-LC) — w takim układzie faza stacjonarna jest bardziej polarna aniżeli faza ruchoma.
- 3) Z grupami jonowymiennymi — mają zastosowanie w **chromatografii jonowej** (ang. *ion chromatography* — IC).
- 4) Z grupami optycznie czynnymi — służą do rozdzielania mieszanin racemicznych.

16.2.1.1. Fazy chemicznie związane niepolarne dla RP-LC i polarne dla NP-LC

Na powierzchni krzemionki znajdują się grupy silanolowe $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ zdolne do różnego typu reakcji chemicznych, a m.in.:

- do tworzenia estrów w wyniku reakcji grup silanolowych z alkoholami

$$\equiv\text{Si}-\text{OH} + \text{R}-\text{OH} \rightarrow \equiv\text{Si}-\text{O}-\text{R} + \text{H}_2\text{O}$$
- do tworzenia wiązań Si—C, w wyniku reakcji:

$$\begin{aligned} \equiv\text{Si}-\text{OH} + \text{SOCl}_2 &\rightarrow \equiv\text{Si}-\text{Cl} \\ \equiv\text{Si}-\text{Cl} + \text{R}-\text{Li} &\rightarrow \equiv\text{Si}-\text{R} \end{aligned}$$

- do tworzenia wiązań silanolowych (silikonowych) w wyniku reakcji grup silanolowych z organochlorosilanami



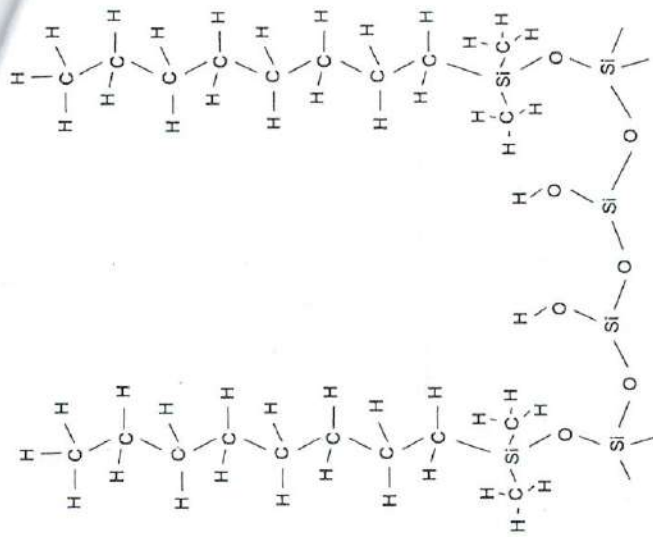
Ten trzeci typ reakcji służy do otrzymywania faz zarówno niepolarnych, jak i polarnych. W chromatografii z odwróconym układem faz —R to grupy alkilowe: $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_8\text{H}_{17}$, $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$, a także $\text{—}\langle\bigcirc\rangle\text{—}$. Natomiast w chromatografii z normalnym układem faz z krzemionką związane są grupy polarne:



Schemat żelu krzemionkowego z chemicznie związaną grupą *n*-oktylodimetylosililową przedstawiono na rys. 16.10.

16.2.1.2. Wymieniacze jonowe dla wysokosprawnej chromatografii cieczerw

Wymieniacze jonowe (jonity) są to nierozpuszczalne substancje wielocząsteczkowe o budowie jonowej, zdolne do wymiany własnych jonów na jony obecne w roztworze. W konwencjonalnej chromatografii jonitowej podstawową grupę wymieniaczy jonowych



Rys. 16.10. Schemat żelu krzemionkowego z chemicznie związaną grupą *n*-oktylodimetylosililową

stanowią zwykle jonowymiennie. Każda żywica jonowymienna składa się z nierozpuszczalnego szkieletu (matrycy), z którym związane są grupy funkcyjne, zdolne do wymiany kationów (kationity) lub anionów (anionity). W żywicach jonowymiennych matrycą najczęściej jest kopolimer styrenu z diwinylobenzenem. W kationitach grupami funkcyjnymi są: sulfonowa ($-\text{SO}_3\text{H}$), karboksylowa ($-\text{COOH}$) i fosfonowa ($-\text{PO}_3\text{H}_2$), a w anionitach najczęściej czwartorzędowe sole amoniowe [$-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3$]. Natomiast w HPLC stosuje się jonity, w których matrycą jest krzemionka, a grupy funkcyjne są związane w sposób analogiczny do innych faz chemicznie związanych. Dominującą technologią jest modyfikacja małych ziaren (3 μm , 5 μm , 10 μm) mikroporowatych w całej masie. W wyniku działania na krzemionkę organosilanami można otrzymać anionity i kationity, co ilustrują schematy na rys. 16.11.

16.2.1.3. Wypełnienia w chromatografii żelowej

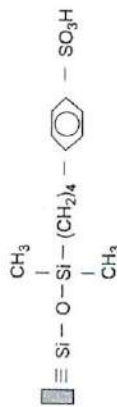
Chromatografia żelowa nazywana jest także chromatografią sitową lub sączeniem molekularnym. W chromatografii sitowej o rozdzielaniu substancji decydują wymiary rozdzielanych cząsteczek. Wypełnienia kolumn stanowią żele o zdefiniowanych średnicach porów, zbliżonych do rozmiarów cząstek rozdzielanych substancji.

W kolumnie wypełnionej takim żelem substancje rozdzielane, o dużych rozmiarach cząsteczek, większych od średnicy porów wypełnienia, przechodzą bezpośrednio do wycieku (nie penetrują ziaren), natomiast cząsteczki o mniejszych rozmiarach wnikają

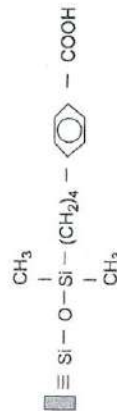
a) aniony z grupami amoniowymi



b) kationity z grupami sulfonowymi



c) kationity z grupami karboksylowymi



Rys. 16.11. Przykłady wymieniaczy jonowych na bazie krzemionki

w pory żelu. Im mniejsze są rozmiary cząsteczek, tym głębiej penetrują one ziarna żelu, a tym samym wolniej migrują wzdłuż kolumny. Rozdzielanie zachodzi zatem na skutek różnicy mas cząsteczkowych rozdzielanych związków. Sytuację taką ilustruje schemat przedstawiony na rys. 14.1.

W konwencjonalnej chromatografii żelowej jako wypełnienia kolumn są stosowane usieciowane żele dekstranowe (sephadexy) i usieciowane żele poli(akrylamidowe). Są to żele pęczniące w wodzie i dlatego też nie można ich stosować w technikach HPLC. W wysokociśnieniowej chromatografii żelowej są stosowane żele sztywne, do których zalicza się żele krzemionkowe o dużych średnicach porów, szkło o kontrolowanej porowatości, a także usieciowany polistyren o strukturze makroporowatej. Podstawowe równanie, przedstawiające zależność między masą cząsteczkową M a objętością elucji V_R w chromatografii żelowej, ma postać:

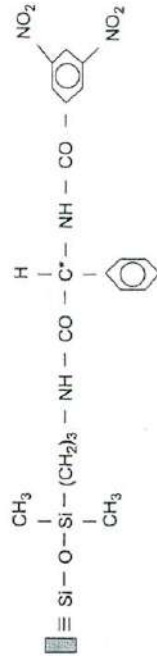
$$V_R = -B \log M + C \quad (16.1)$$

gdzie B, C — stałe.

16.2.1.4. Fazy chiralne w wykosprawnej chromatografii cieczowej

Ważnym osiągnięciem HPLC jest rozdzielanie izomerów optycznie czynnych. Związki chiralne spotykamy zarówno w przyrodzie, jak też wiele z nich jest przedmiotem syntezy, w szczególności w grupie substancji biologicznie czynnych. W wielu przypadkach enancjomery różnią się aktywnością fizjologiczną, a w grupie farmaceutyków jeden z enancjomerów może wywierać dodatni wpływ na organizm, a drugi może być szkodliwy. Dlatego rozdzielanie mieszanin racemicznych na enancjomery jest tak

istotne. Spośród metod chromatograficznych w rozdzielaniu racematów szczególną rolę odgrywa chromatografia gazowa i wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa. W obydwu przypadkach rozdzielanie optycznie czynnych izomerów odbywa się na optycznie czynnych fazach stacjonarnych. Mechanizm rozdzielania polega na wykorzystaniu enancjoselektywności, tzn. chiralna faza stacjonarna „rozpoznaje”, czyli silniej wiąże jeden z enancjomerów i na tej zasadzie następuje rozdzielanie mieszanin racemicznych. W handlu można nabyć tzw. chiralne fazy stacjonarne (ang. *chiral stationary phases* — CSP), które należą do faz chemicznie związanych z krzemionką o małej średnicy ziaren. Na rysunku 16.12 przedstawiono schemat chiralnej fazy chemicznie związanej, stosowanej w HPLC.



Rys. 16.12. Chiralna faza stacjonarna, *N*-(3,5-dinitrobenzoilo)fenyloglicyna, związana z krzemionką przez grupę 3-aminopropylsilanolową

16.3. Fazy ruchome i mechanizmy rozdzielcze w chromatografii cieczowej

W chromatografii cieczowej fazy ruchome — rozpuszczalniki wywiera decydujący wpływ na zdolność rozdzielczą układu. Rozpuszczalniki stosowane jako fazy ruchome w HPLC powinny:

- wykazywać odpowiednią zdolność rozpuszczania próbki,
- umożliwiać detekcję próbki,
- charakteryzować się wysokim stopniem czystości,
- nie reagować chemicznie ani z fazą stacjonarną, ani z rozdzielaną próbką,
- charakteryzować się trwałością w warunkach chromatografowania,
- być tanie.

16.3.1. Fazy ruchome w chromatografii adsorpcyjnej

W chromatografii adsorpcyjnej zachodzi konkurencyjna reakcja adsorpcji substancji rozpuszczonej (próbki) i rozpuszczalnika z adsorbentem:



gdzie: X_{ads}, X_m — cząsteczki próbki w fazie adsorbenta i w fazie ruchomej, S_{ads}, S_m — cząsteczki rozpuszczalnika zaadsorbowane i w postaci wolnej fazy ruchomej. Silniejsza adsorpcja rozpuszczalnika na fazie stacjonarnej zmniejsza adsorpcję próbki badanej.

Zjawiska te opisuje równanie Snydera–Soczewińskiego:

$$\log k = \log V_a + \beta(E_0 - A_s E_0) + \log \frac{W_a}{V_M}$$

gdzie: k — współczynnik retencji, V_a — objętość fazy ruchomej zaadsorbowanej przez jednostkę masy adsorbenta, β — liczba bezwymiarowa, charakteryzująca aktywność adsorbenta, E_0 — energia swobodna adsorpcji cząsteczek analitu, A_s — powierzchnia adsorbenta zajęta przez jeden mol cząsteczek analitu, E_0 — energia swobodna adsorpcji cząsteczek zajęta przez jeden mol cząsteczek zajętej przez te cząsteczki, W_a — masa adsorbenta w kolumnie, V_M — objętość fazy ruchomej w kolumnie.

Równanie to można przedstawić w postaci skróconej:

$$\log k = \text{const} + \beta(E_0 - A_s E_0)$$

Z równania wynika, że wartość współczynnika retencji zależy głównie od energii swobodnej adsorpcji analitu E_0 i energii swobodnej adsorpcji fazy ruchomej E_0 . Wartość E_0 jest miarą mocy elucyjnej rozpuszczalnika.

Rozpuszczalniki sklasyfikowano według wzrastającej mocy elucyjnej i powstały w ten sposób tzw. **szereg eluotropowy** rozpuszczalników. Przyjmuje się, że moc elucyjna rozpuszczalnika jest proporcjonalna do jego przenikalności elektrycznej, którą można wyznaczyć eksperymentalnie.

Tablica 16.3. Szereg eluotropowy rozpuszczalników

Rozpuszczalnik	Moc elucyjna	Względna przenikalność elektryczna
<i>n</i> -Pentan	0,00	1,84
<i>n</i> -Heksan	0,01	1,88
Cykloheksan	0,04	2,02
Tetrachlorek węgla	0,18	2,24
Toluen	0,29	2,38
Benzen	0,32	2,28
Eter dietylowy	0,38	4,33
Chloroform	0,40	4,80
Dichlorometan	0,42	8,93
Tetrahydrofuran	0,45	7,58
Dichloroetan	0,49	10,70
Aceton	0,56	21,40
Octan etylu	0,58	6,11
Acetonitryl	0,65	37,50
Przydyna	0,71	12,40
Etanol	0,88	25,80
Metanol	0,95	33,60
Woda	bardzo duża	80,40
Kwas octowy	bardzo duża	6,10

Jak to podano wyżej, cząsteczki eluentu rywalizują o miejsce na powierzchni adsorbentu z cząsteczkami substancji chromatografowanej. Dlatego moc elucyjną eluentu

można scharakteryzować wartością siły jego oddziaływania z powierzchnią adsorbentu. W przypadku chromatografii na polarnych adsorbentach, np. na silikazelu, siłę elucji wyznacza polarność cząsteczek eluentu. Im większa polarność, tym moc elucyjna większa. Ważną cechą eluentu jest także jego lepkość, która ma istotny wpływ na wartość ciśnienia w kolumnie potrzebą do wymuszenia odpowiedniego przepływu fazy ruchomej. Szereg eluotropowy rozpuszczalników, według wzrastającej mocy elucyjnej, dla adsorbentów polarnych przedstawiono w tablicy 16.3.

Wybór eluentu do rozdzielania konkretnej mieszaniny nie zawsze jest sprawą prostą. Należy najpierw zastosować eluent o średniej mocy elucyjnej (ze środka szeregu eluotropowego). Następnie w zależności od uzyskanego efektu rozdzielania należy zmienić rozpuszczalnik na taki, który ma większą lub mniejszą moc elucyjną. Częściej jednak do wybranego rozpuszczalnika dodaje się innego rozpuszczalnika, dobierając w ten sposób moc elucyjną mieszaniny. Należy dbać, aby składniki rozdzielane miały wartość k w granicach od 1 do 10.

16.3.2. Fazy ruchome dla faz chemicznie związanych

Fazy chemicznie związane można określić jako fazy pseudociekłe i proces chromatograficzny można rozpatrywać jak zachodzący w układzie ciecz–ciecz. W układzie takim wykorzystuje się podział próbki X między fazę ruchomą „m” i stacjonarną „s”:

$$X_m \leftrightarrow X_s \quad (16.3)$$

Podział substancji X między dwie fazy jest określony przez oddziaływania międzycząsteczkowe z cząsteczkami fazy ruchomej i fazy stacjonarnej. Parametry retencyjne analitu k można regulować przez dobór rozpuszczalnika. Przy doborze fazy ruchomej wykorzystuje się następujące dwa parametry:

- parametr rozpuszczalności Hildenbranda δ ,
- indeks polarności P' .

Parametr rozpuszczalności δ jest miarą mocy rozpuszczalnika i stosuje się go do celu ustalenia względnej pozycji rozpuszczalnika w szeregu eluotropowym. Parametr ten obrazuje specyficzne oddziaływania międzycząsteczkowe i składa się z czterech różnych udziałów:

$$\delta = \delta_d + \delta_p + \delta_a + \delta_h \quad (16.4)$$

gdzie δ_d jest miarą oddziaływań dyspersyjnych Londona, δ_p — miarą oddziaływań dipolowych, δ_a — miarą protonoakceptorowych oddziaływań rozpuszczalnika, δ_h — miarą protonodonorowych oddziaływań rozpuszczalnika. Parametr rozpuszczalności, określający w sposób ilościowy polarność, można zdefiniować w sposób następujący:

$$\delta = (\Delta E/V)^{1/2} \quad (16.5)$$

gdzie: ΔE — energia wewnętrzna parowania, V — objętość molowa. Parametr rozpuszczalności można wyrazić także za pomocą indeksu polarności P' , który można wyliczyć z danych rozpuszczalności.

W przypadku faz stacjonarnych chemicznie związanych możemy wyróżnić dwie sytuacje (patrz p. 16.2.1):

1) Fazy stacjonarne niepolarne (np. C_8 , C_{18}) — wówczas faza ruchoma jest bardziej polarna od fazy stacjonarnej. Taki układ nazywamy odwróconym układem faz (RP). W układzie RP jako eluentów używa się najczęściej mieszaniny metanol-woda lub acetonitryl-woda. W układzie takim wzrost ilości wody powoduje wydłużenie czasów retencji chromatografowanych substancji niepolarnych, natomiast większa ilość rozpuszczalnika organicznego powoduje skrócenie czasu retencji.

2) Fazy stacjonarne polarne (np. RNH_2 , RNO_2 , $RCHOHCH_2OH$) — wówczas faza ruchoma jest mniej polarna od fazy stacjonarnej. Taki układ nazywamy normalnym układem faz (NP). W układzie NP podstawowym rozpuszczalnikiem jest rozpuszczalnik niepolarny, np. *n*-heksan, a jego moc elucyjną modyfikuje się przez dodatek rozpuszczalnika organicznego o większej polarności, najczęściej chloroformu.

Szerzeg rozpuszczalników o wzrastających wartościach parametru rozpuszczalności δ i wzrastających indeksach polarności P' przedstawiono w tabelicy 16.4.

Tabela 16.4. Szerzeg rozpuszczalników ułożonych wg wzrastających wartości parametru rozpuszczalności δ

Rozpuszczalnik	Parametr rozpuszczalności, δ	Indeks polarności, P'
Heksan	14,9	0
Dichlorometan	19,8	3,4
Tetrahydrofuran	18,6	4,2
Chloroform	19,0	4,4
Dioxan	20,4	4,8
Etanol	25,9	5,2
Acetonitryl	23,9	6,2
Metanol	29,4	6,6
Woda	47,8	9,0

16.3.3. Faza ruchoma w chromatografii jonowymiennej

Ten rodzaj chromatografii ma zastosowanie do analizy związków jonowych i to zarówno nieorganicznych, jak i organicznych. Procesem decydującym o retencji związków jest reakcja wymiany jonowej. Równowaga tej reakcji jest uzależniona od dysocjacji substancji chromatografowanych. Dlatego czynnikiem decydującym o mocy elucyjnej fazy ruchomej jest pH roztworu. W chromatografii jonowymiennej jako fazy ruchome stosuje się wodne roztwory buforowe. Przez dobór odpowiedniego pH i sily jonowej roztworu można uzyskać fazę ruchomą o pożądanych właściwościach elucyjnych. W przypadku chromatografii kationowymiennej wzrost pH powoduje wzrost czasu retencji, a w chromatografii anionowymiennej przeciwnie, w miarę obniżania pH objętość retencji wzrasta. Roztworami buforowymi dla anionów są: bufor amonowy, pirydynowy i inne bufory kationowe, dla kationów natomiast: bufor octanowy, cytrynianowy, fosforanowy i inne.

16.3.4. Fazy ruchome w chromatografii żelowej

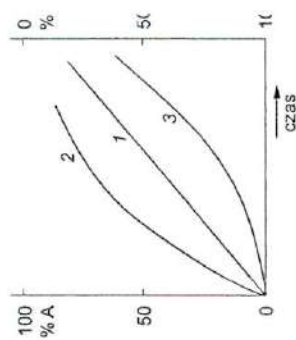
Podstawowym kryterium doboru fazy ruchomej jest zdolność tej fazy do rozpuszczenia substancji rozdzielanych. Jedyną rolą eluentu w tej metodzie jest przeniesienie składników chromatografowanej mieszaniny wzdłuż kolumny. W zależności od natury rozdzielanych polimerów jako fazę ruchomą stosuje się wodę lub wodne roztwory soli a w innych przypadkach rozpuszczalniki organiczne (np. *n*-heksan, chloroform, tetrahydrofuran, metanol).

16.3.5. Elucja izokratyczna i elucja gradientowa

W różnych metodach chromatografii cieczowej czas retencji składników próbki regulujemy przez odpowiedni dobór mocy elucyjnej eluentu. Może to być dobór składu mieszaniny rozpuszczalników (chromatografia adsorpcyjna, chromatografia z fazami związanymi w układzie NP i RP) lub pH roztworu i sily jonowej roztworu w przypadku chromatografii jonowymiennej. Wyróżnić można dwa przypadki:

- 1) Skład eluentu jest jednakowy przez cały czas chromatografowania próbki — mówimy, że elucja jest **izokratyczna**.
- 2) Skład eluentu zmienia się podczas chromatografowania próbki — mówimy, że elucja jest **gradientowa**.

Zmiana składu eluentu może mieć różny przebieg, tak jak to przedstawiono na rysunku 16.13.



Rys. 16.13. Wykres gradientu składu przy modyfikacji rozpuszczalnika A za pomocą rozpuszczalnika B; 1 — prostoliniowy, 2 — wypukły, 3 — wklęsły

Elucja gradientowa ma szerokie zastosowanie w przypadku chromatografowania mieszanin złożonych, zawierających składniki różniące się w sposób zasadniczy polarnością. W elucji gradientowej proces chromatografowania rozpoczyna się eluentem o małej mocy elucyjnej, a następnie dodając rozpuszczalnika o dużej mocy elucyjnej, zwiększając moc elucyjną mieszaniny. W przypadku chromatografii jonowymiennej moc elucyjną reguluje się przez zmianę pH i sily jonowej eluentu.

Elucję gradientową realizuje się w różny sposób w zależności od rozwiązań aparaturowych. Częstym sposobem jest zastosowanie dwóch zbiorników, jednego z silnym a drugiego ze słabym eluentem, połączonych z dwoma pompami, które tłoczą rozpuszczalnik poprzez wspólny mieszalnik do kolumny. Praca pomp jest sterowana komputerowo tak, że sumaryczna objętość eluentu przepływającego przez kolumnę w jednostce

16.5. Zastosowanie wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej

Metoda HPLC ma zastosowanie zarówno w analizie jakościowej, jak i ilościowej złożonych mieszanin różnych klas związków. Analiza jakościowa polega na identyfikacji pików odpowiadających poszczególnym składnikom próbki. Można tego dokonać w dwojaki sposób:

- a) Przez porównanie czasu retencji próbki z czasem retencji wzorca, podobnie jak to jest w GC.
 - b) Przez zastosowanie detektorów jakościowych, np. spektrometru mas. Detektor MS pozwala w sposób jednoznaczny zidentyfikować poszczególne piki chromatogramu.
- Analiza ilościowa w HPLC jest oparta na takich samych zasadach jak w GC. Ilościowo zawartość składników w próbce oblicza się, wykorzystując fakt, że powierzchnia piku lub jego wysokość jest proporcjonalna do ilości danego składnika w próbce. W analizie wykorzystuje się porównanie wysokości (powierzchni) piku próbki z wysokością (powierzchnią) piku wzorca. Korzysta się przy tym z procedur opartych na metodzie wzorca wewnętrznego bądź zewnętrznego lub kalibracji bezwzględnej. Współczesne chromatografy zaopatrzone w komputer pozwalają w prosty sposób wykonać analizę ilościową.

Wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa jest stosowana do rozdzielania i analizy tych substancji, których nie można analizować metodą GC lub których rozdzielanie tą metodą nastręcza duże trudności. Do najczęściej analizowanych tą metodą związków można zaliczyć:

- związki biologicznie czynne: białka, polipeptydy, aminokwasy, polisacharydy, witaminy, sterydy, kwasy nukleinowe i ich składniki;
- preparaty farmaceutyczne;
- środki ochrony roślin, pestycydy;
- węglowodory policykliczne, w tym rakotwórcze [benzo(a)piren] w powietrzu atmosferycznym, wodzie i w środkach spożywczych;
- mosteryczne, związki metaloorganiczne i związki kompleksowe;
- aniony nieorganiczne metodą chromatografii jonów;
- skomplikowane mieszaniny kationów, np. rozdzielanie pierwiastków ziem rzadkich.

czasu jest stała, natomiast zmienia się udział poszczególnych składników mieszaniny zgodnie z zaprogramowanym gradientem.

16.4. Wybór techniki chromatograficznej i aspekty praktyczne HPLC

Proces rozdzielania metodą HPLC można prowadzić różnymi technikami. Wybór techniki chromatograficznej jest uzależniony od właściwości analizowanej substancji. Przed przystąpieniem do analizy należy określić:

- 1) Przypuszczalną masę molową analizowanej substancji, tzn. należy ustalić, czy analizowana substancja jest polimerem, czy też substancją o małej masie cząsteczkowej.
- 2) Rozpuszczalność badanych substancji, tzn. należy ustalić, czy próbka analizowana rozpuszcza się w rozpuszczalnikach polarnych czy też niepolarnych.
- 3) Liczbę i rodzaj grup funkcyjnych w analizowanych związkach.
- 4) Czy substancja ma charakter jonowy (kwasy, zasady, sole), czy też jest to cząsteczka obojętna.

Znajomość wymienionych cech analizowanej próbki pozwala zastosować jedną z omówionych technik analitycznych, tzn. metodę adsorpcyjną, podziałową w układzie NP, podziałową w układzie RP, jonowymienną lub chromatografię żelową. Zasady wyboru techniki chromatograficznej, fazy stacjonarnej i fazy ruchomej są przedstawione na rys. 16.14.

Metoda	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Przykłady próbek
LLC-RP	fazy związane C ₈ , C ₁₈	woda-metanol -acetonitryl	steroidy, węglowodory, sterydy, chloropiestydy
LSC	żel krzemionkowy	heksan-etanol -chloroform	aminy, sterydy, barbiturany, alkaloidy
LLC-NP	fazy związane -CN -NO ₂ -NH ₂	heksan -acetonitryl	alkohole, glikole, alkaloidy
chromatografia jonowymienna	anionity	bufor wodny o pH 2-8	kwasy organiczne, nukleotydy, cukry, aniony nieorganiczne
chromatografia perjonowych jonowymienna	fazy związane C ₁₈	metanol-woda	aminokwasy
chromatografia jonowymienna	kationity	bufor wodny o pH 2-8	karbaminiany, aminy, glukozydy, kationy nieorganiczne
chromatografia żelowa	żele	roztwory wodne aceton -tetrahydrofuran	polimery syntetyczne i naturalne

Rys. 16.14. Zasady wyboru techniki chromatograficznej

