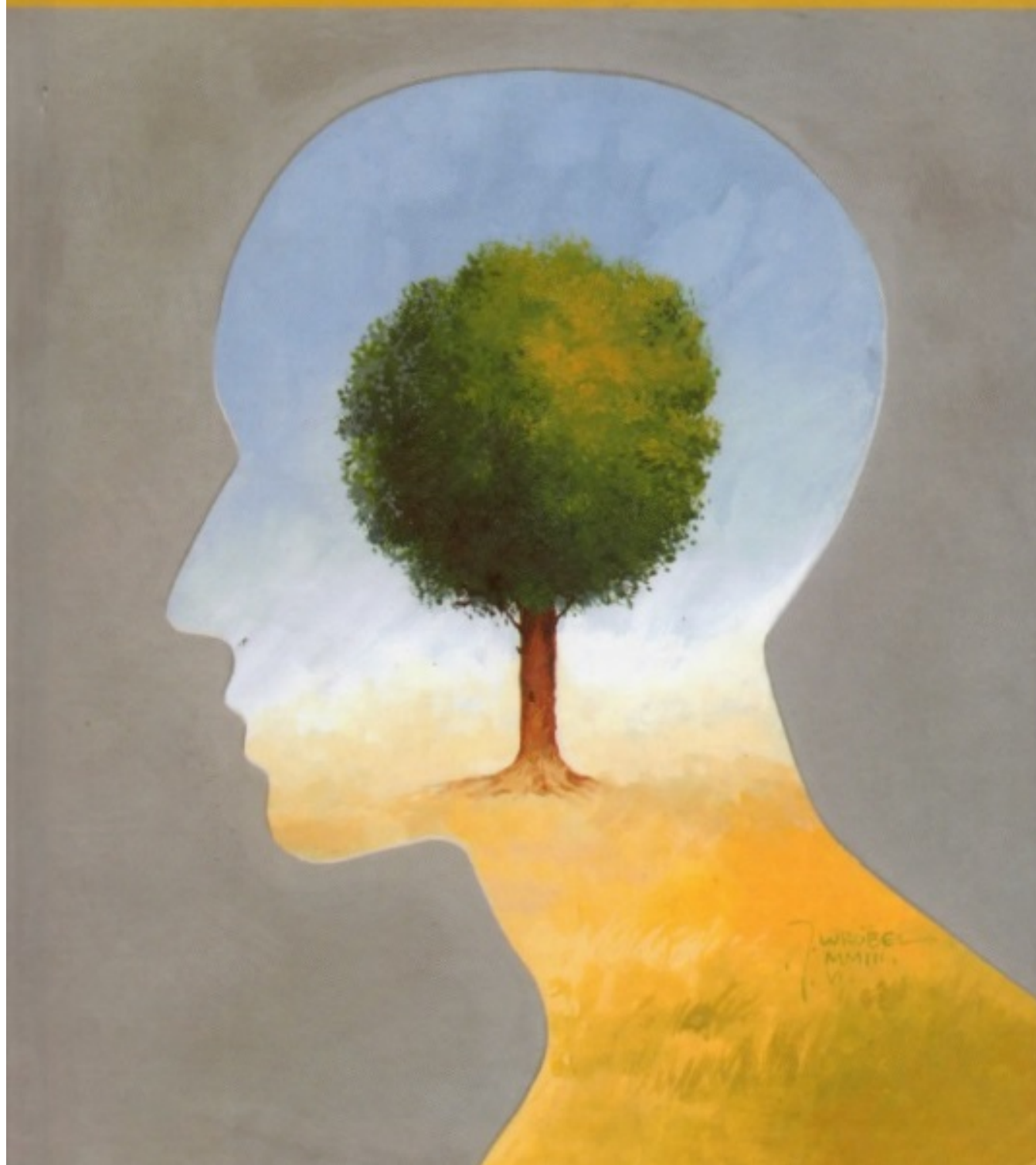


CHROMATOGRRAFIA CIECZOWA

praca zbiorowa pod redakcją M. Kamińskiego



CHROMATOGRAFIA CIECZOWA

Praca zbiorowa pod redakcją:

dr hab. inż. M. Kamińskiego

oraz

mgr inż. R. Kartanowicza

Autorzy:

dr inż. K. Gazda, mgr inż. D. Jastrzębski, dr hab. inż. M. Kamiński,
dr inż. B. Kandybowicz, mgr inż. R. Kartanowicz, dr inż. B. Makuch, dr M. Śliwka Kaszyńska

Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego

Gdańsk 2004

Wydawca: Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego (CEEAM)
Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska
ul. G. Narutowicza 11/12, 80 - 952 Gdańsk
<http://www.pg.gda.pl/chem/CEEAM>

Wydano za zgodą:
Rektora Politechniki Gdańskiej

Książka ta powstała dzięki wsparciu Komisji Europejskiej, w ramach Piątego Programu Ramowego, Akcja Kluczowa: "Zrównoważone Zarządzanie i Jakość Wody"
Priorytet: Energia, Środowisko i Zrównoważony Rozwój
Kontrakt n°: EVK1-CT-2002-80010 (CEEAM)

Projekt okładki: Jarosław Wróbel

Prawa autorskie 2004 by Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego (CEEAM), Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk

Wszystkie prawa zastrzeżone. Żadna część niniejszej pracy objęta prawami autorskimi nie może być reprodukowana za pomocą żadnych środków - graficznych, elektronicznych lub mechanicznych - lub wykorzystywana w żadnej postaci bez pisemnej zgody wydawcy.

Skład komputerowy: Ziemowit Skowroński, Katarzyna Skowrońska

Koordinacja techniczna: Zakład Poligrafii Politechniki Gdańskiej, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk, (48 58) 347 23 56

Druk: "WIB", Piotr Winczewski, ul. J. Sobieskiego 14, 80-216 Gdańsk

ISBN: 83-919081-5-1

SPIS TREŚCI

Przedmowa	7
1. Podstawowe parametry opisujące układ chromatograficzny	9
1.1. Podstawowe parametry i wymagania wobec fazy stacjonarnej oraz eluentu. Najważniejsze zasady postępowania zapewniające efektywne stosowanie chromatografii cieczowej	15
2. Chromatografia w układach faz normalnych	18
2.1. Nieorganiczne fazy stacjonarne	18
2.2. Inne adsorbenty nieorganiczne	20
2.3. Wiązane fazy stacjonarne stosowane w normalnym układzie faz	21
2.4. Mechanizm retencji w układach faz normalnych	21
2.5. Eluenty stosowane w układach faz normalnych	23
2.6. Zastosowanie układów faz normalnych	26
2.7. Wybrane przykłady zastosowań chromatografii cieczowej w układach faz normalnych	29
3. Chromatografia w układzie faz odwróconych	32
3.1. Definicja	32
3.2. Fazy stacjonarne	32
3.3. Retencja substancji w warunkach chromatografii w układzie faz odwróconych ..	37
3.4. Fazy ruchome	38
3.5. Rozdzielanie mieszanin substancji o charakterze kwasów lub zasad	44
3.6. Zastosowania	49
4. Elucja gradientowa	53
4.1. Parametry programu elucji gradientowej	54
4.2. Wpływ parametrów programu elucji na wyniki rozdzielania	59
4.3. Odtwarzalność wyników rozdzielania	63
4.4. Optymalizacja programu elucji	64
4.5. Przykłady chromatogramów rozdzielania substancji z wykorzystaniem elucji gradientowej	66
5. Chromatografia żelowa	69
5.1. Mechanizm rozdzielania substancji w chromatografii żelowej i metodyka kalibracji w celu oznaczania masy cząsteczkowej	69
5.2. Metodyka postępowania dla określenia rozkładu masy cząsteczkowej polimeru / biopolimeru	73
5.3. Fazy stacjonarne i ruchome stosowane w chromatografii żelowej substancji lipofilowych i hydrofilowych oraz zasady doboru optymalnych warunków rozdzielania	74
5.4. Problemy i zakłócenia, które należy brać pod uwagę w praktyce i sposoby ich eliminacji	76
Chromatografia żelowa (GPC/SEC) - znaczenie symboli	84
6. Chromatografia jonowymienna i jonowa	85
6.1. Skrót	85
6.2. Typy wymiennicy jonowych	85
6.3. Pojemność jonowa i zakres pH silnych i słabych wymiennicy jonowych	85
6.4. Chromatografia jonowa i jonowymienna - opis szczegółowy	88
6.5. Chromatografia jonowa - ogólne reguły wpływania na retencję i zalecenia praktyczne	91
Selektywność i sprawność rozdzielania	93

	Skład eluentu, detekcja konduktometryczna, supresja jonów eluentu	98
	Supresory jonów eluentu	99
	Inne metody detekcji wykorzystywane w chromatografii jonowej	101
6.6.	Przykłady zastosowań chromatografii jonowej (HPIC)	102
7.	Kolumnowa chromatografia cieczowa w rozdzielaniu peptydów i białek	107
7.1.	Wprowadzenie	107
7.2.	Efekty i zjawiska wpływające na selektywność rozdzielania peptydów i białek w warunkach chromatografii cieczowej oraz przykłady często stosowanych warunków rozdzielania	109
7.3.	Rozdzielanie peptydów i białek w układach faz odwróconych	113
7.4.	Eluenty, modyfikatory eluentu i programy elucji stosowane w układach faz odwróconych	115
7.5.	Rozdzielanie peptydów i białek w układach jonowymiennych	117
7.6.	Układy adsorpcyjne i adsorpcyjno - jonowymienne w normalnym układzie faz	119
7.7.	Chromatografia powinowactwa	121
7.8.	Chromatografia żelowa peptydów i białek	121
7.9.	Chromatografia oddziaływań hydrofobowych	123
7.10.	Metody detekcji w chromatografii peptydów i białek	124
7.11.	Podsumowanie	124
8.	Chromatograficzne metody rozdzielania związków optycznie czynnych	125
8.1.	Chiralność cząsteczek chemicznych	126
8.2.	Techniki rozdzielania enancjomerów ze szczególnym uwzględnieniem HPLC	128
	Chiralne fazy stacjonarne CSP's	129
	Typ I. Fazy wykorzystujące zjawisko przeniesienia ładunku	129
	Typ II. Chiralne polimery i pochodne celulozy	131
	Typ III. Cyklodekstryny	132
	Typ IV. Etery koronowe	133
	Typ V. Fazy ligandowymienne (LEC)	133
	Typ VI. Fazy proteinowe	134
9.	Aparatura, Kolumna, Sprawność rozdzielania, Przepuszczalność kolumny	137
9.1.	Aparatura HPLC	137
9.1.	Najważniejsze moduły składowe aparatu HPLC	139
	1. Pompa	139
	2. Zawór dozujący lub automatyczny podajnik próbek	141
	3. Kolumny HPLC	141
	4. Termostat kolumn	142
	5. Zawory proporcjonujące	142
9.3.	Elucja gradientowa - problemy związane ze stosowaniem elucji gradientowej i zalecenia przydatne w praktyce	143
9.4.	Detekcja w HPLC	146
9.5.	Dyspersja masy w kolumnie i ocena jakości (sprawności, przepuszczalności i selektywności) kolumny oraz pozakolumnowego rozmycia stref	149
	Znaczenie symboli	155
	Symbole greckie	156
10.	Sposób uzyskiwania zgodności przebiegu programu elucji gradientowej w kolumnie z wymaganą postacią programu oraz zapewnienia odtwarzalności parametrów retencji na drodze korekty programu elucji	157
10.1.	Wprowadzenie	157
10.2.	Część teoretyczna	157
10.3.	Część doświadczalna	160
10.4.	Wyniki i wnioski	160
	Znaczenie symboli	167

11. Oznaczanie ilościowe w HPLC	168
11.1. Metoda wzorca zewnętrznego (metoda krzywej kalibracyjnej)	168
11.2. Metoda wzorca wewnętrznego	170
11.3. Metoda dodatku wzorca	172
11.4. Metoda prostej normalizacji	173
11.5. Metoda normalizacji ze współczynnikami korekcyjnymi	175
12. Chromatografia cienkowarstwowa	176
12.1. Wprowadzenie	176
12.2. Zasada procesu rozdzielania	177
12.3. Technika pracy w przypadku chromatografii cienkowarstwowej	181
12.4. przebieg procesu chromatograficznego	184
12.5. Zalety chromatografii cienkowarstwowej	190
12.6. Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej	190
13. Preparatywna i procesowa chromatografia cieczowa	194
13.1. Wprowadzenie	194
13.2. Główne obszary zastosowań chromatografii w skali preparatywnej i procesowej	194
13.3. Techniki i mechanizmy chromatografii w zastosowaniach preparatywnych oraz zasady powiększania skali rozdzielania	195
13.4. Zjawiska przeladowania kolumny (powierzchni sorpcyjnej) i ich efektywne wykorzystanie w warunkach chromatografii preparatywnej i procesowej	198
13.5. Zasady optymalnego stosowania preparatywnej i procesowej chromatografii cieczowej	201
Ilość dozowanej substancji	202
Średnica kolumny	204
Długość kolumny	204
Średnica ziaren wypełnienia kolumny	205
Prędkość przepływu fazy ruchomej	206
Retencja	206
Optymalne warunki preparatywnego, albo procesowego otrzymywania substancji	208
13.6. Operacje jednostkowe, technologia otrzymywania substancji z zastosowaniem preparatywnej chromatografii cieczowej	208
13.7. Wymagania stawiane kolumnom dla celów preparatywnych i procesowych oraz sposoby ich spełnienia w praktyce	214
Postępowanie w przypadku wymiany eluentu / kolumny. Niektóre przyczyny nieprawidłowej pracy chromatografu i sposoby ich usuwania	222
1. Zasady ogólne	222
2. Kolejne etapy postępowania w przypadku wymiany eluentu z heptanu / heksanu na wodny roztwór buforowy, albo odwrotnie	223
3. Opis głównych problemów ze stabilną i poprawną pracą chromatografu cieczowego i sposoby ich usunięcia	224
Literatura uzupełniająca	225
Wykaz znaczenia skrótów i akronimów	226

1. PODSTAWOWE PARAMETRY OPISUJĄCE UKŁAD CHROMATOGRAFICZNY

Bogumiła Makuch, Marian Kamiński

Chromatografia jest techniką rozdzielania mieszanin substancji w układzie dwufazowym (faza stacjonarna / faza ruchoma). Jest przydatna do rozdzielania substancji, które można rozpuścić w jakimkolwiek rozpuszczalniku pod warunkiem, że istnieje równocześnie, minimalna chociaż rozpuszczalność w eluencie. Proces chromatograficzny można zdefiniować jako zespół oddziaływań faz z substancjami obecnymi w mieszaninie, który prowadzi do rozdzielania substancji i do opuszczania kolumny przez poszczególne składniki mieszaniny w różnym czasie. Mówiąc ściśle i w zgodzie z zasadami fizykochemii - proces chromatograficzny prowadzi do opuszczania kolumny przez poszczególne składniki mieszaniny rozdzielanych substancji, z różnymi wartościami objętości elucji.

Wyniki rozdzielania zapisywane są w formie pików chromatograficznych, których kształt (rozkład stężenia) odpowiada pasmu stężeniowemu substancji opuszczającej kolumnę chromatograficzną, a zapis ten nosi nazwę chromatogramu.

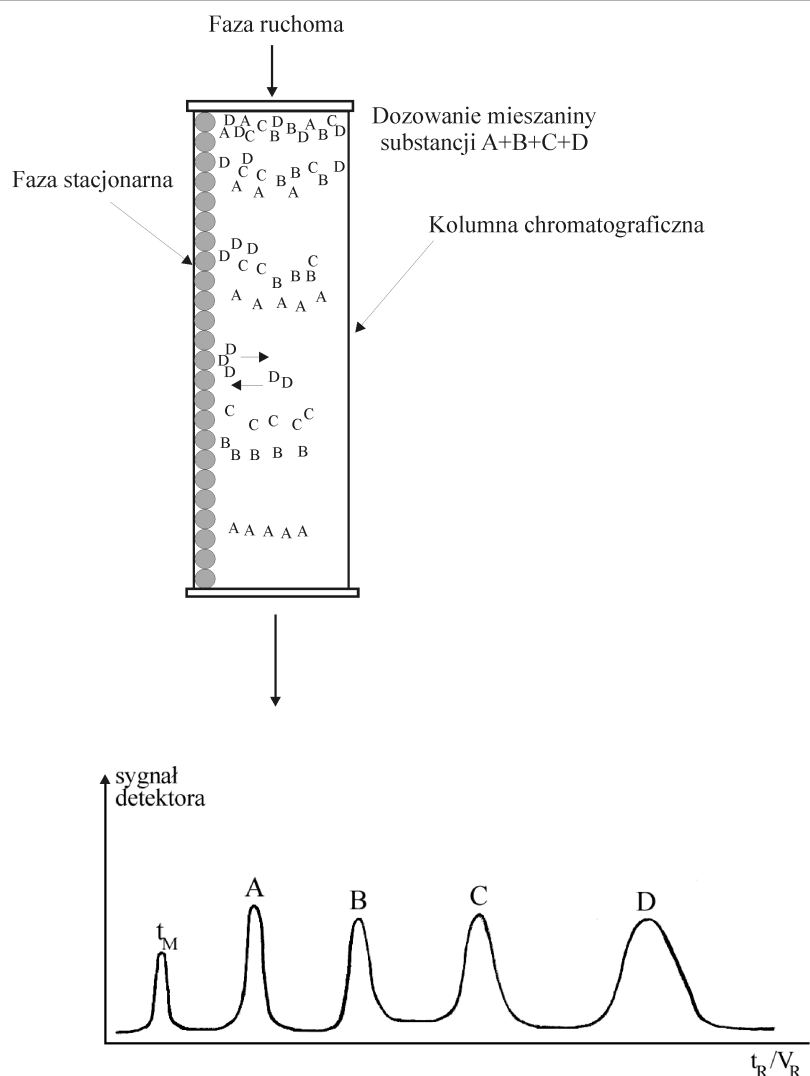
Chromatogram może być źródłem informacji dwojakiego typu:

- jakościowych - na podstawie miejsca pików na chromatogramie można m.in. wnioskować o rodzaju (właściwościach fizykochemicznych) rozdzielanych substancji, a na podstawie liczby pików, o liczbie składników w mieszaninie (jednakże pod warunkiem, że zastosowany układ chromatograficzny zapewnił rozdzielanie wszystkich składników mieszaniny a detektor jest czuły na wszystkie substancje - wszystkie je "widzi");
- ilościowych - wielkość rejestrowanego sygnału detektora, mierzona wysokością, albo powierzchnią pików chromatograficznych jest funkcją stężenia bądź masy substancji w próbce dozowanej do kolumny.

Na rysunku 1.1 przedstawiono schemat klasycznej kolumny chromatograficznej oraz wynik procesu rozdzielania w kolumnie, tzn. chromatogram.

Proces chromatograficzny to wielokrotna sorpcja i desorpcja substancji z fazy stacjonarnej do fazy ruchomej i odwrotnie, z fazy ruchomej do stacjonarnej. W zależności od "siły" oddziaływań z każdą z faz, składniki mieszaniny szybciej lub wolniej przemieszczają się wzdłuż warstwy wypełnienia i opuszczają kolumnę w różnym czasie. Jednocześnie pasma ulegają poszerzeniu (rozmyciu) na skutek procesów dyfuzyjnych i dyspersyjnych oraz w rezultacie ograniczonej szybkości zjawisk sorpcji-desorpcji.

Ze względu na różny mechanizm oddziaływań rozdzielanych substancji z fazą ruchomą i stacjonarną układy chromatograficzne dzieli się:



Rys. 1.1. Schemat kolumny chromatograficznej i chromatogram rozdzielonej mieszaniny.

1. Adsorpcyjne (ciecz - ciało stałe) w układzie faz normalnych (NP), gdy wykorzystuje się interakcje polarnych grup funkcyjnych rozdzielanych składników z polarnymi centrami aktywnymi, obecnymi na powierzchni fazy stacjonarnej. Przeciwnym do tego układu jest tzw. układ faz odwróconych (RP), gdy faza stacjonarna jest niepolarna a faza ruchoma polarna, a retencja i rozdzielanie substancji jest zależne od stopnia hydrofobowości molekuł. Do tej grupy należy też zaliczyć tzw. chromatografię oddziaływań hydrofobowych (HIC), gdy do rozdzielania wykorzystuje się hydrofobowe oddziaływania makromolekuł z hydrofobową powierzchnią fazy stacjonarnej, wzmacniane w warunkach zbliżonych do warunków tzw. wysalania.
2. Podziałowe (ciecz-ciecz), w których o rozdzielaniu decyduje różnica współczynników podziału składników mieszaniny między dwie fazy ciekłe, tzn. między ciekłą fazą ruchomą i ciekłą fazą stacjonarną - osadzoną statycznie na nośniku, bądź generowaną w sposób dynamiczny w czasie przepływu eluentu przez kolumnę.

3. Jonowymienne (zwane, w ich nowoczesnej realizacji - jonowymi), gdy rozdzielanie mieszaniny jest oparte na odwracalnej wymianie jonów z fazą stacjonarną. Do tej grupy należy też zaliczać tzw. chromatografię wykluczania jonowego, gdy mechanizm rozdzielania nie jest ściśle jonowymienny i wykorzystuje się zjawisko powstawania tzw. membrany Donnana.
4. Chromatografię par jonowych - alternatywa dla chromatografii jonowymiennej, wykorzystywana głównie w układach faz odwróconych, gdy jonowe, albo bardzo silnie polarne fragmenty cząsteczek substancji rozdzielanych są "maskowane" odpowiednim organicznym "przeciwjonem" i powstaje kompleks, który zachowuje się w układzie chromatograficznym podobnie jak substancja neutralna.
5. Chromatografię żelową, nazywaną chromatografią "wykluczania sterycznego" lub sitową, stosowaną do rozdzielania substancji o różnej masie molowej (w zakresie do ok. 10 000 000 Da) - wykorzystuje się mechanizm tzw. "sita molekularnego", czy tzw. "wykluczania sterycznego" - eliminując, na ile to możliwe, zjawiska sorpcji.
6. Chromatografię powinowactwa, - stosowaną w biochemii i w biotechnologii, gdy wykorzystuje się specyficzne reakcje chemiczne (np. oddziaływanie enzym - koenzym), albo innego typu specyficzne oddziaływania między fazą stacjonarną a substancjami rozdzielanymi (np. tzw. chromatografia "metalopowinowactwa" - oddziaływania Ni...S). Chromatografię powinowactwa można też stosować bez kolumny, wykonując rozdzielanie w naczyniu laboratoryjnym, albo bezpośrednio w bioreaktorze.

Układy chromatograficzne można opisać liczbowo. Opis taki dotyczy, głównie:

- A - parametrów fizycznych kolumny,
- B - selektywności układu chromatograficznego,
- C - sprawności układu,

Ad A - Główne fizyczne parametry kolumny uwzględniają wymiary kolumny tj. długość (L_c), średnicę wypełnienia kolumny (d_c), liniową (u) i objętościową (w) prędkość przepływu fazy ruchomej oraz średnią wielkość ziaren wypełnienia (d_p). Niekiedy, podawany jest, dodatkowo, zakres wielkości ziaren wypełnienia (najczęściej od 10% do 90% udziału masowego na krzywej rozkładu granulometrycznego). Parametrami kolumny są też: objętość martwa (V_0) i z nią związany - czas martwy kolumny (t_0). Objętość martwa kolumny zależy od wymiarów kolumny oraz od rodzaju i stopnia upakowania wypełnienia. Tzn., od porowatości całkowitej, a stąd więc, od porowatości między-ziarnowej i wewnątrz-ziarnowej. W przypadku tzw. kolumn pakowanych oraz od porowatości makro- i mezo-porów oraz mikroporów, w przypadku tzw. kolumn "monolitycznych), ale "w pierwszym przybliżeniu" nie zależy od natężenia przepływu eluentu. Objętość martwą można uważać za sumę objętością cieczy, która jest "uwięziona" (unieruchomiona) w porach oraz tej, która znajduje się między ziarnami wypełnienia. Analogicznym parametrem do objętości martwej kolumny jest czas martwy kolumny (t_0), który definiuje się jako czas od momentu wprowadzenia do kolumny substancji nie ulegającej sorpcji, jednak wnikającej do wszystkich porów wewnątrz ziaren wypełnienia, do chwili pojawienia się maksimum piku tej substancji na wylocie z kolumny. Czas martwy kolumny zależy od objętości martwej kolumny i od objętościowej prędkości przepływu fazy ruchomej (od natężenia przepływu fazy ruchomej).

Wzajemną zależność tych parametrów wyraża równanie:

$$t_0 = \frac{V_0}{w} \quad (1)$$

gdzie: w - objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej,

$$\text{w przybliżeniu: } V_0 = 0,6d_c^2 \cdot L_c \quad (2)$$

gdzie: L_c - długość kolumny,
 d_c - średnica wewnętrzna kolumny.

Równanie (2) jest słuszne, gdy całkowita porowatość wypełnienia wynosi około 0,76.

Wyznaczenie objętości martwej kolumny nie jest wcale proste. Dane literaturowe wskazują, że różnice oznaczonych eksperymentalnie wartości, sięgają +/-20% i otrzymana wartość zależy od warunków wyznaczania tego ważnego parametru kolumny, a przy bardzo dokładnej obserwacji, także od natężenia przepływu eluentu.

Najczęściej czas martwy (objętość martwą kolumny) w układach faz normalnych (NP), wyznacza się, stosując skwalan, albo fluoroalkany, jako substancję wzorcową, a fazą ruchomą jest rozpuszczalnik o średniej sile elucyjnej np. octan etylu. W układach faz odwróconych stosuje się często uracil lub D₂O lub stężony roztwór azotanu potasu (detekcję przy długości fali $\lambda=205-210$ nm), jako substancję testową, a fazą ruchomą może być metanol albo acetonitryl.

Ad B - Selektyność układu chromatograficznego dotyczy dwóch pojęć tj. selektynośći kolumny (sorbentu) i selektynośći fazy ruchomej eluentu. Najprościej selektyność układu chromatograficznego można określić odlegościami między maksimum kolejnych pików, przy założeniu, że mieszanina jest całkowicie rozdzielona. Odlegość między poszczególnymi maksimumami pasm stężeniowych składników mieszaniny daje pogląd o oddziaływaniach tych substancji z fazą stacjonarną (i fazą ruchomą). Selektyność układu chromatograficznego jest więc miarą oddziaływań międzycząsteczkowych i jest przede wszystkim zależna od budowy chemicznej składników rozdzielanej mieszaniny i od właściwości sorbentu i eluentu. Rodzaje oddziaływań międzyfazowych i międzycząsteczkowych oraz mechanizmy retencji będą szczegółowo opisane w kolejnych rozdziałach. Liczbowo, na użytek "chromatografisty", selektyność wyrażana jest parametrami retencji, tj., V_R - objętość retencji, t_R - czas retencji, k - współczynnik retencji.

Wyrażanie selektynośći za pomocą objętości, a szczególnie, za pomocą czasu retencji, utrudnia porównanie poszczególnych układów chromatograficznych (różne wymiary kolumny, różna prędkość przepływu fazy ruchomej powoduje uzyskanie różnych wartości czasu, a także objętości retencji).

Obiektywnym parametrem pozwalającym porównać selektyność różnych układów chromatograficznych jest bezwymiarowy współczynnik retencji k , który wiąże, w odniesieniu do konkretnej substancji, parametry eluentu i parametry fazy stacjonarnej kolumny.

$$k = K(V_s / V_m) = C_s V_s / C_m V_m \quad (3)$$

gdzie: K - stała podziału z równania Nernsta,
 V_s - objętość fazy stacjonarnej,
 V_m - objętość fazy ruchomej,
 C_m - stężenie substancji w fazie ruchomej,
 C_s - stężenie substancji w fazie stacjonarnej.

Należy pamiętać, że nie jest to proste przeniesienie równania Nernsta, gdzie założono, że stosunek objętości fazy organicznej do objętości fazy nieorganicznej jest bliski 1:1.

W praktyce współczynnik retencji k wyznacza się z chromatogramu, korzystając z poniższej zależności (4), zwanej równaniem elucji.

$$V_R = V_0(1+k) \quad \text{lub} \quad t_R = t_0(1+k) \quad (4)$$

gdzie: V_R - objętość retencji określonej substancji,
pozostałe zmienne j.w.

Kolejnym, szczególnie ważnym parametrem, opisującym selektywność kolumny jest α , tzn. - współczynnik selektywności, bądź retencja względna, albo współczynnik rozdzielania.

$$\alpha = k_2 / k_1 \quad (5)$$

gdzie: cyfry 1 i 2 odnoszą się do kolejnych pików chromatograficznych, odpowiednio: następnego i poprzedniego.

Ad C - Sprawność układu chromatograficznego jest wyrażana liczbą pólk teoretycznych (N), bądź tzw. wartością wysokości równoważnej półki teoretycznej, potocznie: "wysokością półki teoretycznej" (H). Poglądowo wysokość półki teoretycznej można zdefiniować jako teoretyczną wysokość wypełnienia kolumny, w zakresie której, ustala się stan równowagi stężenia substancji w fazie stacjonarnej i w fazie ruchomej.

W literaturze naukowej można znaleźć szereg teorii i zależności, wg których można teoretycznie określić sprawność kolumny chromatograficznej, uwzględniając wielkość ziaren, strukturę wypełnienia, kinetykę dyfuzji, opory przenoszenia masy, prędkość i profil przepływu cieczy, kinetykę zjawisk sorpcji - desorpcji itp. W praktyce, liczbę pólk teoretycznych można łatwo obliczyć na podstawie chromatogramu, korzystając z zależności (6):

$$N = 5.545 (l_R / w_{1/2})^2 \quad (6)$$

gdzie: l_R - odległość maksimum pików od punktu dozowania;
 $w_{1/2}$ - szerokość pików w połowie wysokości (obliczona na podstawie chromatogramu).

Obliczenia wykonane na podstawie chromatogramu z zastosowaniem zależności (6) oraz innych, uwzględniających szerokość pików przy linii bazowej i ich odległość od punktu dozowania, są teoretycznie poprawne, tylko wtedy, gdy kształt pików jest gaussowski. Otrzymana wartość (N) jest różna dla substancji o różnych współczynnikach retencji. Na ogół przyjmuje się, że dopuszczalne są różnice o około 15%. Większe różnice są spowodowane nadmiernym wpływem tzw. poza-kolumnowych efektów rozmycia stref substancji, nieregularnym profilem przepływu cieczy w kolumnie, albo / i wyraźnie nieliniowymi zjawiskami sorpcji w kolumnie.

W przypadku pików niesymetrycznych, do obliczania sprawności kolumny stosuje się równanie Dorsey-Foley'a, które opisuje zależność (7)

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

gdzie: $w_{0,1}$ - szerokość pików na wysokości 10 % powyżej podstawy pików (powyżej linii bazowej),

B/A - stosunek szerokości lewej / prawej (zstępującej do wstępującej) strony piku, wyznaczony na poziomie 10% wysokości piku, inaczej współczynnik asymetrii (A_s). W praktyce pik uważa się za symetryczny, gdy współczynnik A_s ma wartość 0.95 do 1.1.

Obecnie, ocenę sprawności kolumny dokonuje się najczęściej z zastosowaniem systemu komputerowego. Użytkownik kupując kolumnę otrzymuje się certyfikat jakości kolumny, w którym m. in. podane są liczby pól teoretycznych, wyznaczone dla kilku substancji mieszaniny testowej.

Bardziej szczegółowy opis parametrów, od których zależy sprawność układów chromatograficznych oraz metod wyznaczania w praktyce sprawności kolumny jest przedstawiony w rozdziale "Aparatura, kolumna, sprawność rozdzielania".

Końcowy efekt procesu chromatograficznego jest opisany stopniem rozdzielania (R_s) dwóch sąsiadujących na chromatogramie, substancji "1" i "2", wyrażonym równaniem (8), które ma podstawowe znaczenie w chromatografii. Uzależnia ono stopień rozdzielania substancji od sprawności i selektywności układu chromatograficznego :

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{1 + k_2} \quad (8)$$

gdzie: k_2 - współczynnik retencji substancji później eluowanej,
znaczenie innych parametrów podano poprzednio.

Każdy z czynników równania (8) jest niezależny od drugiego. Istotne jest stwierdzenie, że im wyższa sprawność kolumny, tym niższa jest wymagana selektywność układu, natomiast, warunkiem koniecznym uzyskania rozdzielania jest $\alpha > 1.0$. Im wartość α jest bliższa 1.0, tym nieproporcjonalnie wyższa musi być sprawność kolumny. Jednocześnie z równania (8) widać, że nie jest celowe zwiększanie współczynnika retencji powyżej wartości $k = \text{ok. } 10$. W przeciwnym razie wzrasta czas rozdzielania, spada granica oznaczalności, z powodu spadku wysokości pików, tzn. spadku stężenia w maksimum piku, a praktycznie nie wzrasta już stopień rozdzielania substancji (np. dla $k = 10$, ostatni czynnik w równaniu (8) wynosi 10/11, a dla $k = 20$ to 20/21, więc praktycznie nie różni się od 10/11).

Przyjmuje się, że w celu wykonywania oznaczeń ilościowych, współczynnik R_s powinien mieć wartość powyżej ok. 0,9. Zwiększanie R_s ponad wartość 1,0, a szczególnie 1,5 jest działaniem nieefektywnym w warunkach chromatografii analitycznej, ponieważ prowadzi do zwiększania czasu rozdzielania, nie wpływając na dokładność otrzymanych wyników.

Niektóre inne, powszechnie stosowane w chromatografii, określenia to:

Elucja izokratyczna (chromatografia w warunkach elucji izokratycznej, albo warunki elucji izokratycznej) - rozdzielanie przebiega ze stałym składem fazy ruchomej (eluentu).

Elucja gradientowa (chromatografia w warunkach elucji gradientowej, niekiedy, "chromatografia gradientowa") - skład fazy ruchomej jest zmienny w sposób ciągły (gradient elucji), bądź w sposób skokowy (elucja stopniowa) w czasie rozdzielania. Zasadą jest wzrost siły elucyjnej fazy ruchomej w funkcji czasu elucji (objętości eluentu, płynącego przez kolumnę).

Pojemność względem pików - określa liczbą substancji, które mogą być rozdzielone w kolumnie w warunkach elucji izokratycznej. Każda kolumna chromatograficzna ma określoną długość

i określoną sprawność, a więc w zakresie $k = 0$ do $k = 10$, jest w stanie "pomieścić" określoną liczbę rozdzielanych substancji. Im mniej rozmyte pasma stężeniowe (większa sprawność kolumny), tym większa pojemność względem pików.

Impedancja separacji - parametr charakteryzujący ciśnienie konieczne dla uzyskania jednej półki teoretycznej w kolumnie w jednostce czasu, a więc opisujący przepuszczalność kolumny w odniesieniu do tzw. efektywnej sprawności kolumny. Szczególnie korzystnymi, bardzo niskimi, wartościami impedancji separacji charakteryzują się wprowadzone niedawno, tzw. kolumny monolityczne, które nie są wypełnione ziarnistym sorbentem, ale wypełnienie stanowi otrzymany syntetycznie "monolityczny" sorbent, tzn., warstwa wypełnienia, porowata w całej objętości kolumny, złożona z tzw. makro-porów, mezo-porów i mikro-porów. Te ostatnie decydują o powierzchni sorpcyjnej monolitycznego wypełnienia kolumny, natomiast w przestrzeni makro-porów i mezoporów przepływa eluent, przenoszący cząsteczki rozdzielanych substancji.

Porowatość między-ziarnowa - udział objętości przestrzeni między ziarnami fazy stacjonarnej w kolumnie w całej objętości wypełnienia kolumny. W przypadku kolumny monolitycznej, funkcję przestrzeni między-ziarnowej pełni objętość makro - porów i mezo - porów.

Porowatość wewnątrz-ziarnowa - udział objętości dostępnej dla cząsteczek eluentu i analitu wewnątrz ziaren wypełnienia kolumny (a w przypadku kolumny monolitycznej łącznej objętości mikro - porów), odniesiony do łącznej objętości ziaren (niekiedy, do łącznej objętości wypełnienia kolumny). Ziarna fazy stacjonarnej mogą być całkowicie porowate lub tylko porowate w warstwie powierzchniowej. Pory wewnątrz ziarna mają różne średnice, długości, są dwustronnie lub jednostronnie otwarte.

1.1. PODSTAWOWE PARAMETRY I WYMAGANIA WOBEC FAZY STACJONARNEJ ORAZ ELUENTU. NAJWAŻNIEJSZE ZASADY POSTĘPOWANIA ZAPEWNIAJĄCE EFEKTYWNE STOSOWANIE CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

Parametry charakteryzujące fazę stacjonarną (sorbent)

Najważniejsze, to:

- Właściwości powierzchni sorpcyjnej, tzn., rodzaj grup funkcyjnych oraz rodzaj i zawartość zanieczyszczeń (np. jonów metali) oraz centrów o szczególnie wysokiej energii na powierzchni sorpcyjnej (niekorzystne);
- Wielkość powierzchni właściwej sorbentu. Np., żel krzemionkowy o wielkości porów 60 Å, może mieć powierzchnie właściwą nawet do 750 m²/g. Wysoka wartość powierzchni właściwej jest często pożądaną cechą sorbentu, ale może być niekorzystna.;
- Stopień obsadzenia powierzchni sorpcyjnej grupami aktywnymi, tzn., biorącymi udział w oddziaływaniach sorpcyjnych, wyrażony w mMol/g, albo w % (np. węgla alifatycznego). Wysoka wartość stopnia obsadzenia powierzchni sorpcyjnej jest pożądaną cechą sorbentu (niekiedy, może być niekorzystna);

Im większa powierzchnia sorpcyjna, a także im większy stopień obsadzenia grupami funkcyjnymi tej powierzchni, tym większa retencja, a także większa pojemność sorpcyjna, a więc lepsza przydatność sorbentu dla preparatywnego wykorzystania kolumny. Niekiedy, jed-

nak, sorbenty o bardzo wysokiej wartości powierzchni właściwej i o wysokim stopniu obsadzenia grupami aktywnymi na jednostkę powierzchni sorbentu, charakteryzują się nieliniowością izotermi sorpcji i piki chromatograficzne, szczególnie substancji wykazujących wyższą retencję są poszerzone i asymetryczne po stronie zstępującej. Wówczas, w warunkach chromatografii analitycznej, są to niepożądane cechy sorbentu. Pożądane są optymalne wartości w/w parametrów.

- Wielkość porów (w istocie, chodzi o średnią wielkość i zakres wielkości porów). Średnie wielkości porów sorbentów do HPLC mogą wynosić 50, 60, 80, 100, 120, 150, 200, 250, 300, 500, 1000, 2500, 5000, aż do 10 000 Å (1Å = 0.1nm). Wielkość porów powinna być dostosowana do wielkości cząsteczek rozdzielanych substancji, tak, aby mogły one wnikać wewnątrz porów i wykorzystywać powierzchnię sorpcyjną do rozdzielania. Szczególnie, pod tym względem warunki, dotyczą chromatografii żelowej. Można przyjąć, że im większe pory wypełnienia kolumny, tym mniejsza powierzchnia właściwa sorbentu (a, więc, tym mniejsza retencja) oraz tym mniejsza odporność mechaniczna wypełnienia na mechaniczne oddziaływanie ciśnienia (kolumny o wysokich wartościach wielkości porów mogą być wykorzystywane tylko przy ograniczonych ciśnieniach).
- Średnia wielkość ziaren wypełnienia, a w istocie, powinno się uwzględniać wartość średnią i rozkład wielkości ziaren.
- Znaczenie praktyczne może mieć też gęstość materiału wypełnienia kolumny, jego podatność na elektryzowanie się, jednak, dotyczy to warunków wypełnienia kolumny, a w przypadku kolumny wypełnionej, może mieć znaczenia dla wykonywania przeliczeń dla innych warunków rozdzielania, np. w celu powiększenia skali rozdzielania.

Wymagania wobec eluentu i składników eluentu

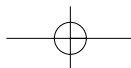
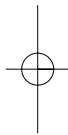
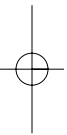
- Eluent powinien być komponowany przede wszystkim z tych składników, które zapewniają wystarczającą selektywność układu chromatograficznego. Powinno się, jednak, przy wyborze eluentu uwzględniać też następujące, inne przesłanki:
- Składniki eluentu nie mogą chemicznie reagować ani z fazą stacjonarną, ani z substancjami rozdzielanymi, wykluczając tworzenie par jonowych i inne zamierzone działania. Nie mogą, oczywiście, także reagować wzajemnie ze sobą i z tymi materiałami konstrukcji aparatu chromatograficznego, które mają kontakt z eluentem.
- Eluent powinien charakteryzować się możliwie niską lepkością, co wpływa na obniżenie ciśnienia pracy aparatu i zwiększenie okresu między-naprawczego pompy oraz umożliwia stosowanie dłuższej kolumny albo / i wypełnienia o mniejszych ziarnach. Jest też korzystne dla uzyskania wysokiej sprawności rozdzielania, ponieważ ze wzrostem lepkości eluentu, spadają wartości współczynników dyfuzji, a stąd pogarsza się kinetyka wymiany masy w kolumnie.
- Szczególnie w warunkach preparatywnego wykorzystania chromatografii cieczowej, ale także w przypadku stosowania niektórych detektorów (np. MS, albo LLSD, LC-FID), ważne znaczenie ma też niskie ciepło parowania eluentu, niska temperatura wrzenia i nieobecność w nim nielotnych substancji, których nie można by odparować.
- W przypadku wykorzystywania detektorów spektrofotometrycznych eluent nie powinien absorbować światła w tych zakresach długości fali, które będą wykorzystywane do detekcji.

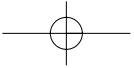
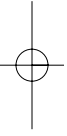
Dotyczy to też innych cech eluentu, które mogą przeszkadzać w przypadku stosowania innych detektorów, np. przewodnictwo w przypadku detektora konduktometrycznego, niskiego potencjału red-ox składników eluentu w przypadku detektora elektrochemicznego.

Z drugiej strony, do eluentu dodaje się często różne dodatki, nierzadko, w bardzo niskich stężeniach, aby w ten sposób zapewnić np. kompleksowanie jonów metali, które mogłyby bez tego wchodzić w reakcję ze składnikami analitu, aby obniżyć ryzyko denaturacji biopolimerów, albo sprzyjać ich renaturacji, czy też, umożliwić stosowanie tzw. odwróconej detekcji, albo w innym celu.

Inne najważniejsze zasady, których przestrzeganie zapewnia efektywne stosowanie chromatografii cieczerwowej w praktyce

- Nie powinno się dopuszczać do wyschnięcia kolumny. W wypełnieniu, nawet bardzo dobrze upakowanej kolumny, może wówczas nastąpić pęknięcie, co zdecydowanie pogarsza sprawność kolumny i bez ponownego napełnienia kolumny nie daje się usunąć.
- Kolumny nie powinno się poddawać mechanicznym udom, ani w sposób gwałtowny nie powinno się obniżać ciśnienia eluentu. W przeciwnym razie może nastąpić osiadanie wypełnienia kolumny, pogorszenie profilu cieczy i obniżenie sprawności rozdzielania.
- Próbkę zawierającą zanieczyszczenia mechaniczne powinna przed dozowaniem do kolumny zostać przefiltrowana przez obojętny (inertny) filtr membranowy (np. 0.45 mikrometra). Nie powinna też ona zawierać substancji trwale sorbowanych na powierzchni wypełnienia kolumny. Stosowanie tzw. "kolumn ochronnych" w celu przeciwdziałania skutkom tego typu zanieczyszczeń jest praktycznie nieskuteczne. Gdy próbka zawiera zanieczyszczenia mechaniczne kolumny ochronne trzeba bardzo często wymieniać, gdy, natomiast zawiera zanieczyszczenia trwale sorbowane na wypełnieniu - nigdy nie wiadomo, w którym momencie pojemność powierzchni sorpcyjnej kolumny ochronnej została przekroczona i następuje "uszkodzenie" powierzchni sorpcyjnej właściwej kolumny rozdzielczej. Obecność substancji trwale sorbowanych na powierzchni wypełnienia w dozowanej próbce, zawsze powoduje systematyczny spadek retencji oznaczanych substancji, tym szybszy, im zawartość tych zanieczyszczeń jest wyższa.
- Należy przestrzegać zaleceń producenta kolumny, zarówno, co do granicznych wartości pH eluentu, jaki i do, składników eluentu, których nie należy stosować w przypadku określonego typu wypełnienia kolumny.
- Najkorzystniejszym rozpuszczalnikiem substancji dozowanych do kolumny HPLC jest eluent, albo ciecz o składzie odpowiadającym początkowemu składowi eluentu (w przypadku programowania składu fazy ruchomej, tzn., w warunkach elucji gradientowej). Stosowanie rozpuszczalnika o mniejszej sile elucyjnej, jest korzystne, gdy w warunkach analizy śladowej, dozuje się dużą objętość próbki i wykorzystuje się w ten sposób efekt "zateżenia" i zwężenia pasma analitu na powierzchni sorbentu na wlocie do kolumny. Stosowanie w roli rozpuszczalnika substancji dozowanych do kolumny cieczy o wyższej sile elucyjnej od eluentu (początkowego składu eluentu w warunkach elucji gradientowej), jest niekorzystne, szczególnie gdy objętość dozowanej próbki jest względnie duża. Wiąże się m.in. ze zmniejszeniem retencji, rozdzielanych substancji, szczególnie tych, które są słabo sorbowane oraz z innymi problemami. Stosowanie w funkcji rozpuszczalnika próbki, cieczy o znacznie wyższej sile elucyjnej od eluentu jest uzasadnione tylko wówczas, gdy analizowane substancje nie rozpuszczają się w eluencie. Należy jednak dozować jak najmniejszą objętość jak najbardziej rozcieńczonej próbki.





2. CHROMATOGRAFIA W UKŁADACH FAZ NORMALNYCH

Bogumiła Makuch

Układem faz normalnych (NP) nazywa się układ chromatograficzny, w którym faza stacjonarna jest bardziej polarna niż faza ruchoma, a podstawowym zjawiskiem decydującym o rozdzielaniu jest adsorpcja na powierzchni fazy stacjonarnej.

Od pierwszych lat stosowania chromatografii cieczowej, fazą stacjonarną były substancje nieorganiczne np. krzemian magnezu, węglan magnezu, tlenek magnezu, bądź węglan wapnia i inne, zaś fazą ruchomą rozpuszczalniki organiczne.

Rozwój wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), a szczególnie wprowadzenie nowych rodzajów faz stacjonarnych, doprowadził do stosowania nie tylko nieorganicznych, ale również organicznych faz stacjonarnych, których własności są podobne lub prawie takie same jak adsorbentów nieorganicznych. Zatem, pod pojęciem “rozdzielanie w układzie faz normalnych” rozumie się, iż mechanizm fizykochemiczny decydujący o rozdzielaniu, to adsorpcja, a fazą stacjonarną może być adsorbent nieorganiczny bądź organiczne substancje, związane na powierzchni nieorganicznego, albo organicznego nośnika. W chromatografii w układach faz normalnych, rolę centrów aktywnych pełnią polarne grupy funkcyjne.

2.1. NIEORGANICZNE FAZY STACJONARNE

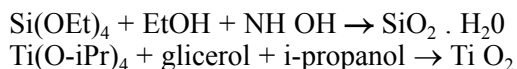
Układ faz normalnych został zastosowany w pierwszym doniesieniu Michaiła Cwieta (odkrycie chromatografii elucyjnej - Warszawa, 1904) o rozdzieleniu ekstraktu eterowego z liści (mieszanina chlorofili), wykonanym z zastosowaniem nieorganicznej fazy stacjonarnej w układzie faz normalnych (faza stacjonarna: sproszkowana kreda, faza ruchoma - eter naftowy). Następnie przez kilkadziesiąt lat stosowano sole nieorganiczne jak np. węglan wapnia, krzemian magnezu, glinokrzemiany i inne, jako fazy stacjonarne. Jednakże największe zastosowanie dla celów rozdzielania substancji w układach faz normalnych mają tlenkowe adsorbenty nieorganiczne: porowaty di-tlenek krzemu (SiO_2 - żel krzemionkowy, od 1938r.), popularnie zwany krzemionką di-tlenek cyrkonu (ZrO_2), di-tlenek tytanu (TiO_2) i tlenek glinu (Al_2O_3).

Przez wiele lat stosowano, prawie wyłącznie żel krzemionkowy oraz w mniejszym stopniu tlenek glinu, popularnie zwany “aluminą”.

Technologia otrzymywania żelu krzemionkowego jest procesem skomplikowanym, a właściwości finalnego produktu są zależne od wielu parametrów technologicznych. Żel krzemionkowy otrzymywano przez wiele lat poprzez dodatek kwasu solnego do wodnego roztworu krzemianu sodu (tzw. “szkła wodnego”). Wytrącony osad suszono w temperaturze pokojowej, pozostawiano starzeniu i w miarę potrzeby kruszono, w celu uzyskania odpowiedniej granulacji. Pozostałe sole sodowe usuwano, a uwodniony żel krzemionkowy odwadniano (aktywowano) susząc w temperaturze około 120°C przez kilka godzin.

Obecnie do otrzymywania tlenkowych adsorbentów stosuje się procedurę sol-gel polegającą na kontrolowanej hydrolizie alkoholów odpowiednich metali tj $\text{Al}(\text{O-iPr})_3$, $\text{Si}(\text{O-Et})_4$, $\text{Zr}(\text{O-iPr})_4$, $\text{Ti}(\text{O-iPr})_4$, gdzie Et - grupa etylowa, iPr - grupa izopropylowa.

Schemat procesu przedstawiono poniżej:

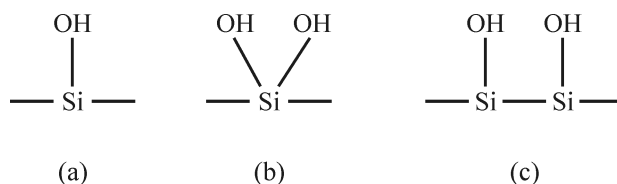


Przebieg tego procesu jest dobrze poznany, dokładnie określono wpływ pH, temperaturę i kinetykę. Produkt końcowy można modyfikować dodatkiem różnych substancji np. dodatek kwasu winowego pozwala uzyskać ziarna o kształcie rurki lub kształcie robaczkowym.

Przydatność chromatograficzna tlenków glinu, krzemu, tytanu i cyrkonu jest charakteryzowana obecnością grup hydroksylowych (M-OH), gdy M to Si, Al, Ti, Zr i grup metal-tlen-metal (M-O-M) na powierzchni sorbencyjnej. Całkowita zawartość wymienionych powyżej grup, ich dostępność dla rozdzielanych substancji i użyteczność dla modyfikacji powierzchni zależy od pochodzenia sorbentu, traktowania chemicznego i termicznego. Na strukturę tlenku metalu, a w dalszej kolejności na charakter kwasowo-zasadowy ma duży wpływ natura i zawartość metali alkalicznych oraz temperatura kalcynacji.

Żel krzemionkowy jest nadal dość powszechnie stosowany w roli fazy stacjonarnej w chromatografii cieczowej. Wynika to z niskiej ceny w związku z powszechną obecnością krzemu i jego związków w przyrodzie oraz bardzo bogatego zbioru przykładów zastosowań. Tlenki tytanu, czy cyrkonu są znacznie bardziej kosztowne. Należy jednak zaznaczyć, że w wielu przypadkach stosując tlenek glinu lub cyrkonu, uzyskuje się znacznie lepsze wyniki rozdzielania i większą odporność na podwyższone pH eluentu, niż w przypadku stosowania żelu krzemionkowego.

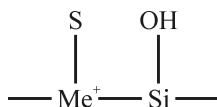
O właściwościach adsorbencyjnych żelu krzemionkowego i w dużym stopniu, innych wymienionych tlenków, decyduje rodzaj i ilość grup hydroksylowych na powierzchni i ich dostępność. Szczególnie do grup OH adsorbują się cząsteczki rozdzielanych substancji. W przypadku adsorbentów o charakterze tlenków metali, te ostatnie też odgrywają rolę jako centra adsorpcji.



Według Snydera i innych autorów, na powierzchni żelu krzemionkowego wyróżnia się trzy rodzaje miejsc aktywnych wynikających z obecności grup hydroksylowych tj. wolne (a), bliźniacze (b) i tzw. zaasocjowane (c) grupy hydroksylowe:

W chromatografii najbardziej pożądana jest obecność grup typu b i c. Wolne grupy hydroksylowe zachowują się jak bardzo słaby kwas (ich $pK_a = 7,1$), natomiast grupy bliźniacze są mniej kwaśne niż grupy hydroksylowe i stąd ich większa przydatność do rozdzielania związków o charakterze zasadowym. Uważa się, że łączna liczba grup hydroksylowych powinna wynosić około $8 \mu\text{moli/m}^2$.

Istotny wpływ na właściwości powierzchni żelu krzemionkowego (i innych tlenkowych adsorbentów), odgrywa śladowa zawartość różnych metali - wapnia, sodu, magnezu, żelaza, potasu, a czasem też kadmu. Metale te mają bezpośredni wpływ na kwasowość powierzchni.



Stwierdzono, że zawartość tych metali może wynosić od dziesiątych części do kilkudziesięciu ppm. Obecność metali na powierzchni tworzy, jeszcze jeden rodzaj centrum aktywnego, w którym ma miejsce tworzenie się kompleksu metalu i substancji rozdzielanych wg poniższego schematu (S - cząsteczka sorbowana):

Poważną wadą żelu krzemionkowego jest brak odporności na pH powyżej 7. Tych ograniczeń nie ma, gdy fazami stacjonarnymi są tlenek tytanu, cyrkonu bądź tlenek glinu. Wówczas można stosować eluenty o wyższych, ale też ograniczonych, wartościach pH. Szczególnie, w przypadku tlenku glinu nie można przekraczać pH 9.5.

Obecnie chromatografia adsorpcyjna z wykorzystaniem nieorganicznych adsorbentów, ma znacznie mniejsze zastosowanie niż dawniej. Podstawową wadą adsorbentów, jako faz stacjonarnych, jest ich wrażliwość na obecność wody w eluencie. Następuje zmiana właściwości adsorpcyjnych - niekontrolowana dezaktywacja. Tych niedogodności unika się w zasadniczym stopniu, stosując modyfikację powierzchni sorpcyjnej związanymi substancjami organicznymi o określonych grupach funkcyjnych, tzn., stosując tzw. fazy związane.

2.2. INNE ADSORBENTY NIEORGANICZNE

Oprócz opisanych powyżej tlenków, jako nieorganiczne adsorbenty, stosuje się również niektóre sole nieorganiczne, np. krzemian magnezu pod nazwą "Florasil", szkło o kontrolowanej porowatości (CPG), heksagonalne kryształy uwodnionego fosforanu wapnia $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (hydroksyapatyt), również sadzę grafitowaną.

Te fazy stacjonarne są stosowane okazjonalnie. Zdarza się uzyskanie szczególnie zadowalających wyników rozdzielania dla określonych typów związków chemicznych, np. w przypadku rozdzielania niektórych białek z zastosowaniem hydroksyapatytu.

Wśród nieorganicznych adsorbentów na uwagę zasługuje grupa zwana mezoporowate gli-nokrzemiany o nazwie handlowej MCM-41, wyprodukowane przez Mobil Oil Corporation w 1992 r. Właściwości chromatograficzne tego typu fazy stacjonarnej mogą być modyfikowane przez różny stosunek zawartości krzemu i glinu. Zaletą tego wypełnienia jest jednorodna określona porowatość 2-8 nm, jednolita struktura porów i niewielka kwasowość oraz możliwość podstawiania krzemu innymi metalami np. cyrkonem lub tytanem.

Przeprowadzono szereg badań porównawczych wyników rozdzielania na tych wypełnieniach i na powszechnie stosowanych tlenkach. W wielu przypadkach uzyskano znaczne skrócenie czasu rozdzielania oraz wysoką selektywność. Nie bez znaczenia jest możliwość stosowania tej grupy faz stacjonarnych do rozdzielania związków kwaśnych, zasadowych i obojętnych jednocześnie.

Opisane powyżej, nieorganiczne fazy stacjonarne też wykazują znaczną wrażliwość na obecność wody w fazie ruchomej, stąd kłopoty z powtarzalnością parametrów retencji, w wyniku niekontrolowanej adsorpcji wody. Długi czas równoważenia kolumny, tzn. uzyskania stanu równowagi między zawartością wody w fazie stacjonarnej i zawartością wody na powierzchni adsorbentu, uniemożliwia praktycznie stosowanie warunków elucji gradientowej, tzn. pro-

gramowania zmiany składu fazy ruchomej. Również tę niedogodność usunięto stosując wiązane fazy stacjonarne do rozdzielania w układzie faz normalnych.

2.3. WIAZANE FAZY STACJONARNE STOSOWANE W NORMALNYM UKŁADZIE FAZ

Obecnie związane chemicznie fazy stacjonarne praktycznie zastąpiły stosowanie naturalnych, nieorganicznych adsorbentów w chromatografii cieczowej w układach faz normalnych.

Ogólna zasada tworzenia wiązanych faz stacjonarnych, przydatnych w układach faz normalnych, polega na tym, że centra aktywne tworzy grupa polarna, związana najczęściej wiązaniem alkilo-, albo arylo- siloksanowym za pośrednictwem grupy hydroksylowej, obecnej pierwotnie na powierzchni żelu krzemionkowego lub innych tlenków, przed przeprowadzeniem chemicznej modyfikacji powierzchni sorpcyjnej.

Najczęściej żel krzemionkowy jest modyfikowany związkami chemicznymi, posiadającymi następujące grupy: aminową, nitrową, cyjanową, diol, fenyłową lub cyklodekstrynami. Przygotowuje się też czasem wiązane fazy stacjonarne, przydatne do rozdzielania ściśle określonej mieszaniny substancji.

Niektóre z wyżej wymienionych faz np. cyjanowa lub fenyłowa, mogą być stosowane, zarówno w układzie faz normalnych, jak również, w układzie faz odwróconych (RP).

Można, generalnie stwierdzić, że wiązane fazy stacjonarne stosuje się w układach faz normalnych do rozdzielania tych substancji, które bardzo trudno rozdzielić w układach faz odwróconych (izomery strukturalne, izomery położeniowe, izomery optyczne), albo gdy rozdzielanie w zamierzony sposób nie jest możliwe w układzie faz odwróconych, (rozdzielanie grupowe węglowodorów, lipidów, kwasów tłuszczowych itp.). Z powodu określonej hydrofobowości oraz niższej, wartości energii oddziaływań adsorpcyjnych czas retencji w warunkach wykorzystania eluentu o tym samym składzie jest znacznie krótszy, gdy stosuje się związaną fazę stacjonarną, niż z zastosowaniem adsorbentów nieorganicznych o tego samego typu oddziaływaniach sorpcyjnych. Np., w przypadku stosowania związanej fazy stacjonarnej typu DIOL, w porównaniu do żelu krzemionkowego.

Istotną wadą układów faz normalnych z zastosowaniem wszystkich adsorbentów, także faz wiązanych, jest rażliwość na zawartość wody w fazie ruchomej. Jest to szczególnie widoczne, gdy fazą ruchomą jest nie polarny rozpuszczalnik, np. heptan, czy eter. Należy pamiętać, że nawet w takich nie polarnych rozpuszczalnikach jak heksan czy heptan, zawartość wody w temperaturze pokojowej wynosi do 0,01 % v/v W takiej sytuacji, nawet zmiana zawartości wody o kilkanaście ppm zmieni retencję. Efekt ten jest spowodowany tworzeniem silnych wiązań wodorowych między wodą a grupami hydroksylowymi na powierzchni adsorbentu.

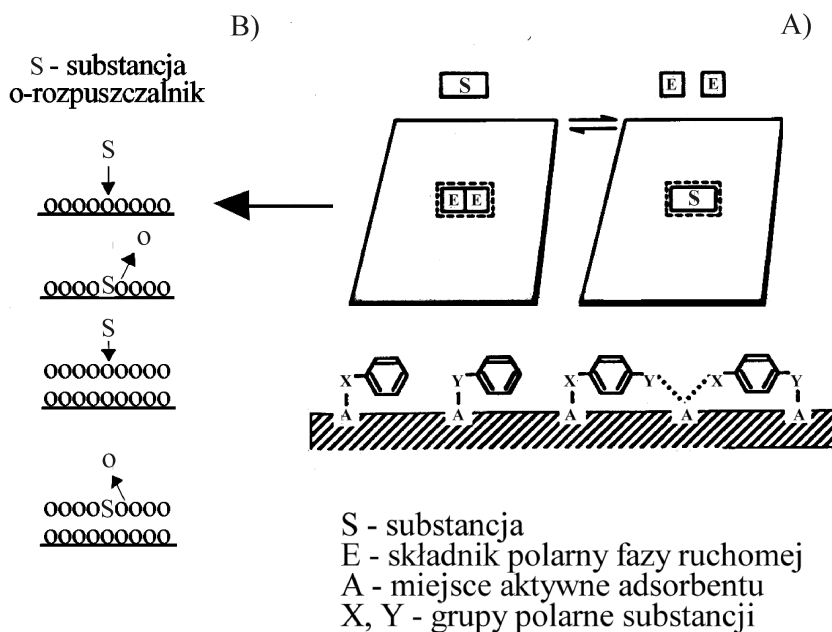
Ta bardzo istotna niedogodność adsorpcyjnych układów faz normalnych jest zdecydowanie mniej "dotkliwa" w przypadku stosowania polarnych faz stacjonarnych, związanych chemicznie z żelem krzemionkowym, albo innym polarnym adsorbentem (tzw. faz typu Diol, NH₂ czy CN). Ważną zaletą faz wiązanych jest dość duża szybkość osiągnięcia stanu równowagi z fazą ruchomą pod względem zawartości wody na powierzchni sorpcyjnej. Mogą być, zatem, stosowane w warunkach chromatografii cieczowej z elucją gradientową.

2.4. MECHANIZM RETENCJI W UKŁADACH FAZ NORMALNYCH

Do opisu mechanizmu retencji w adsorpcyjnych układach faz normalnych stosowany jest model Snydera - Soczewińskiego. Autorzy tego modelu zakładają konkurencyjność oddziaływań

między powierzchnią adsorbentu (centrami aktywnymi na powierzchni sorpcyjnej) a cząsteczkami substancji rozdzielanych i cząsteczkami rozpuszczalnika (fazą ruchomą). Oddziaływania tych substancji z powierzchnią adsorbentu są natury dyspersyjnej bądź mają miejsce słabe oddziaływania typu dipol - dipol.

W warunkach chromatografii analitycznej, stężenia substancji rozdzielanych są niskie, a powierzchnia adsorbentu pokryta jest monowarstwą cząsteczek, będących składnikami fazy ruchomej, a retencja rozdzielanych substancji jest efektem wypierania cząsteczek fazy ruchomej z powierzchni adsorbentu przez cząsteczki rozdzielanych substancji i zajęciem ich miejsca lub wynikiem asocjacji cząsteczek substancji w warstwie rozpuszczalnika. W przypadku asocjacji



Rys 2.1. Schemat oddziaływań między rozdzielanymi substancjami i fazą ruchomą a powierzchnią adsorbentu.

cząsteczka "chromatografowanej" substancji usuwa w przybliżeniu równoważną objętość fazy ruchomej z warstwy podwójnej rozpuszczalnika zaadsorbowanego na powierzchni fazy stacjonarnej, czyniąc dostęp do "odkrytego" centrum aktywnego. Schematycznie konkurencyjność oddziaływań między substancjami i fazą ruchomą a powierzchnią adsorbentu przedstawiono na rys. 2.1 a i b.

Proces retencji w układach adsorpcyjnych jest procesem ciągłego przemieszczania się cząsteczek substancji i fazy ruchomej na powierzchni adsorbentu i może być zapisany równaniem:

$$S_n + nB_a \rightleftharpoons S_a + nB_n \quad (1)$$

gdzie:

- S_n - cząsteczka substancji w fazie ruchomej,
- B_a - cząsteczka fazy ruchomej tworząca monowarstwę,
- n - liczba cząsteczek B przemieszczona przez adsorpcję cząsteczek S,
- S_a - zadsorbowane cząsteczki substancji (wchodzące w monowarstwę),
- B_n - n cząstek B w fazie ruchomej.

Model Snydera - Soczewińskiego dotyczy rozdzielania substancji nie polarnych i słabo polarnych, gdy cząsteczki substancji i cząsteczki fazy ruchomej są jednakowo traktowane przez

adsorbent i nie wykazują “chęci” do *zlokalizowanej adsorpcji*, czyli mogą swobodnie przemieszczać się na powierzchni adsorbentu. Gdy polarność powierzchni sorpcyjnej wzrasta, zarówno cząsteczki substancji rozdzielanych, jak i cząsteczki rozpuszczalnika są silnie przyciągane przez polarne grupy (centra aktywne) na powierzchni fazy stacjonarnej (patrz Rys. 2.2b), a oddziaływania cząsteczek substancji i cząsteczek fazy ruchomej z adsorbentem są specyficzne i nie są identyczne. Można to wyjaśnić następująco: cząsteczki substancji polarnych adsorbują się bezpośrednio na preferowanym miejscu adsorbentu np. w przypadku żelu krzemionkowego tymi miejscami są grupy -OH, a siła oddziaływań zależy od polarności zaangażowanej grupy. Wówczas występuje zlokalizowana adsorpcja. Jeżeli “chromatografowane” substancje posiadają dwie lub więcej grupy polarne, to nie ma możliwości by każda z grup mogła adsorbować się w tym samym czasie i tylko jedna z grup polarnych jest zlokalizowana na powierzchni adsorbentu. Również zlokalizowana adsorpcja bardzo polarnego rozpuszczalnika jest możliwa, co ma duże konsekwencje praktyczne, gdyż może następować zmiana selektywności układu chromatograficznego, na skutek ciągłej zmiany składu fazy ruchomej. Cząsteczki polarne i polarny składnik fazy ruchomej silnie współzawodniczą o miejsce na powierzchni adsorbentu zatem retencja i selektywność zależą od zawartości polarnego składnika w fazie ruchomej.

Powyższy opis adsorpcji wyjaśnia dlaczego układy adsorpcyjne są tak bardzo wrażliwe na obecność polarnego składnika w fazie ruchomej tzw. *moderatora*. Najbardziej powszechnym moderatorem jest woda, niestety - przysparzającym wielu kłopotów w adsorbcyjnych układach faz normalnych. Nawet niewielka zawartość wody w niepolarnym rozpuszczalniku uważanym za bezwodny, np. w heksanie, drastycznie zmienia retencję rozdzielanych substancji na skutek zmiany selektywności układu chromatograficznego. W skrajnych wypadkach może nastąpić całkowita dezaktywacja fazy stacjonarnej i utrata możliwości adsorpcji. (Trzeba mieć świadomość, że wówczas może zaczynać zachodzić podział do “warstewki” wody).

Z przedstawionych zjawisk wynika, że w doborze składnika polarnego w fazie ruchomej kierujemy się nie tylko polarnością rozpuszczalnika, ale i jego zdolnością do zlokalizowanej adsorpcji.

2.5. ELUENTY STOSOWANE W UKADACH FAZ NORMALNYCH

Ciecze stosowane jako faza ruchoma w chromatografii ciekowej, muszą spełniać określone warunki:

- odpowiednia lepkość,
- kompatybilność z detektorem,
- dostępność o czystości wymaganej w chromatografii,
- mała toksyczność i niski koszt.

Lepkość eluentu jest ważna z dwóch powodów. Zbyt wysoka lepkość fazy ruchomej wymagałaby stosowania bardzo wysokich ciśnień, ponadto dla procesu chromatograficznego korzystne są możliwie niskie wartości współczynników dyfuzji, co jest sprzeczne ze stosowaniem eluentu o znacznej lepkości.

Ze względu na pracę kolumny z detektorem w systemie “on-line”, konieczne jest, by faza ruchoma nie dawała sygnału w zakresie tych wartości parametru fizycznego który jest wykorzystywany do detekcji rozdzielanych substancji. Na przykład, jeżeli pracujemy z detektorem UV-VIS nie należy stosować eluentu absorbującego promieniowanie w tym zakresie, co cząsteczki rozdzielanych substancji.

Szczególnie ważna odpowiednia czystość składników eluentu, gdyż nawet śladowa zawartość zanieczyszczeń może mieć wpływ na wartość sygnału detektora, podwyższać linię bazową, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia granicy oznaczalności i do mniejszej dokładności oznaczeń. Zanieczyszczenia rozpuszczalnika, szczególnie polarne, powodują też zmiany selektywności układu chromatograficznego, a w skrajnych przypadkach - utratę zdolności rozdzielczej kolumny.

Lista rozpuszczalników, które mogłyby być stosowane jako fazy ruchome jest długa. Przez wiele lat czyniono różne próby ich charakterystyki w celu ułatwienia doboru optymalnego składu eluentu dla określonego układu chromatograficznego i konkretnego zadania rozdzielczego.

Najstarszy sposób doboru eluentu oparty jest na tzw. trójkącie polarności. Każdemu z boków trójkąta odpowiada kolejno: faza ruchoma - substancje rozdzielane - typ fazy stacjonarnej (adsorbentu). Za kryterium przyjęto polarność każdego ze składników układu chromatograficznego. Polarność adsorbentu wyrażana jest w skali Brockmana (I-V). Ogólnym wnioskiem jest reguła - gdy rozdzielane są substancje nie polarne i słabo polarne to adsorbent i faza ruchoma powinny być również słabo polarne i odwrotnie dla substancji polarnych potrzebna jest polarna faza ruchoma. Ten wniosek zyskał potwierdzenie w miarę rozwoju chromatografii.

Innym kryterium podziału i doboru rozpuszczalników jest możliwość występowania wiązania wodorowego między substancjami rozdzielanymi i cząsteczkami fazy ruchomej oraz stacjonarnej.

Najbardziej przydatnym kryterium oceny przydatności rozpuszczalnika w adsorbcyjnych układach faz normalnych jest jego siła elucyjna i selektywność. Snyder (1968) uporządkował rozpuszczalniki stosowane w chromatografii adsorpcyjnej w kolejności siły elucyjnej, przypisując każdemu rozpuszczalnikowi określoną wartość, wyrażaną parametrem ϵ^0 . Wartość tego parametru charakteryzuje energię oddziaływań fazy ruchomej z powierzchnią adsorbentu. Za wartość $\epsilon^0 = 0$ przyjęto oddziaływanie między pentanem a powierzchnią standaryzowanego adsorbentu. Oczywiście jest, że wartość ϵ^0 jest różna dla każdego rozpuszczalnika i dla różnych adsorbentów. Eksperymentalnie wykazano, że wyniki uzyskane dla elucji z zastosowaniem tlenku glinu mogą być bezpośrednio przeniesione na inne typy tlenków. Dla żelu krzemionkowego, tlenku magnezu i krzemianu magnezu może być zastosowana poniżej przedstawiona zależność:

$$\epsilon^0 (\text{SiO}_2) = 0,77 \epsilon^0 (\text{Al}_2\text{O}_3) ; \quad \epsilon^0 (\text{MgO}) = 0,58 (\text{Al}_2\text{O}_3),$$

Dla rozpuszczalników organicznych (nie elektrolitów), "siła elucyjna" w układzie faz normalnych w warunkach adsorpcji ciała stałe - ciecz jest synonimem polarności w warunkach podziału ciecz-ciecz. Siła elucyjna, lub polarność rozpuszczalników, jest charakteryzowana przez ich zdolność do rozpuszczania polarnych substancji i wartością współczynnika retencji eluowania ich z kolumny. Siła elucyjna jest wyższa, im bliższy czasowi martwemu kolumny jest czas retencji.

W tabeli 2.1 zestawiono rozpuszczalniki najczęściej stosowane w układzie faz normalnych, uszeregowane według rosnącej siły elucyjnej (ϵ^0) dla żelu krzemionkowego oraz zaznaczono, czy rozpuszczalnik może podlegać zlokalizowanej adsorpcji (patrz punkt "Mechanizm retencji w układach faz normalnych"). Podano również długość fali, poniżej której, wykazuje on już na tyle wysoką absorpcję światła, że zastosowanie detektora fotoabsorpcyjnego nie może już mieć miejsca. Informacja ta ułatwiają dobór długości fali, przy której będzie prowadzona detekcja rozdzielanych substancji.

Tabela 2.1. Wartość siły elucyjnej wybranych rozpuszczalników najczęściej stosowanych w adsorbcyjnych układach faz normalnych.

Rozpuszczalnik	ϵ''	lokalizacja	UV [nm]
pentan, heksan,oktan	0,00	nie	201
chloroform	0,26	nie	247
chlorek etylenu	0,30	nie	234
eter di-izo-propylowy	0,32	słaba	2171
1,3 dichloroetan	0,34	nie	234
eter di-etylowy	0,38	tak	219
eter metylo-terta butylowy	0,48	tak	225
octan etylu	0,48	tak	258
dioksan	0,51	tak	215
acetonitryl	0,52	tak	192
1-lub 2- propanol	0,60	tak	214
metanol	0,70	tak	210
kwas octowy	duża	tak	--
woda	b. duża	tak	205

Dla innych faz stacjonarnych i związanych faz polarnych jest podobny trend wzrostu siły elucyjnej, jak podano w tabeli 1, ale wartości siły elucyjnej są najczęściej niższe.

Znajomość siły elucyjnej znacznie ułatwia dobór fazy ruchomej do rozdzielania mieszanin określonych substancji. Zazwyczaj dobiera się dwuskładnikową fazę ruchomą stosując rozpuszczalnik o dużej sile elucyjnej (polarny) i rozpuszczalnik niepolarny, o małej sile elucyjnej ("rozcieńczalnik" eluentu).

Rozpuszczalniki, będące składnikami fazy ruchomej nie mogą, oczywiście reagować z sobą, ani z fazą stacjonarną reagować i muszą spełniać inne wymagania, przedstawiono poprzednio.

Wiele prac badawczych potwierdziło, że retencja substancji w określonym adsorbcyjnym układzie faz normalnych, może być określona na podstawie równania:

$$\log k = c - n \log X_n \quad \text{lub} \quad \log k = c - n \log (\% B) \quad (2)$$

gdzie: c, c', n, n' - stałe dla rozdzielanych substancji, rozpuszczalnika B oraz dla określonej kolumny.

Retencja jest funkcją procentowej zawartości polarnego składnika eluentu. Eksperymentalne dane wykazały, że jeżeli wzrasta dwukrotnie procentowa zawartość rozpuszczalnika polarnego w fazie ruchomej, to trzykrotnie maleje wartość współczynnika retencji k .

Snyder podał też równanie, na podstawie którego, można obliczyć siłę elucyjną dwuskładnikowej fazy ruchomej (ϵ'') o dowolnym udziale każdego ze składników.

Dane eksperymentalne pozwoliły utworzyć zestawy rozpuszczalników o jednakowej sile elucyjnej. Poniżej przedstawiono różne składy fazy ruchomej, dla których wartość siły elucyjnej wynosił $\epsilon'' = 04$ (adsorbent żel krzemionkowy):

- 40 % tetrahydrofuranu w heksanie,
- 50 % octanu etylu w heksanie,
- 15 % izopropanolu w heksanie,
- 50 % octanu etylu dichlorometanie i inne.

Inny sposób doboru składu fazy ruchomej o określonej sile elucyjnej polega na wykorzystaniu nomogramu opracowanego przez Nehera. Idea polega na opracowaniu zestawów kilku mieszanin dwóch rozpuszczalników o podobnych zakresach siły elucyjnej i graficznego ich usytuowania w taki sposób, by na tej samej linii pionowej znajdowała się ta sama wartość siły elucyjnej. W każdym zestawie, głównym składnikiem jest rozpuszczalnik o niższej sile elucyjnej, a drugim, rozpuszczalnik polarny o różnych procentowych jego zawartościach wzdłuż osi poziomej. Dzięki takiemu wzajemnemu usytuowaniu różnych par rozpuszczalników, można łatwo zamienić skład eluentu, zachowując tę samą siłę elucyjną, ale wprowadzając inne oddziaływania z powierzchnią fazy stacjonarnej i cząsteczkami substancji rozdzielanych. Zainteresowany czytelnik znajdzie szczegóły w odpowiednich publikacjach źródłowych i w niektórych podręcznikach, które uzyskały odpowiednią zgodę od redakcji, posiadającej zgodę autora na dysponowanie jego prawem autorskim do nomogramów.

Inną miarą określającą przydatność rozpuszczalnika do rozdzielania określonych substancji m. in., w warunkach adsorpcyjnej chromatografii cieczowej w układzie faz normalnych, jest selektywność. Definicja opisowa selektywności to zdolności danego rozpuszczalnika do selektywnego rozdzielenia (a także zaadsorbowania) jednego komponentu w porównaniu do drugiego, gdy polarności obu składników są takie same. Istotnym wnioskiem wynikającym z tej definicji jest okoliczność, że oprócz siły elucyjnej w doborze rozpuszczalnika należy uwzględnić parametr selektywności, gdyż rozpuszczalniki mogą mieć taką samą siłę elucyjną, a wyniki rozdzielania mogą być bardzo różne. Jak wyjaśniono wcześniej, dla określania siły elucyjnej uwzględniono oddziaływanie rozpuszczalnika z fazą stacjonarną, natomiast w doborze selektywności należy uwzględnić wszystkie wzajemne oddziaływania między fazą ruchomą, stacjonarną i substancjami rozdzielanymi.

Najczęściej, przy doborze selektywności w układzie faz normalnych dokonuje się zmiany zawartości polarnego składnika eluentu lub zamiany tego rozpuszczalnika na inny. Np. możemy zmienić rozpuszczalnik, który nie wykazuje zlokalizowanej adsorpcji na rozpuszczalnik, którego adsorpcja jest silnie zlokalizowana. Po takiej zmianie zwykle mają miejsce istotne zmiany selektywności układu.

Najbardziej skutecznym sposobem doboru rozpuszczalników w normalnym układzie faz (także w układzie faz odwróconych) jest korzystanie z trójkątów polarności. Konstrukcja trójkąta oparta jest na mieszaninach trzech rodzajów rozpuszczalników, gdy heksan, albo inny rozpuszczalnik o znikomej sile elucyjnej jest stosowany jako rozcieńczalnik. Na jednym z wierzchołków jest np. heksan z chlorkiem metylenu (nie ulegającym lokalizacji - tabela 2.1), na drugim - heksan z dodatkiem eteru metylowo - tert-butyłowego, albo octanu etylu lub acetonitrylu, a na trzecim inna mieszanina rozpuszczalników rozcieńczonych heksanem, albo innym niepolarnym rozcieńczalnikiem. Skład tych mieszanin rozpuszczalników jest tak dobrany, że wartość siły elucyjnej na wierzchołkach trójkąta jest taka sama. Na bokach i na powierzchni trójkąta, są następnie, za pomocą kilku linii krzywych i dodatkowo - za pomocą punktów, naniezione te wzajemne proporcje mieszanin rozpuszczalników, "stanowiących" wierzchołki trójkąta, które posiadają stałą, określoną wartość siły elucyjnej (ale różne selektywności). Tak przygotowany diagram jest szczególnie przydatny użytkowo. Jego przygotowanie jest, jednak, pracochłonne i wymaga posiadania odpowiedniego oprogramowania komputerowego.

2.6. ZASTOSOWANIE UKŁADÓW FAZ NORMALNYCH

W chromatografii cieczowej dominuje obecnie stosowanie układów faz odwróconych (RP). Generalnie można powiedzieć, że chromatografię w układzie faz normalnych (NP), można stosować do rozdzielania związków niejonowych i raczej nisko oraz średnio polarnych, jako alternatywę dla układów faz odwróconych. Wiele organicznych związków chemicznych jest lepiej rozpuszczalnych w organicznych rozpuszczalnikach niż w wodzie. Są też substancje, które mogą ulegać rozkładowi w środowisku wodnym. W konsekwencji, w takich przypadkach nie może być zastosowana faza ruchoma z dodatkiem wody i układy faz odwróconych, a układy faz normalnych stanowią oczywista alternatywę.

Należy też mieć świadomość, że bardzo ważne znaczenie praktyczne ma szczególna "zdolność" układów faz normalnych do wysoce selektywnego rozdzielania izomerów strukturalnych, a w przypadku stosowania chiralnych faz stacjonarnych, do rozdzielania izomerów optycznych. Tego typu zadania separacyjne z reguły bardzo trudno jest "rozwiązać" z zastosowaniem układów faz odwróconych.

Niektóre modyfikowane fazy stacjonarne są szczególnie przydatne do rozdzielania określonych grup związków chemicznych, np. do rozdzielania mieszaniny organicznych azotanów (mono-, di-) jest przydatna faza wiązana typu β -cyklodekstryna - żel krzemionkowy. Przykładem zastosowania fenylovej fazy wiązanej, jest jej skuteczność dla rozdzielania podstawionych bimetalicznych karbonyli, zaś aminowe fazy wiązane są bardzo przydatne do rozdzielania szerokiej grupy flawonów.

Na podkreślenie zasługuje zdolność adsorbentów do rozróżniania substancji pod względem polarności grup funkcyjnych. To powoduje, że praktycznie tylko układy faz normalnych znajdują zastosowanie do rozdzielania mieszanin substancji na klasy związków chemicznych. Rozdzielanie grupowe, np. składników ropy naftowej i produktów ropopochodnych, nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych, mono-, di-, i tri-glicerydów itp., może być z powodzeniem wykonywane, tylko, z zastosowaniem układów faz normalnych, a układy faz odwróconych są w tym celu, zupełnie nieprzydatne. To szczególna "umiejętność" adsorbentów do rozróżniania grup funkcyjnych zgodnie z ich polarnością, jest wykorzystywana w analizie składu grupowego w wielu dziedzinach jak np. w przemyśle rafineryjnym, tłuszczowym, kosmetycznym lub analityce środowiska.

W przypadku bardzo złożonych próbek środowiskowych a także ekstraktów roślinnych czy otrzymanych w wyniku ekstrakcji składników żywności lub pasz, w celu oznaczenia zawartości analitu konieczne jest często uprzednie oddzielenie polarnych, albo niepolarnych zanieczyszczeń. Tutaj nieocenione zasługi przynosi adsorpcyjna chromatografia cieczowa w układzie faz normalnych.

Dla hipotetycznej mieszaniny substancji, w której znajdują się wszystkie znane klasy związków chemicznych, siłę oddziaływań wyrażoną opisowym pojęciem "słaba" "średnia" i "silna" adsorpcja, można przedstawić w następującej kolejności:

- | | |
|--|--|
| Nie adsorbowane
i b słabo adsorbowane - | węglowodory alifatyczne i cykliczne (parafiny i nafteny) |
| Słabo adsorbowane - | alkeny (olefiny), merkaptany, sulfidy, jednopierścieniowe węglowodory aromatyczne (tzw., monoaromaty) i chloroaromatyczne (tzw. chloroaromaty - z jednym i więcej pierścieniami aromatycznymi), |

Średnio adsorbowane -	wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, etery, nityle, związki nitrowe i większość związków karbonylowych,
Silnie adsorbowane -	alkohole, fenole, aminy, amidy, imidy, sulfotlenki, kwasy karboksylowe.

W wielu starszych aplikacjach można znaleźć wykorzystanie żelu krzemionkowego, albo tlenku glinu, do rozdzielania jonów, szczególnie, jonów metali. Stosowano elenty zawierające wodę. Warunki rozdzielania należy, wówczas, scharakteryzować, jako podziałowo - adsorpcyjne z pewnym udziałem oddziaływań o charakterze jonowymiennym.

W nawiązaniu do tych już prawie zapomnianych zastosowań chromatografii cieczowej w układach faz normalnych, należy stwierdzić, że stosowanie kilku do kilkunastoprocentowego udziału wody w fazie ruchomej, oraz takich składników organicznych jak pirydyna, kwas octowy itp. i nieorganicznych adsorbentów, było powszechną praktyką, a w chromatografii cienkowarstwowej (TLC) nadal jest powszechnie stosowane do rozdzielania organicznych substancji silnie polarnych, np. antybiotyków.

Należy też dodać, że podobne pod względem mechanizmów rozdzielania, jest stosowanie nieorganicznych adsorbentów z nie wodnym eluentem, prawie (ale niecałkowicie) nasyconym wodą (np. w układzie żel krzemionkowy - di-chlometan - metanol-woda 94:8:0.12 v/v). Takie warunki rozdzielania zalicza się do układów podziałowych z dynamicznie generowaną, praktycznie wodno - metanolową fazą stacjonarną i znajduje szczególnie efektywne zastosowanie do rozdzielania glikozydów, a także alkaloidów, tzn., licznych grup roślinnych naturalnych metabolitów wtórnych, często o ważnym znaczeniu farmakologicznym.

Ważnym parametrem faz ruchomych, powszechnie stosowanych w warunkach chromatografii adsorpcyjnej w układach faz normalnych, jest ich niższa temperatura wrzenia i niskie ciepło parowania, niż w przypadku stosowania układów faz odwróconych, czy jonowymiennych. Te parametry są szczególnie istotne, gdy stosuje się chromatografię cieczową na skalę preparatywną, czyli gdy celem jest nie tyle rozdzielić i oznaczyć zawartości określonych składników próbki, co wydzielić z mieszaniny taką ilość substancji, która umożliwiłaby wykonanie różnych badań, bądź inne wykorzystanie.

2.7. WYBRANE PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ W UKŁADACH FAZ NORMALNYCH

Rys. 2.2. Chromatogram linuronu i jego metabolitów.

Kolumna: 250x4.6 [mm] (żel krzemionkowy)

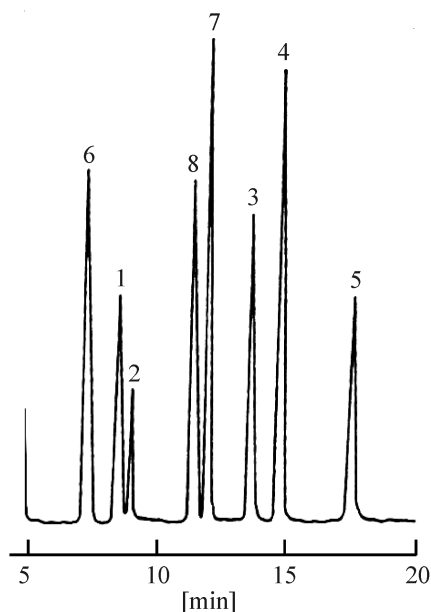
Wypełnienie: μ Porasil dp = 10 μ m.

Elucja gradientowa od heksanu + 2% (2-propanol + 25% NH_4OH) do heksanu + 35% (2-propanol + 25% NH_4OH) w ciągu 30 min.

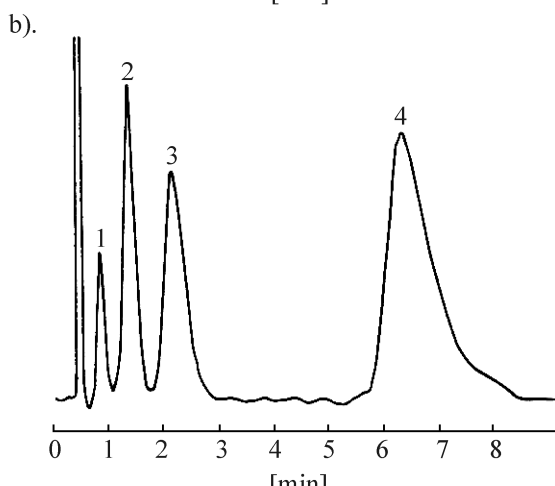
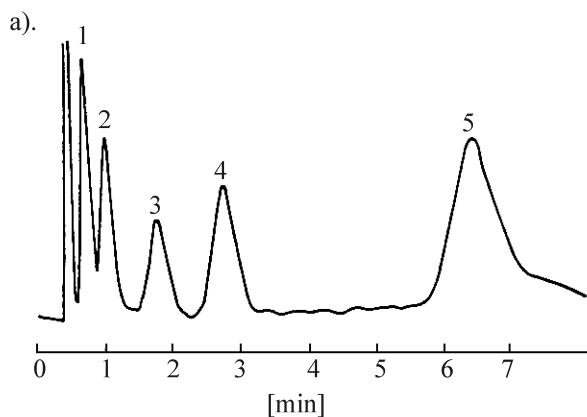
Prędkość przepływu fazy ruchomej 1.5 ml/min.

Detekcja: UV-280 nm

Substancje: 1 - linuron; 2 - 3,4-dichloroanilina; 3 - substancja nieznaną; 4 - 3-(3,4-dichlorofenyl)-1-metylomocznik; 5 - 3,4-dichlorofenylocmocznik; 6 - metyl-N-9,3,4-dichlorofenylokarbaminian; 7 - 3,4-dichloroacetanilid; 8 - 3-(3,4-dichlorofenyl)-1-etylocmocznik



Rys. 2.3. Chromatogram fenoli (a) i naftoli (b).



Kolumna: 600x2.2 [mm],
faza stacjonarna: μ Porasil A.

Faza ruchoma: heksan.

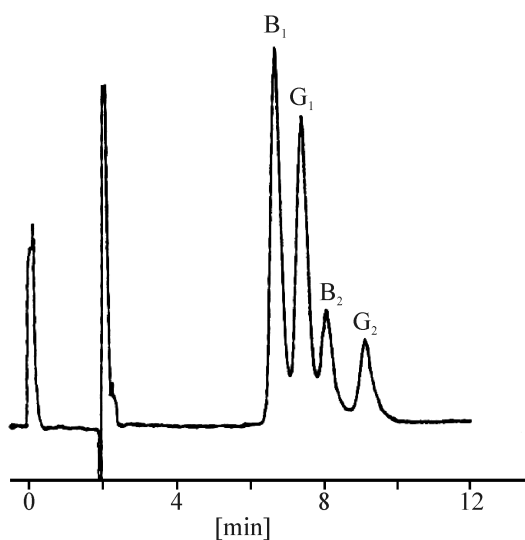
Prędkość fazy ruchomej 1,5 ml/min.

Detekcja: Refraktometr.

Substancje:

(Rys. a) 1 - karwakrol; 2 - 1,3,4 - ksylenol;
3 - 1,2,4-ksylenolol ; 4 - m-krezol; 5 -
fenol.

(Rys. b) 1 - 2,3,5 - trimetylofenol;
2 - α - naftol; 3 - β - naftol; 4 - fenol



Rys. 2.4. Chromatogram (a) aflatoksyn (B₁, G₁, B₂, G₂); (b) - ekstrakt z zielonej kukurydzy

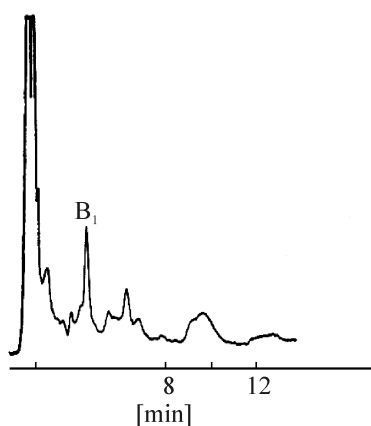
Kolumna: 300x6.3 [mm].

Faza stacjonarna żel krzemionkowy całkowicie porowaty dp - 10 µm,

Faza ruchoma: chlorek metylenu nasycony wodą + metanol 99.4 : 0.6 v/v.

Prędkość przepływu fazy ruchomej 3.5 ml/min.

Detekcja UV-350 nm.



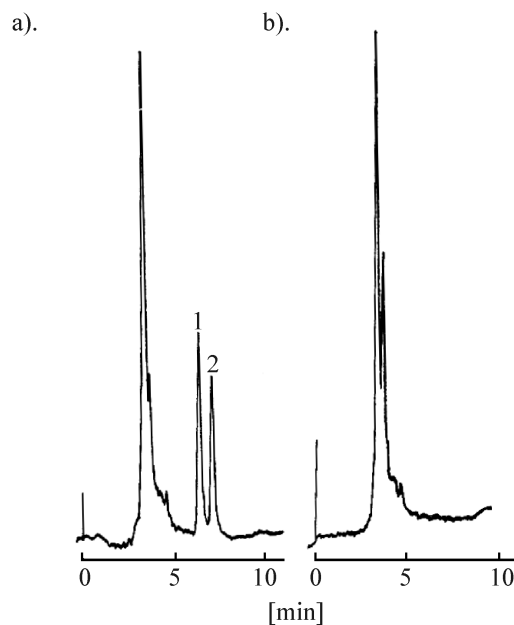
Rys.2.5. Chromatogram ekstraktu 1 ml krwi ludzkiej, a - z dodatkiem diasepamu (pik 1) i N-desmetylodiazepanu (pik 2). b - próbka odniesienia -ekstrakt krwi.

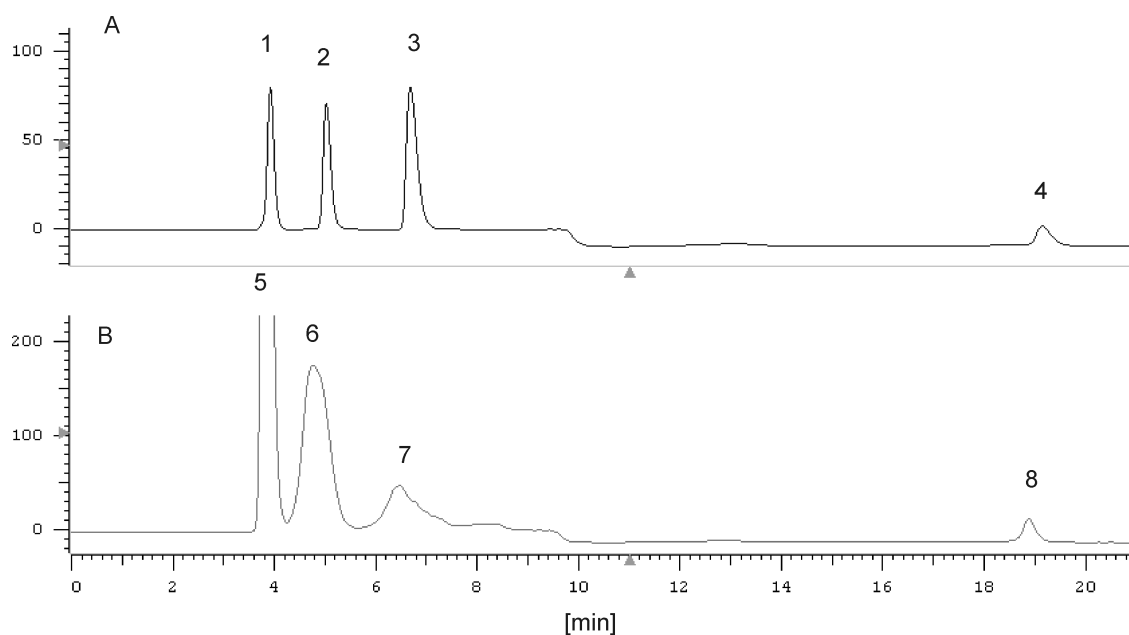
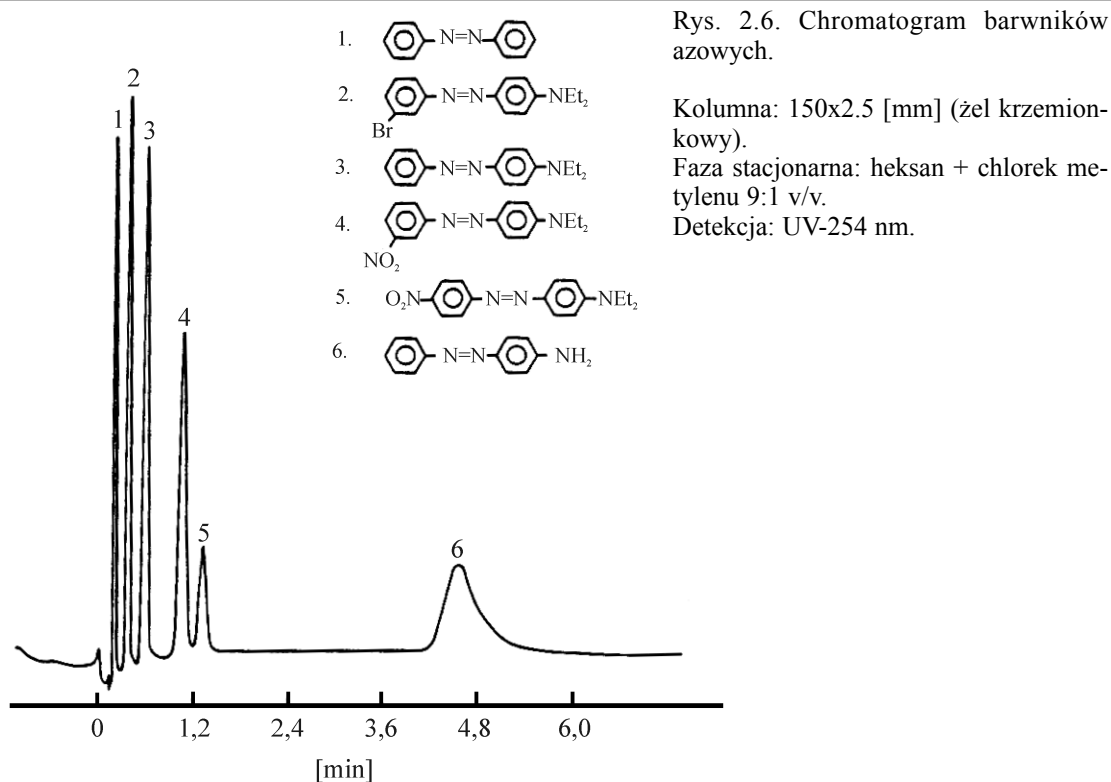
Kolumna 250x4.6 [mm].

Faza stacjonarna: Lichrosorb Si-60 dp = 5 µm.

Faza ruchoma: heptan + izopropanol + metanol 4:1:0,1 v/v.

Detekcja UV-235 nm.





Rys. 2.7. Chromatogram rozdzielania grupowego produktów naftowych: (A) roztworu węglowodorów wzorcowych, (B) oleju napędowego. Warunki chromatograficzne zgodnie z wymaganiami normy EN-12916. Kolumna: Spherisorb NH₂ 3 μm, 250x4.6 mm. Faza ruchoma: n-heptan. Natężenie przepływu: 0.8 ml/min. Temperatura: 20°C. Czas przełączenia zaworu do elucji wstecznej (*ang. backflush*): 8.40 min. Detektor: refraktometryczny.

Piki: 1-cykloheksan, 2-o-ksylen, 3 - 1-metylnaftalen, 4 - fenantren. 5 - węglowodory parafinowo-naftenowe, 6 - jednopierścieniowe węglowodory aromatyczne, 7 - dwupierścieniowe węglowodory aromatyczne, 8 - wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

3. CHROMATOGRAFIA W UKŁADZIE FAZ ODWRÓCONYCH

Krystyna Gazda

3.1. DEFINICJA

Układ faz odwróconych (RP), to taki układ, w którym faza stacjonarna jest mniej polarna niż faza ruchoma. Nazwa "układ faz odwróconych" jest nazwą zwyczajową, wynikającą z historii rozwoju chromatografii cieczowej. W początkowym okresie stosowania technik chromatograficznych fazami stacjonarnymi były polarne sorbenty, natomiast fazami ruchomymi rozpuszczalniki mniej polarne. Taki układ jest obecnie traktowany jako "układ faz normalnych" (NP).

3.2. FAZY STACJONARNE.

Przez wiele lat niepolarne fazy stacjonarne były otrzymywane przez nanoszenie substancji niepolarniej, o dużej lepkości, w sposób fizyczny na nośnik, np przez impregnację bibuły celulozowej olejem parafinowym. Fazy takie miały wiele wad, a najważniejszą z nich były problemy z uzyskaniem dobrej odtwarzalności własności retencyjnych i tym samym odtwarzalności parametrów chromatograficznych. Jedną z przyczyn było wymywanie fazy stacjonarnej z nośnika w trakcie elucji. Prace nad usprawnieniem procesu doprowadziły do powstania nowej generacji faz stacjonarnych, nazwanych fazami związanymi. Otrzymuje się je w wyniku modyfikacji powierzchni sorbentów, najczęściej polarnych, nie polarnymi, albo średnio polarnymi cząsteczkami fazy stacjonarnej, chemicznie związanymi z cząsteczkami powierzchni "nośnika". Materiałem wyjściowym, powszechnie jeszcze stosowanym do produkcji faz związanych, jest żel krzemionkowy, ale wykorzystuje się też tlenek glinu, dwutlenek tytanu, cyrkonu, albo polimery organiczne (kopolimer styrenu i diwinylobenzenu, albo poliamidy, lub polimetakrylany i inne).

Własności powierzchniowe żelu krzemionkowego zostały opisane w części dotyczącej chromatograficznych układów faz normalnych. W celu otrzymania fazy związanej o dobrych własnościach powierzchniowych z wykorzystaniem żelu krzemionkowego, stężenie grup -OH na powierzchni porowatej "krzemionki" powinno wynosić $7 \div 8 \mu\text{moli/m}^2$. Ważna jest również chemiczna czystość żelu krzemionkowego, ponieważ obecność metali powoduje wzrost kwasowości grup -OH. Grupy -OH, pozostałe na powierzchni sorpcyjnej powodują niejednorodność właściwości powierzchni sorpcyjnej faz związanych, szczególnie wyraźną, gdy są to grupy o podwyższonej aktywności, powstałej w wyniku aktywacji przez jony metali.

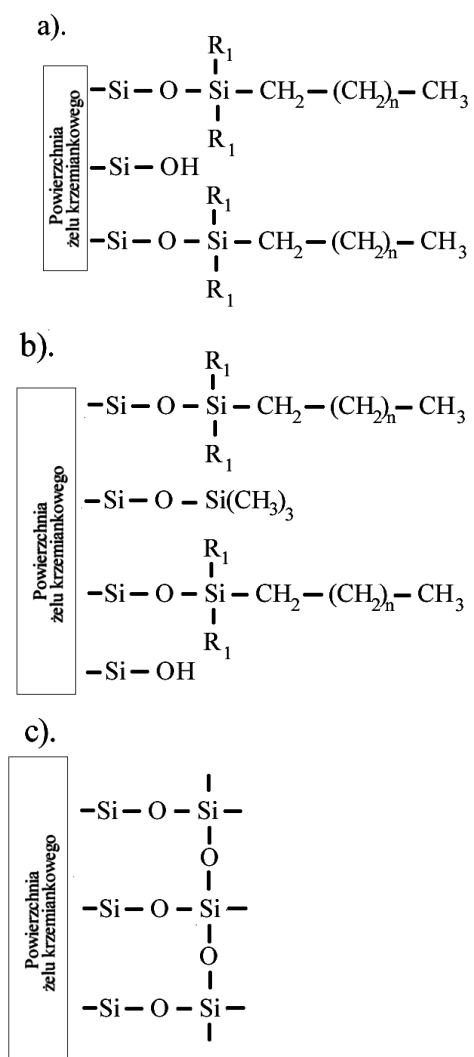
Otrzymywanie żelu krzemionkowego o odpowiedniej granulacji, porowatości, powierzchni właściwej oraz strukturze powierzchniowej jest dobrze opanowane. Adsorbent ten jest od dziesięcioleci stosowany w chromatografii. Istnieje grupa producentów oferujących materiał o odpowiednich parametrach. Wadą żelu krzemionkowego jest względnie duża jego rozpuszczal-

ność w wodzie, gwałtownie wzrastająca w roztworach o pH > 7, z powodu wzrostu szybkości hydrolyzy wiązań siloksanowych na powierzchni żelu krzemionkowego.

Otrzymywanie niepolarnych faz związanych opiera się na reakcji powierzchniowych grup OH z odpowiednimi silanami. Reakcję z monochlorosilanem można przedstawić w uproszczeniu za pomocą równania :



R jest łańcuchem węglowodorowym (C18, C8, C4, grupą fenyłową, alkilo-difenyłową itp.), albo inną grupą funkcyjną (alkilonitryl, alkiloamina, aklilodiol itp.), decydującą o charakterze i właściwościach powierzchni otrzymanego sorbentu. Jest to przykład fazy "monomerycznej", w której z jednym atomem krzemu związana jest jedna cząsteczka silanu.



Rys. 3.1. Schemat struktury powierzchni żelu krzemionkowego modyfikowanego alkilochlorosilanami: a) na powierzchni pozostały resztowe grupy -OH, b) powierzchnia deaktywowana trimetylochlorosilanem, na powierzchni pozostały nieliczne grupy -OH, c) faza spolimeryzowana.

W otrzymanej w ten sposób fazie stacjonarnej stosowanej w układzie faz odwróconych, zamiast grup OH, o charakterze kwasowym, na powierzchni znajdują się niepolarne łańcuchy węglowodorowe, ewentualnie alkilonitrylowe, albo podobne. Powierzchnia jest tym bardziej hydrofobowa, im większy jest stopień pokrycia niepolarną fazą stacjonarną oraz im więcej atomów węgla zawiera łańcuch węglowodorowy.

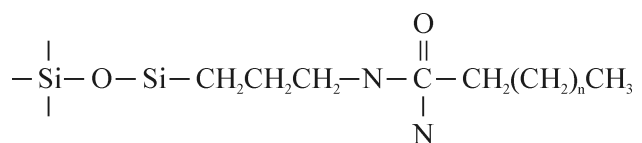
W przypadku zastosowania silanu z trzema grupami aktywnymi, np. trichlorosilanu, zależnie od warunków prowadzenia reakcji, można otrzymać warstwy, monomeryczne lub spolimeryzowane, usieciowane przestrzennie poprzez wiązania siloksanowe.

Grubość i struktura organicznej warstwy zależy od liczby i rozmieszczenia grup -OH na "wyjściowej" powierzchni żelu, chemicznej natury silanu oraz warunków reakcji. Warstwy monomeryczne mają lepiej zdefiniowaną powierzchnię. W tego typu fazach łatwiej jest też uzyskać powtarzalność własności powierzchniowych w kolejnych seriach produkcyjnych.

Hydrofobowość powierzchni zależy więc od natury silanu oraz od stopnia pokrycia fazą węglowodorową. Idealnym stanem byłoby związanie wszystkich powierzchniowych grup -OH. W praktyce jest to nieosiągalne. Ze względu na przeszkody steryczne, nie wszystkie grupy OH mogą przereagować z dużą cząsteczką chloroalkilosilanu (najczęściej oktadecylosilanu, a w przypadku najsilniej hydrofobowych faz stacjonarnych, łańcuch węglowodorowy może liczyć nawet 30 atomów węgla). Ponadto, w przypadku użycia trichloroalkilosilanu, w wyniku hydrolizy, pozostałe atomy chloru podstawiane są grupami -OH. Nawet w przypadku faz spolimeryzowanych, jeżeli nie dochodzi do pełnego usieciowania, pozostaje pewna liczba grup -OH.

Obecność polarnych grup aktywnych na powierzchni zasadniczo niepolarnej może prowadzić do mieszanego mechanizmu adsorpcji, którego skutkiem jest "ogonowanie" pików substancji polarnych, szczególnie tych o charakterze zasadowym. Usunięcia większości tych grup dokonuje się przez przeprowadzenie następczej reakcji z monochlorosilanem, najczęściej trimetylochlorosilanem. W efekcie uzyskuje się bardziej jednorodną powierzchnię. Grupy -OH, które nie przereagowały z małymi cząsteczkami silanu w drugim etapie, będą również trudno dostępne dla innych cząsteczek, ich wpływ na retencję związków nie będzie zauważalny.

W niektórych przypadkach dotyczących mieszanin substancji polarnych faza zawierająca na powierzchni grupy polarne polepsza selektywność rozdzielania. Doświadczenie wykazało, że lepsze efekty rozdzielania związków polarnych uzyskuje się na fazach, których grupy polarne są mniej aktywne niż powierzchniowe grupy -OH. W ostatnich latach opracowano nowy rodzaj faz związanych, w których w łańcuchu alifatycznym, na ogół przy trzecim węglu, licząc od wiązania łańcucha węglowodorowego z powierzchnią sorbentu, znajduje się grupa polarna, najczęściej amidowa.



Mimo, że możliwości są olbrzymie, w praktyce stosowanych jest kilka rodzajów wypełnień. Niektóre z nich zestawiono w Tabeli 3.1.

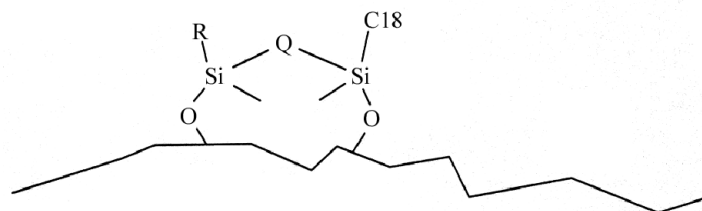
Fazy związane wyprodukowane na bazie żelu krzemionkowego są trwałe w pewnym przedziale pH, zazwyczaj 2 - 8, często jednak 2,5 - 7,5. Przy pH < 2 następuje wymywanie fazy związanej z kolumny wskutek rozerwania wiązania siloksanowego (hydrolizy), natomiast przy pH > 7, zaczyna mieć miejsce rozpuszczanie się żelu. Z praktycznego punktu widzenia jest to

Tabela 3.1. Zestawienie najczęściej stosowanych rodzajów faz stacjonarnych, produkowanych na bazie żelu krzemionkowego.

*) Fazy wprowadzone do handlu w ostatnich latach.

Rodzaj modyfikacji	Grupa funkcyjna	Najczęściej stosowany skrót nazwy
n-alkanami	-CH ₂ CH ₃	C 2
	-CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	C 4
	-CH ₂ (CH ₂) ₆ CH ₃	C 8
	-CH ₂ (CH ₂) ₂₈ CH ₃	C 18
grupą fenyłową	-CH ₂ (CH ₂) _x C ₆ H ₅	fenylowa
grupą propylocyjanową	-CH ₂ (CH ₂) ₂ CN	cyjanowa
grupą perfluorową *)	-CH ₂ (CF ₂) _x CF ₃	
grupą polarną, np amidową, karbaminianową, eterową *)	-CH ₂ (CH ₂) ₂ NHCO(CH ₂) _n CH ₃	

niewygodne ograniczenie, szczególnie górna granica pH wynosząca 7,5 ÷ 8 utrudnia analizę niektórych substancji o charakterze zasadowym. Fazy związane zawierające węglowodory o krótkich łańcuchach są mniej stabilne przy niskich wartościach pH niż fazy długołańcuchowe. Zwiększoną odporność na graniczne wartości pH wykazują fazy polimeryczne w porównaniu z monomerycznymi. Otrzymano też fazy chronione sterycznie, w których zamiast grupy metylenowej w pozycji R1 (patrz rys. 3.1) wprowadzone są grupy o większych cząsteczkach, np. -CH₂CH(CH₃)₂, utrudniające hydrolizę wiązania Si-O-Si lub oddziaływanie z grupami -OH. Inną grupę stanowią fazy, w których powierzchniowe grupy -OH zostały połączone łańcuchem węglowodorowym, jak schematycznie przedstawiono na rysunku 2. Fazy te wykazały się dość dobrą odpornością na pH w zakresie 1 ÷ 11.



Rys. 3.2. Schemat powierzchni fazy stacjonarnej, której powierzchnia żelu krzemionkowego jest chroniona przez dodatkową grupę alkilową Q.

Q : grupa etylowa lub propylowa

W ostatnich latach badano możliwości wyprodukowania wypełnień niepolarnych, których podstawą są tlenki cyrkonu i tytanu. Fazy te są trwałe w dużym zakresie pH, 1 ÷ 13, oraz bardziej odporne na wyższe temperatury. Nie są to jednak wypełnienia porównywalne pod względem efektów chromatograficznych z wypełnieniami opartymi na żelu krzemionkowym. Dotychczas, tego rodzaju wypełnienia wykorzystuje się częściej w badaniach naukowych niż w pracach rutynowych.

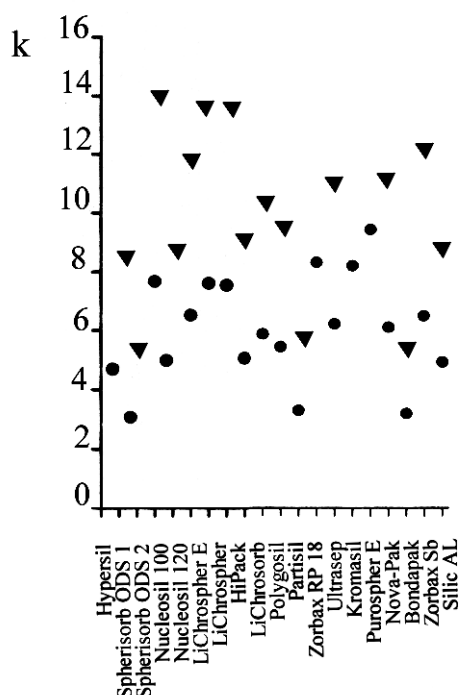
Inną grupą wypełnień stanowią polimery: poli(styren-diwinilobenzen), poliakrylany i polimetakrylany. Mogą być otrzymane w postaci materiałów sypkich o odpowiedniej granulacji. Mogą być również modyfikowane w celu uzyskania odpowiednich własności chromatograficznych. Wykazują na ogół niższą sprawność niż wypełnienia tradycyjne. Znajdują zas-

tosowanie w szczególnych warunkach, gdy niezbędne jest użycie fazy ruchomej o bardzo niskim lub wysokim pH.

Najnowszą generację faz stacjonarnych stanowią fazy monolityczne. Są to kolumny, których wewnątrz stanowi pręt porowaty, a nie jak dotychczas, warstwa porowata upakowana z materiału sypkiego. Fazy monolityczne mogą być otrzymane, podobnie jak tradycyjne, z modyfikowanego żelu krzemionkowego lub polimeru organicznego. Przyczyna opracowywania tego typu kolumn leży w trudnościach związanych z pakowaniem kolumn materiałem ziarnistym. Szczególne trudności napotyka się przy pakowaniu kolumn o małej średnicy. Miniaturyzacja kolumn jest korzystna ze względu na oszczędność rozpuszczalników i skrócenie czasu rozdzielania, lecz szczególnie potrzebna w przypadku stosowania spektrometru mas jako detektora (LC-MS).

Produkcją wypełnień zajmują się wyspecjalizowane firmy. W handlu dostępne są przede wszystkim fazy monomeryczne, wyprodukowane na bazie żelu krzemionkowego. Niektórzy producenci oferują również fazy spolimeryzowane. Spośród wymienionych rodzajów faz największe zastosowanie znalazły fazy z oktadecylosilanem.

Producenci informują użytkowników jaka jest grupa funkcyjna decydująca o charakterze powierzchni, na bazie jakiego materiału i o jakich parametrach wyprodukowano fazę, jaki jest stopień pokrycia węglem, czy wypełnienie poddano procesowi usuwania resztkowych grup -OH (ang. endcapped), do jakich mieszanin dany rodzaj wypełnienia nadaje się najlepiej, w jakim zakresie pH można je bezpiecznie stosować. Niejednokrotnie oferują wypełnienie do rozdzielania określonego rodzaju mieszanin. Mogą to być nawet typowe sorbenty, które zostały przetestowane przez producenta pod kątem rozdzielania pewnego typu związków i na tego typu rozdzielanie producent udziela gwarancji. Istnieje wiele możliwości wpływania w procesie produkcyjnym na ostateczne własności fazy, dlatego fazy otrzymane przez różnych producentów



Rys. 3.3. Współczynniki retencji etylobenzenu i toluenu na fazach typu C18, wyprodukowanych przez różnych producentów. Faza ruchoma: metanol/woda 49/51.

różnią się między sobą. Najczęściej wypełnienia różnią się stopniem pokrycia fazą organiczną, np. faza typu C18 może zawierać aż 27% węgla lub tylko 12 %, tyle samo, co C8. Różnice te powodują przede wszystkim różnice w retencji związków, rzadziej w selektywności (rys. 3)

3.3. RETENCJA SUBSTANCJI W WARUNKACH CHROMATOGRAFII W UKŁADZIE FAZ ODWRÓCONYCH

Układ chromatograficzny składa się z trzech składników: fazy stacjonarnej, fazy ruchomej i mieszaniny substancji poddawanych rozdzielaniu. Fazę ruchomą w tym typie chromatografii stanowi mieszanina wody i rozpuszczalnika organicznego, mieszającego się z wodą.

Retencja substancji jest wypadkową wielu oddziaływań, do których należy:

- działanie sił van der Waalsa pomiędzy hydrofobową fazą stacjonarną a cząsteczkami substancji
- działanie sił elektrostatycznych pomiędzy cząsteczkami substancji rozdzielanej, zawierającej polarne grupy funkcyjne i cząsteczkami fazy ruchomej
- działanie sił van der Waalsa pomiędzy cząsteczkami substancji rozdzielanej i fazy ruchomej
- oddziaływanie elektrostatyczne pomiędzy cząsteczkami substancji rozdzielanej i fazy ruchomej a powierzchniowymi grupami -OH lub, tam, gdzie to możliwe, tworzenie kompleksów z metalami, występującymi w stężeniach śladowych na powierzchni fazy stacjonarnej.

Cząsteczki fazy ruchomej, składającej się z wody i rozpuszczalnika polarnego (rozpuszczalników polarnych), ulegają asocjacji w wyniku oddziaływań elektrostatycznych, tworzą się również między nimi wiązania wodorowe. Pojawienie się cząsteczki hydrofobowej powoduje zakłócenie w strukturze fazy ruchomej zawierającej wodę. Na skutek działania sił między cząsteczkami polarnymi pojawia się tendencja do usunięcia hydrofobowej cząsteczki (lub hydrofobowej części cząsteczki) z fazy wodnej i wyparcia jej w kierunku hydrofobowej powierzchni fazy stacjonarnej. Efekt działania tych sił zależy od napięcia powierzchniowego i stałej dielektrycznej rozpuszczalników tworzących fazę, momentu dipolowego i objętości molowej substancji. Siła oddziaływania faza stacjonarna ↔ substancja zależy od wielkości cząsteczek biorących udział w procesie, tj. od wielkości cząsteczki węglowodoru tworzącego fazę związaną oraz cząsteczki chromatografowanej substancji i rośnie wraz z ich wzrostem. Zależy również od gęstości pokrycia fazą związaną. Jeżeli faza stacjonarna zawiera na powierzchni grupy OH, a cząsteczka substancji zawiera polarną grupę funkcyjną, możliwe jest również oddziaływanie poprzez te grupy, którego siła zależy w pewnym stopniu od składu fazy ruchomej.

Dokładny mechanizm retencji w fazach odwróconych nadal nie jest znany. Ogólnie można powiedzieć, że retencja związku zależy od chemicznej natury cząsteczek substancji i cząsteczek otaczającej je fazy ruchomej i stacjonarnej, oraz od struktury warstwy powierzchniowej. Przedstawione oddziaływania umożliwiają jednak przewidywania dotyczące retencji rozdzielanych substancji. Retencja substancji rośnie ze wzrostem:

- stopnia pokrycia powierzchni związaną fazą organiczną
- długości łańcucha fazy związanej
- hydrofobowości grupy funkcyjnej decydującej o charakterze powierzchni sorpcyjnej
- hydrofobowości substancji rozdzielanych
- zawartości wody w fazie ruchomej

Kolejność elucji: substancje eluują w kolejności od najbardziej polarnych (ściśle najbardziej hydrofilowych) do niepolarnych (najmniej hydrofilowych), a w szeregach homologicznych od nisko- do wysokocząsteczkowych.

W przypadku obecności powierzchniowych grup OH substancje o charakterze zasadowym mogą charakteryzować się wyższą retencją niż wynikałoby to z wielkości cząsteczki i stopnia ich hydrofobowości.

Ważnym parametrem w chromatografii jest selektywność będąca miarą różnic w retencji poszczególnych substancji. Jest zależna od typu fazy stacjonarnej, typu i składu fazy ruchomej oraz w pewnym stopniu od temperatury. Można wyróżnić trzy rodzaje selektywności związane z oddziaływaniem substancji z fazą stacjonarną:

- selektywność względem grupy metylenowej, zwana hydrofobową
- selektywność chemiczna (lub polarna), wynikająca z oddziaływań jonowych, dipolowych lub wiązań wodorowych z powierzchniowymi grupami OH, ewentualnie tworzeniem kompleksów z metalami z warstwy powierzchniowej
- selektywność steryczna, wynikająca ze struktury wypełnienia i kształtu cząsteczek substancji rozdzielanych.

Selektywność hydrofobowa określa różnice retencji dwóch sąsiednich elementów szeregu homologicznego, różniących się o grupę $-CH_2-$. Selektywność hydrofobowa rośnie ze wzrostem długości łańcucha fazy związanej oraz ze stopniem pokrycia powierzchni. Zależy również od rodzaju i ilości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej. Ten rodzaj selektywności wyróżnia chromatografię w układach faz odwróconych spośród wszystkich innych typów chromatografii.

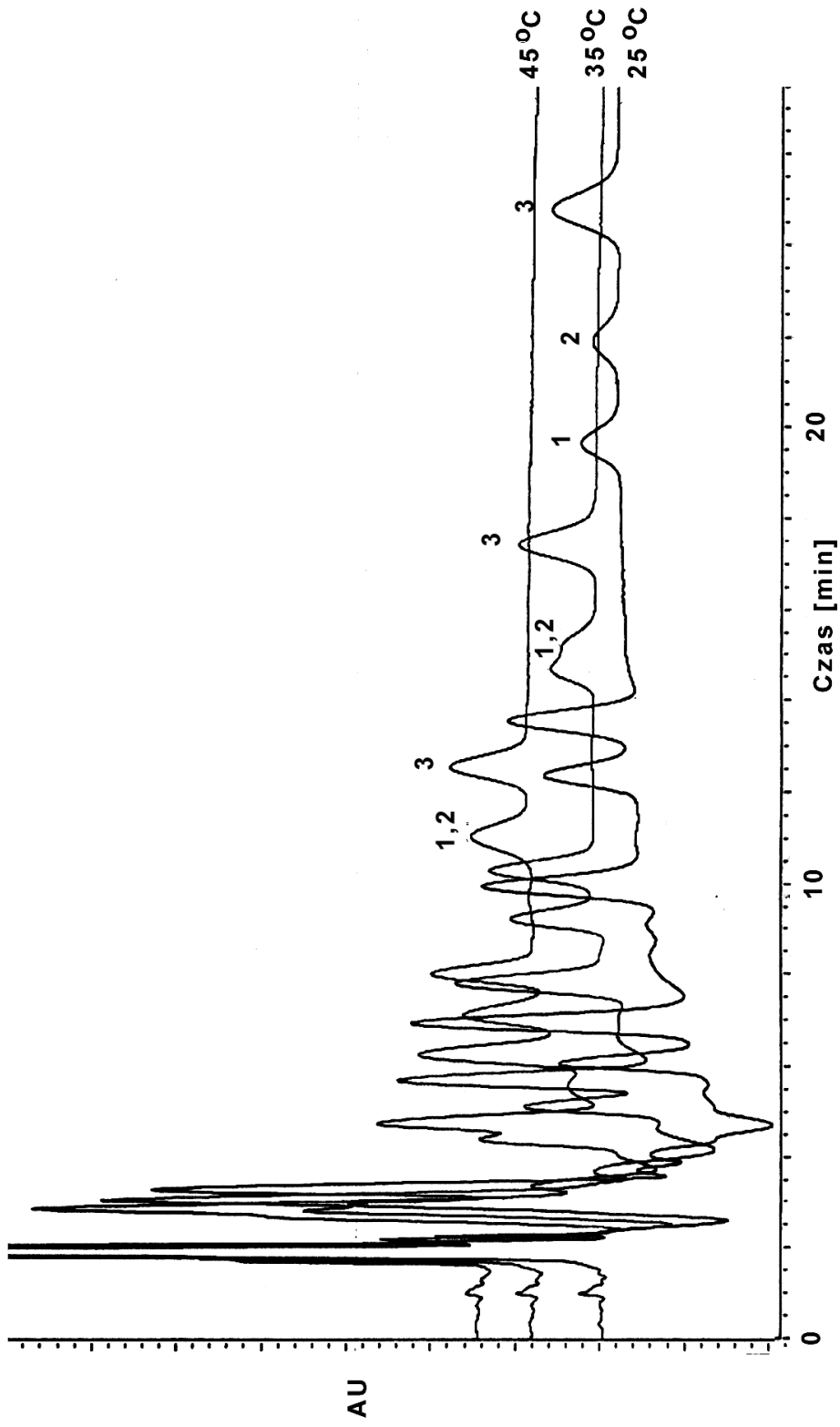
Selektywność chemiczna, z uwagi na zależność od oddziaływań polarnych, jest istotna tylko dla substancji zawierających polarne grupy funkcyjne. Zależy również od składu fazy ruchomej.

Selektywność steryczna jest istotna w rozdzielaniu wielopierścieniowych węglowodorów skondensowanych, polibifenyli, steroidów, karotenoidów. Zaobserwowano, że selektywność steryczna jest lepsza w kolumnach monomerycznych i polimerycznych o dużym stopniu pokrycia fazą związaną. Prawdopodobnie selektywność tego rodzaju związana jest z większym uporządkowaniem struktury fazy organicznej w wypełnieniach o dużym stopniu pokrycia.

Wzrost temperatury przede wszystkim zmniejsza retencję substancji rozdzielanych i tym samym może wpłynąć na selektywność rozdzielania. Na rysunku 4 przedstawiono wpływ temperatury na rozdzielanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Wzrost temperatury spowodował istotne zmniejszenie czasu elucji, lecz także znaczne pogorszenie stopnia rozdzielania, do nałożenia się pików włącznie, (np. substancje oznaczone numerami 1 i 2 na rys. 3.4). Kontrola temperatury ma na celu przede wszystkim stabilizację warunków rozdzielania w celu uzyskania dobrej powtarzalności

3.4. FAZY RUCHOME

Faza ruchoma powinna być cieczą obojętną chemicznie względem fazy stacjonarnej i składników rozdzielanych mieszanin, być dostatecznie dobrym rozpuszczalnikiem dla badanych substancji, aby nie dochodziło do ich wytrącania się w kolumnie, mieć małą lepkość zapewniającą małe opory przepływu i dobre warunki wymiany masy, utrzymać stały skład przez dostatecznie długi okres czasu mając na uwadze zarówno parowanie składników jak i trwałość rozpuszczalników organicznych wobec dostępu powietrza. Faza ruchoma nie powinna być toksyczna. Przy wyborze rozpuszczalnika należy mieć na uwadze jego własności ze względu na stosowany detektor, np. w przypadku detektora fotometrycznego powinna być przepuszczalna



Rys. 3.4. Wpływ temperatury na rozdzielanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Kolumna typu C18, faza ruchoma: metano/woda 90/10.

dla światła w stosowanym zakresie długości fal. Część z tych warunków jest trudna do spełnienia.

W chromatografii w układach faz odwróconych fazami ruchomymi są mieszaniny wody i rozpuszczalników organicznych (tzw. modyfikatorów) mieszających się z wodą. Najczęściej stosowane rozpuszczalniki organiczne to acetonitryl, metanol i tetrahydrofuran. Mieszając wodę z metanolem lub tetrahydrofuranem otrzymuje się roztwory o lepkości większej niż lepkość wody prawie do 80% zawartości rozpuszczalnika organicznego a maksimum lepkości przypada w zakresie 40 ÷ 50%. Niewielki wzrost lepkości dla mieszanin z acetonitrylem obserwuje się do zawartości około 30% tego rozpuszczalnika.

Tabela 3.2. Własności niektórych rozpuszczalników.

Nazwa rozpuszczalnika	Przepuszczalność światła, powyżej ... nm.	Współczynnik załamania światła w 20°C	Lepkość, cP	Temperatura wrzenia
Metanol	205	1,3284	0,55	64,7
Acetonitryl	190	1,3441	0,38	81,6
Tetrahydrofuran	212 (230 ?)	1,4072	0,55	66,0
Woda	190	1,3330	1,00	100
Kwas octowy	230			

Niektóre własności częściej stosowanych rozpuszczalników zestawiono w tabeli 3.2.

Faza ruchoma musi mieć odpowiednią siłę elucyjną. Z praktycznego punktu widzenia substancje nie powinny być eluowane zbyt szybko, ponieważ potrzebna byłaby bardzo sprawna kolumna, ani zbyt wolno, ponieważ traci się czas i rozpuszczalnik. Faza ruchoma powinna być tak dobrana, aby współczynniki retencji wszystkich substancji w mieszaninie (wartości k) mieściły się w zakresie 1 ÷ 10. Ze względu na hydrofobowy charakter faz stacjonarnych, w tym układzie woda jest najslabszym rozpuszczalnikiem. Dodatek rozpuszczalnika organicznego do wody powoduje wzrost siły elucyjnej tak powstałej fazy ruchomej, tzn. im więcej rozpuszczalnika tym siła elucyjna jest większa. Konsekwencją wzrostu siły elucyjnej jest zmniejszenie retencji, czyli czasu i objętości retencji rozdzielanych substancji. Ustalono ważną, przybliżoną zależność pomiędzy zawartością rozpuszczalnika organicznego a retencją substancji:

$$\lg k = \lg k_w - n \cdot c \quad (1)$$

gdzie: $k = \frac{V_R - V_0}{V_0}$ - współczynnik retencji

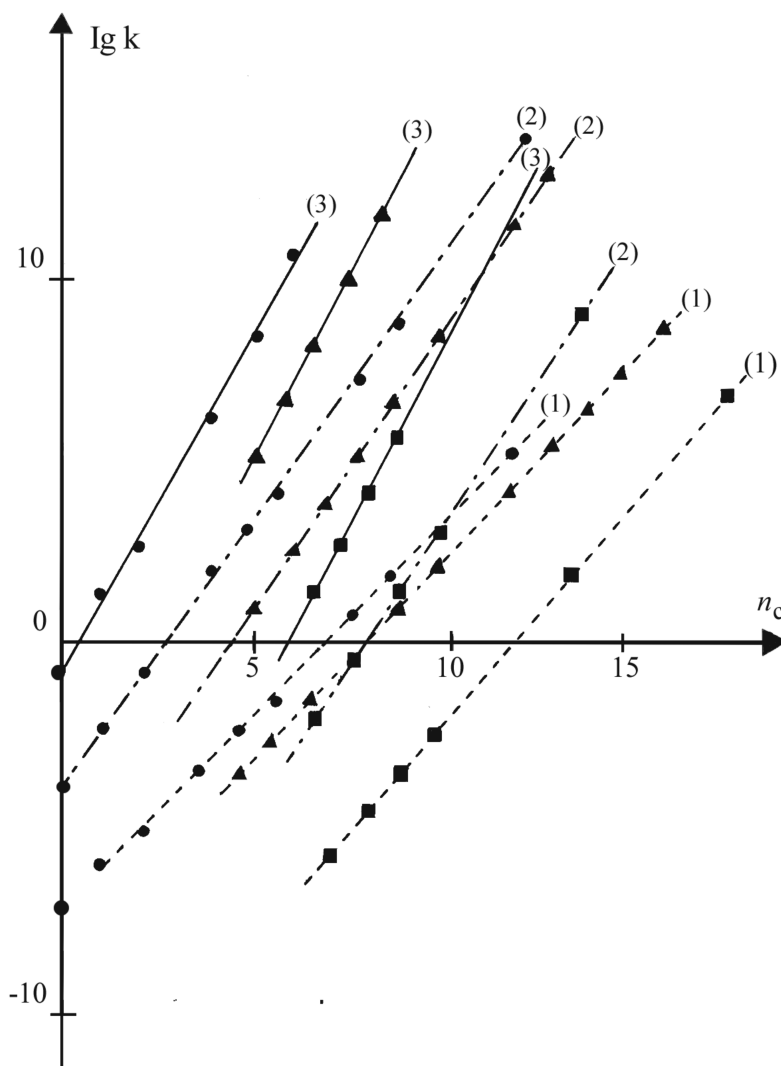
k_w - wartość k w czystej wodzie

c - udział objętościowy rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej

n - stała, zależna od rodzaju rozpuszczalnika stanowiącego składnik eluentu i od rodzaju substancji rozdzielanej

Zależność [1] jest zależnością spełnianą na ogół tylko w pewnym zakresie zmian stężenia modyfikatora organicznego, lecz bardzo użyteczną praktycznie. Pozwala na szybkie oszacowanie odpowiedniego składu fazy ruchomej, po uzyskaniu danych retencji z użyciem dwu faz ruchomych, różniących się stężeniem organicznego modyfikatora.

Szczególną cechą odwróconego układu faz jest zdolność do rozdzielania mieszanin związków należących do szeregów homologicznych (rys. 3.5).



Rys. 3.5. Zależność logarytmu współczynnika retencji od liczby atomów węgla w szeregach homologicznych: n-metyloestry, n-alkany, n-alkilobenzeny. Kolumna typu C18, fazy ruchome: 1) metanol, 2) metanol/woda 9/1, 3) metanol/woda 8/2.

Cecha ta, jak już wspomniano, nazwana została selektywnością hydrofobową lub selektywnością względem grupy metylenowej. Poza zależnością od rodzaju powierzchni wypełnienia, selektywność ta zależy w pewnym stopniu od rodzaju rozpuszczalnika. W każdej jednak fazie ruchomej typu: woda - rozpuszczalnik organiczny, selektywność hydrofobowa rośnie ze wzrostem zawartości wody. Chociaż selektywność hydrofobowa zależy od rodzaju rozpuszczalnika organicznego, zmiana rodzaju rozpuszczalnika w fazie ruchomej nie spowoduje zmiany kolejności elucji substancji niepolarnych.

Substancje zawierające w swojej cząsteczce polarne grupy funkcyjne mogą wykazywać specyficzne oddziaływanie nie tylko z pozostałymi grupami -OH na powierzchni sorbentu, lecz także z cząsteczkami fazy ruchomej. Efektem tych oddziaływań mogą być duże zmiany w selektywności rozdzielania substancji polarnych po zmianie rodzaju rozpuszczalnika organicznego. W przypadkach szczególnych, gdy mieszanina rozdzielanych substancji składa się ze związków o różnym charakterze, może nastąpić nawet zmiana kolejności elucji. Np. z kolumny typu C8, z

fazą ruchomą woda /metanol 50/50, substancje eluowały w następującej kolejności: p-nitrofenol, p-dinitrobenzen, nitrobenzen i benzoesan metylu, natomiast z tej samej kolumny z fazą woda/tetrahydrofuran 75/25 porządek elucji był następujący: benzoesan metylu, nitrobenzen, p-dinitrobenzen i p-nitrofenol. W praktyce analitycznej często rozdzielane są mieszaniny związków bardziej zbliżonych pod względem budowy i tak drastyczną zmianę selektywności obserwuje się niezbyt często.

Od początku stosowania chromatografii próbowano poszczególne rozpuszczalniki ułożyć w szeregi o stopniowo zmieniającej się sile elucyjnej. W przypadku faz odwróconych jednym z kryteriów mocy elucyjnej rozpuszczalnika może być parametr rozpuszczalności Hildebranda, obliczany z ciepła parowania rozpuszczalnika. Dla metanolu, acetonitrylu i tetrahydrofuranu wartość parametru rozpuszczalności wynosi, odpowiednio: 12,9; 11,8 i 9,1.

Ogólnie, rozpuszczalnikom polarnym odpowiadają duże wartości parametru rozpuszczalności. Zmiana rozpuszczalnika w fazie ruchomej np. z bardziej polarnego metanolu na mniej polarny tetrahydrofuran, przy tym samym udziale objętościowym, spowoduje zmniejszenie objętości retencji każdej substancji. Klasyfikacja rozpuszczalników za pośrednictwem parametru rozpuszczalności nie jest doskonała. Wartości parametru dla heksanu i eteru etylowego są prawie sobie równe, natomiast własności tych rozpuszczalników jako faz ruchomych są zupełnie odmienne. Parametr rozpuszczalności odzwierciedla tylko wzajemne oddziaływanie cząsteczek czystego rozpuszczalnika, nie daje natomiast żadnej informacji na temat oddziaływania: rozpuszczalnik ↔ substancja, które w istotny sposób wpływa na skuteczność rozdzielania. Próby uwzględnienia tych oddziaływań w klasyfikacji rozpuszczalników doprowadziły do ustalenia empirycznego parametru nazwanego indeksem polarności P' . Indeks polarności składa się z trzech składowych odzwierciedlających własności protonoakceptorowe (x_a), protonodonorowe (x_b) oraz własności dipolowe (x_d) cząsteczki. Przypisując rozpuszczalnikom odpowiednie wartości x_a , x_b i x_d , podzielono je na grupy o zbliżonych wartościach odpowiedniego parametru. Spośród różnych związków należących do poszczególnych grup w Tabeli 3.3 zestawiono tylko niektóre, najczęściej stosowane w chromatografii jako fazy ruchome.

Jeżeli faza ruchoma o danym składzie nie zapewnia odpowiedniej selektywności (piki niektórych substancji nie są dostatecznie rozdzielone) należy zmienić skład fazy przez wybór rozpuszczalnika należącego do innej grupy. W ten sposób zapewnia się zmianę rodzaju oddziaływań międzycząsteczkowych, mających istotne znaczenie w procesie rozdzielania. Autor klasyfikacji, Snyder, zasugerował stosowanie w fazach odwróconych metanolu, acetonitrylu i tetrahydrofuranu jako rozpuszczalników odpowiednich ze względu na cechy fizyczne, dostateczną siłę

Tabela 3.3. Grupy rozpuszczalników.

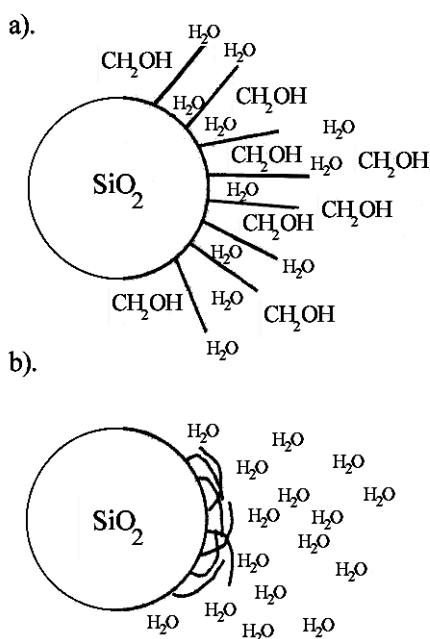
Grupa	Rozpuszczalnik
I	eter metylowo-t-butyłowy (etry alifatyczne)
II	metanol (alkohole alifatyczne)
III	tetrahydrofuran
IV	kwasy octowy formamid
V	chlerek metylenu, chlerek etylenu
VI	dioksan acetonitryl
VII	toluen
VIII	woda, chloroform

elucyjną i różnicę w oddziaływaniach, zapewniających dobre rezultaty w rozdzielaniu większości mieszanin związków niskocząsteczkowych.-

Podsumowując, podstawowe zasady doboru składu eluentu w układach faz odwróconych są następujące:

- przeprowadzić rozdzielanie w kolumnie C8 lub C18 z fazą ruchomą o dużej sile elucyjnej (np woda / acetonitryl 2 / 8)
- zmniejszając zawartość acetonitrylu doprowadzić do takich warunków, aby zakres wartości k substancji mieścił się w przedziale 0.5 - 20. (Jeżeli kolumna ma wymiary 15 x 0,46 cm, odpowiada to zakresowi objętości retencji od około 2,3 ml dla pierwszego piku do około 30 ml dla ostatniego)
- w razie potrzeby poprawić selektywność przez zmianę rodzaju rozpuszczalnika organicznego (wymienić acetonitryl na metanol lub tetrahydrofuran lub zastosować fazę trójskładnikową).
- jeżeli stopień rozdzielania jest niezadowalający, zmienić pH fazy ruchomej
- jeżeli nadal rozdzielanie nie jest odpowiednie, zmienić typ wypełnienia kolumny (typ sorbentu).

W przypadku dobierania mocy elucyjnej fazy ruchomej odpowiedniej do rozdzielania mieszanin substancji polarnych na sorbentach typu C18 należy uważać, aby zawartość wody w fazie ruchomej nie przekraczała 95%. Przy tak dużej zawartości wody powierzchnia fazy stacjonarnej nie jest zwilżana przez fazę ruchomą i łańcuchy węglowodorowe mają tendencję do zaginania się w kierunku powierzchni. Ilustruje to rysunek 6. Konsekwencją tego może być zmniejszenie się objętości retencji związków zamiast spodziewanego wzrostu.



Rys. 3.6. Ilustracja zmiany konfiguracji hydrofobowej fazy związanej pod wpływem rodzaju otaczającej cieczy: a) mieszanina metanolu i wody, b) woda

Istnieją programy komputerowe, które pozwalają wybrać warunki rozdzielania optymalne dla danej mieszaniny na podstawie określonego zestawu chromatogramów wykonanych wstępnie.

Programy te na razie nie są w powszechnym użyciu przede wszystkim ze względu na ich cenę. Problemem jest też często nieznanomość wielu składników rozdzielanej mieszaniny (składników stanowiących zanieczyszczenia)

3.5. ROZDZIELANIE MIESZANIN SUBSTANCJI O CHARAKTERZE KWASÓW LUB ZASAD

W przypadku zastosowania typowego układu faz odwróconych (faza stacjonarna: C 18, faza ruchoma: woda / rozpuszczalnik organiczny) do rozdzielania mieszanin zawierających związki tak polarne jak kwasy lub zasady organiczne problemem może okazać się zbyt słaba retencja tych związków. Istnieje kilka możliwości rozwiązania tego problemu:

- zmiana typu chromatografii, na jonowymienną
- zmiana pH fazy ruchomej
- zastosowanie bardziej polarnej fazy ruchomej
- dodatek do fazy ruchomej elektrolitu umożliwiające utworzenie pary jonowej

Wybór rozwiązania zależy od typu próbki. Jeżeli próbka zawiera mieszaninę związków niejonowych i jonowych, chromatografia jonowymienna nie przyniesie dobrych rezultatów. Ważnym kryterium jest również moc kwasów (i/lub zasad) obecnych w próbce.

W przypadku słabych elektrolitów zmiana pH może wpłynąć na stopień dysocjacji, a nawet cofnąć dysocjację i uczynić cząsteczkę hydrofobową, zwiększając tym samym jej retencję na hydrofobowej fazie. Ilustruje to rys. 3.7.

Zależność współczynnika retencji k od pH fazy ruchomej dla kwasów jednoprotonowych przebiega zgodnie z wyrażeniem:

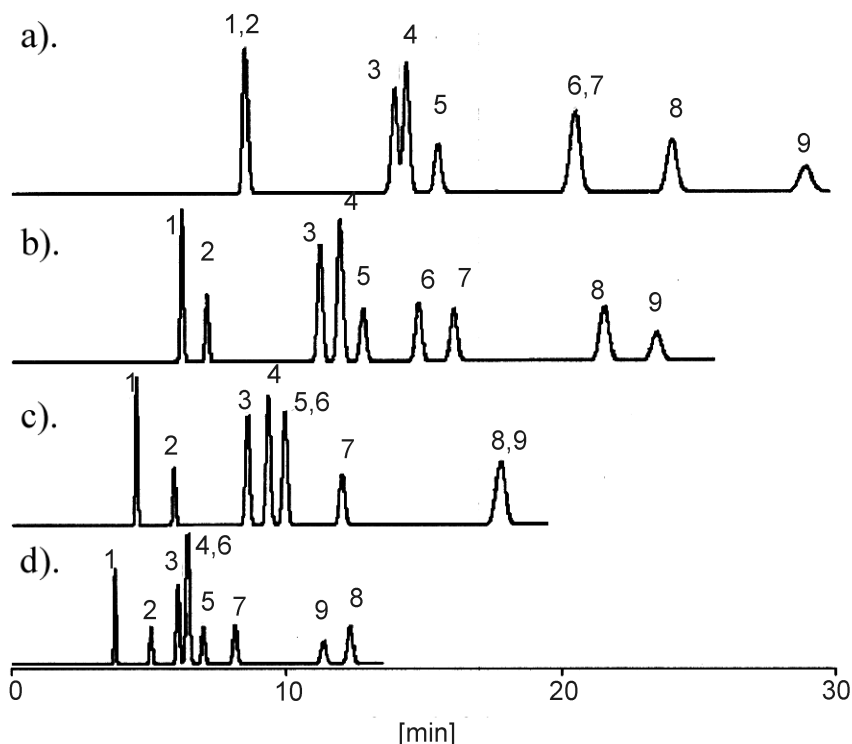
$$k = \frac{k_0 + k_1(K_a/[H^+])}{1 + (K_a/[H^+])} \quad (2)$$

w którym:

k_0	- współczynnik retencji formy neutralnej
k_1	- współczynnik retencji formy zjonizowanej
K_a	- stała dysocjacji kwasu
$[H^+]$	- stężenie jonów wodorowych w fazie ruchomej

Zależność jest nieliniowa, kształtem przypominająca krzywą miareczkowania, z punktem przegięcia przy wartości pH równej wartości pK_a kwasu. Z kształtu krzywej wynika, że największych zmian w retencji kwasu można oczekiwać w obszarze pH obejmującym wartość pK_a w zakresie $\pm 1,5$ pH od wartości pK_a . W tym zakresie pH wszelkie błędy w przygotowaniu buforu będą miały istotny wpływ na odtwarzalność parametrów retencji, należy więc tego zakresu w praktyce unikać.

Jeżeli w wyniku rozdzielania w fazie ruchomej o odczynie obojętnym otrzymano chromatogram, na którym znajdują się piki o bardzo małej objętości retencji, obniżenie pH do wartości bezpiecznej dla kolumny, np. do wartości 2,5 powinno dostarczyć informacji na temat obecności słabych kwasów - jeżeli w próbce znajdują się słabe kwasy, zniknie pewna liczba pików z obszaru o małej objętości retencji (na początku chromatogramu), a pojawią się nowe piki w obszarze większych objętości retencji, tj. w części chromatogramu oddalonej od frontu. Jeżeli ze względu na selektywność rozdzielania wszystkich składników próbki wartość pH wymaga dalszego dopasowania, zmiany w kolejno przygotowanych fazach ruchomych nie powinny być duże, np. o 0,5 jednostki pH, aby nie powodować dalszych gwałtownych zmian retencji i nie



Rys. 3.7 . Wpływ pH na rozdzielanie pochodnych kwasu benzoowego: a) pH 2,5, b) pH 3,0, c) pH 3,5, d) pH 4,0. Kolumna C8, 250 x 4,6 mm, dp = 5µm.

Faza ruchoma: metanol/bufor 35/65.

Temperatura 35 °C. Natężenie przepływu: 1 ml/min. Piki: 1 = kwas 2-nitrobenzoowy,

2 = kwas fталowy, 3 = zanieczyszczenie, 4 = kwas 2-fluorobenzoowy,

5 = kwas 3-cyjanobenzoowy, 6 = kwas 2-chlorobenzoowy, 7 = kwas 3-nitrobenzoowy,

8 = kwas 3-fluorobenzoowy, 9 = kwas 2,6-dimetylobenzoowy

utrudniać interpretacji chromatogramu. Obniżenie pH nie wpłynie na retencję substancji zasadowych lub ją osłabi.

Podobną zależność współczynnika retencji od wartości pH obserwuje się dla słabych zasad:

$$k = \frac{k_0 + k_1([H^+]/K_a)}{1 + ([H^+]/K_a)} \quad (3)$$

w którym: k_0 - współczynnik retencji formy neutralnej
 k_1 - współczynnik retencji formy zjonizowanej
 K_a - stała dysocjacji kwasu sprzężonego z zasadą,
 $K_b = K_w / K_a$,
 K_b - stała dysocjacji zasady
 $[H^+]$ - stężenie jonów wodorowych w fazie ruchomej

W fazach związanych, otrzymanych na bazie żelu krzemionkowego zakres zmian pH w celu cofnięcia dysocjacji zasad jest ograniczony przeważnie do wartości 7,5 ÷ 8. Ponadto, długotrwałe stosowanie granicznych wartości pH zmniejsza trwałość kolumny. Jeżeli stosowanie wysokich pH jest nieodzowne, stosować można wypełnienia będące polimerami organicznymi, np. poli(styren-diwinilobenzen). Kolumny tego typu mają jednak gorszą sprawność od kolumn z fazami opartymi na żelu krzemionkowym.

Podwyższenie pH nie wpłynie na retencję substancji kwasowych, lub osłabi ich retencję. Zmiana wartości pH fazy ruchomej, zasadniczo, nie wpływa na retencję substancji niejonowych. Obniżenie wartości pH zmniejsza jednak kwasowość powierzchniowych grup OH, zmniejszając możliwość oddziaływania z grupami polarnymi rozdzielanych substancji, czego efektem może być większa symetria pików.

W przypadku detektora UV-VIS zmiana pH może powodować zmianę wysokości pików, ponieważ molowy współczynnik absorpcji wielu substancji zależy od pH. Utrudnia to interpretację chromatogramów.

Innym sposobem na rozwiązanie problemu retencji silnie polarnych związków jest zastosowanie faz stacjonarnych zwilżalnych przez fazy ruchome zawierające dużo, nawet 100% wody. Należą do nich:

- fazy krótkołańcuchowe, bez pokrycia resztkowych grup na powierzchni
- fazy z powierzchnią o zwiększonej hydrofilności przez pokrycie resztkowych grup OH grupami polarnymi
- fazy z grupą polarną wbudowaną w łańcuch alkiłowy w pobliżu wiązania łańcucha z powierzchnią żelu (najczęściej na trzecim węglu licząc od wiązania powierzchniowego)
- fazy długołańcuchowe (C 27, C 30)

Przykład rozdzielania zasad organicznych na fazie zawierającej grupy eterowe przedstawiono na rys. 8.

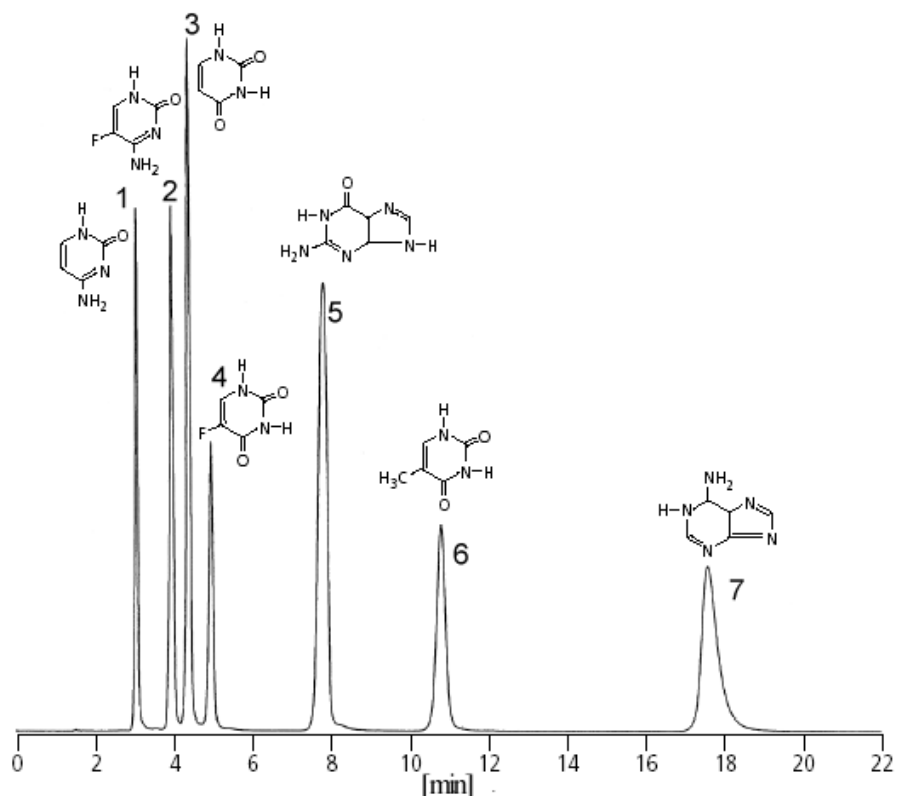
Pierwsze z wymienionych faz (z resztkowymi grupami OH na powierzchni) używane są od początku stosowania chromatografii w fazach odwróconych, dlatego wady i zalety tych faz są dobrze znane. Ze względu na obecność aktywnych grup -OH wykazują inną selektywność względem substancji polarnych niż fazy hydrofobowe i mogą skutecznie rozdzielić mieszaniny w innych warunkach nie rozdzielone. Istotną wadą tych wypełnień jest możliwość silnego oddziaływania z substancjami zasadowymi, powodując ogonowanie pików tych substancji. Jest to szczególnie istotne w zakresie $\text{pH} > 5$, ponieważ w takich warunkach powierzchniowe grupy OH są zjonizowane.

Druga grupa faz, to fazy zawierające grupy OH powstałe po hydrolizie grup alkoksylowych związanych z powierzchnią żelu w wyniku reakcji resztowych grup OH z trialkoksylanem. Grupy te mają słabsze własności kwasowe i powodują mniejszą asymetrię pików.

Najmłodszą generacją faz przeznaczonych do rozdzielania składników polarnych są fazy z grupami polarnymi podstawionymi w łańcuchu alkiłowym. Fazy te są dobrze zwilżane przez wodną fazę ruchomą i wykazują dobrą odtwarzalność warunków. Szczególną zaletą tych faz w rozdzielaniu związków polarnych jest małe ogonowanie pików, nawet w zakresie $\text{pH} = 4 \div 8$.

Fazy "długołańcuchowe" (C 27 lub C 30) powodują silniejszą retencję wszystkich substancji, tak niepolarnych jak i polarnych, w porównaniu z fazami o krótszych łańcuchach, np. C 18, nawet w przypadku wysokiego pokrycia fazą związaną. Są też bardziej odporne na zmiany w strukturze powierzchni, wynikające ze zmian konformacyjnych zachodzących w obecności fazy ruchomej o dużej zawartości wody. Z zastosowaniem tego typu faz stacjonarnych uzyskano dobre rozdzielanie serii nukleotydów w wodnej fazie ruchomej o $\text{pH} = 6$.

W przypadku rozdzielania silnych kwasów lub silnych zasad, zastosowanie znajduje tworzenie par jonowych. Polega to na dodaniu do fazy ruchomej składnika, z którego w wyniku dysocjacji powstanie jon organiczny o dużej cząsteczce i przeciwnym znaku (tzw. "przeciwnon") do znaku jonu będącego składnikiem rozdzielanej mieszaniny. Przed wprowadzeniem próbki,



Rys 3.8. Rozdzielanie zasad organicznych na hydrofilowej fazie stacjonarnej zawierającej grupy eterowe.
 Kolumna: AquaSep, 150 x 4,6 mm, dp = 5µm. Faza ruchoma: 0,05 M octan sodu (pH 4,6). Natężenie przepływu: 1,0 ml/min. Detektor: UV 254 nm. (ES Industries)

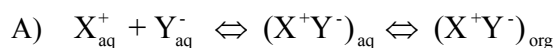
kolumnę przemywa się fazą ruchomą zawierającą przeciwjon, aż do osiągnięcia równowagi między fazami.

Chromatografia par jonowych bierze swój początek w ekstrakcji par jonowych w układzie woda / rozpuszczalnik organiczny. Jon interesującej substancji znajdujący się w fazie wodnej i przeciwjon tworzą "parę jonową", przeniesioną z fazy wodnej do fazy organicznej:

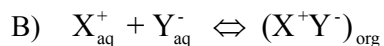
$$\begin{aligned}
 (1) \quad & X_{aq}^+ + Y_{aq}^- \rightleftharpoons (X^+Y^-)_{org}^{K_{XY}} \\
 (2) \quad & D_X = \frac{[X^+Y^-]_{org}}{[X^+]_{aq}} = K_{XY} [Y^-]_{aq} \\
 (3) \quad & k = D_X (V_s/V_m) = K_{XY} [Y^-] (V_s/V_m)
 \end{aligned}$$

- Oznaczenia:
- X_{aq}^+ - jon substancji X w fazie wodnej
 - Y_{aq}^- - przeciwjon w fazie wodnej
 - $(X^+Y^-)_{org}$ - para jonowa w fazie organicznej
 - K_{XY} - stała tworzenia pary (X^+Y^-)
 - D_X - współczynnik podziału substancji X między fazę wodną i organiczną
 - V_s - objętość fazy organicznej
 - V_m - objętość fazy wodnej
 - k - parametr retencji

W chromatografii proponowane są dwa mechanizmy. Jeden z nich jest analogiczny do przedstawionego wyżej procesu ekstrakcji:



Wg tego schematu substancja dostarczająca “przeciwjonu” znajduje się w fazie ruchomej. Utworzona w fazie ruchomej para jonowa dzieli się pomiędzy dwie fazy. Schemat ten może mieć miejsce w typowej chromatografii podziałowej.



Według tego schematu przeciwjon dodany do fazy ruchomej adsorbuje się na fazie stacjonarnej i uczestniczy w wymianie jonowej z jonem substancji X znajdującym się w fazie ruchomej. Jonem wymienianym przez jon substancji X jest mały jon nieorganiczny, który z przeciwjonem tworzy obojętną cząsteczkę dodaną do fazy ruchomej. Uważa się, że w chromatografii z fazami związanymi ten mechanizm jest bardziej prawdopodobny.

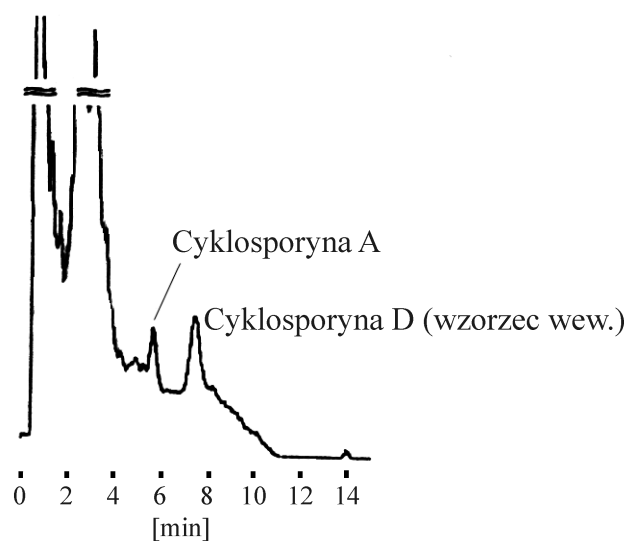
Tabela 3.4. Parametry wpływające na retencję.

Zmienna	Efekt
Typ jonu parującego	Większa zdolność do tworzenia pary, większa retencja
Wielkość jonu	Wzrost cząsteczki jonu powoduje wzrost retencji
Stężenie jonu	Wzrost stężenia jonu powoduje wzrost retencji, lecz do pewnej granicy
pH	Zależy od natury substancji. Retencja rośnie gdy zmiana pH powoduje wzrost stężenia formy zjonizowanej
Typ rozpuszczalnika org.	Retencja maleje ze wzrostem charakteru hydrofobowego
Stężenie rozpuszczalnika. org.	Retencja maleje ze wzrostem stężenia
Temperatura	Retencja maleje ze wzrostem temperatury
Faza stacjonarna	Retencja rośnie ze wzrostem charakteru hydrofobowego i/lub wyższym pokryciem fazą związaną

Z samej zasady tworzenia par jonowych wynika, że w przypadku rozdzielania zasad organicznych przeciwjonem może być sól kwasu organicznego, natomiast w przypadku rozdzielania kwasów, związek amoniowy.

Parametry wpływające na retencję przedstawiono w Tabeli 3.4:

3.6. ZASTOSOWANIA

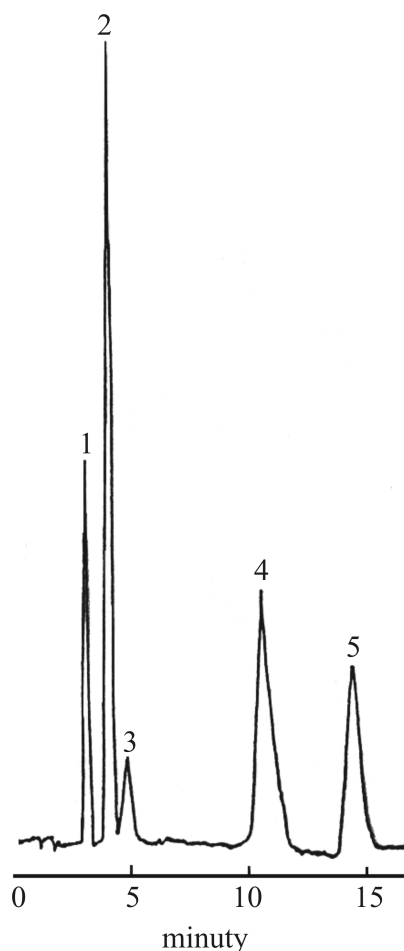


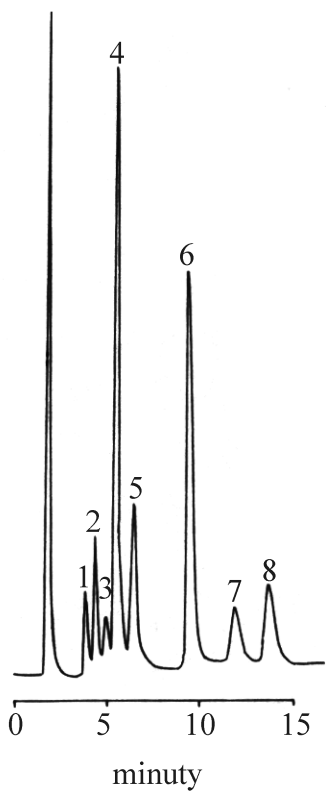
Rys 3.9. Oznaczanie cyklosporyny A w osoczu krwi.

Warunki analizy: kolumna
SUPELCOSIL LC-8, 75 x 4,6 mm, 3
 μm ,
prekolumna: Supelguard LC-8, 20 x 4,6
mm, 5 μm .
Faza ruchoma: acetonitryl : metanol : 3,3
mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 : 17 : 33.
Natężenie przepływu: 2 ml/min.
Detekcja: 210 nm UV.
Próbka: 50 μl ekstraktu sporządzonego z
osocza pacjenta.
(SUPELCO)

Rys 3.10. Rozdzielanie związków kompleksowych metali z EDTA w układzie faz odwróconych.

Warunki rozdzielania: kolumna RP-18 LiChrospher
(Merck), 10 μm ,
faza ruchoma: bufor pH 3,3 - metanol 95 : 5, skład
buforu: 50 mM kwas mrówkowy, 1,0 mM EDTA, 4,0
mM wodorotlenek tetrabutylamonowy, 10 mM
azotan sodu, wodorotlenek sodu do pH 3,3,
temperatura pokojowa.
Natężenie przepływu: 1,5 ml/min.
Detekcja: 260 nm od startu do 8 min, 242 nm od 8 min
do końca.
Próbka: mieszanina wzorców metali 1 mM EDTA oraz
- 5 ppm Bi, 2 ppm Fe, 4 ppm Co, 8 ppm Cu i 10 ppm
Pb, objętość próbki: 100 l.





Rys 3.11. Rozdzielanie cukrów na kolumnie z pierwszorzędową grupą aminową jako grupą funkcyjną.

Kolumna: YMC-Pack Amino S-5 120 A, 250 x 4,6 mm.

Faza ruchoma: acetonitryl/woda 75/25.

Natężenie przepływu: 2,0 ml/min.

Detekcja: RI

Analizowane substancje: 1 = ksyloza, 2 = ryboza,

3=arabinoza, 4 = fruktoza, 5 = glukoza,

6 = sukroza, 7 = maltoza, 8 = laktoza

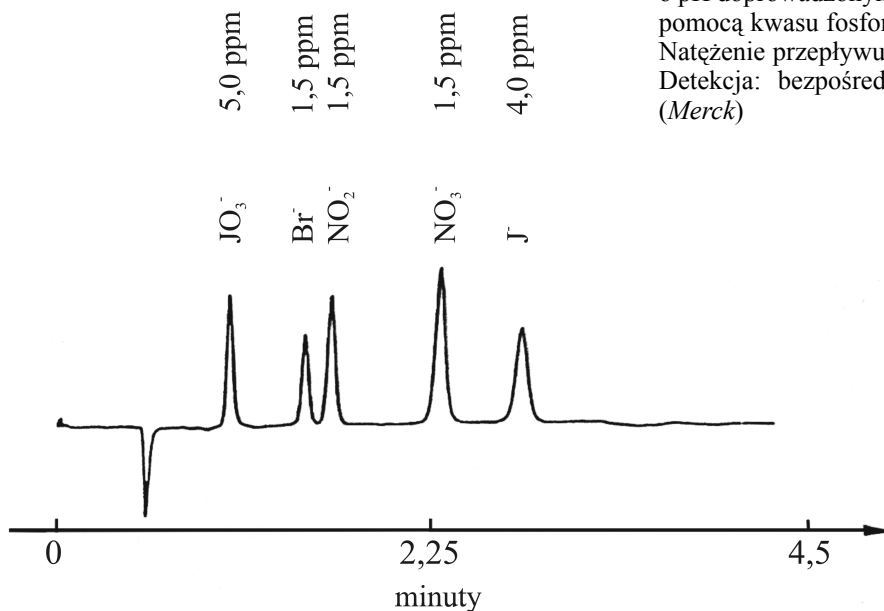
Rys 3.12. Rozdzielanie anionów nieorganicznych w systemie par jonowych.

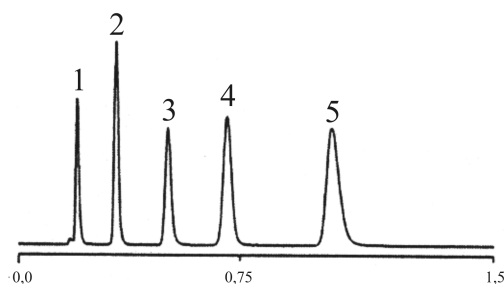
kolumna: LiChrospher^R RP8, 5 μm.

Faza ruchoma: woda zawierająca NaCl w stężeniu 0,1m., oktyloaminę 0,01 m., o pH doprowadzonym do wartości 6,2 za pomocą kwasu fosforowego.

Natężenie przepływu: 2 ml/min.

Detekcja: bezpośrednia, UV 205 nm. (Merck)



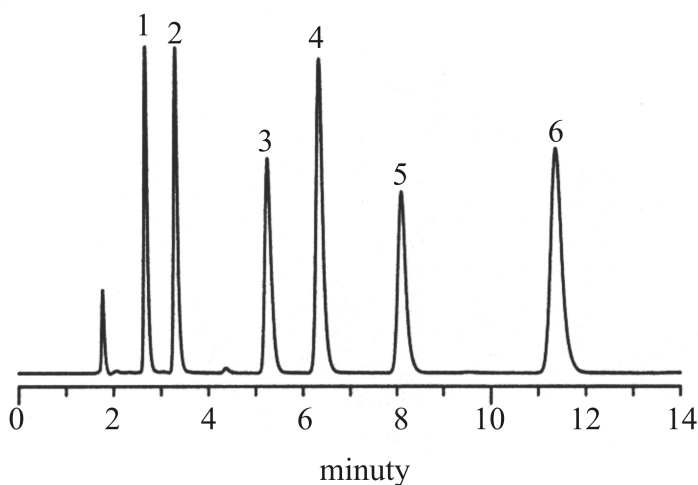


Rys 3.13. Rozdzielanie mieszaniny na kolumnie monolitycznej.

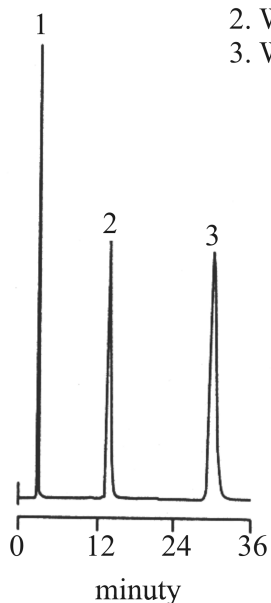
Kolumna: Chromolith™ Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm.
 Faza ruchoma: acetonitryl/0,1% wodny roztwór kwasu trójfluorooctowego 20/80 (obj.)
 Temperatura: 25°C.
 Detekcja: UV 220 nm.
 Natężenie przepływu: 9 ml/min (153 bar).
 Analizowane substancje: 1) 63 µg/ml atenolol, 2) 29 µg/ml pindolol, 3) 108 µg/ml metoprolol, 4) 104 µg/ml celiprolol, 5) 208 µg/ml bisoprolol. (Merck)

Rys 3.14. Rozdzielanie mieszaniny barbituranów na kolumnie: a) Discovery C18 i b) Discovery RP-AmideC16).

Kolumna: 150 x 4,6 mm, 5 m.
 Faza ruchoma trójskładnikowa: (metanol:acetonitryl 60:40) / woda 25/75.
 Natężenie przepływu: 2ml/min.
 Temperatura: 30°C.
 Detekcja.: UV 214nm
 Analizowane substancje: 1 = barbital, 2 = phenobarbital, 3 = aprobarbital, 4 = butobarbital, 5 = mephobarbital, 6 = pentobarbital, 7 = secobarbital (SUPELCO)



- 1. Witamina C (0,15mg/mL)
- 2. Witamina D3 (0,30mg/mL)
- 3. Witamina K1 (0,60mg/mL)

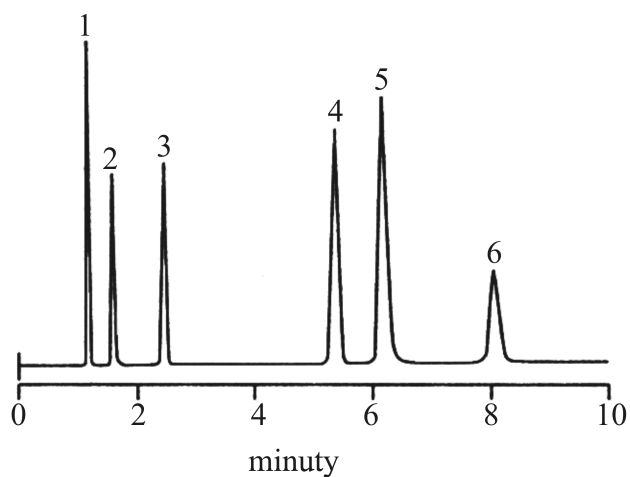
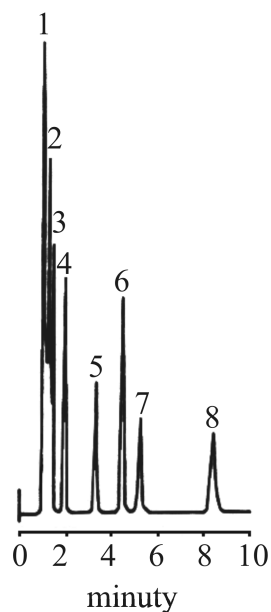


Rys 3.15. Rozdzielanie witamin.

Kolumna: Adsorbosil C18, 300 x 4,6 mm, 10 µm.
 Faza ruchoma: 100% metanol.
 Natężenie przepływu: 1ml/min.
 Detekcja: UV, 254 nm. (Alltech)

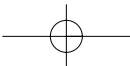
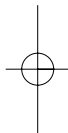
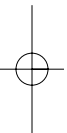
Rys 3.16. Rozdzielanie katecholamin.

Kolumna: Adsorbosphere HS C18, 7 μm ., 150 x 4,6 mm.
 Faza ruchoma: metanol : roztwór 0,001 m. siarczanu heptylowosodowego w 0,07 m. KH_2PO_4 , pH 3,0 (13 : 87).
 Natężenie przepływu: 2ml/min.
 Detekcja: UV, 280nm.
 Analizowane substancje: 1 = norepinefryna, 2 = epinefryna,
 3 = 3,4-dihydroksybenzyloamina, 4 = dopamina,
 5 = kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy, 6 = serotonina,
 7 = kwas 5-hydroksyindoloctowy, 8 = kwas homowanilinyowy
 (Alltech)



Rys 3.17. Równoczesne rozdzielanie mieszaniny substancji o charakterze kwasowym, zasadowym i neutralnym.

Kolumna: Alltima C18, 5 μm ., 150 x 4,6 mm.
 Faza ruchoma: roztwór KH_2PO_4 o stężeniu 50mmol/l pH 3 : acetonitryl (40 : 60).
 Natężenie przepływu: 1,0ml/min.
 Detekcja: UV, 254 nm.
 Analizowane substancje: 1 = uracyl,
 2 = pirydyna, 3 = fenol,
 4 = N,N-dimetyloanilina,
 5 = kwas 4-butylobenzoowy,
 6 = toluen



4. ELUCJA GRADIENTOWA

Krystyna Gazda

Istnieją dwa sposoby prowadzenia elucji:

- elucja izokratyczna, w trakcie której skład fazy ruchomej (eluentu) jest stały (np. mieszanina metanolu i wody w stosunku 6/4);
- elucja gradientowa, gdy następuje wzrost siły elucyjnej fazy ruchomej realizowany przez zmianę jej składu (np. skład fazy ruchomej w trakcie rozdzielania zmienia się od 10% metanolu w wodzie do 90% metanolu w wodzie). Warunki elucji izokratycznej bywają niekiedy uważane za warunki elucji gradientowej, z zastosowaniem programu elucji o stałym składzie eluentu.

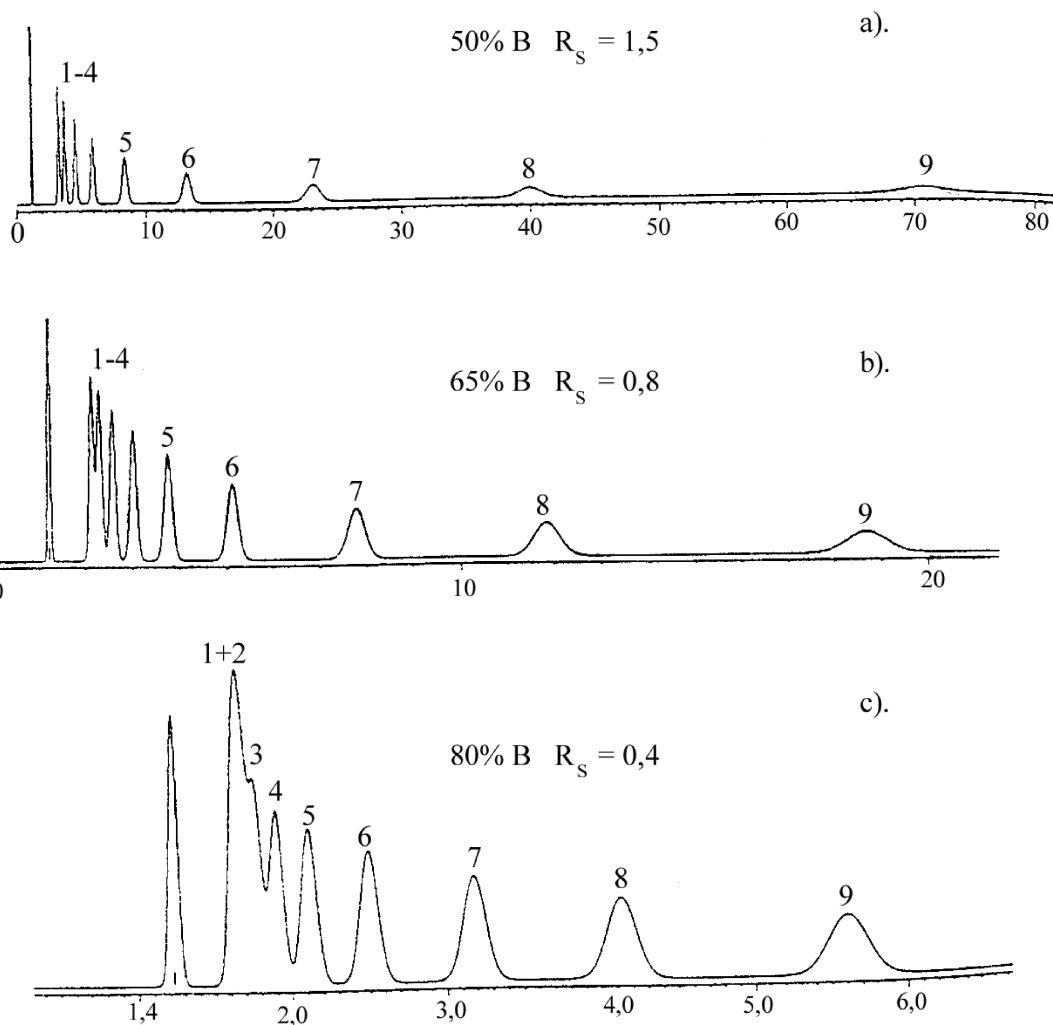
Elucja gradientowa stosowana jest wtedy, gdy badana mieszanina składa się z substancji o bardzo różniących się właściwościach sorpcyjnych i tym samym znacznie różniących się retencją. W takim przypadku faza ruchoma odpowiednia do rozdzielania składników o słabej retencji nie eluuje z kolumny składników silnie zatrzymywanych, lub ich elucja następuje po bardzo długim czasie. Duży czas retencji jest niekorzystny, powodując stratę czasu, rozpuszczalników oraz obniżenie granicy detekcji. Natomiast, jeżeli dobierze się fazę ruchomą o odpowiedniej mocy do rozdzielania składników o dużej retencji, to substancje eluowane w początkowym etapie separacji (na początku chromatogramu), nie będą rozdzielone. Ilustruje to rysunek rys 4.1.

Rozwiązaniem tego problemu jest tzw. elucja gradientowa, rozpoczynająca się od fazy ruchomej o słabej mocy i polegająca na systematycznym zwiększaniu siły elucyjnej. Elucję gradientową stosuje się, więc, w celu optymalizacji warunków rozdzielania mieszanin substancji istotnie różniących się właściwościami retencyjnymi w określonym układzie chromatograficznym, tj. wtedy, gdy stosując elucję izokratyczną, uzyskuje się bardzo duże różnice czasu retencji poszczególnych składników rozdzielanej mieszaniny. Wówczas, w początkowej fazie elucji gradientowej, gdy faza ruchoma jest słaba, dostatecznie dużą szybkość migracji osiągną substancje o słabej retencji. Substancje, których oddziaływanie z fazą stacjonarną jest silne, pozostaną w pobliżu wlotu do kolumny tak długo, aż faza ruchoma osiągnie odpowiednią moc. Na chromatogramie pojawiają się, więc, kolejno piki substancji podobnie jak w elucji izokratycznej, jednak szerokości pików są do siebie zbliżone.

Elucja gradientowa polega na dodawaniu składnika B o wyższej sile elucyjnej, do składnika A eluentu o niskiej sile elucyjnej.

Siła elucyjna może wzrastać w sposób skokowy lub ciągły, lecz nie może maleć w trakcie trwania elucji. Krzywe, wg, których może przebiegać zmiana siły elucyjnej fazy ruchomej, przedstawiono na rys 4.2.

W konsekwencji, po zakończeniu rozdzielania, siła elucyjna jest znacznie większa niż w momencie dozowania próbki, dlatego przed następnym dozowaniem należy przeprowadzić regenerację (reaktywację) kolumny, tj. doprowadzić kolumnę do stanu równowagi z rozpuszczalnikiem o początkowym składzie. Można to wykonać przez przemywanie kolumny fazą ruchomą

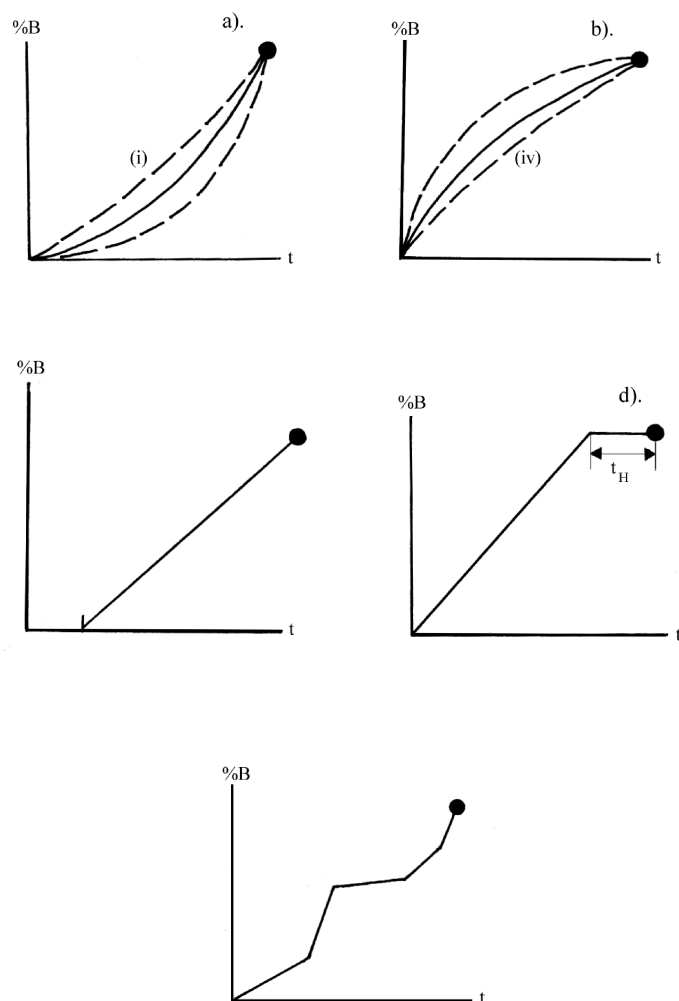


Rys. 4.1. Rozdzielanie estrów dialkylowych kwasu ftalowego w układzie faz odwróconych. (symulacja komputerowa). Faza ruchoma: woda + acetonitryl. W fazie o składzie 50% wody + 50% acetonitrylu składniki mieszaniny są rozdzielone, lecz czas elucji ostatniego piku jest bardzo duży.

o zmniejszającej się sile elucyjnej, albo przez skokowy powrót do początkowego składu fazy ruchomej i przemywanie kolumny tą fazą. Objętość cieczy potrzebna do regeneracji kolumny może stanowić kilka do kilkunastu objętości martwych kolumny i jest ustalana doświadczalnie. Regenerację kolumny uważa się za zakończoną, gdy uzyska się pożądaną wartość k dla substancji testowej o $k = \text{ok. } 5$.

4.1. PARAMETRY PROGRAMU ELUCJI GRADIENTOWEJ

Program elucji gradientowej może być złożony z jednego, albo kilku odcinków o różnych wartościach szybkości przyrostu stężenia w elucje składnika o wyższej sile elucyjnej, a więc o różnej wartości "gradientu" stężenia składnika / składników o wyższej sile elucyjnej. W przy-

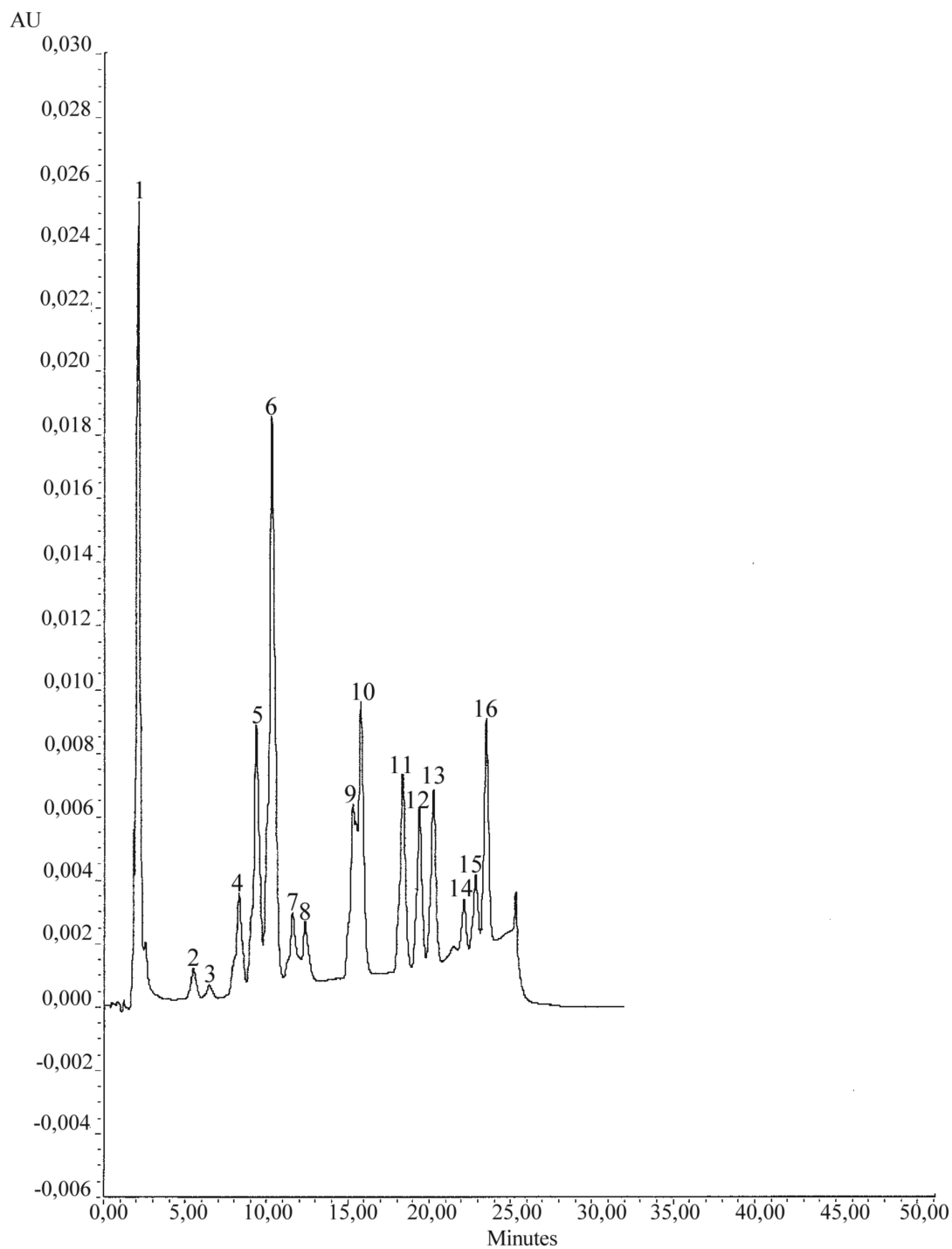


Rys. 4.2. Ilustracja kształtu gradientu, tj. zmiany stężenia rozpuszczalnika B (o większej sile elucyjnej) w dwuskładnikowej fazie ruchomej, w funkcji czasu t:

a) gradient wklęsły, b) gradient wypukły, c) gradient liniowy, rozpoczęty z pewnym opóźnieniem, d) gradient liniowy, zakończony elucją izokratyczną, e) gradient skokowy, ze zmienną w czasie procesną szybkością przyrostu stężenia rozpuszczalnika B.

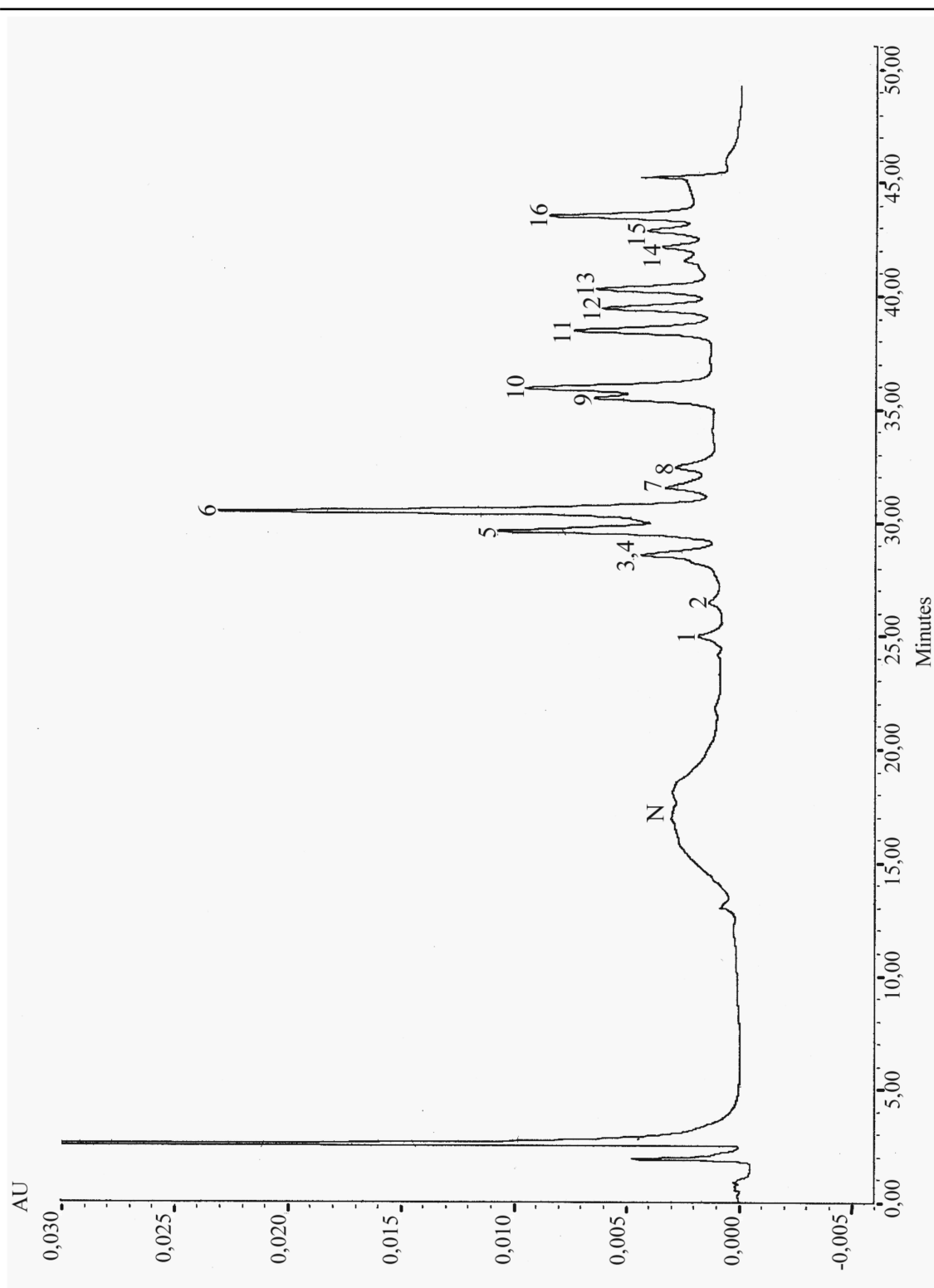
padku dwuskładnikowej fazy ruchomej, warunki rozdzielania w elucji gradientowej określone są przez następujące parametry:

- *początkowy skład fazy ruchomej* (składnik A lub mieszanina A + B o określonym składzie),
- *wartość gradientu*, tj. szybkość, z jaką w fazie ruchomej rośnie stężenie rozpuszczalnika o większej sile elucyjnej,
- *czas trwania odcinka programu o określonym gradiencie*, tj. czas liczony od momentu rozpoczęcia realizacji programu elucji o określonej wartości gradientu do zakończenia tego odcinka programu elucji,
- *końcowy skład fazy ruchomej* (mieszanina składników A i B eluentu, w którym wzrosła zawartość składnika B w stosunku do składu początkowego)
- *kształt funkcji programu elucji* tzw. "kształt gradientu", tj. typ funkcji, wg której realizowany jest program zmian stężenia eluentu,
- właściwości składników A i B eluentu

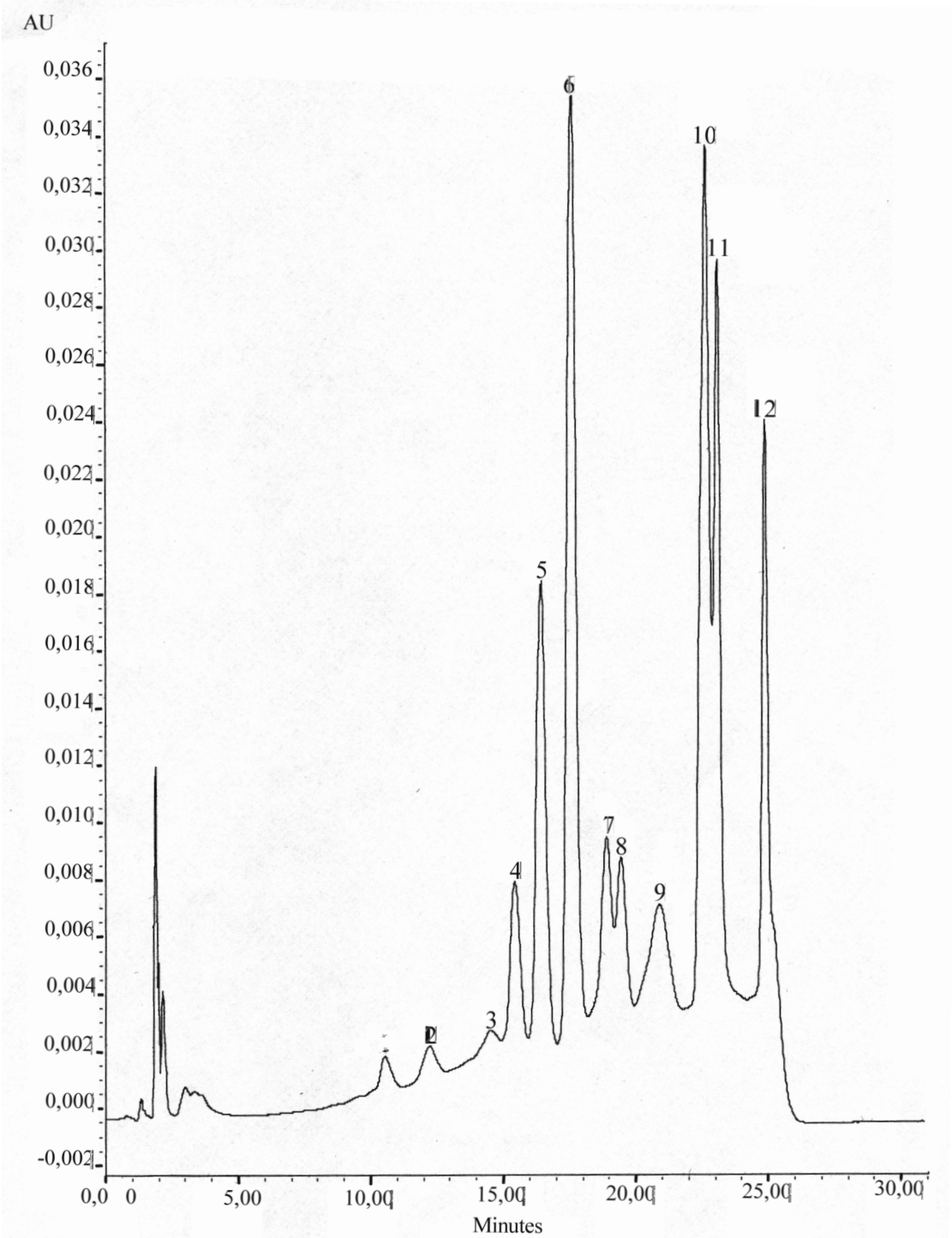


Rys. 4.3. Chromatogram mieszaniny wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Oznaczenie substancji: 1) naftalen, 2) acenaftylen, 3) acenaften, 4) fluoren, 5) fenantren, 6) antracen, 7) fluoranten, 8) piren, 9) benzo[a]antracen, 10) chryzen, 11) benzo[b]fluoranten, 12) benzo[k]fluoranten, 13) benzo[a]piren, 14) dibenzo[a,h]antracen, 15) benzo[ghi]perylene, 16) indeno[1,2,3-cd]piren.

Kolumna RP 18, o wymiarach 4,6 mm x 15 cm, faza ruchoma: woda + acetonitryl. Elucja gradientowa od składu 50/50 v/v do 100% acetonitrylu, w czasie 20 min (2,5 % / min).



Rys. 4.4. Chromatogram mieszaniny wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Elucja gradientowa od składu 95% wody i 5% acetonitrylu do 100% acetonitrylu, w czasie 40 min (2,4 % / min). Pozostałe oznaczenia i warunki jak na rysunku 4.3.



Rys. 4.5. Chromatogram mieszaniny wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Faza ruchoma: woda + metanol. Elucja gradientowa od składu 50/50 do 100% acetonitrylu, w czasie 20 min (2,5 % / min). Pozostałe oznaczenia i warunki jak na rysunku 4.3.

Składnik A: jakakolwiek ciecz o słabej sile elucyjnej, mieszająca się z cieczą B (np. woda, albo woda : acetonitryl 9:1 - w układzie faz odwróconych, heksan, lub heptan - w układzie faz normalnych)

Składnik B: - ciecz o dużej sile elucyjnej (np. acetonitryl, lub metanol w układzie faz odwróconych (RP), albo izopropanol w układzie faz normalnych (NP).

Stosowane są również eluenty wieloskładnikowe, np trójskładnikowe, z których dwa składniki mają dużą siłę elucyjną. W takim przypadku, mieszanina dwóch cieczy o stałym składzie (A + B) bywa uważana jako składnik "A" eluentu, w którym w trakcie programu elucji rośnie stężenie składnika C. (Stosowane jest też programowanie zmian składu trzech, a nawet większej liczby cieczy równocześnie.)

Siła elucyjna rozpuszczalnika B (lub C) powinna być tak duża, aby wszystkie składniki próbki opuściły kolumnę w czasie trwania programu elucji zwiększonym o czas martwy, tj. w czasie $t_g + t_m$.

t_g - czas realizacji programu elucji przez urządzenie,

t_m - czas martwy

Na rys. 4.3 przedstawiono przykład rozdzielania mieszaniny wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych z zastosowaniem elucji gradientowej. W przykładzie tym rozpuszczalnikiem A jest woda, rozpuszczalnikiem B jest acetonitryl. W trakcie elucji w fazie ruchomej zmienia się stężenie acetonitrylu w wodzie od 50 % v/v acetonitrylu (skład początkowy) do 100 % acetonitrylu (skład końcowy). Czas programu elucji wynosi 20 minut, więc gradient wynosi 50 %/ 20 min, czyli 2,5 %/min. Jest to gradient liniowy (wzrost stężenia rozpuszczalnika silniejszego w jednostce czasu ma stałą wartość).

4.2. WPŁYW PARAMETRÓW PROGRAMU ELUCJI NA WYNIKI ROZDZIELANIA

a) Początkowy skład fazy ruchomej.

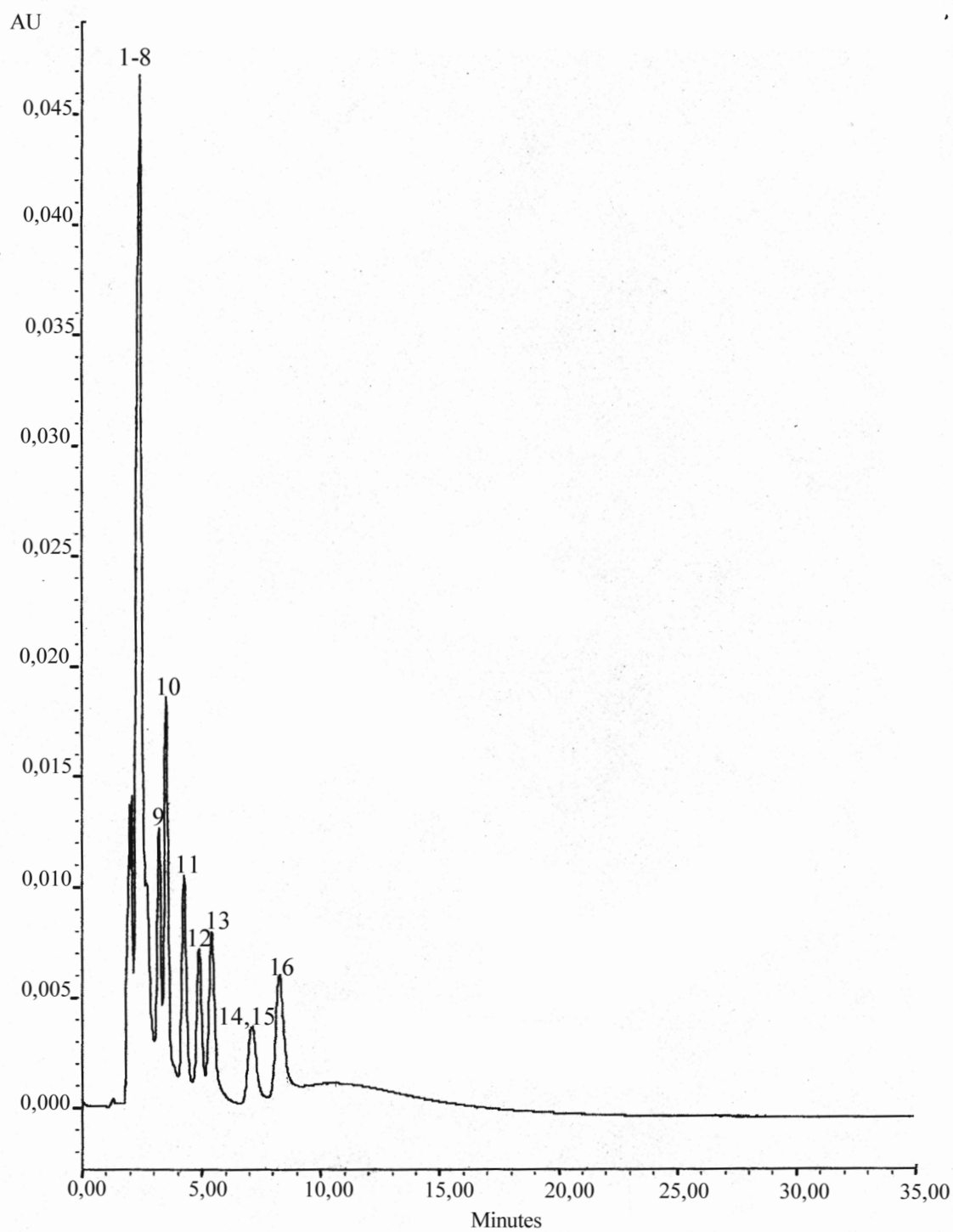
Początkowy skład fazy ruchomej, określający początkową moc fazy ruchomej, powinien zapewnić dostateczne rozdzielanie składników o słabej retencji, nie powodując jednak zbędnej straty czasu i rozpuszczalników, co miałyby miejsce, gdyby pierwszy pik był znacznie oddalony od początku chromatogramu. Taki przypadek mógłby wystąpić, gdyby rozpoczęto elucję od zbyt słabego eluentu (rys. 4.4).

Odrotnie, gdyby w elucji gradientowej rozpoczętej od możliwie najslabszej fazy ruchomej nie uzyskano rozdzielania słabo adsorbujących się składników, wówczas dobre rezultaty może przynieść rozdzielanie przez pewien czas w fazie o stałym początkowym składzie i rozpoczęcie przyrostu stężenia silniejszego składnika eluentu z pewnym opóźnieniem. Należy pamiętać, że w układzie faz odwróconych z typowymi kolumnami C8 i C18, nie powinno się stosować faz ruchomych o mniejszej niż 5 % zawartości rozpuszczalnika organicznego w wodzie.

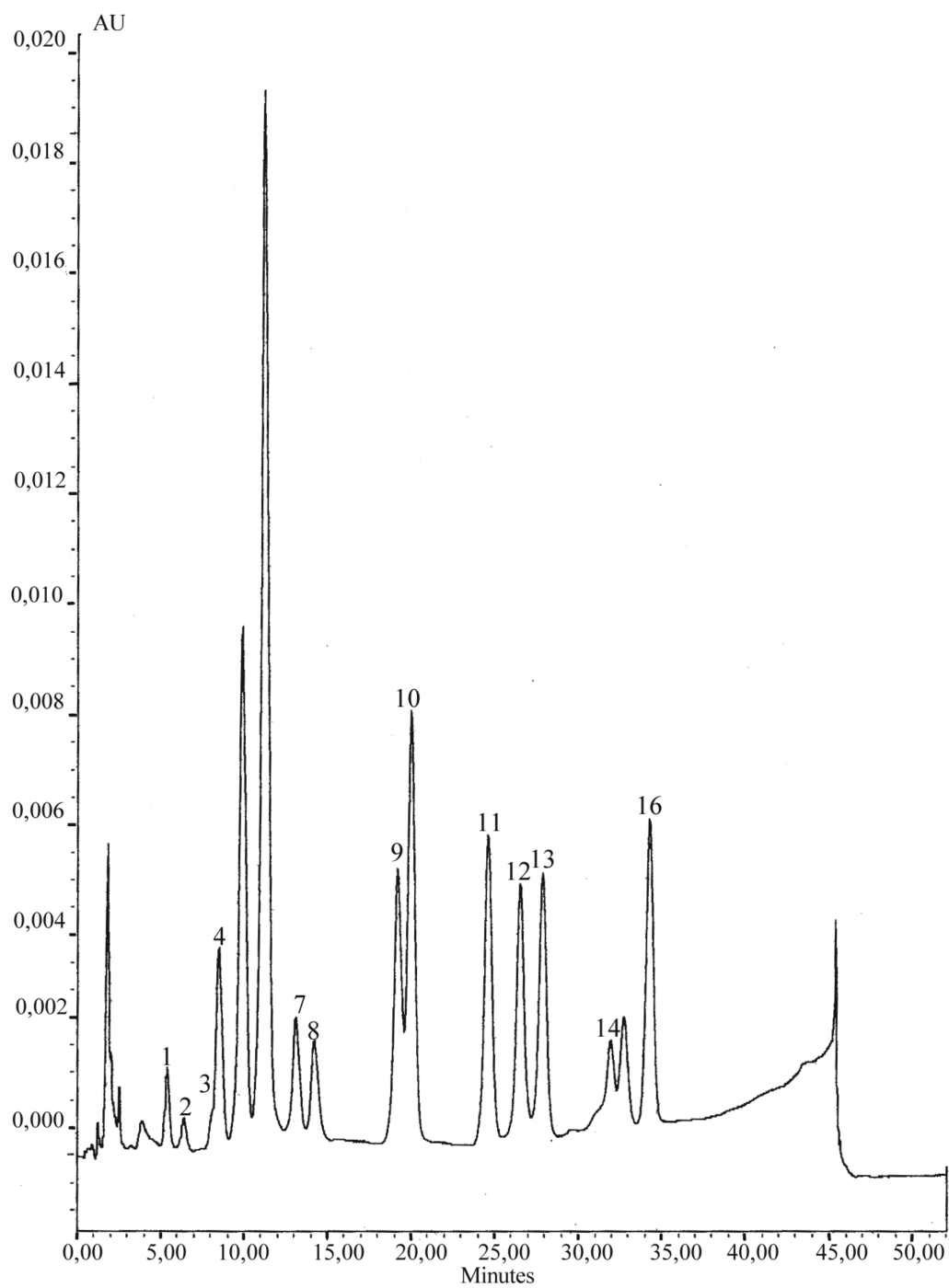
Początkowy skład fazy ruchomej nie ma wpływu na rozdzielanie substancji o silnej retencji.

b) Końcowy skład fazy ruchomej.

Elucję gradientową powinno prowadzić się do takiego składu fazy ruchomej i do takiej siły elucyjnej końcowego eluentu, aby zapewnić wymycie wszystkich składników mieszaniny w cza-



Rys. 4.6. Chromatogram mieszaniny wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Kolumna jak na rys. 4.3, faza ruchoma: metanol. (Elucja izokratyczna). Oznaczenia substancji jak na rysunku 4.3.



Rys. 4.7. Chromatogram mieszaniny wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.
Elucja gradientowa od składu 50/50 v/v do 100% acetonitrylu, w czasie 40 min (1,25 % / min).
Pozostałe oznaczenia i warunki jak na rysunku 4.3.

się trwania programu elucji. Przykład źle zaprojektowanego programu elucji przedstawiono na rys. 4.5.

Metanol jest zbyt słabym eluentem i w czasie trwania programu elucji kilka substancji nie zostało wymytych z kolumny. Rys. 4.6 przedstawia chromatogram tej samej mieszaniny rozdzielanej w warunkach izokratycznych w 100 % metanolu. Ostatni składnik rozdzielanej mieszaniny pojawia się dopiero po około 9 minutach.

Możliwe jest przedłużanie czasu trwania elucji z zastosowaniem fazy ruchomej o stałym, końcowym składzie, lecz jest to niekorzystne, ponieważ przedłuża się czas rozdzielania a piki substancji eluowane w czasie przekraczającym czas programu elucji są tym bardziej rozmyte, im czas ten jest dłuższy. Nie należy też niepotrzebnie przedłużać elucji ani prowadzić ją do zbyt wysokiego stężenia składnika eluentu o wyższej sile elucyjnej. Na przykład, jeżeli wszystkie składniki rozdzielanej mieszaniny opuściły kolumnę do czasu, gdy eluent osiągnął 80 % składnika B, to prowadzenie elucji do 100 % B, jest nieuzasadnione. Kończąc elucję przy 80 % oszczędza się czas i ciecz. Ponadto, zużycie cieczy, potrzebnej na doprowadzenie kolumny do stanu "wyjściowego" jest tym mniejsze, im mniejsza jest różnica między stężeniem początkowym i końcowym.

c) Szybkość zmian składu eluentu ("wartość gradientu").

Jest to ważny parametr, od którego w dużym stopniu zależy efektywność rozdzielania. Od wartości gradientu zależy, przede wszystkim, szerokość pików, odległość między pikami oraz czas rozdzielania. Ze wzrostem tego parametru maleją wszystkie wymienione wielkości. Ze względu na zwięźanie się pików ze wzrostem gradientu rośnie ich wysokość i tym samym polepszają się warunki detekcji. Zbyt duży gradient może jednak doprowadzić do utraty rozdzielczości, do nakładania się pików włącznie.

Wartość gradientu wpływa również na selektywność rozdzielania. Podobnie jak w elucji izokratycznej, również w elucji gradientowej wzrost retencji poprawia współczynnik rozdzielania. Na rys. 4.7 przedstawiono chromatogram mieszaniny analitów z grupy WWA otrzymany przy dwa razy wolniejszym przyroście stężenia acetonitrylu niż na rys. 4.3. Uzyskano nieco lepsze rozdzielanie składników, (5 i 6, 7 i 8 oraz 9 i 10), lecz czas rozdzielania wzrósł około 40%.

Zależność parametru retencji k od stężenia silnego rozpuszczalnika w fazie ruchomej jest funkcją malejącą, a kształt tej zależności wynika z typu chromatografii. W układzie faz odwróconych zależność ta ma postać: $\log k = \log k_0 - nc$, a w układzie normalnym: $\log k = \log k_0 - n \log c$. (Znaczenie parametrów podano w poprzednich rozdziałach). Współczynniki n w obydwu wyrażeniach zależą od rodzaju substancji i im większe różnice w tych współczynnikach tym większe różnice w selektywności po zmianie wartości gradientu.

Wartość gradientu wyrażona jako % zmiany stężenia B w jednostce czasu jest niewygodna w przypadku wprowadzenia jakichkolwiek zmian w prędkości przepływu lub wielkości kolumny. Wielkością, która decyduje o szybkości elucji substancji jest % zmiany stężenia B na jednostkę objętości fazy ruchomej. Te dwie wielkości są sobie równoważne w tej samej kolumnie i przy tej samej prędkości przepływu fazy ruchomej. W praktyce bezpieczniejsze jest stosować poprawioną wartość gradientu wyrażoną jako:

$$G_s = \frac{V_m(\Delta\%B)}{Ft_G} \quad (1)$$

gdzie: G_s - poprawiona wartość gradientu
 V_m - martwa objętość kolumny [ml]
 $\Delta\%B$ - % zmiany stężenia B/min

F	- natężenie przepływu [ml/min]
t_G	- czas trwania gradientu

Aby zachować stałość warunków rozdzielania, należy zachować stałość parametru G_s . Zwiększając na przykład dwukrotnie natężenie przepływu należy dwukrotnie zmniejszyć czas trwania gradientu. Zwiększając długość kolumny (wzrost V_m) należy proporcjonalnie zwiększyć natężenie przepływu lub czas trwania gradientu.

d) Kształt gradientu

Przeważnie dostatecznie dobre rozdzielanie uzyskuje się stosując gradient liniowy. Ten typ gradientu jest zalecany szczególnie w układzie faz odwróconych ze względu na liniowy charakter zmian logarytmu parametru retencji ze zmianą stężenia rozpuszczalnika bardziej aktywnego (rozpuszczalnika B). W przypadku rozdzielania związków wielkocząsteczkowych (oligomery), dla których wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej i retencji maleje selektywność, lepszą efektywność rozdzielania osiąga się stosując gradient wypukły, czyli zmniejszając wartość gradientu w miarę trwania elucji. Zmiana kształtu gradientu uzasadniona jest także wtedy, gdy na chromatogramie pojawiają się grupy pików źle rozdzielonych lub obszary o pustych przestrzeniach między pikami.

W pierwszym etapie opracowania metody gradient liniowy jest najbardziej odpowiedni.

e) Skład fazy ruchomej

Dobór składu fazy ruchomej podlega takim samym prawom jak w elucji izokratycznej. Jeżeli nie uzyskuje się rozdzielania w mieszaninie A + B, i zmiana parametrów, a w szczególności zmiana wartości gradientu nie daje pozytywnych rezultatów, należy zmienić w mieszaninie rozpuszczalnik bardziej aktywny (rozpuszczalnik C zamiast B). Jeżeli okaże się, że w różnych grupach pików selektywność jest inna dla każdego z rozpuszczalników, dobre efekty może dać mieszanina A + B + C.

4.3. ODTWARZALNOŚĆ WYNIKÓW ROZDZIELANIA

Odtwarzalność wyników zależy przede wszystkim od :

- jakości urządzenia wytwarzającego gradient stężenia
- doprowadzenia kolumny do stanu początkowego
- regeneracji kolumny (przemywanie kolumny rozpuszczalnikiem o dużej sile elucyjnej)

Doprowadzenie kolumny do stanu równowagi z fazą ruchomą o początkowym składzie jest szczególnie ważne w rozdzielaniu pików eluowanych w pierwszej kolejności. Niedostateczne przemycie kolumny spowoduje gorsze rozdzielanie i mniejsze czasy retencji tej grupy pików. Rozdzielanie złożonych mieszanin może powodować problemy innego rodzaju. Jeżeli program gradientu ustalony jest tak, że niektóre składniki nie opuszczają kolumny, wówczas składniki te gromadzą się na kolumnie zanieczyszczając jej powierzchnię. Jest to niezamierzona modyfikacja powierzchni wypełnienia, która może prowadzić do zmiany selektywności kolumny. W takim przypadku należałoby po zakończeniu procesu przemywać kolumnę silnym rozpuszczalnikiem w celu usunięcia z niej wszystkich substancji.

Innego rodzaju problemy stwarza obecność w fazie ruchomej zanieczyszczeń, które wprawdzie nie mają wpływu na parametry kolumny, lecz są wykrywane przez detektor i powodują znaczne podniesienie linii podstawowej. Interpretacja takiego chromatogramu może prowadzić do błędnych wyników.

4.4. OPTIMALIZACJA PROGRAMU ELUCJI

Do opracowania warunków rozdzielania istnieją programy komputerowe. Bazują one na wykorzystaniu otrzymanych teoretycznie i korygowanych empirycznie zależności

$$k = f(\text{udziału objętościowego składników B, C, ... w eluencie})$$

oraz na poszukiwaniu takiego przebiegu programu elucji, albo takiego składu eluentu w warunkach elucji izokratycznej, aby zapewnić na poziomie od ok. 0.9 do 1.2, wartości R_s między wszystkimi parami pików substancji, które powinny zostać rozdzielone, i o których program optymalizacyjny został w odpowiedni sposób "poinformowany" albo poprzez wprowadzenie nazwy substancji, albo jej wzoru strukturalnego, albo, gdy te dane są nieznane - czasów retencji (położenia pików) na wszystkich chromatogramach "próbnych", wykonanych w zaprogramowanych warunkach. Uwzględniane składniki B, C, ... eluentu, to w warunkach układu faz odwróconych (RP): metanol (MeOH), acetonitryl (ACN), dioksan (Dx), kwas trófluorooctowy (TFA), trietanoloamina (TEA), substancje tworzące pary jonowe typu tetraalkiloamonioowe (np. chlorek tetrabutylamonioowy - TBA), kwas alkilosulfonowy (np. kwas oktylosulfonowy - OSA).

Optymalne warunkach rozdzielania substancji w układach jonowymiennych programy te także "potrafią" często "podpowiedzieć". Natomiast, tego typu programy optymalizacyjne prawie z reguły nie uwzględniają optymalizacji programu elucji w warunkach układów faz normalnych. Niektóre umożliwiają otrzymanie dla tych warunków optymalnego składu eluentu dla warunków izokratycznych (dla stałego składu eluentu).

Ograniczenia optymalizacji, to najniższe i najwyższe dopuszczalne pH eluentu, maksymalna dopuszczalna wartość ciśnienia pracy kolumny, maksymalny dopuszczalny czas rozdzielania (analizy).

Programy te są kosztowne. Ich skuteczne stosowanie wymaga też znajomości struktury chemicznej, albo, co najmniej poprawnej identyfikacji na chromatogramach, wykonanych przez program optymalizacyjny - tych wszystkich rozdzielanych substancji (oznaczanych i zanieczyszczeń), których piki mogą "nakładać" się nawzajem na siebie. Informacje tego typu są często bardzo trudne, a czasem niemożliwe do uzyskania, gdy liczba zanieczyszczeń jest duża i gdy jednocześnie nie znamy struktury chemicznej zanieczyszczeń trudnych do rozdzielania od interesujących nas oznaczanych substancji. Problem jest już zupełnie nierozwiązalny, gdy substancje zanieczyszczeń są nieznane i widma UV-VIS zanieczyszczeń są bardzo podobne do siebie oraz zbliżone do widm oznaczanych substancji.

W konsekwencji, do chwili obecnej, większość analityków stosuje metodę prób i błędów przy opracowywaniu optymalnego programu elucji. Należy, jednak przyznać, że dla wstępnego określenia zbliżonego do optymalnego programu elucji i określenia najlepszych kierunków poszukiwań optymalnego programu elucji, programy tego typu są bardzo przydatne.

Rozpoczynając opracowanie metody rozdzielania mieszaniny związków niskocząsteczkowych wybiera się kolumnę typu C8 lub C18 o średnicy 0,46 cm i długości 15 cm. W pierwszej kolejności przeprowadza się elucję gradientową w dużym zakresie stężeń rozpuszczalnika B (przeważnie od 5 % do 100 %) i z małą szybkością przyrostu stężenia, np. $1 \div 2 \text{ \% / min}$. Celowe jest wykonanie co najmniej trzech prób, z zastosowaniem kolejno w postaci eluentu B: MeOH, ACN, THF. Na podstawie tych chromatogramów, należy "dopasować" skład początkowy i końcowy oraz rozważyć możliwość zwiększenia wartości gradientu. Jeżeli na chromatogramie pojawiają się pary pików źle rozdzielonych mimo zmian wartości gradientu, należy zmienić rodzaj rozpuszczalnika silniejszego tak, jak w elucji izokratycznej. Należy pamiętać, że zmiana temperatury kolumny wpływa na jej selektywność. Jeżeli podnosi się temperaturę kolumny np. z $25 \text{ }^\circ\text{C}$ na $40 \text{ }^\circ\text{C}$, należy obniżyć wartość gradientu (czyli wydłużyć czas trwania programu elucji) np. 2 razy i ponownie dopasować warunki na podstawie chromatogramu.

Pierwszy chromatogram, uzyskany w gradiencie o dużym zakresie stężeń może być pomocny w wyborze typu elucji. Jeżeli różnica czasu retencji pomiędzy pierwszym i ostatnim

pikiem stanowi nie więcej niż 40% czasu gradientu, wówczas prawdopodobnie elucja izokratyczna będzie odpowiednia do rozdzielenia tej mieszaniny.

Tabela 4.1. Parametry ustalane i wielkości na które wpływają

Parametr (ustalany przez analityka)	Wpływa na :
Początkowa moc fazy ruchomej	- Czas analizy - Rozdzielczość składników o małych czasach retencji
Wartość gradientu	- Objętość retencji - Szerokość pasm - Rozdzielczość
Kształt gradientu	- Szerokość pasm - Rozdzielczość - Preferowany kształt gradientu : w normalnym układzie faz - wklęsły w fazach odwróconych - prostoliniowy

Zależność pomiędzy parametrem retencji k a czasem elucji można przedstawić następującym równaniem:

$$\log k_i = \log k_0 - b(t/t_m) \quad (3)$$

Jeżeli prowadzona jest elucja od rozpuszczalnika A (100% A, 0%B) do rozpuszczalnika B (0% A, 100% B) w czasie t_G , wówczas po przekształceniu równania 3 wyrażenie na parametr b przyjmuje postać:

$$b = (t/t_m) \log(k_A/k_B) \quad (4)$$

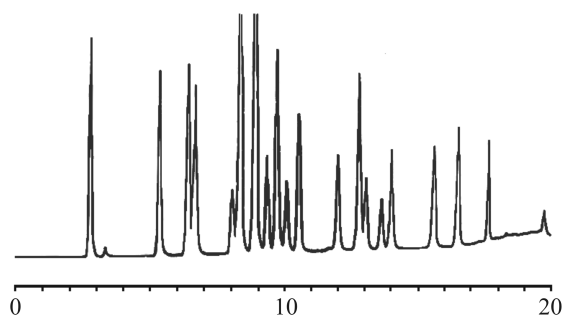
ponieważ $t_m = V_m/F$, więc:

$$b = \frac{V_m}{(F \cdot t_G)} \log\left(\frac{k_A}{k_B}\right) \quad (4)$$

Oznaczenia: k_i - wartość k substancji w fazie ruchomej o składzie wytworzonym przez urządzenie gradientowe w czasie t
 k_0 - wartość k substancji w fazie ruchomej o początkowym składzie
 b - stała określająca szybkość gradientu, zależna również od rodzaju substancji i układu faz
 V_m - martwa objętość retencji
 t_m - martwy czas retencji
 t_G - czas trwania gradientu

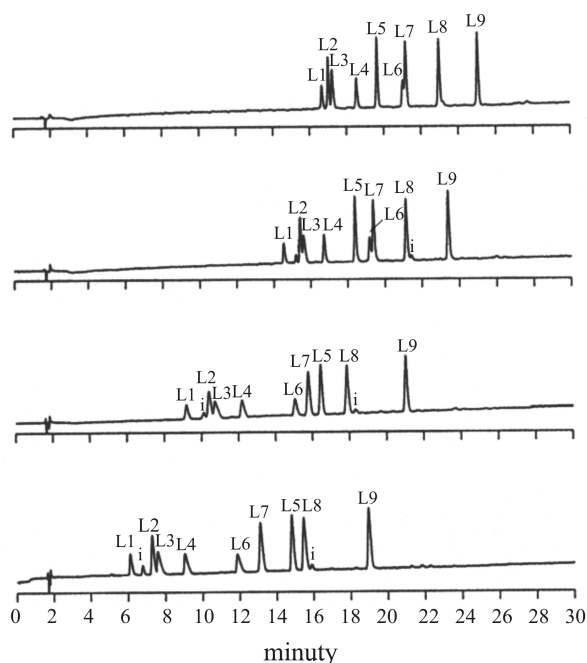
Jak wynika z równania 3, **zmiana natężenia przepływu powoduje zmianę wartości gradientu elucji**. Jeżeli gradient zaplanowany jest na określony czas, a ostatnia substancja jest eluowana z kolumny szybciej, następny bieg należy zaprogramować w krótszym czasie, lecz pozostawić nie zmieniony początkowy skład fazy ruchomej i wartość gradientu, np., jeżeli parametry pierwszego biegu były następujące: gradient metanolu w wodzie od 40% do 100% w czasie 30 min (2%/min), a czas retencji ostatniej substancji wynosił 20 min, następny bieg można skrócić o 10 min ustawiając gradient od 40% do 80% w czasie 20 min (wartość gradientu nadal wynosi 2% / min).

4.5. PRZYKŁADY CHROMATOGRAMÓW ROZDZIELANIA SUBSTANCJI Z WYKORZYSTANIEM ELUCJI GRADIENTOWEJ



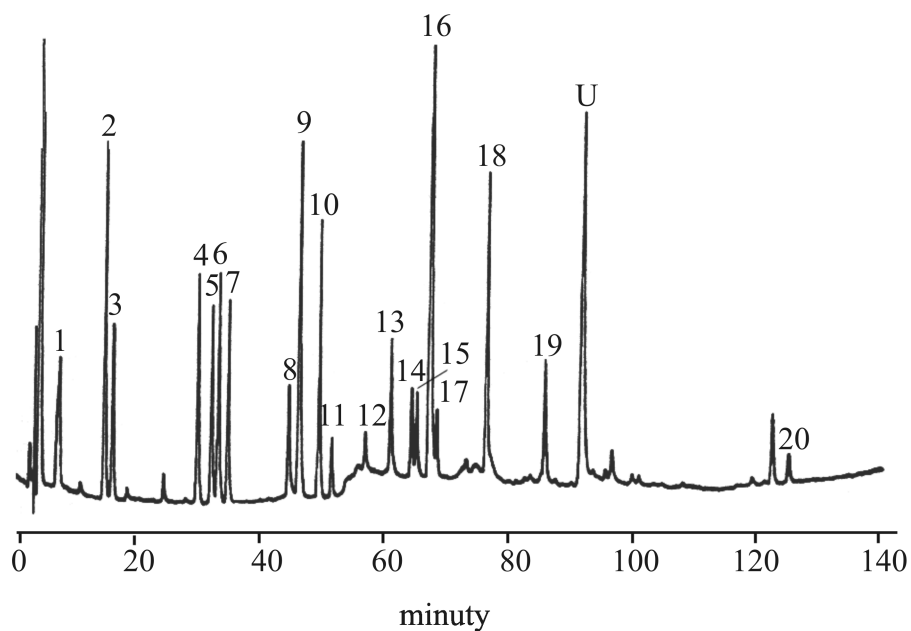
Rys 4.8. Chromatogram mieszaniny wzorców polichlorofenoli. Kolejność elucji: fenol, o-chlorofenol, p.-chlorofenol, m.-chlorofenol, 2,6-dichlorofenol, 4-chloro-2-nitrofenol, 1-chloro-3-nitrobenzen, 2,3-dichlorofenol, 2,5-dichlorofenol, 2,4-dichlorofenol, 3,4-dichlorofenol, 3,5-dichlorofenol, 2,4,6-trichlorofenol, 2,3,5-trichlorofenol, 2,3,5,6-tetrachlorofenol, 2,3,4,5-tetrachlorofenol, pentachlorofenol.

Warunki rozdzielania: kolumna ODS, 100 x 4,6 mm, 5 μ m., faza ruchoma: A- 0,005 M. KH₂PO₄, pH 2,5, B- metanol, elucja gradientowa: 20 - 60% B w ciągu 15 min, 60 - 90% B w ciągu 3 min, Natężenie przepływu 1,5 ml/min. Detekcja: UV 260 nm.



Rys 4.9.

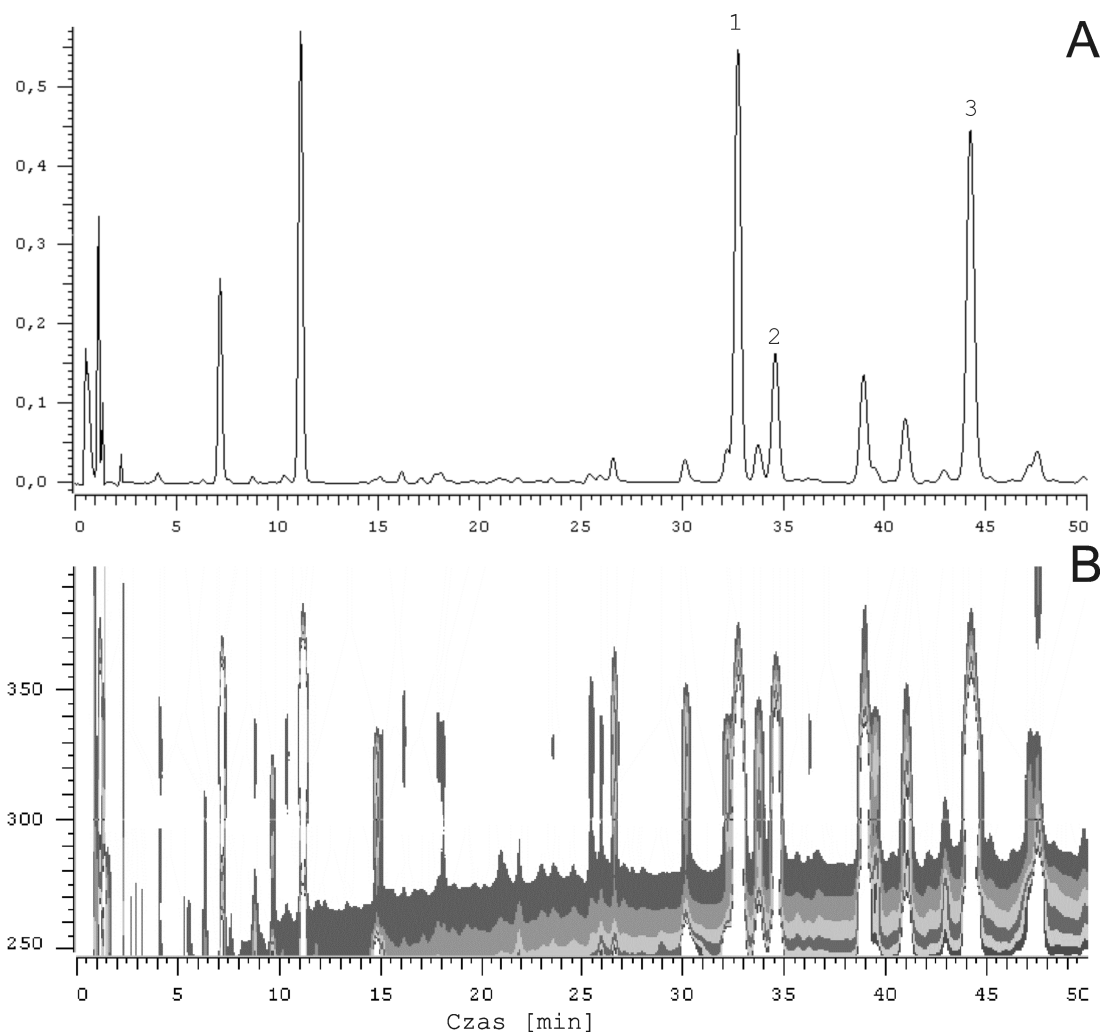
Zmiany w selektywności rozdzielania peptydów wynikające z zastosowania kolumn typu StableBond o różnym charakterze powierzchni: a) ZORBAX 300SB-C18, b) ZORBAX 300SB-C8, c) ZORBAX 300SB-C3, d) ZORBAX 300SB-CN i wymiarach: 150 x 4,6 mm, 5 μ m. Faza ruchoma: A - 0,1% TFA w wodzie, B - 0,1% TFA w acetonitrylu. Elucja gradientowa: 0 - 36% B w ciągu 30 min (gradient liniowy), temperatura: 40 °C. Natężenie przepływu: 1 ml/min. Detekcja: 210 nm UV. Warunki elucji takie same w każdej kolumnie. Analizowane substancje: L1 = LeuGlyLeu, L2 = LeuHisLeu, L3 = LeuArgLeu, L4 = LeuLeuLeu-amid, L5 = LeuLeuValTyr, L6 = LeuLeuLeu, L7 = LeuLeuPhe-amid, L8 = LeuLeuPhe, L9 = LeuLeuValPhe. (*Agilent Technologies*)



Rys 4.10.

Rozdzielanie mieszaniny pestycydów i herbicydów.

Kolumna: SUPELCOSIL LC-ABZ, 250 x 4,6 mm, 5 m. Faza ruchoma: elucja gradientowa od 10% do 90% acetonitrylu w wodzie, 0,5%/min. Natężenie przepływu: 1ml/min. Temperatura: 40°C. Detekcja: UV 225nm. Objętość próbki: 50µl. Analizowane substancje: 1 = kofeina, 2 = metamidron, 3 = fenuron, 4 = metoksuron, 5 = symazyna, 6 = bromacil, 7 = cyjanazyna, 8 = atrazyna, 9 = karbaryl, 10 = izoprotruron, 11 = profam, 12 = propazyna, 13 = terbutylazyna, 14 = linuron, 15 = propanil, 16 = prometryna, 17 = fenamifos, 18 = fenitroton, 19 = paration, 20 = prometryna, U = nieznaną. (SUPELCO)



Rys 4.11.

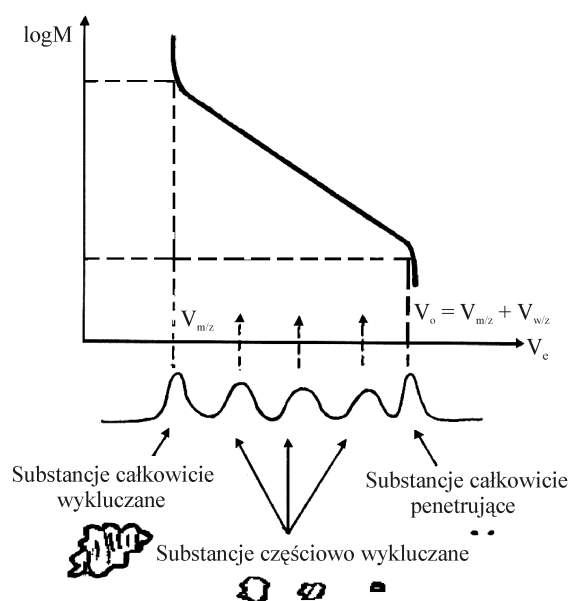
Oznaczanie pochodnych kumaryny w ekstrakcie chloroformowym z zawiesiny komórkowej *Ruta graveolens*. A - chromatogram zarejestrowany przy długości fali 300 nm. B - chromatogram typu UV-DAD, zarejestrowany w zakresie długości fali do 245 do 400 nm. 1 - ksantotoksyna, 2 - psoralen, 3 - bergapten. Kolumna: Lichrospher RP-18e 5 μ m (250 x 4.0mm). Składniki fazy ruchomej: A - woda, B - THF, C - metanol. Program elucji: 5-13%B w 20 min, 13-22%B i 5-7%C od 20 do 52 min, w końcu izokratycznie tylko 65%B przez 7 min. Temperatura: 30°C. Natężenie przepływu fazy ruchomej: 1.5 ml/min. Objętość próbki dozowanej: 20 μ l. Detekcja: UV-DAD w zakresie długości fali 245-400 nm.

5. CHROMATOGRAFIA ŻEŁOWA W UKŁADACH LIOFILOWYCH I HYDROFILOWYCH

Marian Kamiński

5.1. MECHANIZM ROZDZIELANIA SUBSTANCJI W CHROMATOGRAFII ŻEŁOWEJ I METODYKA KALIBRACJI W CELU OZNACZANIA MASY CZĄSTECZKOWEJ

Wypełnienie każdej kolumny chromatograficznej składa się z porowatych wewnątrznie ziaren, tworzących pory międzyziarnowe, przez które płynie ciecz oraz z ogromnej ilości otwartych mikroporów wewnątrz ziaren wypełnienia. W przypadku, natomiast, tzw. kolumn monolitycznych, wypełnienie posiada mezopory o dużych rozmiarach w miejsce porów międzyziarnowych w kolumnach wypełnionych i mikropory wewnątrz "litego szkieletu". W przestrzeni mikroporów ciecz praktycznie nie płynie. Pory wewnątrz ziaren wypełnienia kolumny, albo mikropory w kolumnach monolitycznych, zawsze mają w pewnym stopniu zróżnicowane średnice, a więc charakteryzują się określonym rozkładem wartości promieni hydrodynamicznych. W kolumnach do chromatografii żelowej wartość przeciętna i charakter rozkładu średnic porów są tak dobrane, aby ich rozmiary były dostosowane do wielkości średnic hydrodynamicznych rozdzielanych cząsteczek.



Rys. 5.1. Ilustracja zależności logarytmu masy cząsteczkowej od objętości elucji ($\log M_w = f(V_e)$), otrzymywanej podczas kalibracji metody oznaczania rozkładu masy cząsteczkowej z zastosowaniem chromatografii żelowej.

W warunkach chromatografii żelowej (*GPC - Gel Permeation Chromatography*, albo *SEC - Size Exclusion Chromatography*) dąży się, o ile to tylko możliwe, do całkowitego wyeliminowania oddziaływań sorpcyjnych między powierzchnią wypełnienia kolumny i cząsteczkami rozdzielanych substancji. Wówczas mechanizm rozdzielania jest termodynamicznie prosty. Wykorzystuje się zróżnicowanie drogi i czasu dyfuzji cząsteczek o zróżnicowanej wielkości i masie cząsteczkowej, w przestrzeni porów wewnątrz ziaren wypełnienia kolumny, albo w mikroporach kolumny monolitycznej. W konsekwencji uzyskuje się określoną zależność funkcyjną między wartością logarytmu masy molekularnej rozdzielanych cząsteczek i objętością ich elucji z kolumny. Ilustruje to rys. 1 oraz zależności funkcyjne zamieszczone dalej.

Objętość elucji (V_e) jest funkcją objętości porów międzyziarnowych, albo mezoporów w kolumnie monolitycznej ($V_{m/z}$), objętości martwej kolumny (V_0) i wartości stałej podziału (K_d), opisaną zależnością (1).

$$V_e = V_{m/z} + K_d (V_0 - V_{m/z}) \quad (1)$$

W idealnej kolumnie żelowej w zakresie objętości elucji (V_e) pomiędzy ($V_{m/z}$) i V_0 , pochodna (S), zwana "pojemnością rozdzielczą kolumny żelowej" i zdefiniowana za pomocą zależności (2):

$$S = \frac{dV_e}{d \ln M_w} \quad (2)$$

jest wartością stałą. W rzeczywistości, jednak, jest to funkcja nieliniowa i zależność K_d od masy cząsteczkowej może być opisana za pomocą zależności (3):

$$K_d \cong k \left[1 - \frac{k_1 \cdot M_w^{1/2}}{r_p} \right]^3 \quad (3)$$

gdzie: M_w jest masą cząsteczkową substancji eluowanej, r_p średnią wartością promienia hydrodynamicznego porów wewnątrzziarnowych, a k i k_1 to stałe dla wypełnienia konkretnej kolumny.

W przypadku każdej kolumny chromatograficznej (nie tylko do chromatografii żelowej) można też napisać zależności (4) do (8), opisujące pojęcie porowatości międzyziarnowej (4), wewnątrzziarnowej (5) i całkowitej (6) wypełnienia kolumny chromatograficznej oraz odpowiednio: objętości całkowitej wypełnienia (7) i objętości martwej (V_0), w powiązaniu z objętością wewnątrzziarnową (V_i), porowatością wewnątrzziarnową (ε_i) i objętością całkowitą wypełnienia kolumny (V_t):

$$\varepsilon_{m/z} = \frac{V_{m/z}}{V_t} \quad (4)$$

$$\varepsilon_i = \frac{V_{w/z}}{V_0 - V_{m/z}} \quad (5)$$

$$(6)$$

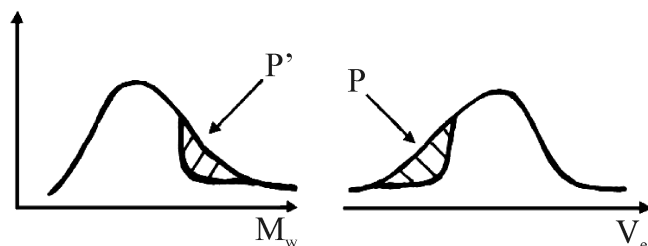
$$\varepsilon_0 = \frac{V_0}{V_t}$$

$$V_t = \Pi \cdot d_c^2 \cdot L_c / 4 \quad (7)$$

$$V_0 = V_{m/z} + (V_t - V_{m/z}) \cdot \varepsilon_i \quad (8)$$

Składniki próbki o największych wymiarach cząsteczek lub cząstek, a więc o największej masie cząsteczkowej, albo penetrują najmniejszą część porów, tzn. tylko pory o największych średnicach, do których są w stanie wnikać, albo płyną między ziarnami (w przestrzeni makro i mezoporów). Tym samym względnie szybko opuszczają kolumnę (pomimo najniższej wartości współczynnika dyfuzji - co jest okolicznością niekorzystną). Natomiast, cząsteczki o najmniejszych wymiarach, a więc o najmniejszej masie cząsteczkowej i o największej wartości współczynnika dyfuzji, penetrują wszystkie pory, stąd ich retencja jest największa. Substancje o pośrednich rozmiarach, a więc o pośrednich masach cząsteczkowych i pośrednich wartościach współczynnika dyfuzji, wnikają do tych porów, które są dostatecznie dużych rozmiarów, stąd ich retencja jest pośrednia.

Najczęściej otrzymujemy dość "ubogi" chromatogram naszkicowany na rys 5.2 po prawej stronie, w którym powierzchnia (P) pierwszego piku, albo początkowy fragment piku, odwzorowuje zawartość (P') największych cząsteczek w badanej próbce, a odpowiednia objętość elucji jest proporcjonalna do logarytmu masy cząsteczkowej składników próbki o najwyższej masie molekularnej. Kolejne piki, albo fragmenty piku na rys. 5.2. odpowiadają substancjom o coraz mniejszych rozmiarach cząsteczek (cząstek), a więc o coraz mniejszej masie cząsteczkowej.



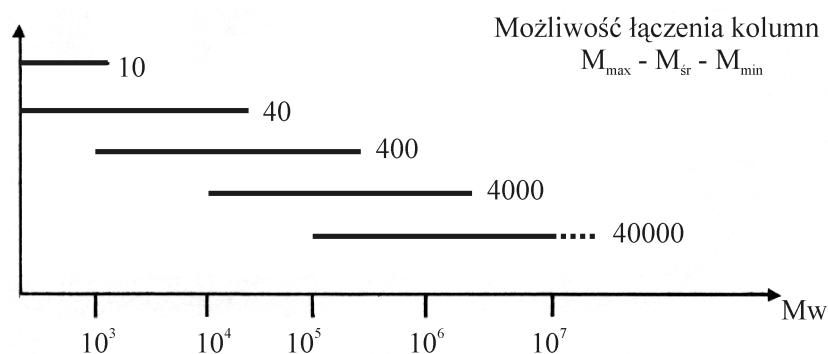
Rys. 5.2. Szcik ilustrujący związek rozkładu masy cząsteczkowej substancji (np. polimerów) rozdzielanych w warunkach chromatografii żelowej (po lewej stronie) z przebiegiem chromatogramu (po prawej stronie).

Największe cząsteczki, o bardzo wysokich promieniach hydrodynamicznych i w praktyce, o bardzo wysokich masach molekularnych, nie są w stanie wnikać do żadnych porów wewnątrz wypełnienia kolumny i przebywają one tylko w przestrzeni, w której płynie eluent, tzn. w przestrzeni międzyziarnowej, albo w mezo i makroporach w przypadku kolumny monolitycznej. Mówimy wówczas, że takie molekuly są wykluczane z kolumny. Na podstawie objętości ich elucji wyznacza się objętość przestrzeni międzyziarnowej w kolumnie żelowej oraz tzw. porowatość międzyziarnową wypełnienia kolumny (rys. 5.1.). Nie można jednak opisać rozkładu ich masy cząsteczkowej. Można jedynie stwierdzić, że jest wyższa od daltonów. Nie można także w warunkach chromatografii żelowej scharakteryzować rozkładu najmniejszych cząsteczek, które wnikają do wszystkich porów wypełnienia kolumny. Do ich rozdzielania, z wykorzystaniem mechanizmu żelowego, trzeba zastosować inną kolumnę, albo inne, połączone szeregowo kolumny, o innym zakresie średnic porów.

W związku z opisem mechanizmu chromatografii żelowej, warto pamiętać, że w przypadku wykorzystywania innych rodzajów chromatografii cieczowej, z zastosowaniem konkurencyjnych oddziaływań sorpcyjnych - średnice porów sorbentu powinny być na tyle duże, aby rozdzielane substancje wnikały do wszystkich porów w wypełnieniu kolumny. Bardzo rzadko wykorzystuje się "z premedytacją" jednocześnie mechanizm chromatografii żelowej i sorpcyjnej. Może to być korzystne tylko wtedy, gdy rozdzielane substancje będą wykazywały tym mniejsze powinowactwo sorpcyjne, im większą mają masę cząsteczkową. W innych przypadkach będą miały miejsce wzajemnie niekorzystne oddziaływania i pogorszenie selektywności kolumny.

Wypełnienia kolumn do chromatografii żelowej przygotowuje się w ten sposób, że rozkład średnic porów wyrażany w angstromach lub w nm mieści się w określonym wąskim zakresie, jest precyzyjnie zbadany i podany w świadectwie jakości kolumny.

Kolumnę żelową dobieramy w ten sposób, aby rozkład wielkości porów był dostosowany do rozkładu wartości hydrodynamicznych średnic cząsteczek rozdzielanych substancji, a więc do rozkładu masy cząsteczkowej badanej próbki. Związek między średnicą porów w [nm] i orientacyjnym zakresem masy cząsteczkowej substancji, analizowanych pod względem rozkładu masy cząsteczkowej w warunkach chromatografii żelowej, naszkicowano na rys. 5.3. Na tym rysunku, zwrócono też uwagę, że w chromatografii żelowej częste jest łączenie kolumn o różnych zakresach rozkładu wielkości porów. Przy czym korzystnie jest zachować kolejność: dozownik - kolumna o największych porach - kolumna o pośrednich porach - kolumna o najmniejszych porach - detektor. Alternatywą jest zastosowanie kilku kolumn, wypełnionych mieszaniną ziaren o różnych zakresach wielkości porów (tzw. kolumn typu "mix"). Stosowanie mieszanych



Rys. 5.3. Orientacyjne zakresy wartości masy cząsteczkowej, które można oznaczać w warunkach chromatografii żelowej, gdy średnią wielkość porów wypełnienia wyrażono w nm.

wypełnień (tzw. "mix") jest nieco mniej korzystne ze względu na hydrodynamiczne rozmycie stref. Ze względu na niższy koszt kolumny bywa, jednak często stosowane dla wstępnego określenia zakresu masy cząsteczkowej.

Skład eluentu dobieramy na tej zasadzie, aby był on dobrym rozpuszczalnikiem rozdzielanych substancji i, o ile to tylko możliwe, dążymy do wyeliminowania sorpcji cząsteczek separowanych substancji do powierzchni wypełnienia. Można wówczas wykorzystywać do separacji jedynie zróżnicowanie dróg dyfuzji cząsteczek o różnych promieniach hydrodynamicznych penetrujących na drodze dyfuzji molekularnej pory sorbentu o zróżnicowanych polach przekroju poprzecznego.

Uzyskanie "czystego" żelowego mechanizmu rozdzielania nie zawsze jest możliwe. Szczególnie, w przypadku rozdzielania substancji o charakterze biopolimerów (białka, polisa-

charydy, czy nukleotydy). W warunkach rozdzielania tak polarnych substancji trudno jest całkowicie wyeliminować sorpcję na powierzchni wewnątrz porów wypełnienia kolumny. Powierzchnię zewnętrzną ziaren wypełnienia, albo powierzchnię makro i mezoporów (w kolumnie monolitycznej) można pominąć, jako o ok. dwa rzędy wielkości mniejszą, od powierzchni wewnątrz ziaren wypełnienia, albo od powierzchni mikroporów, w przypadku kolumny monolitycznej.

Chromatografia żelowa jest wykonywana w dwóch głównych alternatywnych układach separacyjnych:

- w warunkach nie wodnych, tzn. w warunkach, nazywanych "liofilowymi", z zastosowaniem takich eluentów, jak: THF, dioxan, czterochloroetylen, chlorobenzen, ksylen i tym podobne oraz kopolimerów styrenu i divinylbenzenu (najczęściej), albo poliestrów, lub innego typu polimerów, jako fazy stacjonarnej. Jest wtedy wykorzystywana do badań rozkładu masy cząsteczkowej polimerów nisko i średnio polarnych, rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach nie polarnych, a także lipidów, fosfolipidów itp. niskopolarnych substancji pochodzenia naturalnego;
- w warunkach wodnych, albo z zastosowaniem silnie polarnych nie wodnych eluentów, takich jak dimetyloformamid, metanol, acetonitryl i ich mieszaniny z wodą i z wodnymi roztworami soli, kwasów i zasad, z zastosowaniem wypełnień kolumn o ziarnach wykonanych z polarnych polimerów, takich jak polidextrany i inne polocukry, polwęglany, szkła porowate, silanizowany żel krzemionkowy i tym podobnych materiałów. Jest, wówczas, wykorzystywana do rozdzielania, a także do charakteryzowania rozkładu masy cząsteczkowej polimerów polarnych, a szczególnie biopolimerów, takich jak poli-cukry, białka, nukleotydy, i tym podobne, niekiedy w połączeniach z substancjami o niższej polarności.

5.2. METODYKA POSTĘPOWANIA DLA OKREŚLENIA ROZKŁADU MASY CZĄSTECZKOWEJ POLIMERU / BIOPOLIMERU

5.2.1. ILOŚCIOWE OZNACZANIE ROZKŁADU MAS CZĄSTECZKOWYCH - METODY

- kalibracja bezpośrednia wg zasady pokazanej na rysunku 1. (istnieje problem posiadania wzorców odpowiednich polimerów i ograniczona przydatność nisko-dyspersyjnych frakcji polistyrenów, albo dekstranów do kalibracji pod względem rzeczywistej wartości masy cząsteczkowej),
- kalibracja z wykorzystaniem polimerów polidispersyjnych o znanym rozkładzie masy molekularnej,
- kalibracja uniwersalna $\log([\eta] M_w) = f(V_e)$

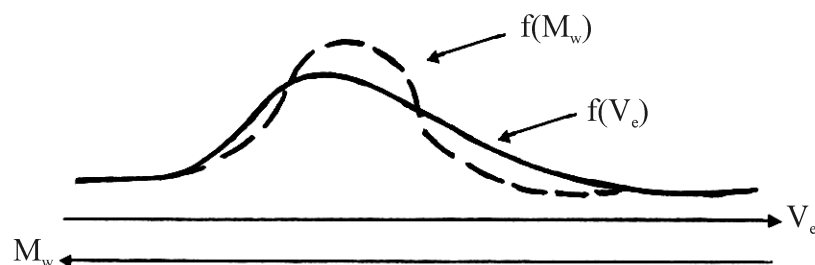
Masy cząsteczkowe określonego typu cząsteczek chemicznych są w przybliżeniu proporcjonalne do ich promieni hydrodynamicznych. Dlatego przy pomocy opisanego mechanizmu rozdzielania jest możliwe określenie, nie tylko rozkładu promieni hydrodynamicznych rozdzielanych cząsteczek, ale także rozkładu masy cząsteczkowej badanego materiału polimerowego. Można tego dokonać tym dokładniej im bardziej zbliżone są budową i kształtem cząsteczki badanego polimeru i polimeru, który został wykorzystany do kalibracji.

Do kalibracji wykorzystuje się odpowiednie polimery wzorcowe o wąskich frakcjach masy cząsteczkowej. Najlepiej, gdy M_{max} / M_{min} jest mniejsze od 1,05 do 1,20. W badaniach

wykonywanych w celu określenia orientacyjnego rozkładu masy cząsteczkowej polimerów nisko i średnio polarnych, do kalibracji wykorzystywane są wzorcowe polimery polistyrenowe o niewielkiej wartości dyspersji masy cząsteczkowej. W badaniach dokładnych powinno się stosować wzorce polimerów tego samego typu, jak polimer, którego rozkład masy cząsteczkowej jest poszukiwany, bo tylko wtedy możemy przyjmować zgodność między masą cząsteczkową wzorca kalibracyjnego i badanego polimeru.

Doświadczalnie wyznacza się zależność funkcyjną między $\log M$ i objętością elucji wzorcowych polimerów (V_e), a następnie na podstawie tych danych i po zintegrowaniu fragmentacyjnym odpowiedniego chromatogramu badanego polimeru oblicza się rozkład masy cząsteczkowej. (patrz rys. 5.1 i 5.2). W bardziej dokładnych badaniach określa się zależność: $\log([\eta] M) = f(V_e)$, gdzie $[\eta]$ jest lepkością dynamiczną wzorca masy molekularnej o średniej masie cząsteczkowej M .

Korzystne jest też skorygowanie przebiegu chromatogramu, w postaci "odjęcia" tych części piku, które są utworzone na drodze dyspersji hydrodynamicznej w kolumnie (rys. 5.4.). Wygodne (w praktyce, konieczne) jest użycie do tego celu wyspecjalizowanego oprogramowania komputerowego, bez którego trudno dokonać precyzyjnie "fragmentacyjną" integrację



Rys. 5.4. Schemat ilustrujący zasadę eliminacji wpływu dyspersji hydrodynamicznej dla dokładnego określania rozkładu masy cząsteczkowej polimeru - $f(M_w)$

chromatogramu badanego polimeru, a przede wszystkim nie możliwe jest uwzględnienie wpływu rozmycia hydrodynamicznego i skorygowanie pod tym względem chromatogramu badanego polimeru. Bez tego otrzymane wyniki nie są bardzo dokładne.

5.3. FAZY STACJONARNE I RUCHOME STOSOWANE W CHROMATOGRAFII ŻELOWEJ SUBSTANCJI LIPOFILOWYCH I HYDROFILOWYCH ORAZ ZASADY DOBORU OPTYMALNYCH WARUNKÓW ROZDZIELANIA

5.3.1. ELUENTY STOSOWANE W WARUNKACH CHROMATOGRAFII ŻELOWEJ POLIMERÓW NISKO I ŚREDNIO POLARNYCH

Warunkiem stosowania chromatografii do oznaczania rozkładu masy cząsteczkowej jest rozpuszczalność polimeru w eluencie i jak wspomniano, taka siła elucyjna fazy ruchomej, aby eliminowała ona adsorpcję cząstek polimeru na powierzchni sorpcyjnej żelu.

W przypadku nisko i średnio polarnych polimerów syntetycznych w charakterze eluentu stosuje się najczęściej tetrahydrofuran (THF), będący dobrym rozpuszczalnikiem wielu

Tabela 5.1. Eluenty stosowane w chromatografii żelowej polimerów nisko i średnio polarnych.

Eluent	toluen	THF (tetrahydrofuran)	aceton	dwuchlorobenzen	DMFA (dimetyloformamid)
"Siła elucyjna" wg Burtona	8,9	9,1	9,9	10,1	12,1

polimerów i jednocześnie substancją dobrze eliminującą (minimalizującą) adsorpcję nawet do żelu krzemionkowego a także oddziaływania hydrofobowe.

W chromatografii żelowej biopolimerów, w roli elueentu stosuje się bufor będący dobrym rozpuszczalnikiem polimeru, a jednocześnie zapewniający minimalne oddziaływania sorpcyjne. Niekiedy dodaje się AcCN, lub IzoOH, aby ograniczyć oddziaływania hydrofobowe z powierzchnią fazy stacjonarnej.

Rodzaje faz stacjonarnych w chromatografii żelowej :

- pęczniejące - ściśliwe (wymagające przygotowania - spęcznienia) - uwaga na silnie nieliniową zależność oporu przepływu (P) od natężenia przepływu!
- twarde - nieściśliwe do określonej wartości ciśnienia - bardzo wysoce usieciowane kopolimery, albo wypełnienia oparte o żel krzemionkowy (np. DIOL), szkło porowate, tlenek cyrkonu lub inne trwałe sorbenty o w różny sposób dezaktywowanej powierzchni.

Albo:

- liofilowe (dla polimerów nisko i średnio polarnych),
- hydrofilowe (dla polimerów bardzo polarnych i dla biopolimerów), np. dezaktywowany żel krzemionkowy, szkło porowate, ditlenek cyrkonu (dawniej, dezaktywacja szkła porowatego glikolem polietylenowym, obecnie, częściej silanizowanie powierzchni sorbcyjnej), a szczególnie wiązanie diolu i silanizacja resztkowych grup OH).

Tabela 5.2. Niektóre handlowe wypełnienia kolumn do chromatografii żelowej (*współczesna oferta handlowa jest bardzo bogata*)

Organiczne	Nieorganiczne (często modyfikowane)
<ul style="list-style-type: none"> • dekstranowe (Sephadex G10-G200, LM-20, LH60, Sephacryl) • agarozowe (Sepharos, Biogel A, Ultrigel A, ...) • akrylowe, metakrylowe (Biogel P, Ultrigel ACA, ...) • polistyrenowo - divinylbenzenowe (PS-DVB, TSK G1000-G7000, PORAGEL 60-500, Lichrogel PS 1-4000) 	<ul style="list-style-type: none"> • silikażele (Lichrospher SI 100 -4000, TSK-GEL SW 2000-4000 o dezaktywowanej powierzchni sorpcyjnej) • szkła porowate - CPG 40-3000 Å • tlenki glinu, cyrkonu, tytanu, szczególnie modyfikowane, typu DIOL

Sorbentem najczęściej wykorzystywanym do rozdzielania nisko- i średnio-polarnych polimerów jest kopolimer styrenu i divinylbenzenu, przestrzennie usieciowany, o kulistych ziarnach wielkości 5 μ m, będący praktycznie sorbentem twardym przydatnym w warunkach HPLC. Tego typu sorbenty noszą różne nazwy firmowe typu Lichrogel, TSK-gel G-1000 do G-7000 i wiele innych.

W przypadku stosowania chromatografii żelowej do rozdzielania biopolimerów wykorzystuje się sorbenty o znacznie wyższej polarności. Przy czym istnieją dwie różne ich grupy, sorbenty twarde, coraz powszechniej stosowane oraz sorbenty miękkie i średnio twarde, które wymagają spęcznienia w odpowiednim roztworze przed zastosowaniem do rozdzielania.

Do grupy sorbentów twardych można zaliczyć różnego typu szkła o kontrolowanej porowatości, a także sorbenty typu DIOL związany chemicznie do powierzchni żelu krzemionkowego, albo dwutlenku cyrkonu, lub tytanu, o kontrolowanej wielkości porów. W celu obniżenia oddziaływań sorpcyjnych te twarde polimery są dodatkowo silanizowane dla zablokowania pozostałych na powierzchni grup hydroksylowych i najbardziej aktywnych innego typu centrów sorpcyjnych. W tym celu stosuje się też niekiedy dodatek glikolu etylenowego do eluentu.

Do grupy żeli miękkich i średnio twardych można zaliczyć żele dekstranowe (m.inn. Sephadexy od G5 do G200, LH-20, LH-60), agarozowe (Sephrose, Biogel'e A, Ultrigel'e A), akrylowe (Biogel'e P, Ultrigel'e ACA) i inne.

W przypadku stosowania chromatografii żelowej do rozdzielania biopolimerów jest bardzo trudno, a często praktycznie niemożliwe, uzyskać takie warunki, aby adsorpcja była całkowicie wyeliminowana. Jeden ze sposobów polega na stosowaniu w roli fazy stacjonarnej silanizowanego szkła porowatego. Inne rozwiązanie to stosowanie sit molekularnych typu DIOL chemicznie związanych z powierzchnią żelu krzemionkowego o starannie zamaskowanych resztkowych grupach -OH przy użyciu metylo-silanu. Dodatkowo, w charakterze fazy ruchomej, stosuje się wodne roztwory buforów z dodatkiem EDTA, mocznika, etanolu itp. Czasem pożądane rozdzielanie można uzyskać tylko wtedy, gdy wykorzystana jest przepis istniejący w specjalistycznej literaturze. Dotychczas nie opracowano jeszcze w pełni uniwersalnych reguł doboru najlepszego eluentu do chromatografii żelowej substancji bardzo polarnych.

5.4. PROBLEMY I ZAKŁÓCENIA, KTÓRE NALEŻY BRAĆ POD UWAGĘ W PRAKTYCE I SPOSOBY ICH ELIMINACJI

Niektóre polimery rozpuszczają się tylko na gorąco, więc korzystne jest by chromatograf żelowy był wyposażony w termostat kolumny oraz by termostatowany był także zawór dozujący, a niekiedy też cela przepływowa detektora.

Problemy i zakłócenia, które trzeba brać pod uwagę:

- możliwość oddziaływań sorpcyjnych rozdzielanych polimerów,
- pęcznienie i kurczenie się ziaren wypełnień kolumn do chromatografii żelowej pod wpływem różnych eluentów - ostrożnie ze zmianą eluentu w kolumnach do chromatografii żelowej, bo można trwale zniszczyć kolumnę!,
- istnienie określonego stopnia ściśliwości nawet "twardych" żeli i ograniczonej odporności na ciśnienie, szczególnie żeli "szeroko-porowatych",
- na bardzo wolną dyfuzję makromolekuł i konieczność ograniczenia prędkości przepływu eluentu w celu niedopuszczenia do nadmiernego rozmycia pików,
- "przeszkadzanie sobie nawzajem" przez duże molekuly penetrujące wnętrza porów i zatykanie niektórych porów przez cząsteczki makropolimerów,
- możliwość polikondensacji makromolekuł.

W przypadku stosowania kolumn do chromatografii żelowej należy być bardzo ostrożny przy wymianie eluentu na inny. Przede wszystkim trzeba przestrzegać ściśle zaleceń producenta

kolumny. Gdy dane takie są niedostępne, należy przestrzegać ogólnej reguły, aby w przypadku kolumn przeznaczonych do rozdzielania nisko i średnio polarnych polimerów syntetycznych nie zastosować cieczy polarnych, takich jak woda, metanol, etanol, izopropanol, acetonitryl. W przeciwnym razie może dojść do nieodwracalnego skurczenia się ziaren wypełnienia kolumny i w konsekwencji utraty zarówno jej selektywności, jak i sprawności. Podobnie ma się sprawa z hydrofilowymi żelami miękkimi i półtwardymi, których spęcznienia dokonuje się z użyciem roztworów wodnych. W takim przypadku zastosowanie heksanu, czy toluenu może zniszczyć porowatą strukturę ziaren wypełnienia, a aceton, albo THF mogą spowodować nadmierne spęcznienie sorbentu, a nawet go rozpuścić!

5.4.1. DETEKTORY WYKORZYSTYWANE W CHROMATOGRAFII ŻELOWEJ

Detekcja: detektor RI, UV, pomiar lepkości, laserowy detektor bezpośredniego rozproszenia światła przez cząsteczki polimerów, LLSD laserowy detektor rozproszenia światła po odparowaniu eluentu (Laser Light Scattering Detector), LC-MS.

Wiele polimerów nie absorbuje światła UV, a nawet, gdy to światło absorbują, to sygnał nie jest proporcjonalny do masy cząsteczkowej. Takimi detektorami, których sygnał jest proporcjonalny, albo w przybliżeniu proporcjonalny, nie tylko do stężenia badanych składników eluatu, ale i do masy cząsteczkowej, są: detektor refraktometryczny (RI), detektor laserowy światła rozproszonego (LLSD), spektrometr mas do pracy w układzie (HPLC-MS).

Ostatnio, rośnie zakres zastosowania specyficznego detektora mierzącego intensywność rozproszenia wiązki światła laserowego przez cząsteczki o różnych promieniach hydrodynamicznych, pod różnymi kątami. Na podstawie sygnałów, otrzymanych z tego detektora można bezpośrednio obliczyć rozkład masy cząsteczkowej polimeru, gdy wynosi ona ponad 5 tysięcy daltonów - bez stosowania kalibracji za pomocą wzorców polimerowych. Zapewnia to odpowiednie specjalizowane oprogramowanie, oparte na zasadach fizyki rozproszenia i ugięcia promieni świetlnych przez cząsteczki o wymiarach zbliżonych do długości fali działającego na nie światła.

Najczęściej, jednak, wykorzystywany jest w chromatografii żelowej detektor refraktometryczny (RID). Jego stosunkowo niska czułość nie jest wadą, gdy stężenia próbek dozowanych do kolumny, są w chromatografii żelowej względnie wysokie. Jego nieprzydatność w warunkach elucji gradientowej, tu nie przeszkadza, gdyż w chromatografii żelowej nie ma potrzeby wykorzystywania elucji gradientowej - co, jednak, nie jest zawsze słuszne w chromatografii żelowej biopolimerów.

Trzeba też zwrócić uwagę na możliwość stosowania kombinacji detektora RI i pomiaru lepkości do obliczania bezwzględnej wartości masy cząsteczkowej polimerów w eluacie wypływającym z kolumny.

5.4.2. ZASTOSOWANIA CHROMATOGRAFII ŻELOWEJ

Podstawowy zakres zastosowań chromatografii żelowej to rozdzielanie substancji różniących się masą cząsteczkową, a więc wielkością cząsteczek.

Główne zastosowania chromatografii żelowej to oznaczanie rozkładu masy cząsteczkowej różnego typu polimerów. Warunkiem stosowalności, jest rozpuszczalność polimeru w eluencie. Przy czym dla wyjątkowo trudno rozpuszczalnych polimerów, jako eluent wybiera się najlepszy rozpuszczalnik polimeru i proces rozdzielania prowadzi się w podwyższonej temperaturze.

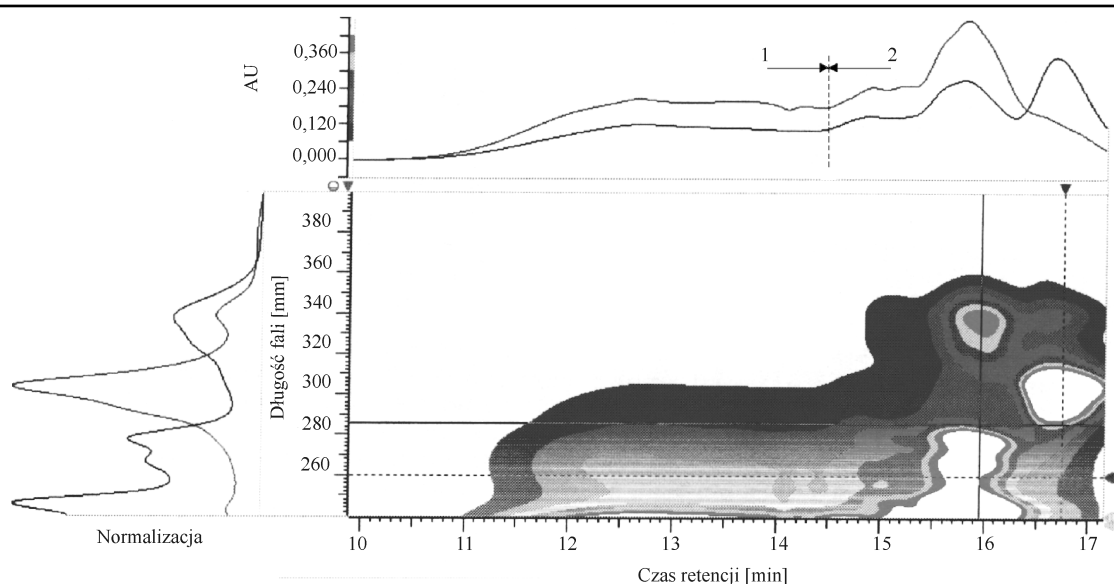
Chromatografia żelowa znalazła też wiele innych zastosowań, jak oznaczanie zawartości różnego typu dodatków uszlachetniających, albo niepożądanych zanieczyszczeń polimerów, smarów, olejów, tłuszczów, kosmetyków itp. materiałów, do oznaczania zawartości plastyfikatorów, antyutleniaczy, konserwantów, pozostałości rozpuszczalnika i innych substancji w polimerach. Służy wtedy do oznaczania zawartości tych składników próbki, które różnią się zasadniczo masą molekularną od pozostałych, np. zawartości plastyfikatora w polimerze, wiskozatora w oleju smarowym, modyfikatora polimerowego w asfalcie drogowym itp.

W skali preparatywnej, albo pół preparatywnej bywa wykorzystywana do otrzymywania frakcji polimerów, albo biopolimerów o mało zróżnicowanej, albo jednakowej wielkości cząsteczek (biopolimery), do odsalania białek, do przygotowania próbek do analizy poprzez wyodrębnienie frakcji o określonym zakresie masy cząsteczkowej (najczęściej w celu oddzielenia frakcji o niskiej masie molowej od lipidów, czy polisacharydów).

Inną grupą zastosowań chromatografii żelowej jest przygotowanie próbek do oznaczania niskocząsteczkowych zanieczyszczeń w żywności, produktach naftowych i w środowisku. Zasada postępowania polega na wstępnej izolacji frakcji o niskich wartościach masy cząsteczkowej. Wyizolowana frakcja zostaje poddana analizie z zastosowaniem innego rodzaju układu chromatograficznego, najczęściej w układzie faz odwróconych. Można w ten sposób np. przygotować próbki do oznaczania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, pestycydów, a także wielu innych niskocząsteczkowych zanieczyszczeń w glebie, olejach, asfaltach, w mięsie np. ryb i w wielu innych materiałach biologicznych oraz w innych materiałach, gdzie większość składników próbki posiada masy cząsteczkowe znacznie wyższe od WWA, albo od innych badanych zanieczyszczeń.

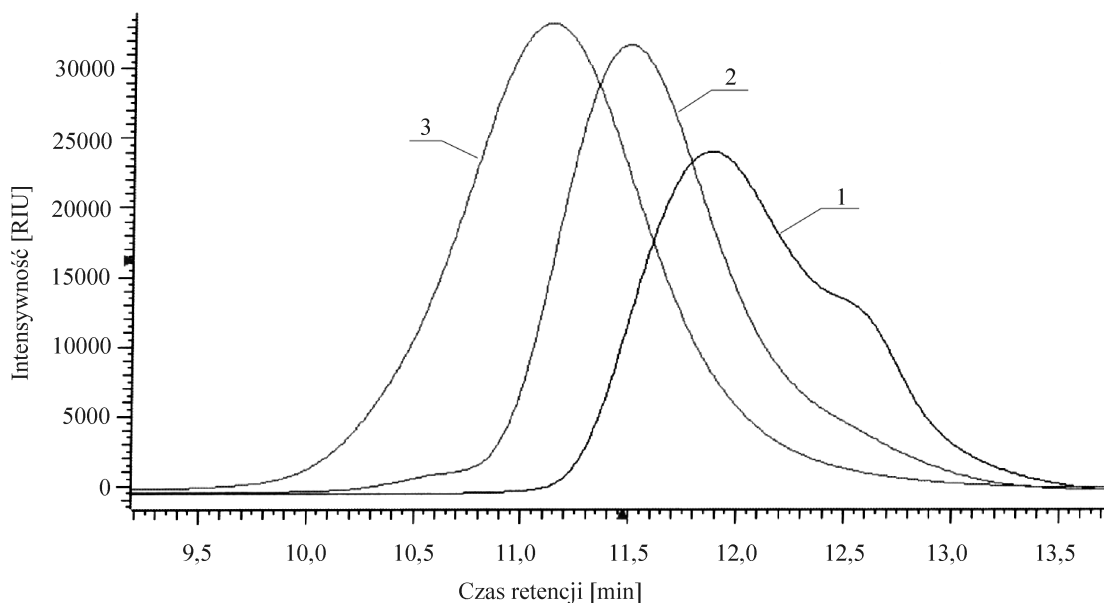
Na podobnej zasadzie wykorzystuje się powszechnie chromatografię żelową do wstępnego frakcjonowania badanych materiałów na frakcje o określonym zakresie masy cząsteczkowej w badaniach biochemicznych, mikrobiologicznych i w biotechnologii, a także w preparatyce użytkowych ilości wyodrębnianych substancji. Przykładem szczególnie dobitnym jest tu odsalanie roztworów peptydów i białek, otrzymanych po zastosowaniu tzw. frakcyjnego wysalania, albo strącania w punkcie izoelektrycznym peptydów i białek.

Na rysunkach 5.5-5.11 pokazano przykłady kilku typowych zastosowań chromatografii żelowej.



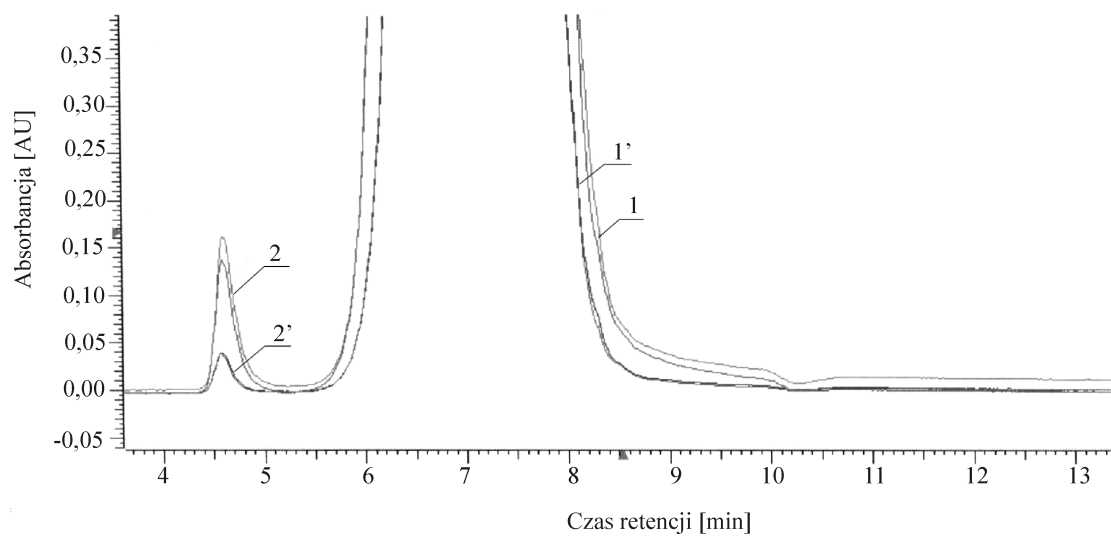
Rys. 5.5

Przykład zastosowania chromatografii żelowej do oznaczania stopnia konwersji w reaktorze pierwszego stopnia procesu hydrokrakingu katalitycznego z wykorzystaniem detektora UV - DAD (odwzorowanie poziomicowe). Kolumna: 2xLiChrogel PS1 (100 Å) - 250x7mm i.d.; Eluent: THF; $w=0,8\text{ml/min}$; temperatura 30°C; Piki (części chromatogramu): 1-część wsadu, która nie uległa hydrokonwersji; 2-produkty hydrokonwersji. Po lewej stronie - widma UV głównych aromatycznych produktów hydrokonwersji; u góry chromatogramy dla długości fali 260 nm i 285 nm.



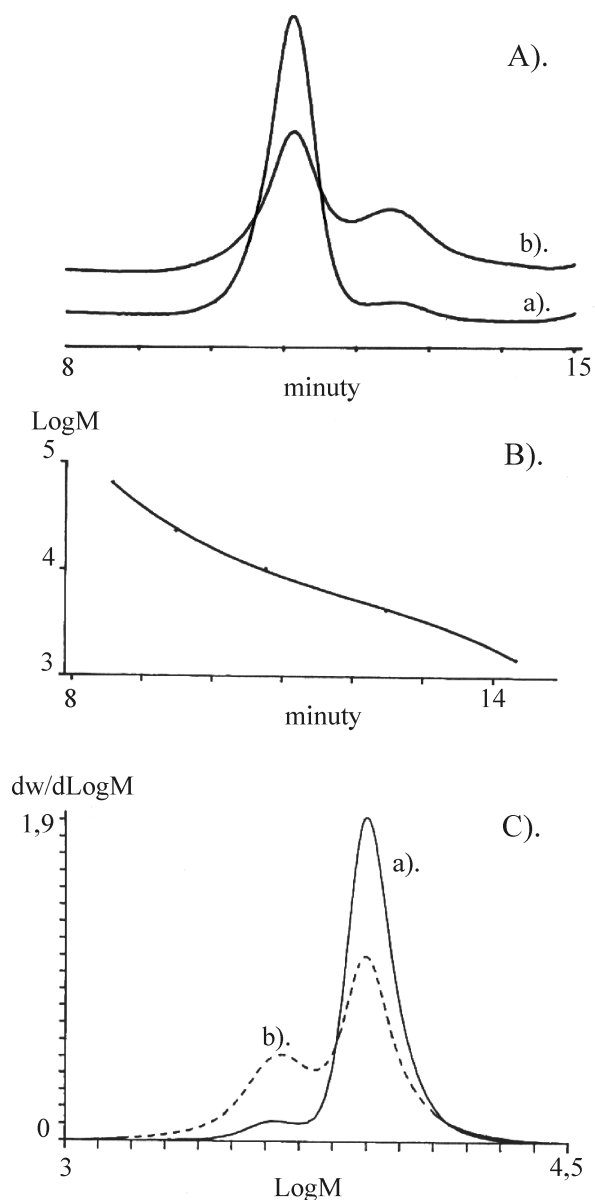
Rys. 5.6

Przykład zastosowania dwóch szeregowo połączonych kolumn typu styren-divinylobenzen do oznaczania rozkładu masy cząsteczkowej (rozkładu temperatury wrzenia) trzech naturalnych olejów bazowych różnych klas lepkości: 1-SAE 10; 2-SAE 30; 3-B5 (brighstock'u); kolumna 2x250x7mm i.d. LiChrogel PS1 (100 Å) Merck; Eluent: THF; $W=0,8\text{ml/min}$; temperatura 30°C; Detektor: RI



Rys. 5.7

Zestawienie kilku nałożonych chromatogramów oznaczania zróżnicowanych zawartości wiskozatora w oleju przekładniowym Tytanis z zastosowaniem chromatografii żelowej, otrzymane z zastosowaniem detektora UV dla dwóch długości fal światła UV. Kolumna: 2x250x4mm i.d.; Wypełnienie: żel krzemionkowy Lichrospher® Si 60 5µm; Eluent: THF; $w=0,8$ ml/min; temperatura 30°C; Detektor UV; Chromatogramy 1,2 - $\lambda=230$ nm; 1', 2' - $\lambda=260$ nm; Piki: 1, 1' - olej bazowy i dodatki jakościowe; 2, 2' - wiskozator.



Rys. 5.8

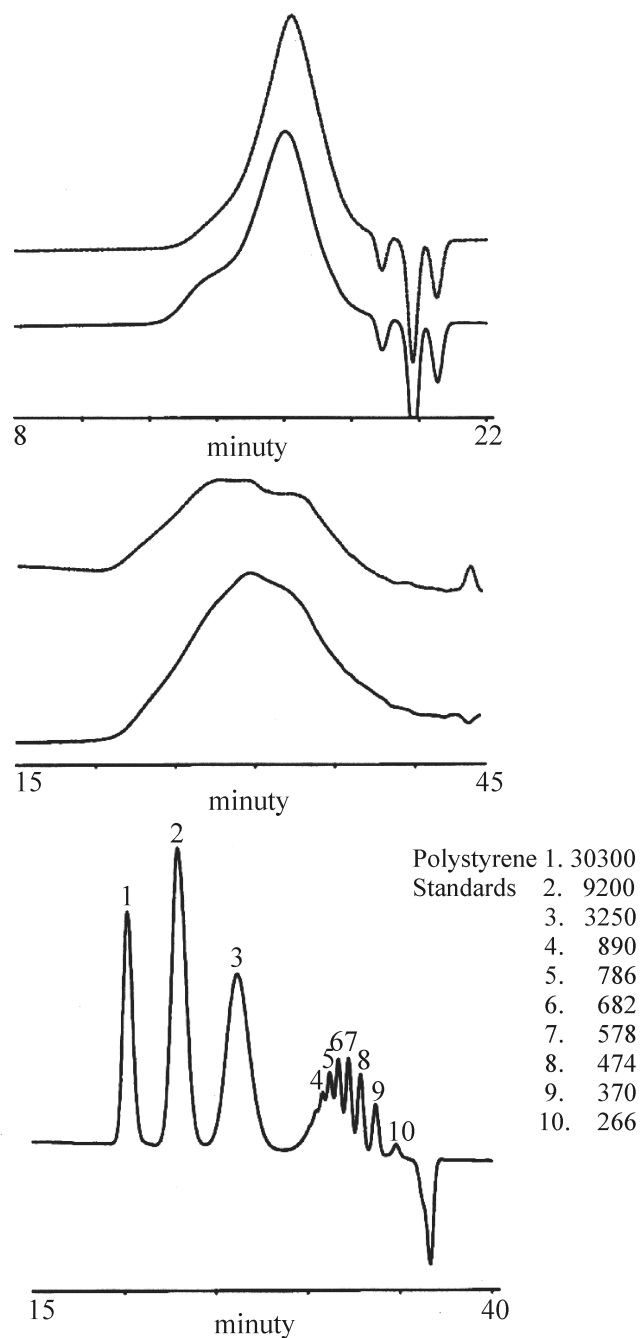
Instrukcja zastosowania chromatografii żelowej do oznaczania rozkładu masy cząsteczkowej bidispersyjnego polimeru "Poliexamer 188" (politlenek etylenu (PEO) do zastosowań farmaceutycznych, jako środek powierzchniowo czynny w czasie produkcji końcowej postaci leków), wykonana w podwyższonej temperaturze.

A) Nałożenie chromatogramów: a) polimer po wyprodukowaniu; b) polimer a) po naświetlaniu światłem UV i ogrzewaniu w warunkach sterylizacji

B) Krzywa kalibracyjna, otrzymana z zastosowaniem nisko-dyspersyjnych standardów PEO

C) Krzywe masowego rozkładu masy cząsteczkowej polimerów a) i b), otrzymane w wyniku obliczeń wykonanych z zastosowaniem dedykowanego oprogramowania komputerowego.

Warunki analityczne: Kolumna: 2xPLgel $5\mu\text{m } 10^3 \text{ \AA}$, 300x7,5mm i.d. (Polymer Laboratories), Anglia; Eluent: di-metyloformamid (DMF) + 0,1% LiBr; w: 1,0 ml/min; Temperatura: 70°C; Detektor: RI (PL - GPC 110); Aplikacja POLYGEN - Dania.



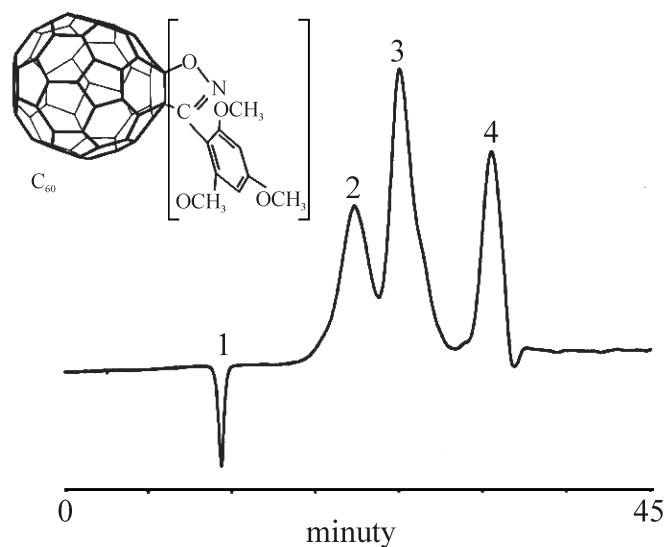
Rys. 5.9.

Przykład zastosowania chromatografii żelowej do oznaczania rozkładu masy cząsteczkowej różnych szarż produkcyjnych asfaltu - aplikacja nr C5 56/A/5,95 firmy Polymer Laboratories (Anglia).

Część 1. Dwie szarże produkcyjne asfaltu drogowego klasy 50/70, Eluent: THF; Kolumny: 2xPLgel 5 μ m MIXED-D, 300x7,5 mm i.d.; W=1 ml/min; Detektor: RI; Temperatura: 25°C;

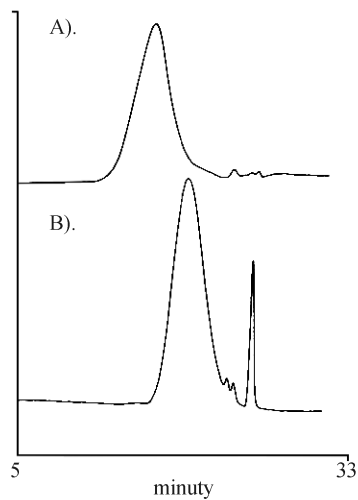
Część 2. Dwie szarże asfaltu polidispersyjnego typu izolacyjnego. Eluent: o-ksylen; Kolumny: 2xPLgel 3 μ m MIXED-E, 300x7,5 mm i.d.; ν =0,5 ml/min; Detektor: RI; Temperatura: 25°C;

Część 3. Chromatogram mieszaniny poliestrowych standardów monodispersyjnych o średnich masach cząsteczkowych podanych na rysunku. Warunki jak dla części 2.; Aplikacja: POLYGEN - Dania



Rys. 5.10.

Przykład zastosowania chromatografii żelowej do rozdzielania fularenów C₆₀(3) i C₇₀(2) oraz nierozpuszczalnego materiału (1) i nieznanymi zanieczyszczeń niskocząsteczkowych (4). Kolumna: 4xPLgel 10µm 50 Å produkcji Polymer Laboratories, 300x7,5 mm; Eluent: Toluen; w=1,0 ml/min, Detektor: RI; Aplikacja: POLYGEN - Dania



Rys. 5.11.

Przykłady zastosowania chromatografii żelowej w warunkach hydrofilowych; A - pektyna z jabłek, B - alkohol poliwinylowy

Kolumna: 3xPLaquagel-OH MIXED 8µm, 300x7,5mm i.d.; produkcji Polymer Laboratories; Eluent: 0,2 M NaNO₃ + 0,01 M NaH₂PO₄, pH=7; W=1,0 ml/min; Dozowano: 200µl 0,2% roztworu w eluencie; Aplikacja: POLYGEN - Dania

Chromatografia żelowa (GPC/SEC) - znaczenie symboli

d_c	- średnica kolumny;
d_p	- średnica ziaren wypełnienia w kolumnie
k, k_1, A, B	- stałe;
L_c	- długość wypełnienia kolumny;
LLSD	- laserowy detektor rozproszenia światła;
M_{min}, M_{max}	- odpowiednio: minimalna i maksymalna masa cząsteczkowa substancji
M_{sr}	- średnia masa cząsteczkowa polimeru (ogólnie);
M_w	- średnia masa cząsteczkowa polimeru (wagowo);
P	- pole pod częścią krzywej rozkładu stężenia (piku); podlegających efektowi sita molekularnego w danej kolumnie;
r_p	- średni promień porów w ziarnach wypełnienia kolumny;
V_0	- objętość "martwa" kolumny (objętość elucji substancji o niskiej masie cząsteczkowej - wnikałcej we wszystkie pory ziaren wypełnienia)
V_e	- objętość elucji (do maksimum albo do środka ciężkości piku)
$V_{m/z}$	- objętość między-ziarnowa wypełnienia;
V_t	- objętość "pustej" (niewypełnionej) kolumny;
$V_{w/z}$	- objętość porów wewnątrz ziaren sorbentu;
η	- lepkość dynamiczna;
ε_i	- porowatość wewnętrzna ziaren sorbentu;
$\varepsilon_{m/z}$	- porowatość między-ziarnowa wypełnienia;
ε_T	- porowatość całkowita kolumny;
$[\eta]$	- lepkość graniczna (nieskończenie rozcieńczonego roztworu polimeru);

6. CHROMATOGRAFIA JONOWYMIENNA I JONOWA

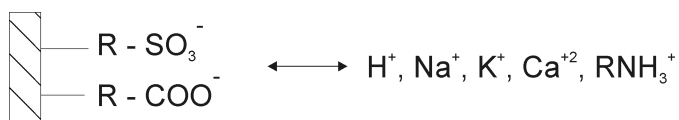
Marian Kamiński

6.1. SKRÓT

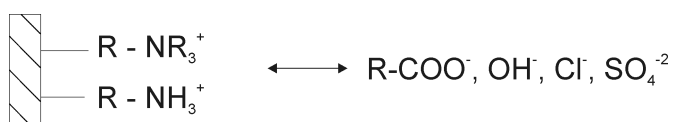
Zastosowanie: Rozdzielanie i oznaczanie nieorganicznych, albo organicznych kationów, albo/i anionów, a także aminokwasów, peptydów, białek, nukleotydów, sacharydów, amin, alkanoloamin i innych wysoce polarnych i jonizowalnych, albo trwale spolaryzowanych oraz silnie polaryzowalnych substancji, m. inn. takich, jak w/w cukry, peptydy itd. W przypadku wykorzystywania dla substancji makromolekularnych należy zapewnić taką wielkość porów wymiennicza jonowego (w zakresie 300 do 1000, a nawet 5000 Å), aby cząsteczki rozdzielanych substancji miały możliwość penetrować wszystkie pory wypełnienia.

6.2. TYPY WYMIENIACZY JONOWYCH

- a) Kationit (kwas związany na powierzchni porów wypełnienia kolumny): mocny, średni, albo słaby - konkurencyjne oddziaływania z kationami:



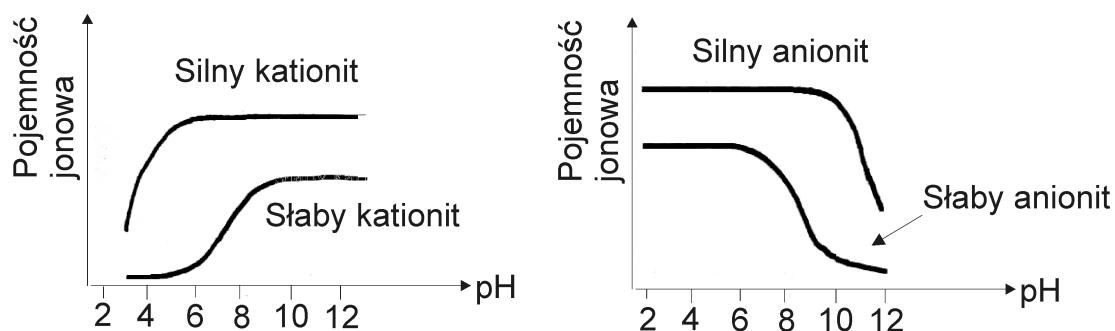
- b) Anionit (zasada związana na powierzchni wypełnienia kolumny): mocny, średni, albo słaby - konkurencyjne oddziaływania z anionami:



- c) wymiennicze jonów z dodatkowymi oddziaływaniami sorpcyjnymi, np. jednocześnie grupy typu C18 oraz $-\text{SO}_3\text{H}$, albo/i NR_4^+OH .

6.3. POJEMNOŚĆ JONOWA I ZAKRES pH SILNYCH I SŁABYCH WYMIENIACZY JONOWYCH

Pojemność jonowa wypełnień stosowanych w wysokosprawnej chromatografii jonowymiennnej (chromatografii jonowej (IC)) powinna być raczej niewielka, co zapewnia szerszy zakres liniowości sorpcji i w konsekwencji bardziej symetryczne i wąskie piki. Mocne kationity i anionity charakteryzują się najczęściej wyższą pojemnością jonową od słabych.



Rys. 6.1. Zależność pojemności jonowej od rodzaju wymiennicza jonów i od pH eluentu.

1. Szeregi eluotropowe w kierunku malejącej siły elucyjnej przeciwjonu (szczegółowa kolejność elucji zależy od rodzaju wymiennicza jonowego oraz od rodzaju przeciwjonu):

- ~ wymiana kationów - często : Ba^{2+} , Pb^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , UO_2^{2+} , Te^+ , Ag^+ , Cs^+ , Rb^+ , K^+ , NH_4^+ , H^+ , Li^+
- ~ wymiana anionów - często: cytrynian, SCN^- , siarczan, szczawian, PO_4^{3-} , BO_3^{3-} , NO_3^- , Br^- , CN^- , NO_2^- , Cl^- , HCOO^- , CH_3COO^- , F^- , OH^- , ClO^- .

3. Na retencję ma wpływ:

- a) typ wymiennicza jonowego,
- b) pH eluentu,
- c) siła jonowa eluentu,
- d) rodzaj przeciwjonu dominujący na powierzchni jonowymiennej (rodzaj przeciwjonu w eluencie)

4. Reguły ogólne:

- e) wzrost siły jonowej eluentu obniża objętość retencji (V_R),
- f) w przypadku wymiany kationów wzrost pH obniża retencję; wyjątek: słabe wymiennicze kationów lepiej dysocjujące przy wyższym pH;
- g) w przypadku wymiany anionu: spadek pH obniża retencję; wyjątek: słabe wymiennicze anionów lepiej dysocjujące przy niższym pH;
- h) rodzaj przeciwjonu w/g następujących reguł podwyższa retencję :
 - im wyższy ładunek przeciwjonu,
 - im mniejsza średnica przeciwjonu,
 - im łatwiej polaryzowalny przeciwjon

5. Zalecenia praktyczne

- i) W warunkach jonowej chromatografii elucyjnej należy wykorzystywać do rozdzielania najwyżej 5% pojemności jonowej kolumny i stosować pH zapewniające dysocjację fazy stacjonarnej (nie przekraczać liniowego zakresu funkcji równowagi jonowymiennej);

- j) Należy stosować stałe pH eluentu ($\text{pH} \leq \text{p}K_s - 1,5$, gdy rozdzielamy kationy słabych zasad) lub $\text{pH} \geq \text{p}K_s + 1,5$, gdy rozdzielamy aniony słabych kwasów), a siłę elucyjną zmieniać poprzez zmianę siły jonowej eluentu (gdzie: $\text{p}K_s$ to $\text{p}K$ rozdzielanego kwasu lub zasady);
- k) Jeżeli cząsteczki substancji rozdzielanych mają hydrofobowe fragmenty w strukturze swych molekuł, a fazę stacjonarną stanowią organiczne kwasy, albo zasady (np. kwas arylosulfonowy, albo kation alkiloamoniowy, a także, gdy faza stacjonarna wymienia jonów jest oparta o kopolimer, np. styrenu - diwinylobenzenu, celowy może być dodatek kilku % acetonitrylu do eluentu, aby obniżyć (albo całkowicie wyeliminować) hydrofobowe oddziaływania z jonowymienną powierzchnią sorpcyjną. Można też w ten sposób sterować dodatkiem acetonitrylu, czy metanolu do eluentu, aby retencja była w części regulowana oddziaływaniami jonowymiennymi i w części oddziaływaniami hydrofobowymi (hydrofobową sorpcją).
- l) Należy stosować dodatek substancji przeciwgrzybowych do eluentu, aby nie uszkodzić pompy i kolumny: 0.005M NaN_3 , kwas kapronowy, fenol, krezol;
- m) Należy płukać okresowo część tłoka pompy pracującą wewnątrz uszczelki, gdy składniki eluentu mogą krystalizować !

6. Detekcja w chromatografii jonowymiennej

- n) przewodnictwo elektrolityczne - celowość, a nawet konieczność supresji jonów;
- o) Detekcja w zakresie UV - niektóre tylko jony; odwrotna detekcja w zakresie UV - możliwość oznaczenia praktycznie wszystkich jonów na poziomie od ok. 1 ppm;
- p) przydatność detektora RI (jeednak tylko w warunkach elucji izokratycznej i dość znacznych stężeń oznaczanych substancji);

7. Alternatywy dla chromatografii jonowymiennej:

- q) chromatografia par jonowych z zastosowaniem sorbentów: C18, C8, C2;
- r) cofanie dysocjacji słabych kwasów lub zasad i wykorzystanie układów faz odwróconych;
- s) stosowanie warunków wykluczania jonowego (rozdzielanie słabych kwasów i zasad).

8. Przykłady substancji tworzących pary jonowe : kwasy alkilo - sulfonowe, zasady alkilo - amoniowe, (korzystnie substancje nie absorbujące UV).

6.4. CHROMATOGRAFIA JONOWA I JONOWYMIENNA - OPIS SZCZEGÓŁOWY

6.4.1. WYMIANA JONOWA

Wymiana jonowa jest to proces polegający na tym, że obecne w roztworze jony i cząsteczki mające określony ładunek wiązane są przez jonit oddający równocześnie do roztworu jony związane, najczęściej OH^- , H^+ , Na^+ i Cl^- .

Proces wymiany jonowej zachodzi w sposób odwracalny i stechiometryczny. Odwracalność reakcji jonowymiennej stwarza jednakową możliwość prowadzenia wymiany jonowej i procesu odwrotnego - odtwarzania pierwotnej postaci jonitu - regeneracji jonitu.

6.4.2. ZAKRES ZASTOSOWAŃ WYMIANY JONOWEJ, MECHANIZMY ROZDZIELANIA I TYPY WYMIENIACZY JONOWYCH

Zjawisko sorpcji jonowymiennej po raz pierwszy zostało opisane ok. 150 lat temu. Praca ta dotyczyła procesów filtracji roztworów soli ziem alkalicznych i metali ziem alkalicznych przez różnego rodzaju gleby zawierające glinokrzemiany. Od tamtego czasu coraz bardziej wykorzystywano zjawisko wymiany jonowej w chemii analitycznej. Warto przytoczyć kilka historycznych zastosowań, takich, jak, oznaczanie całkowitego stężenia soli (azotanów, fosforanów czy siarczanów), usuwanie jonów przeszkadzających w analizie nieorganicznej (np. przy oznaczaniu potasu w obecności siarczanów), wyodrębnianie i oznaczanie składników śladowych zawartych w analizie (np. miedzi w mleku czy cyny, miedzi i żelaza w piwie). Stosowano też proces wymiany jonowej w technologii chemicznej: odzyskiwanie alkaloidów z wyciągów roślinnych na skalę przemysłową (np. alkaloidów chinowych z kory chinowej i skopolaminy z roślin *Datura*), otrzymywanie, oczyszczanie aminokwasów i ich analityka, otrzymywanie pierwiastków ziem rzadkich na skalę produkcyjną itp.

Przede wszystkim, proces wymiany jonowej posłużył i służy nadal powszechnie, do usuwania z wody substancji jonowych w niej rozpuszczonych, tzn. był i jest wykorzystywany do oczyszczania i uzdatniania wód przemysłowych, głównie w energetyce. Celem jest zmniejszenie zasolenia wody do poziomu wymaganego przez odbiorcę. Jonitowe uzdatnianie wody znajduje zastosowanie do zmiękczenia wody poprzez odsalanie i demineralizację, w tym do usuwania fosforanów i azotanów, usuwania azotu amonowego, metali i radionuklidów, a także do usuwania niektórych zanieczyszczeń organicznych z wody.

Chromatografia jonowymienna znajduje szerokie zastosowanie, nie tylko do rozdzielania trwałych jonów nieorganicznych, ale także do rozdzielania różnych jonizowalnych substancji polarnych, takich, jak białka, peptydy, aminokwasy, nukleotydy, kwasy nukleinowe, fragmenty i całe cząsteczki DNA i RNA, cukry, polifenole i inne.

Główne analityczne zastosowania chromatografii jonowymiennej to:

- oznaczanie zawartości anionów, albo/i kationów w wodach i ściekach, począwszy od szczególnie czystych wód stosowanych w technologii półprzewodników i w elektrowniach atomowych poprzez wodę pitną, różne rodzaje wody mineralnej, wodę morską, wody powierzchniowe, surowe i oczyszczone ścieki, kończąc na płynach galwanizacyjnych i różnego rodzaju silnie zanieczyszczonych wodach procesowych w technologii chemicznej i w petrochemii;
- oznaczanie zawartości anionów i kationów w płynach fizjologicznych, w lekach, żywności, paszach, napojach itp.

- oznaczanie zawartości aminokwasów, peptydów, białek, w tym enzymów i koenzymów, cukrów, nukleotydów, RNA, DNA w materiałach pochodzenia biologicznego, albo syntetycznego;
- oznaczanie zawartości pierwiastków, możliwych do przeprowadzenia do postaci jonowej w rudach, w glebie, w materiałach rozszczepialnych i inne.

Oprócz zastosowań analitycznych chromatografia jonowymienna ma ogromny obszar zastosowań preparatywnych i produkcyjnych w technologii chemicznej, w przemyśle farmaceutycznym i w biotechnologii. Do tych zastosowań należą przede wszystkim:

- otrzymywanie lantanowców i trans-uranowców z ich rud oraz z materiałów powstających w wyniku przemian jądrowych;
- izolacja w postaci czystej ważnych farmakologicznie aminokwasów, peptydów, białek, enzymów, nukleotydów, cukrów i polocukrów oraz wielu kwasów i zasad organicznych i inne.

Proces rozdzielania w chromatografii jonowymiennnej, zgodnie z nazwą metody, opiera się na wykorzystaniu procesów wymiany jonów, lub tylko na wykorzystaniu oddziaływań jon indukowany - jon indukowany między powierzchnią fazy stacjonarnej, a fazą ruchomą i jonowymi, lub jonizowanymi składnikami roztworu substancji rozdzielanych. Najczęściej wykorzystuje się w tym celu pakowane kolumny, a bardzo rzadko już dzisiaj cienkowarstwową fazę stacjonarną (np. w formie celulozowej bibuły, gdzie proces rozdzielania ma często także jonowymienny charakter, przy słabych oddziaływaniach jonowymiennych).

Wyniki rozdzielania jonów i substancji przeprowadzonych do postaci zjonizowanej, albo tylko jonizowalnej, ilustruje rys. 6.8-6.10 dotyczący przypadku rozdzielania anionów z zastosowaniem sorbentu, zwanego ogólnie anionitem oraz tabele 6.3 i 6.10 dotyczące wymiany jonowej kationów na sorbencie zwanym kationitem.

W typowej chromatografii jonowymiennnej mamy do czynienia z prowadzoną w warunkach dynamicznych równowagową reakcją chemiczną, w której faza stacjonarna jest jednym z reagentów, a rolę stężenia tego reagentu w równaniu równowagi chemicznej, pełni powierzchnia właściwa sorbentu i stopień obsadzenia tej powierzchni grupami funkcyjnymi, odpowiednio o charakterze zasadowym w przypadku anionitu i o charakterze kwasowym, w przypadku kationitu. Rodzaj i stężenie jonów odpowiedniego znaku, zawartych w eluencie, decyduje o sile elucyjnej eluentu, którego jony konkurują z jonami analitu w procesie wymiany jonowej w kolumnie.

Jonem wymienianym z jonami analitu może być proton, kation sodu, potasu, litu, wapnia itp - w przypadku, kationitów oraz anion hydroksylowy, chlorkowy, azotanowy-5, siarczanowy-6, wodorosiarczanowy-6, fosforanowy-5, wodoro - lub dwuwodoro- fosforanowy-5, octanowy, węglanowy-4, lub wodorowęglanowy-4, boranowy i inne - w przypadku anionitu. Zależy to od składu jonowego eluentu - inaczej, niż ma to miejsce w przypadku wykorzystania kationitów i anionitów w procesie oczyszczania wody lub w innych procesach adsorpcji jonowymiennnej, gdy łatwo odszczepialny przeciwjon zostaje uprzednio związany na powierzchni wymiennicza jonowego w procesie przygotowania, albo regeneracji jonitu.

Podobne procesy o znacznie słabszych energiach oddziaływania mogą zachodzić także, gdy mamy do czynienia nie z trwałymi jonami, ale z substancjami jonizowalnymi, lub bardzo silnie polaryzowalnymi pod wpływem oddziaływania z jonami, albo pod wpływem pola elektrycznego.

Rozróżniamy mocne i słabe wymiennicze jonowe.

- Mocne kationity w postaci sprotonowanej, charakteryzujące się niską wartością pH (niższą od 2). Grupami aktywnymi są najczęściej grupy alkilo-, albo arylo- sulfonowe związane wiązaniem kowalencyjnym z powierzchnią polimerowego, albo krzemionkowego, lub innego typu nośnika.

- Mocne anionity w postaci hydroksylowej, charakteryzujące się wysokim pH (wyższym od 10). Grupą aktywną jest najczęściej grupa tetraalkilo-, albo tetraarylo- amoniowa związana wiązaniem kowalencyjnym z powierzchnią polimerowego, albo krzemionkowego, lub innego typu nośnika.
- Słabe kationity zawierają na powierzchni sorpcyjnej grupy karboksylowe. W postaci sprotonowanej charakteryzują się stosunkowo wysokimi wartościami pH (2-7),
- Słabe anionity zawierają aminy i pH ich hydroksylowej postaci wynosi 7 - 10. Przy czym, słaby kationit jest tym mocniejszym kationitem, im wyżej rzędowa jest amina związana na powierzchni nośnika.

Należy przy okazji zwrócić uwagę, że z wykorzystaniem sorbentów typu C18 można także przygotować stosunkowo trwale wymiennicze jonowe. Dokonuje się tego poprzez zaadsorbowanie na powierzchni C18 grupy alkilosulfonowej, albo alkiloamoniowej, lub kwasu karboksylowego, albo alkiloaminy lub alkilo-alkanoloaminy z roztworu wodnego, lub z wodnego roztworu, zawierającego niewielką zawartość metanolu, albo acetonitrylu. Trzeba pamiętać, aby w przypadku tak przygotowanych wymienniczy jonowych stosować eluentów zawierających wyższe od 5% zawartości modyfikatora w postaci alkoholu, albo acetonitrylu, czy THF'u. W przeciwnym razie nastąpi desorpcja związku jonowymiennego.

Należy także pamiętać, aby dla wymienniczy jonowych, związanych kowalencyjnie z żelazem krzemionkowym, nie wykraczać pH eluentu poza zakres 1,8 do 8,7, ponieważ może nastąpić hydroliza wiązania Si-O-C- i trwała utrata właściwości jonowymiennych sorbentu!

6.4.3. BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI WYMIENIACZY JONOWYCH

Wymiennicze jonowe (jonity) stosowane w jonowymiennej chromatografii, to ciała stałe o rozwiniętej powierzchni, nierozpuszczalne w wodzie i w innych rozpuszczalnikach, posiadające zdolność wymiany jonów z roztworem. W zależności od rodzaju grup wymiennych dzielimy je na dwie grupy:

- kationity - jonity wymieniające kationy z roztworu w eluencie;
- anionity - jonity wymieniające aniony z roztworu w eluencie.

Znane są też wymiennicze amfoteryczne, które w zależności od pH roztworu mają zdolność wymiany anionów lub kationów, a także wymiennicze bipolarne, które mogą jednocześnie wymieniać obydwa rodzaje jonów. Nie znalazły one dotychczas szerszego zastosowania w praktyce, chociaż ciągle trwają badania nad rozwojem ich zastosowań.

Właściwości wymienniczy jonowych są różne w zależności od pochodzenia jonitu. Według kryterium pochodzenia wymiennicze jonowe można podzielić na następujące trzy grupy:

- *Jonity naturalne;*

Są to głównie kationity pochodzenia mineralnego czyli glinokrzemiany. Największe zastosowania znalazły zeolity o składzie $\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot n\text{SiO}_2 \cdot m\text{H}_2\text{O}$.

- *Jonity półsyntetyczne;*

Najpopularniejsze z nich to tzw. węgle sulfonowane o nazwach handlowych Permutyt-H, Zeocarb HJ, Wofatit-X.

- *Jonity syntetyczne;*

Pierwszymi wymienniczymi z tej grupy były syntetyczne związki typu glinokrzemianów - żele i permutyty, jednak ze względu na znikomą zdolność wymiany jonów w środowisku kwaśnym oraz nietrwałość, nie znalazły szerszego zastosowania.

Najważniejsze syntetyczne wymiennicze jonowe to jonity, otrzymane w wyniku syntezy związków organicznych, czyli "klasyczne" żywice jonowymiennie.

"Klasyczne" żywice jonowymiennie - są to wielkocząsteczkowe polimery organiczne nierozpuszczalne w wodzie i w większości rozpuszczalników organicznych, zawierające czynne chemicznie grupy funkcyjne zdolne do wymiany jonów w roztworze elektrolitu.

Żywice jonowymienną można potraktować jako polielektrolit z nierozpuszczalnym polijonowym rdzeniem i ruchliwymi zdolnymi do wymiany jonami przeciwnego znaku. Mają one dużą zdolność wymiany jonów, dużą trwałość chemiczną i znaczną trwałość mechaniczną. Dają się formować w ziarna o pożądanym wymiarach, a dzięki możliwości wyboru różnych grup funkcyjnych związanych z matrycą polimeru, można w szerokich zakresach modelować ich właściwości pod kątem konkretnych potrzeb.

Do tej grupy można też zaliczać syntetyczne wymiennicze jonowe to także jonity, otrzymane w wyniku chemicznej modyfikacji powierzchni żelu krzemionkowego grupami alkilo-, albo arylo- sulfonowymi, karboksylowymi, lub aminowymi również sorbenty otrzymane poprzez "immobilizację" substancji o hydrofobowej części cząsteczki, zawierającej grupy sulfonowe, karboksylowe, amoniowe itd. na powierzchni sorbentów typu C18 i wykorzystywane z eluentami będącymi wodnymi roztworami soli.

W żywicach kationowymiennych grupy funkcyjne mają charakter kwasowy i ulegając jonizacji z odszczepieniem jonu H^+ mogą ten jon wymieniać na inne kationy z roztworu. Najczęściej w centrach aktywnych występują grupy funkcyjne: sulfonowe ($-SO_3H$), karboksylowe ($-COOH$), aminodiocjanowe ($-N\{CH_2COOH\}_2$), fenolowe ($-C_6H_4OH$), fosfonowe ($-PO_3H_2$), pochodne kwasu alkilo, albo arylo fosforowego - 5 i "fosfinowe" ($-PO_2H$, pochodne kwasu alkilo, albo arylo fosforowego 3).

W żywicach anionowymiennych grupy funkcyjne mają charakter zasadowy i są to zwykle czwartorzędowe grupy amoniowe ($-NR_3^+$) oraz trzecio- i drugorzędowe sprotonowane aminy ($-NR_2H^+$, $-NRH_2^+$) lub grupy dialkylsulfoniowe ($-SR_2^+$). Duża liczba grup funkcyjnych w żywicy jonowymiennie powoduje zwiększenie powinowactwa matrycy jonitu do roztworu elektrolitu, co może doprowadzić do rozpuszczenia jonitu w eluencie. Aby temu zapobiec rdzeń żywicy jonowymiennie tworzy się w postaci polimerów usieciowanych przestrzennie. Tak otrzymane jonity są nierozpuszczalne w wodzie i w wodnych roztworach soli, kwasów i zasad, lecz pęcznią w nich wskutek pochłaniania rozpuszczalnika. Stopień pęcznienia maleje ze wzrostem stopnia usieciowania. Zależy on także od takich czynników jak: siła jonowa i pH roztworu, temperatura i rodzaj wymienianych jonów. Pęcznienie jonitu jest zjawiskiem korzystnym, ułatwia bowiem migrację jonów wewnątrz żywicy i przyspiesza proces wymiany masy. Jednak obniża mechaniczną wytrzymałość ziaren jonitu na działanie sił ciśnienia i tego typu jonity nie mogą być stosowane przy wysokich ciśnieniach pompowania eluentu. Zbyt słabe usieciowanie pogarsza wytrzymałość mechaniczną, selektywność i pojemność jonowymienną żywicy. Usieciowanie zbyt duże może, jednak, uniemożliwić skuteczną wymianę większych jonów.

Wymiennicze jonowe na bazie polimerów organicznych mają silnie rozwiniętą powierzchnię, co pozwala jonom i rozpuszczalnikowi swobodnie dyfundować do wnętrza sieci i wchodzić w reakcje jonowymiennie. Stąd charakteryzuje się wysoką pojemnością jonową.

6.5. CHROMATOGRFIA JONOWA - OGÓLNE REGUŁY WPŁYWANIA NA RETENCJĘ I ZALECENIA PRAKTYCZNE

6.5.1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA

Za datę powstania wysokosprawnej elucyjnej chromatografii jonowymiennie, jako techniki analitycznej, zwanej później, chromatografią jonową, przyjmuje się rok 1975. Wtedy w Chica-

go, w USA, zaprezentowano pierwszy handlowy chromatograf, który pozwalał na szybkie rozdzielanie i identyfikację głównych nieorganicznych i organicznych anionów.

Chromatografia jonowa, znajduje zastosowanie głównie jako procesowa metoda rozdzielania i oznaczania jonów tzn. jako technika analityczna.

Wykorzystuje się kilka mechanizmów separacji oraz technik detekcji w celu oznaczenia indywidualnych jonowych w zakresie od $\mu\text{g/l}$ (ppb) do g/l . Dostępne metody pozwalają z reguły na optymalny wybór warunków rozdzielania i detekcji, a w rezultacie na optymalne rozwiązanie szczegółowego problemu analitycznego. Jednak osiągnięcie optymalnych warunków jest często niełatwe.

Rozdzielanie odbywa się dzięki wykorzystaniu różnic stanów równowagi podziału jonowych składników analitu pomiędzy jonową fazę ruchomą i fazę stacjonarną o zjonizowanej powierzchni sorpcyjnej. Skład i budowa fazy stacjonarnej mają kluczowe znaczenie dla procesu rozdzielania.

Wysokosprawna chromatografia jonowymienna (tzw. chromatografia jonowa: *IC - Ion Chromatography* albo *HPIC - High Performance Ion Chromatography*) jest, więc, odmianą chromatografii jonowymienną, w której stosuje się wysokosprawne kolumny rozdzielające, wypełnione jednorodnymi żywicami o małych ziarnach, otrzymanymi z zastosowaniem specjalnych technologii. Detekcja, najczęściej konduktometryczna, po uprzedniej "supresji" jonów eluentu.

Do podstawowych zalet chromatografii jonowej należą:

- możliwość jednoczesnego oznaczania nawet do kilkudziesięciu jonów w próbce;
- stosunkowo krótki czas analizy;
- granica oznaczalności na poziomie ppb, a nawet niższym, przy wykorzystaniu wstępnego wzbogacenia próbki i/albo specjalnych metod detekcji (AAS, ICP, ICP-MS);
- niewielka ilość próbki potrzebna do wykonania oznaczenia;
- możliwość stosowania różnych detektorów chromatograficznych;
- prosty sposób przygotowania próbki;
- możliwość jednoczesnego oznaczania kationów i anionów lub jonów organicznych i nieorganicznych;
- wysoka selektywność wobec oznaczanych jonów w próbkach o złożonej matrycy.

Tabela 6.1. Podstawowe różnice między chromatografią jonowymienną i wysokosprawną chromatografią jonowymienną (chromatografią jonową)

Lp	Chromatografia jonowymienna	Chromatografia jonowa z detekcją konduktometryczną
1	Eluenty o wysokiej sile jonowej (0,1-10 M)	Eluenty o niskiej sile jonowej (0,1-10 mM)
2	Oznaczanie najwyżej kilku jonów	Oznaczanie mieszanin wielu różnych jonów
3	Żywice rozdzielające o dużej pojemności jonowej	Żywice rozdzielające o małej pojemności jonowej
4	Brak "tłumienia" (supresji jonów eluentu)	Konieczne "tłumienie" (supresja jonów eluentu)
5	Stosunkowo długi czas trwania oznaczeń	Szybkie i precyzyjne oznaczanie jonów
6	Detekcja z wykorzystaniem klasycznych metod w zależności od oznaczanego składnika	Uniwersalna detekcja konduktometryczna po uprzedniej supresji jonów eluentu
7	Próg detekcji ograniczony czułością wybranej metody analitycznej	Próg detekcji ograniczony wartością przewodnictwa oznaczanych jonów

W konsekwencji, bardzo wiele oznaczeń nieorganicznych i organicznych jonów w różnego rodzaju próbkach wykonuje się z użyciem tej techniki.

W porównaniu z klasyczną chromatografią jonowymienną - wysokosprawną chromatografią jonowymienną (chromatografia jonowa) jest techniką wydajniejszą, szybszą, czulszą i dającą bardzo dobrą powtarzalność uzyskiwanych wyników. Zasadnicze różnice pomiędzy tymi technikami chromatograficznymi podano w tabeli 6.1.

6.5.2. MECHANIZMY ROZDZIELANIA, DOBÓR WARUNKÓW ELUCJI, DETEKCJI I OZNACZANIA

Wypełnienia kolumn jonowymiennych HPIC stanowią żywice ze związanymi jonowymi grupami funkcyjnymi o stałym ładunku (tzw. jony związane). W wyniku dysocjacji elektrolitycznej przeciwjony, połączone pierwotnie z jonami związanymi, przechodzą do eluentu i mogą być zastępowane identycznymi, albo różnymi przeciwjonami, zawartymi w eluencie, oraz jonami, będącymi składnikami analitu. W konsekwencji w bezpośrednim otoczeniu jonów związanych znajdują się różne przeciwjony, pozostające w warunkach dynamicznej równowagi z jonami związanymi (pierwotne przeciwjony, przeciwjony, będące składnikami eluentu oraz przeciwjony będące składnikami analitu). Zapewnia to elektryczną obojętność układu oraz warunki konkurencyjnych oddziaływań sorpcyjnych, zwłaszcza o charakterze jonowymiennym.

Przeciwjon chwilowo związany z powierzchnią wymiany jonowej zostaje zastąpiony przez jon substancji rozpuszczonej w eluencie, albo jon analitu, a ten pierwszy jest czasowo przekazywany do eluentu i niekiedy wiąże się, dodatkowo, z jonem analitu (powstaje wiązanie jonowe, albo tzw. para jonowa, które pozostają w równowadze dysocjacyjnej z odpowiednimi jonami). Jony analitu, stanowiące składniki próbki, różnią się między sobą czasem przebywania wewnątrz kolumny, wynikającym z ich różnego powinowactwa do fazy stacjonarnej, o którą konkurują z jonami eluentu, co łącznie, jest bezpośrednią przyczyną rozdzielania.

W przypadku przedstawionym na rys.6.3., wypełnienie wysokosprawnej kolumny do chromatografii jonowej stanowią silnie porowate ziarna o średnicy ok. 5.0 , 8.5 , albo 10 μm , wykonane z sieciowanego kopolimeru etylenodiwinylobenzenu (45%) i diwinylobenzenu (55%). Na powierzchni znajdują się chemicznie związane grupy sulfonowe i związane z nimi 65 nm kulki lateksowe ze szczepionymi czwartorzędowymi grupami amoniowymi, stanowiącymi powierzchnię wymiany jonowej.

Selektywność i sprawność rozdzielania

W chromatografii jonowej, podobnie, jak w przypadku innych rodzajów elucyjnej chromatografii kolumnowej selektywność fazy stacjonarnej, w powiązaniu ze sprawnością kolumny można w praktyce scharakteryzować na podstawie zależności (1) poprzez, wyznaczenie doświadczalnie, stopnia rozdzielania pików:

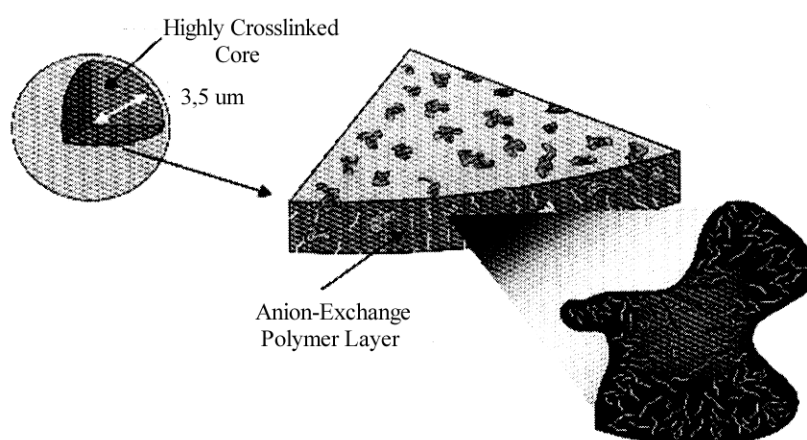
$$R_s = \frac{2d}{w_1 + w_2} \quad (1)$$

gdzie: d - odległość między maksimum kolejnych pików;
 w_1 i w_2 - szerokości podstawy pików.

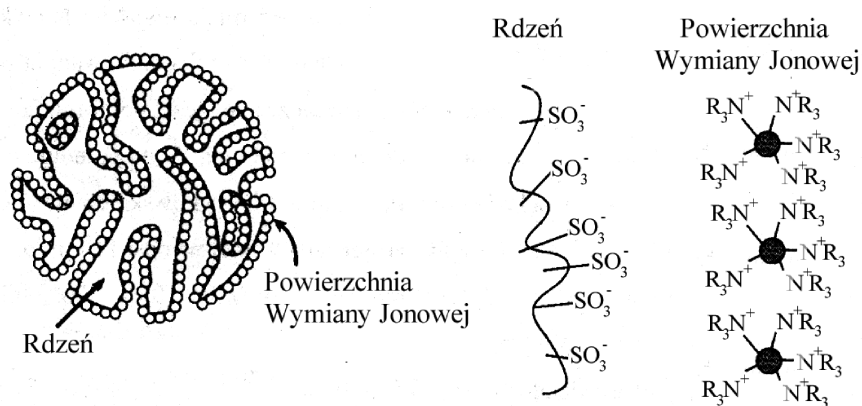
Substancje są tym lepiej rozdzielone im wartość R_s jest większa. Są one rozdzielone do linii podstawowej, gdy R_s jest wyższe od 1.5. Jeżeli $R_s = 1$, to piki o podobnej wysokości (substancje im odpowiadające) są rozdzielone w ok. 96%. Zakładając stopień rozdzielania, jaki chcemy uzyskać dla dwóch rozdzielanych substancji i uwzględniając parametry selektywności układu

Tabela 6.2. Fazy stacjonarne (jonity) stosowane w HPIC.

Jonit	Grupa jonowymienna
Anionity	
- silnie zasadowe	$-N^+(CH_3)_3$, $-N^+(CH_3)_2C_2H_4OH$
- średnio i słabo zasadowe	$-NH_2$, $=NH$, $-N^+R_2H$, $-N^+RH_2$
Kationity	
-silnie kwasowe	$-SO_3^-$, $-PO_3^{2-}$
-średnio kwasowe	$-COO^-$
-słabo kwasowe	$-CH_2N(CH_2COO^-)_2$
-bardzo słabo kwasowe	$-OH$
Amfoteryczne	$-COO^-$ i $-N^+(CH_3)_3$ równocześnie, albo inne



Rys. 6.2. Struktura pojedynczej cząstki w IonPac® AS14 (Dionex Co).



Rys.6.3. Przykład struktury wypełnienia kolumny do HPIC anionów (AS 10, Dionex Co.).

oraz sprawność kolumny opisaną wartością wysokości półki teoretycznej (H), na podstawie zależności (2) można obliczyć potrzebną liczbę półek teoretycznych (N), a stąd, na podstawie zależności (3), długość kolumny (L_C), konieczną do osiągnięcia tej rozdzielczości:

$$N = 16R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{k+1}{k} \right)^2 \quad (2)$$

$$L_C = N \cdot H \quad (3)$$

gdzie: α - retencja względna (k_2/k_1),
 k - współczynnik retencji (dokładnie: wartość k_2 , albo w przybliżeniu: wartość średnia z k_2 i k_1).

O czasie retencji rozdzielanych jonów decydują przede wszystkim liczba i rodzaj jonowymiennych grup funkcyjnych związanych na powierzchni sorpcyjnej jonitu, ale także siła jonowa i rodzaj eluentu, pH eluentu oraz rodzaj jonów analitu. Grupy silnie kwasowe i silnie zasadowe są na powierzchni sorpcyjnej jonitu zdysocjowane w szerokim zakresie pH, a zwiększenie ilości miejsc aktywnych w jednostce objętości wypełnienia kolumny powoduje dłuższe zatrzymanie jonów w kolumnie. Reakcje wymiany jonowej zachodzą stechiometryczne tj. w ten sposób, że na mol każdego jonu, który wiąże się z żywicą - przypada określona ilość moli innego jonu przechodzącego do roztworu. Są to reakcje odwracalne. Na przykład:

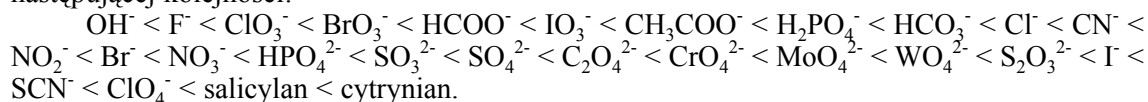


Aktywność jonów związanych z powierzchnią żywicy jest trudna do oceny ilościowej, lecz reakcję odwracalną zapisaną powyżej można opisać ilościowo stosując stałą wymiany masy i określając tzw. współczynnik selektywności K opisany zależnością (5). Jest on miarą powinowactwa jonu próbki do grupy jonowymiennej na powierzchni żywicy względem powinowactwa jonu eluentu.

$$K = \frac{[\text{żywica} - \text{SO}_3^- \text{Na}^+] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{żywica} - \text{SO}_3^- \text{H}^+] \cdot [\text{Na}^+]} \quad (5)$$

Współczynnik ten stosuje się jako miarę selektywności żywicy obsadzonej jednym jonem względem obsadzenia jej innym jonem. Im jest on wyższy, tym dłużej jon będzie pozostawał przyłączony do grupy jonowymiennej i później będzie eluowany z kolumny.

Współczynnik selektywności, a w konsekwencji i czas retencji anionów rozdzielanych na typowych silnie zasadowych żywicach anionowymiennych można uszeregować orientacyjnie w następującej kolejności:



Dla kationów rozdzielnych na silnie kwasowym kationicie porządek ten przedstawia się, orientacyjnie, następująco: $\text{Li}^+ < \text{H}^+ < \text{Na}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{K}^+ < \text{Rb}^+ < \text{Cs}^+ < \text{Ag}^+ < \text{Tl}^+ \ll \text{UO}_2^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Pb}^{2+} < \text{Ba}^{2+} \ll \text{Al}^{3+} < \text{Sc}^{3+} < \text{Y}^{3+} < \text{Eu}^{3+} < \text{Pr}^{3+} < \text{Ce}^{3+} < \text{La}^{3+} \ll \text{Pu}^{4+}$.

Widać, że jony trójwartościowe są silniej związane z żywicą niż jony dwu- lub jednowartościowe. Oznacza to, że dla wymycia jonów trójwartościowych należy używać znacznie mocniejszych eluentów niż do elucji jonów dwu- lub jednowartościowych. Jony o tej samej wartościowości, lecz o większym promieniu jonowym są silniej zatrzymywane przez żywicę niż jony o małym promieniu jonowym. W przypadku rozdzielania jonów tzw. metali ciężkich trzeba pamiętać, że mają one szczególnie dużą tendencję do tworzenia jonów kompleksowych (także z cząsteczkami wody) i praktycznie w roztworze nie występują jony nie skompleksowane.

Ważnym parametrem stosowanym do oceny wypełnień kolumn chromatograficznych jest stała podziału k , czyli stosunek stężenia oznaczanego składnika "i" w fazie stacjonarnej do jego stężenia w fazie ruchomej. Stężenie w roztworze oblicza się na jednostkę objętości.

Zdolność wymiany jonów jak i położenie miejsc aktywnych określone są już na etapie wytwarzania wypełnienia kolumny. Rozwinięcie powierzchni wymiany jonowej jest osiągane zazwyczaj poprzez wytworzenie makro i mikroporów w ziarnach żywicy. Inną technologią jest wiązanie mikroziaren wykonanych z lateksu na powierzchni porów, albo na powierzchni nieporowatych ziaren. Mikroziarna te utrzymują się dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym pomiędzy grupami sulfonowymi i amoniowymi (patrz rys. 6.3).

Wykorzystanie przy wyborze eluentu pojęcia współczynnika selektywności, pozwala sformułować następujące wnioski:

- Ze wzrostem wartościowości jonu analitu, rośnie jego powinowactwo do grupy jonowymiennnej np. jony trójwartościowe są związane silniej niż jony dwuwartościowe. Oznacza to, że dla jonów trójwartościowych należy użyć silniejszego eluentu (o wyższej wartościowości przeciwjonu, o dużo wyższej sile jonowej), niż dla jonów dwuwartościowych. Ogólnie można stwierdzić, że dla elucji jonu trój-, dwu- lub jednowartościowego należy stosować odpowiednio trój-, dwu- lub jednowartościowy eluent;
- dla jonów o tej samej wartościowości, im większy jest promień jonowy i polaryzowalność jonu, tym jon jest silniej zatrzymywany;
- jony charakteryzujące się silnym oddziaływaniem hydrofobowym lub Van der Waalsa z matrycą, mimo słabszych oddziaływań jonowymiennych, będą eluowane później, niż jony o słabszych oddziaływaniach hydrofobowych, a jednocześnie o słabszych oddziaływaniach jonowymiennych. Dla przykładu: jony połączone z pierścieniami aromatycznymi będą znacznie silniej wiązać się z żywicą polistyrenową niż jony nie posiadające pierścienia aromatycznego. Dodatek acetonitrylu, albo metanolu do eluentu powinien tę kolejność odwrócić, jak to ilustruje tabela 6.3. Należy, więc, zwrócić uwagę na możliwość występowania, dodatkowo, mechanizmu faz odwróconych, oprócz mechanizmu jonowymiennego. Gdy, wówczas, do eluentu stanowiącego wodny roztwór soli / kwasu / zasady dodamy AcCN, lub alkohol, to obniżamy siłę jonową eluentu z powodu obniżenia stopnia dysocjacji jonów. Jednak, dzięki eliminacji oddziaływań hydrofobowych, jony zawierające grupy hydrofobowe (alkilowe, aryłowe itd.) zaczynają być znacznie szybciej eluowane, tak, jak to wynika z ich zasadowości / kwasowości oznaczonej w roztworze z wodą. Przykład zmian czasu retencji kilku jonów i alaknolamin i innych jonów w zależności od składu eluentu przedstawiono w tabeli 6.3.

O charakterystyce kolumny wypełnionej żywicą jonowymienną decyduje, więc, rodzaj żywicy, stopień jej usieciowania, rodzaj i ilość grup jonowymiennych, skład eluentu, a także wartość średnia i rozkład wielkości cząstek wypełnienia i jakość upakowania kolumny.

Skład eluentu, detekcja konduktometryczna, supresja jonów eluentu

Skład eluentu jest dobierany przede wszystkim w ten sposób, aby zapewnić dostateczne rozdzielanie oznaczanych jonów. Sterować można rodzajem przeciwjonu, pH i siłą jonową elu-

Tabela 6.3. Wpływ składu eluentu na retencję alkanoloamin i innych kationów. Kolumna: Nucleosil® 5 SA 250x4.6 mm, natężenie przepływu eluentu 2.0 ml/min, temperatura 25°C. (-) piki odwrotne, brak elucji w czasie 30 min.

Skład eluentu	Czas retencji [min]											
	pH	Bicyna	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	MEA	DEA	MDEA	BDEA	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Fe ²⁺
0.15M KH ₂ PO ₄ ⁺ 0.0178M H ₃ PO ₄	2.9	2.05	2.45(-)	2.60	2.93	2.80	3.25	4.40	10.20	3.80	4.43	3.60
0.088M KH ₂ PO ₄ ⁺ 0.0178M H ₃ PO ₄	2.8	2.25	3.19(-)	3.43	3.41	3.80	4.60	6.60	15.60	8.11	9.60	8.04
0.05M KH ₂ PO ₄ ⁺ 0.0178M H ₃ PO ₄	2.7	2.63	4.03(-)	4.40	5.00	4.95	6.15	8.95	23.60	18.20	24.3	16.2
0.15M NaH ₂ PO ₄ ⁺ 0.0178M H ₃ PO ₄	2.7	2.25	2.85(-)	3.10	3.25	3.50	4.30	6.30	17.30	6.40	8.15	6.10
0.01M NaH ₂ PO ₄ ⁺ 0.0178M H ₃ PO ₄	2.7	2.65	3.56(-)	3.84	4.00	4.44	5.56	8.37		11.30	13.7	11.2
93:7 v/v 0.145M KH ₂ PO ₄ ⁺ 0.017M H ₃ PO ₄ : ACN	3.2	1.95(-)	2.50(-)	2.65	3.10	2.75	3.05	3.70	5.70	3.87	4.65	3.72
80:20 v/v 0.12M KH ₂ PO ₄ ⁺ 0.0142M H ₃ PO ₄ : ACN	3.4	1.90(-)	2.60(-)	2.73	3.45	2.85	3.00	3.50	4.50	4.15	5.00	3.90
67:33 v/v 0.10M KH ₂ PO ₄ ⁺ 0.012M H ₃ PO ₄ : ACN	3.6	2.30	2.87(-)	2.98	3.65	3.03	3.15	3.55	4.00	4.45	5.35	4.10

entu. Dla mocnych kationitów i anionitów można stwierdzić, ogólnie, że im wyższa siła jonowa eluentu, tym wyższa jego siła elucyjna, natomiast pH winno być stałe i tak dobrane, aby zapewniło dysocjację jonów rozdzielanych substancji i jonów związanych z powierzchnią żywicy. Rodzaj przeciwjonu winien być dostosowany do stopnia powinowactwa jonów rozdzielanych do powierzchni wymiennicza jonowego. Dobierając stężenie składników eluentu, oprócz wymaganej siły elucji, należy, więc, brać pod uwagę pH eluentu, które, jak wspomniano, należy tak dobrać, aby wszystkie oznaczane substancje były zdysocjowane ($\text{pH}(\text{eluentu}) > pK_a$ (najsłabiej dysocjującego kwaśnego składnika próbki), albo $\text{pH}(\text{eluentu}) < pK_b$ (najsłabiej dysocjującego zasadowego składnika próbki)). Musi być ono jednocześnie zawarte w zakresie dopuszczalnego pH dla stosowanej fazy stacjonarnej! Należy też brać pod uwagę, opisaną powyżej, możliwość istnienia oddziaływań hydrofobowych z powierzchnią polimerowej fazy stacjonarnej.

Na dobór jonów eluentu w chromatografii jonowej ma też wpływ stosowana technika detekcji. Do detekcji anionów i kationów stosuje się współcześnie bardzo często detektor konduktometryczny. Jednak, wysoką czułość tego detektora wobec oznaczanych jonów, można uzyskać tylko wtedy, gdy przewodnictwo eluentu zostanie zredukowane do minimum (najlepiej do przewodnictwa wody), co realizuje się z wykorzystaniem tzw. supresora jonów eluentu.

Można wyróżnić dwie techniki supresji jonów i z punktu widzenia zastosowanej techniki supresji jonów, elenty można podzielić na dwie grupy:

- 1) elenty stosowane z jonowymiennymi supresorami kolumnowymi, wymieniającymi np. jon Na^+ na H^+ , albo/i Cl^- na OH^- , w czego konsekwencji powstaje woda - tzn. z supresją polegającą na chemicznym tłumieniu przewodnictwa jednego, albo kilku jonów eluentu (wykorzystanie, oprócz kolumny rozdzielającej jony, dodatkowej kolumny supresyjnej, wypełnionej kationitem, anionitem, albo ich mieszaniną - kolumny poddawanej okresowo regeneracji) - "dwukolumnowa chromatografia jonowa", obecnie już coraz rzadziej wykorzystywana;
- 2) elenty stosowane z membranowymi urządzeniami do tłumienia przewodnictwa eluentu (wykorzystaniem zjawiska osmozy, albo elektroosmozy) "jednokolumnowa chromatografia jonowa z membranowym supresorem", albo z tzw. "autosupresorem".

Elenty należące do pierwszej grupy powinny charakteryzować się możliwością uzyskania znikomego przewodnictwa jonowego po chemicznej modyfikacji, jaka ma miejsce podczas przejścia eluentu przez kolumnę supresyjną, a elenty drugiego rodzaju, podobnie niskim przewodnictwem, po przejściu przez supresor membranowy.

Gdy nie ma konieczności oznaczania bardzo niskich stężeń jonów, można wykorzystywać detektor konduktometryczny do oznaczania anionów bez supresora jonów, a jedynie z elektroniczną kompensacją przewodnictwa eluentu. W roli eluentu stosuje się wtedy najczęściej roztwory kwasu benzoowego, ftalowego, albo o-sulfobenzoowego o stężeniach od 0,1 do 1,0

Tabela 6.4. Często stosowane elenty w HPIC anionów z detekcją konduktometryczną i chemicznym tłumieniem przewodnictwa eluentu.

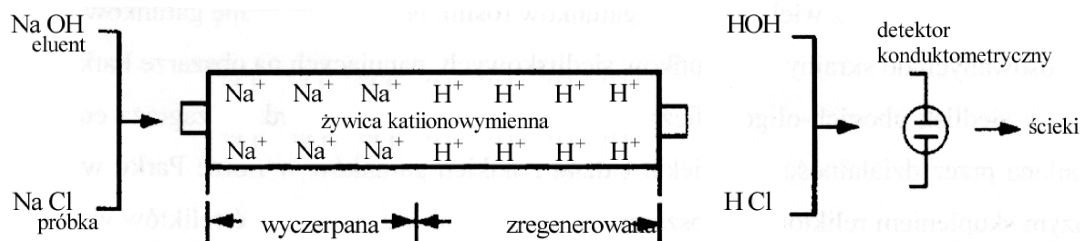
Eluent	Jon eluentu	Produkt supresji	Siła elucji
Na_2CO_3	CO_3^{2-} , Na^+	$[\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2]$, $[\text{H}_2\text{O}]$	Silny
$\text{RNHCH}(\text{R}')\text{SO}_3^{2-}/\text{NaOH}$	$\text{RNHCH}(\text{R}')\text{SO}_3^{2-}$	$\text{RNH}_2 + \text{CH}(\text{R}')\text{SO}_3^{2-}$	Dość silny
$\text{H}_2\text{NCH}(\text{R})\text{CO}_2\text{H}/\text{NaOH}$	$\text{H}_2\text{NCH}(\text{R})\text{CO}_2^-$	$\text{H}_3\text{N} + \text{CH}(\text{R})\text{CO}_2^-$	Dość silny
$\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$	$[\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2]$	Dość silny
NaHCO_3	HCO_3^-	$[\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2]$	Słaby
NaOH	OH^-	H_2O	Słaby
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$	H_3BO_3	Bardzo słaby

mM/dm³ i pH od 4 do 7, których powinowactwo do żywic anionowymiennych jest duże, a przewodnictwo elektrolityczne, stosunkowo niskie.

Z tabeli 6.4 wynika, że eluentami stosowanymi w chromatografii jonowej (HPIC) anionów z detekcją konduktometryczną i chemicznym tłumieniem przewodnictwa mogą być m.in. sole słabych kwasów (w tym aminokwasów), których aniony są protonowane w rezultacie supresji kationu Na⁺. Powstające podczas supresji słabe kwasy są zdysocjowane w bardzo niewielkim stopniu i wnoszą niewielki udział do całkowitego przewodnictwa elektrolitu.

Supresory jonów eluentu

Już w początkowej fazie rozwoju wysokosprawnej chromatografii jonowymiennnej opracowano metodę zmniejszającą sygnał przewodności wynikający z przewodnictwa eluentu (Hamish Small, 1975). Problem ten rozwiązano, początkowo, poprzez zastosowanie drugiej kolumny jonowymiennnej (kolumny tłumienia), umieszczonej za kolumną analityczną. W kolumnie tej, wypełnionej silnie kwasową żywicą kationowymienną, następuje wymiana kationu eluentu na jon wodorowy. Składniki eluentu opuszczają kolumnę tłumienia w postaci słabo zdysocjowanej. Na przykład, gdy w chromatografii anionów eluentem jest roztwór wodorotlenku, po procesie supresji kolumnę tłumienia opuszczają elektrycznie obojętne cząsteczki wody. Natomiast aniony próbki, które z jonami wodorowymi tworzą mocniejsze kwasy, docierają do naczynka konduktometrycznego w postaci zdysocjowanej, gdzie są wykrywane (rys. 6.4).



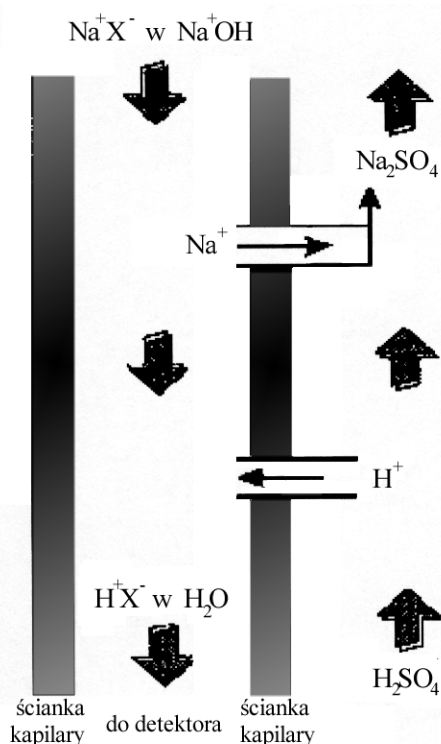
Rys. 6.4. Schemat działania kolumny tłumienia (supresora kolumnowego) w chromatografii jonowej "dwukolumnowej".

Ponieważ kolumna tłumienia zatrzymuje jony eluentu, musi być ona okresowo regenerowana. W omawianym przypadku do regeneracji używa się kwasu siarkowego.

Obecnie, miejsce klasycznej supresji kolumnowej, prawie całkowicie zastąpiły nowoczesne membranowe metody supresji. Zdecydowały o tym uciążliwości związane z okresową regeneracją kolumny supresyjnej oraz z dodatkowym rozmyciem stref rozdzielanych jonów w kolumnie supresyjnej. Ponadto podczas eksploatacji kolumn tłumienia występowały problemy z powtarzalnością i odtwarzalnością wyników związane z niepełną regeneracją kolumny.

Nowoczesne supresory o działaniu ciągłym, są oparte o procesy wymiany jonowej zachodzące poprzez membrany jonowymiennne (dializa). W początkowym okresie wykorzystywano do tego celu supresory kapilarne (rys. 6.5).

W tego rodzaju supresorze podczas analizy anionów eluent (np. NaOH), zawierający jony analitu, płynie wewnątrz włókna kapilarnego na zewnątrz, którego w przeciwnym kierunku płynie kwas siarkowy. Jony sodowe opuszczają wnętrze kapilary poprzez kationowymienną ściankę, a ich miejsce zajmuje odpowiednia liczba kationów wodorowych przenikających do wnętrza kapilary ze strumienia kwasu siarkowego. Oparte o tę samą zasadę współczesne supresory są zbudowane z płaskich, ułożonych wielowarstwowo membran co daje znacznie większą powierzchnię wymiany jonowej i większą wydajność supresji w stosunku do starszych supresorów kapilarnych.



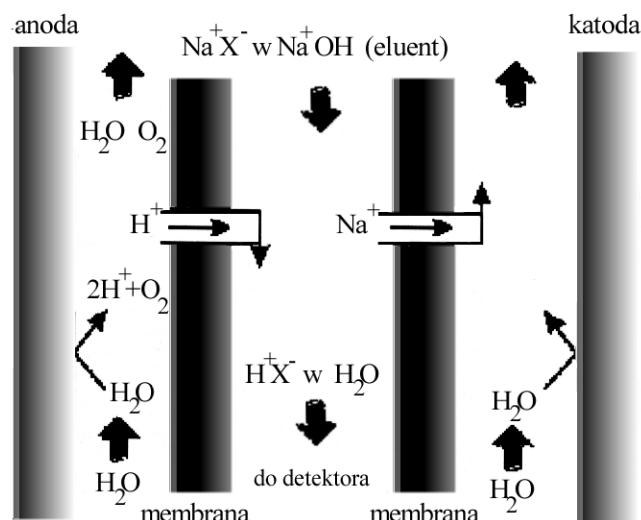
Rys. 6.5. Schemat działania supresora kapilarnego w HPIC anionów.

W kolejnej generacji supresorów membranowych tzw. autosupresorów do wytwarzania jonów wodorowych i wodorotlenowych wykorzystano procesy elektrodowe. Napięcie podane na elektrody wymusza odpowiedni ruch jonów, które są wymieniane między eluentem a regenerantem poprzez membranę w procesie elektrodializy (rys. 6.6).

W tego rodzaju supresorach jako czynnika regenerującego używa się: (i) czystej, dejonizowanej wody (autosupresja z zewnętrznym zasilaniem wodnym), (ii) roztworów kwasów (lub zasad) o odpowiednio dobranym składzie (supresja chemiczna bez podawania napięcia na elektrody), czy wreszcie (iii) fazy ruchomej, która opuściła już detektor konduktometryczny (autosupresja z zawracaniem eluentu). Obecnie produkowane supresory membranowe charakteryzują się małymi objętościami własnymi (cecha bardzo pożądana w HPIC), dużymi wydajnościami wymiany jonowej, szerokim zakresem zmiany prądu, a także zwiększoną odpornością membran na rozpuszczalniki organiczne stosowane w HPIC. Poprawiona została również odporność membran na ciśnienia występujące podczas rozdzielania chromatograficznego. Zastosowanie supresorów membranowych o dużej wydajności wymiany jonowej pozwoliło na wprowadzenie na szeroką skalę do HPIC elucji gradientowej (gradient siły jonowej eluentu) bez potrzeby uciekania się do tzw. gradientu izoprzewodnościowego, czy równoważenia przewodnictwa.

Eluenty podane w tabeli 6.3, w szczególności, bufony NaHCO₃/Na₂CO₃ oraz roztwory NaOH, pokrywają też praktycznie cały zakres zastosowań nowoczesnej chromatografii jonowej anionów z supresorem membranowym.

Stosowanie supresorów membranowych o dużej wydajności tworzenia protonów pozwala na dość swobodne operowanie wielkością siły elucji. Nawet słabe eluenty (o małym powinowactwie jonów do żywicy jonowymiennej) jak NaOH czy Na₂B₄O₇ mogą być wykorzystywane w postaci stosunkowo stężonych roztworów (0,1 mol/l), głównie do prowadzenia rozdzielania z zastosowaniem elucji gradientowej.



Rys. 6.6. Schemat działania autosupresora membranowego (ASRS) w HPIC anionów.

Eluenty stosowane do oznaczania kationów techniką wysokosprawnej chromatografii jonowymienną w wersji "dwukolumnowej" i "jednokolumnowej" to najczęściej rozcieńczone roztwory mocnych kwasów, takich jak HCl, HNO₃, H₂SO₄ o stężeniach od około 0,1 do kilkudziesięciu mM/dm³. Duże powinowactwo kwasów mineralnych do kationitu utrudnia ich stosowanie do rozdzielania kationów dwuwartościowych. Fazami ruchomymi mogą być, wówczas, mieszaniny etylenodiaminy i kwasów mineralnych (w chromatografii dwukolumnowej) lub mieszanina kwasu 2,3-diaminopropionowego z kwasem solnym (w chromatografii jednokolumnowej).

Na szybkość analizy wpływa stężenie eluentu i natężenie jego przepływu przez kolumnę. Podwojenie natężenia przepływu zmniejsza dwukrotnie czas retencji jonów, przy niewiele zmienionych innych parametrach oprócz, oczywiście, ciśnienia pompowania. Zmiana taka pogarsza nieco rozdzielczość. Trzeba być szczególnie ostrożnym przy zwiększaniu przepływu eluentu, gdy polimerowe wypełnienie kolumny wykazuje pewien stopień ściśliwości, co może prowadzić do nienaturalnie wysokiego wzrostu ciśnienia, a nawet do degradacji wypełnienia kolumny.

Inne metody detekcji wykorzystywane w chromatografii jonowej

W wysokosprawnej chromatografii jonowymienną (jonowej), oprócz detekcji konduktometrycznej, znaczenie mają następujące metody detekcji: detekcja potencjometryczna, woltamperometryczna, amperometryczna impulsowa lub integracyjna, fluoroscencyjna, refraktometryczna, pośrednia i bezpośrednia detekcja spektrofotometryczna w zakresie UV i VIS, a także spektrometria absorpcji atomowej (AAS), spektrometria emisyjna z indukcyjnie generowaną plazmą (ICP) oraz (ICP-MS).

Pomiary optyczne można stosować wtedy, gdy jony lub ich kompleksy absorbują światło w zakresie długości fali, pozwalającej na rozróżnienie analizowanych jonów od jonów fazy ruchomej i innych, nie będących przedmiotem analizy. Bezpośrednia detekcja absorpcyjna może być stosowana w oznaczaniu jonów NO₂⁻ i NO₃⁻ oraz Br⁻ i I⁻, S⁻², HS⁻, kwasów karboksylowych itp. Większe możliwości daje technika derywatywacji, czyli przeprowadzania oznaczanych jonów w odpowiednie kompleksy absorbujące w zakresie UV-VIS. Stosuje się ją do oznaczania wielu jonów metali przejściowych.

Aminy aromatyczne można oznaczać z wykorzystaniem detektora amperometrycznego lub UV.

W chromatografii jonowymiennej znajduje też zastosowanie detektor refraktometryczny, jednak tylko w warunkach elucji izokratycznej. Czułość jest stosunkowo niewysoka, ale zaletą jego jest niezawodność działania i prostota obsługi. Detekcja polega na pomiarze różnicy współczynnika załamania światła eluentu i eluatu zawierającego substancję eluowaną z kolumny.

Ponadto coraz bardziej popularne jest sprzężenie chromatografii jonowymiennej ze spektrometrem absorpcji atomowej (AAS), albo ze spektrometrem emisji atomowej z wzbudzeniem plazmowym (ICP-AES). Można w ten sposób oznaczać śladowe ilości pierwiastków (metali) w środowisku naturalnym. Szczególnie wysokie czułości oznaczania można osiągnąć w połączeniu HPIC z ICP-AES i ze spektrometrią mas (HPIC-ICP/AES-MS). W ten sposób można oznaczać metale w stężeniu od ok. 1 ppt do 10% zawartości w próbce dozowanej do kolumny chromatograficznej.

6.6. PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ CHROMATOGRAFII JONOWEJ (HPIC)

Pełna prezentacja wszystkich zastosowań techniki wysokosprawnej chromatografii jonowymiennej (chromatografii jonowej), przekracza ramy tego opracowania. O możliwościach zastosowań analitycznych chromatografii jonowej, pozwala zorientować się przedstawiona poniżej lista wybranych procedur analitycznych, zalecanych przez amerykańskie agendy, w których wykorzystywana jest metodyka chromatografii jonowej. Uzupełniono je o wybrane przykłady procedur analitycznych (not aplikacyjnych) wykorzystujących chromatografię jonową w analizie technicznej opracowane przez Dionex Co. Należy dodać, że znaczna część opublikowanych zastosowań chromatografii jonowej dotyczy wykorzystania warunków izokratycznych (stałego składu eluentu). Zastosowanie elucji gradientowej umożliwia jednocześnie rozdzielenie znacznej liczby jonów. Opublikowano przykład rozdzielania ponad 30-tu anionów, czy bardzo dużej liczby dipeptydów w warunkach elucji gradientowej. Stosowanie elucji gradientowej wiąże się, jednak, z koniecznością reaktywacji kolumny do warunków początkowych - eluentu o słabej sile jonowej, co wymaga często dość znacznego czasu i dość zużywa znaczną ilość eluentu.

Pominięto ogromnie ważne zastosowania HPIC w biologii, biochemii, biotechnologii i immunochemii. O istnieniu wielu tego typu zastosowań wspomniano na wstępie tego opracowania, a wybrane przykłady takich zastosowań zamieszczono w rozdziale dotyczącym zastosowań chromatografii w analizie i preparatyce peptydów i białek.

Jak widać z danych w powyższych tabelach, HPIC ma zastosowanie w ochronie środowiska, przemyśle materiałów półprzewodnikowych (rys. 6.8), w przemyśle rafinerijno petrochemicznym (rys. 6.9) i w innych. Bardzo duże znaczenie HPIC odgrywa m.inn. w energetyce (w elektrowniach jądrowych i węglowych) zapewniając właściwą kontrolę procesu oczyszczania wody. Ważna jest zdolność do identyfikacji poszczególnych zanieczyszczeń jonowych (rys. 6.7), możliwość osiągnięcia progów wykrywalności na poziomie ppt i możliwość pracy w trybie on-line.

Z zastosowaniem HPIC rozróżnia się agresywne i obojętne wtrącenia jonowe, identyfikuje i eliminuje źródło agresywnych jonów, optymalizuje i przedłuża czas życia złóż demineralizujących, mierzy stężenia jonów wymywanych z miejsc trudno dostępnych, określa bilans masy. Programy chemiczne wprowadzone wraz z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii jonowymiennej przedłużają okres między-remontowy elektrowni. Wszystko to pozwala na obniżenie kosztów i na eliminację źródeł emisji groźnych zanieczyszczeń.

Ważne jest m.inn. oznaczanie jonów w roztworach amin stosowanych do odsiarczania gazów porafinacyjnych w rafinerii ropy naftowej (stosuje się monoetanolaminę (MEA),

dietanoloaminę (DEA), albo metyldietanoloaminę (MDEA)). Podczas odsiarczania roztwór alaknolaminy może podlegać zjawiskom degradacji termicznej i chemicznej, szczególnie, gdy istnieje możliwość kontaktu gorącego wodnego roztworu aminy z takimi związkami tlenowymi jak SO_2 , CO_2 , O_2 . Powstają wtedy substancje wtórne, zarówno o charakterze kwasów, jak i zasad. Znaczny stopień degradacji amin powoduje istotne zmniejszenie efektywności usuwania siarkowodoru w procesach odsiarczania oraz jest przyczyną przyspieszonej korozji instalacji.

Badania nad aminami przeprowadził również Kadnar. Zaproponował metodę rozdzielania i oznaczania amin oraz niektórych kationów z zastosowaniem dwóch kolumn (IonPac CS10 i CS12A) i wysokosprawnej chromatografii jonowymiennnej. Przykład wyników tych badań przedstawiono na rys. 6.10 i w tabeli 6.10.

Tabela 6.5. Metody analityczne HPIC; Agencja Ochrony Środowiska (EPA).

Metoda	Nazwa metody	Anality	Matryca
300.0	The Determination of Inorganic Anions in Water by Ion Chromatography.	Br^- , Cl^- , F^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , ClO_2^- , ClO_3^{2-} , BrO_3^{2-}	woda pitna, woda powierzchniowa, woda gruntowa, woda reaktorowa, ciała stałe, ługi
300.7	Dissolved Sodium, Ammonium, Potassium, Magnesium, and Calcium in Wet Deposition by Chemically Suppressed Ion Chromatography.	Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg_2^+ , Ca_2^+	wody opadowe
9056	Anion Chromatography Method.	Br^- , Cl^- , F^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-}	próbki stałe po mineralizacji, wody

Tabela 6.6. Metody analityczne HPIC; American Standard Test Methods (ASTM)

Metoda	Nazwa metody	Anality	Matryca
ASTM D-4110	Determination of Anions by Ion Chromatography.	Br^- , Cl^- , F^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}	woda pitna, woda powierzchniowa, woda gruntowa, ścieki wodne
D 4327-97	Anions in Water by Chemically Suppressed.	Br^- , Cl^- , F^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}	woda pitna, ścieki wodne
D 4856-90	Dissolved Hexavalent Chromium in Water by Ion Chromatography.	H_2CrO_4	próbki wody

Tabela 6.7. Metody analityczne HPIC (Narodowy Instytut Bezpieczeństwa Pracy - NIOSH, USA)

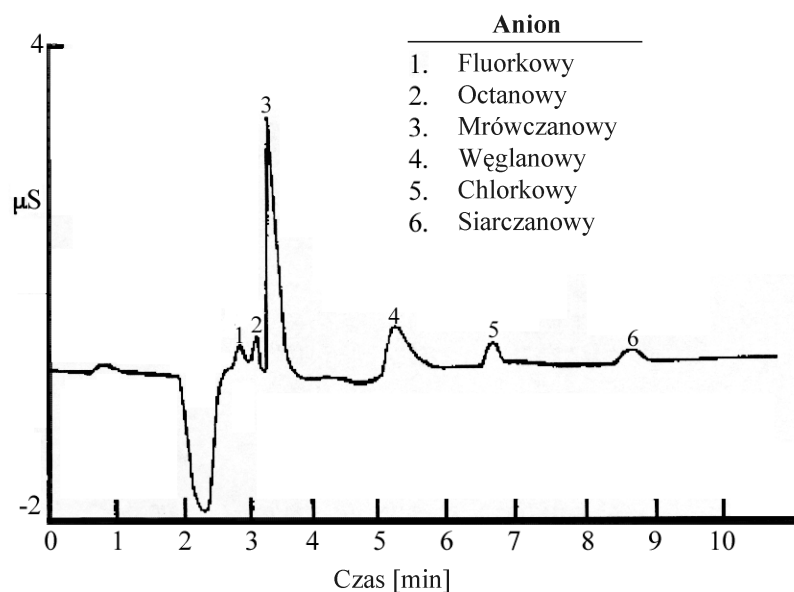
Metoda	Nazwa metody	Anality	Matryca
S137	Formic acid in Water by Ion Chromatography.	kwask mrówkowy	próbki powietrza
3509	Aminoethanol Compounds II.	Etanolamina, dietanolamina, trietanolamina	próbki powietrza
6701	Ammonia.	NH_4^+	próbki powietrza

Tabela 6.8. Metody analityczne HPIC; Urząd Bezpieczeństwa Pracy (OSHA)

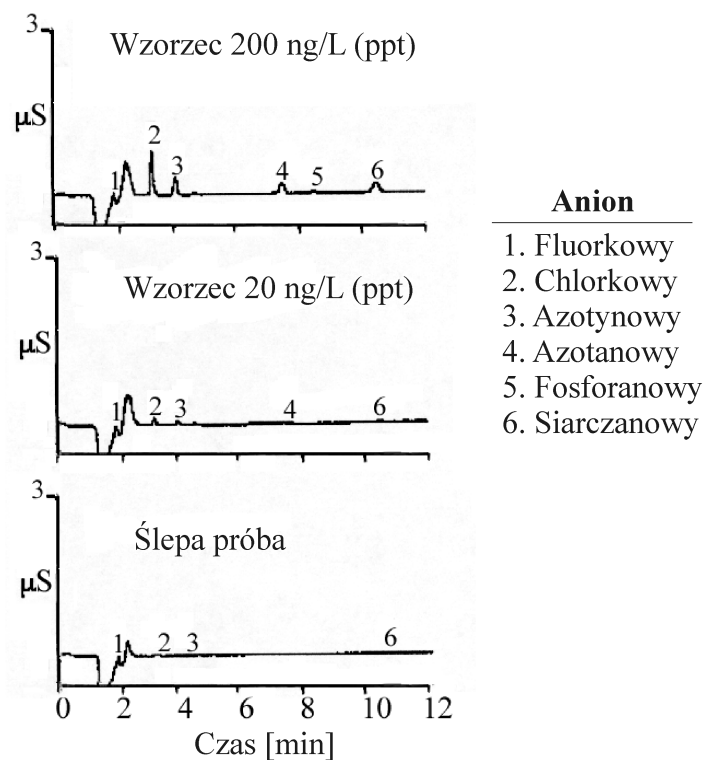
Metoda	Nazwa metody	Analit	Matryca
ID-104	Sulfur Dioxide in Workplace Amospheres (Bubbler).	SO ₄ ²⁻	próbki powietrza
ID-182	Nitric Dioxide in Workplace Atmospheres (IC).	NO ₂ ⁻	próbki powietrza

Tabela 6.9. Wybrane metody analityczne HPIC; Noty Aplikacyjne Dionex Co.

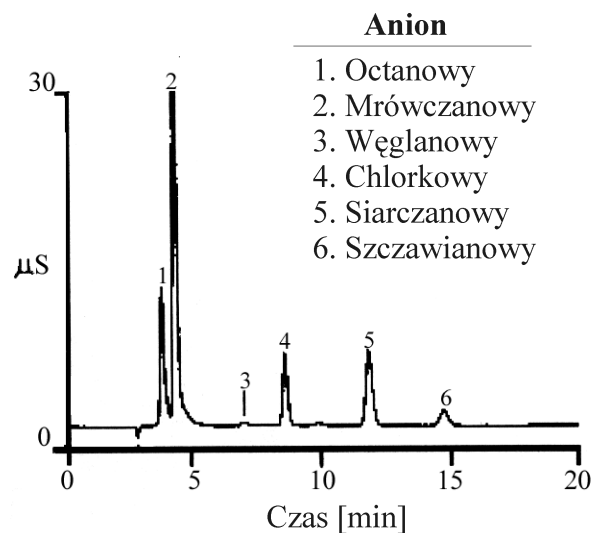
Metoda	Nazwa metody	Analit	Matryca
AN4	Analysis of Nitrate and Sulfate Collected on Air Filters.	NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻	próbki powietrza
AN56	Determination of Trace Anions and Key Organic Acids in High Purity, Ammoniated, and Borated Waters Found in Steam Cycle Power Plants.	aniony, kwasy organiczne w ilościach śladowych	wody obiegowa w energetyce
AN70	Choline and Acetylcholine.	cholina i acetylocholina	Płyny fizjologiczne, roztwory wodne
AN72	Determination of Trace Transition Metals in Reagent-Grade Acids, Bases, and Salts Using Ion Chromatography/Inductively Coupled Argon Plasma Spectroskopy (IC/ICAP).	Cd ₂ ⁺ , Co ₂ ⁺ , Cu ₂ ⁺ , Pb ₂ ⁺ , Ni ₂ ⁺ , Mn ₂ ⁺ , Zn ₂ ⁺ , Al ₃ ⁺ , w ilościach śladowych	roztwory zasad, kwasów i soli



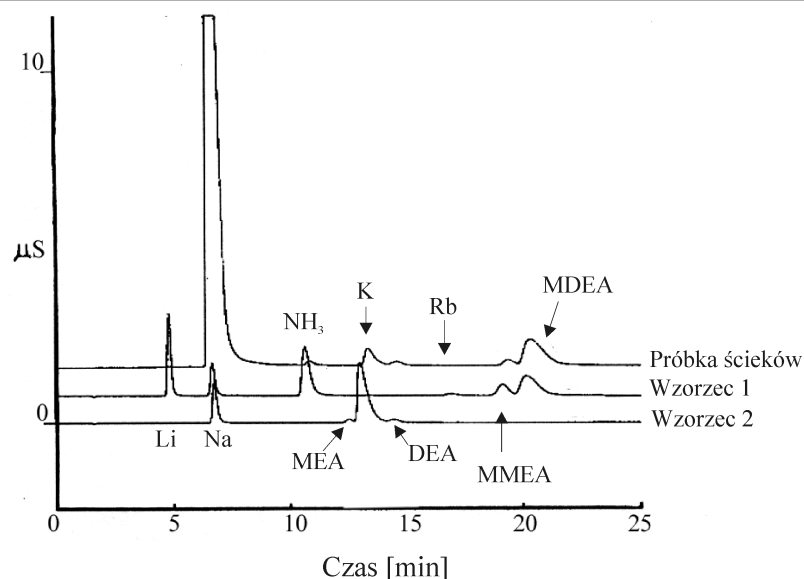
Rys. 6.7. Przykład zastosowania wysokosprawnej chromatografii jonowymiennej do oznaczania organicznych kwasów i kilku nieorganicznych anionów w wodzie (Dionex).



Rys. 6.8. Oznaczanie niskiej: ng/l (ppt) zawartości anionów w wodzie stosowanej w przemyśle elektro-nicznym (Dionex Co).



Rys. 6.9. Oznaczanie stabilnych jonów i kwasów organicznych w roztworze aminy (Dionex).



Rys. 6.10. Rozdzielanie etanoloamin na kolumnie CS10. Eluent: 20 mM H₂SO₄, przepływ 1ml/min.

Tabela 6.10. Czas retencji kationów i anionów dla różnych kolumn i stężeń eluentu (przepływ eluentu 1ml/min; oznaczenia: N.E.-nie jest eluowany z kolumny; N.T.- nie wykryty)

Kationy i aminy	Czas retencji (min)			
	Kolumna CG10+CS10		Kolumna CG12A+CS12A	
	20 mM H ₂ SO ₄	30 mM H ₂ SO ₄	10 mM H ₂ SO ₄	20 mM H ₂ SO ₄
Li+	4.8	4.0	3.8	2.9
Na+	6.7	5.2	4.6	3.3
NH ₄ ⁺	10.7	7.9	5.4	3.7
MEA	12.5	9.0	5.5	N.T.
K+	13.0	9.4	6.8	4.6
DEA	14.4	9.1	N.T.	N.T.
Rb+	17.0	11.8	8.4	5.4
TEA	17.4	12.5	N.T.	N.T.
MMEA	19.1	13.5	5.8	4.0
MDEA	20	13.1	7.0	4.7
Morfolina	36	26	8.8	N.T.
Mg ²⁺	N.E.	N.E.	11.8	4.9
Mn ²⁺	N.E.	N.E.	12.8	N.T.
Ca ²⁺	N.E.	N.E.	14.4	5.3
Sr ²⁺	N.E.	N.E.	16.8	6.0
Ba ²⁺	N.E.	N.E.	24	8.1
Piperyzyna	N.E.	N.E.	N.E.	17.8
"N"	36.5	26	8.9	5.6
"T", component 1	12.5	9.2	5.4	3.8
"T", component 2	39	28	11.6	7.3
"D"	12.5	9.1	5.4	N.T.

7. KOLUMNOWA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA W ROZDZIELANIU PEPTYDÓW I BIAŁEK

Daniel Jastrzębski, Marian Kamiński

7.1. WPROWADZENIE

Peptydy i białka mają ogromne znaczenie w organizmach żywych jako enzymy, hormony, przeciwciała i inne składniki komórek i płynów fizjologicznych. Niektóre peptydy wykazują aktywność antybiotyczną.

Konieczność uzupełniania braków określonych peptydów i białek w organizmie lub stosowania peptydowych antybiotyków, albo innych leków peptydowych, pociąga za sobą potrzebę otrzymywania tych substancji w formie biologicznie aktywnej. Najczęściej wymagana jest równocześnie bardzo wysoka czystość izolowanych substancji. Peptydy i białka można otrzymać w sposób tradycyjny, wyodrębniając je z tkanek zwierzęcych (w tym ludzkich), a niekiedy także z roślin. Ostatnio, rośnie znaczenie chemicznych, a szczególnie biotechnologicznych metod syntezy peptydów i białek.

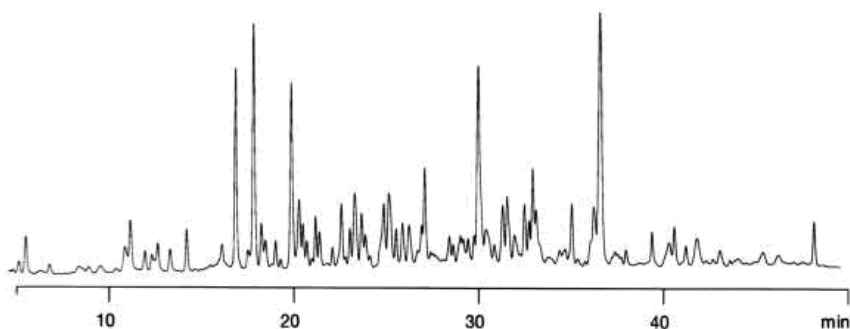
Dobór odpowiedniej techniki rozdzielania potrzebnych peptydów i białek od zanieczyszczeń, a następnie optymalnych warunków wyodrębniania, zapewniających otrzymanie produktu o najwyższej aktywności biologicznej stanowi z reguły trudny problem separacyjny.

Łatwiejsza często do opracowania jest metodyka oznaczania zawartości wyodrębnianych substancji w półproduktach oraz w finalnym produkcie. Trzeba jednak mieć świadomość, że jest to także problem, wymagający często znacznego nakładu pracy eksperymentalnej.

Wśród różnych sposobów rozdzielania peptydów i białek dominujące znaczenie identyfikacyjne i analityczne posiadają metody elektroforetyczne. Ważne i ciągle rosnące znaczenie posiada też wykorzystanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Chromatografia cieczowa bywa używana w zastosowaniach analitycznych do identyfikacji i oznaczania zawartości peptydów o niskich masach cząsteczkowych, które trudno rozdzielić w warunkach elektroforezy żelowej.

Ogromną karierę robi obecnie stosowanie HPLC - MS w proteomice do identyfikacji białek na podstawie składu peptydów po działaniu na białko trypsyną w ściśle kontrolowanych warunkach (*trypsin digestion peptide mapping*). Analityka przebiega w warunkach elucji gradientowej z zastosowaniem kolumn HPLC o szczególnie wysokiej sprawności i odbywa się z reguły trybie przełączania kolumn. Rys 7.1. przedstawia przykład chromatogramu rozdzielania peptydów powstałych z kazeiny pod działaniem trypsyny. Jest to swego rodzaju "odcisk palca" białka poddanego działaniu trypsyny. W powiązaniu z odpowiednimi bazami danych biolodzy i biotechnolodzy uzyskali ostatnio szczególnie efektywne narzędzie badań bazujące na HPLC. W ostatnim czasie można znaleźć wiele publikacji, dotyczących zasad stosowania HPLC w zakresie proteomiki.



Rys. 7.1. Przykład chromatogramu kazeiny po działaniu trypsyną. Kolumna Jupiter Proteo 90A Jupiter - "HPLC columns for the proteomic era".

Chromatografia cieczowa w skali preparatywnej i procesowej, ma w zastosowaniu do białek i peptydów ważne znaczenie preparatywne oraz produkcyjne. Coraz częściej można dzisiaj spotkać w halach przemysłowych zakładów farmaceutycznych instalacje wykorzystujące kolumny chromatograficzne i chromatografię cieczową w skali procesowej do rozdzielania peptydów i białek oraz nie tylko tych substancji.

Do rozdzielania peptydów i białek z zastosowaniem chromatografii cieczowej wykorzystywane są praktycznie wszystkie znane układy chromatograficzne. Stosowana jest chromatografia żelowa (GPC - gel permeation chromatography, albo SEC - size exclusion chromatography), chromatografia jonowymienna (IEC - ion exchange chromatography, w tym, chromatografia wykluczania jonowego - ion exclusion chromatography). Wykorzystuje się chromatografię adsorpcyjną, najczęściej w układach faz odwróconych w "klasycznej" postaci (RP-HPLC - reverse phase high performance chromatography) oraz chromatografię oddziaływań hydrofobowych (HIC - hydrophobic interaction chromatography), a nawet chromatografię adsorpcyjną w układach faz normalnych (NP-HPLC - normal phase high performance chromatography), szczególnie, z chemicznie związaną fazą stacjonarną. Dodatkowo, bardzo szerokie zastosowanie znajdują metody chromatografii powinowactwa (Affinity Chromatography - AC), jako odrębna grupa metod separacyjnych o szczególnie wysokiej selektywności i specyficzności.

W literaturze opisano wiele procedur rozdzielania, które są aktualne dla konkretnego problemu rozdzielczego, tzn. do rozdzielania konkretnych peptydów, białek i ich zanieczyszczeń. Nie opracowano, jednak, dotychczas w sposób zadowalający, takich ogólnych reguł, które umożliwiłyby dobór odpowiednich warunków rozdzielania w zależności od pierwszo- i wyżej rzędowej struktury rozdzielanych peptydów i białek.

Analizując literaturę prezentującą warunki rozdzielania peptydów i białek można, jednak, zauważyć pewne dominujące kierunki postępowania i na tej podstawie przedstawić uogólnione zasady doboru warunków rozdzielania tych substancji z zastosowaniem chromatografii cieczowej.

Dalej omówiono stosowane najczęściej sposoby wpływania na selektywność i sprawność układu chromatograficznego w przypadku najważniejszych metod rozdzielania peptydów i białek z wykorzystaniem elucyjnej chromatografii cieczowej

7.2. EFEKTY I ZJAWISKA WPŁYWAJĄCE NA SELEKTYWNOŚĆ ROZDZIELANIA PEPTYDÓW I BIAŁEK W WARUNKACH CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ ORAZ PRZYKŁADY CZĘSTO STOSOWANYCH WARUNKÓW ROZDZIELANIA

Peptydy i białka są, jak wiadomo, jednocześnie kwasami i zasadami. W strukturze cząsteczki złożonej z n aminokwasów występuje $n-1$ wiązań peptydowych, a także możliwość istnienia tzw. mostków disiarczkowych oraz wewnętrznych wiązań wodorowych, determinujących drugo- i trzecio- rzędową strukturę cząsteczki. Obecność aminokwasów zawierających hydrofobowe fragmenty wpływa na wzrost ogólnej hydrofobowości cząsteczki peptydu / białka. W zależności od pH rozpuszczalnika może mieć miejsce dysocjacja protonu od zewnętrznej grupy karboksylowej (pH powyżej punktu izoelektrycznego) lub protonowanie n -terminalnej grupy aminowej (pH poniżej punktu izoelektrycznego), albo szczególnie silne obniżenie rozpuszczalności peptydu dla pH odpowiadającego punktowi izoelektrycznemu.

Dysocjacja elektrolityczna peptydów i białek oraz znaczne spolaryzowanie wiązań peptydowych powoduje, że substancje te - w zależności od pH oraz składu rozpuszczalnika, mogą tworzyć pary jonowe oraz być solwatowane przez substancje będące donorem elektronów, jaki i przez akceptory elektronów. Gdy cząsteczki substancji tworzących z peptydem parę jonową, albo solwatujących peptyd posiadają część nie polarną, to w wyniku solwatacji może następować zasadniczy wzrost hydrofobowości agregatu. Znaczny wzrost hydrofobowości, związany z tzw. zjawiskiem "wysalania", ma też miejsce w przypadku umieszczenia białka w bardzo stężonym roztworze soli.

Wszystkie te zjawiska mają wpływ na zachowanie się cząsteczek peptydów i białek w roztworach oraz na ich oddziaływania z fazą stacjonarną w różnych układach chromatograficznych. Dodatkowo komplikować może sytuację tendencja niektórych peptydów i białek do kondensacji i tworzenia w określonych warunkach wysokomolekularnych agregatów.

Na retencję i na stopień rozdzielania peptydów i białek ma, więc, wpływ szereg parametrów układu chromatograficznego, takich, jak: typ powierzchni sorpcyjnej wypełnienia kolumny i uboczne oddziaływania na powierzchni sorbentu, powierzchnia właściwa fazy stacjonarnej, wielkość i porowatość ziaren wypełnienia kolumny, skład, pH, temperatura i prędkość przepływu eluentu, oddziaływania dodatkowych składników eluentu, w tym stężenie soli w eluencie, przebieg programu elucji i inne parametry, w tym, nawet ciśnienie podczas rozdzielania.

W tabeli 7.1 zestawiono reprezentatywne przykłady warunków stosowania chromatografii cieczowej do rozdzielania peptydów / białek w różnych układach. Dane te obejmują bardzo często wykorzystywane warunki rozdzielania i mogą być przewodnikiem, przydatnym dla wstępnego doboru warunków przy rozwiązywaniu problemów rozdzielczych, dotyczących peptydów i białek.

Na podstawie danych zawartych w tabeli 1 widać, że prawie wszystkie znane układy chromatograficzne są wykorzystywane do rozdzielania peptydów i białek. Jednak, najczęściej stosowane są układy faz odwróconych oraz chromatografia jonowymienna, a wstępna separacja jest wykonywana z wykorzystaniem chromatografii żelowej, szczególnie z wykorzystaniem "twardych" sorbentów typu DIOL, ostatnio głównie takich, których struktura porowata bazuje ma "matrycy" z porowatego di-tlenku cyrkonu, albo di-tlenku tytanu. Dodatkowo, należy zwrócić uwagę, że do rozdzielania i wyodrębniania białek stosowana jest też często chromatografia oddziaływań hydrofobowych (HIC) oraz szeroko jest wykorzystywana chromatografia powinowactwa.

Lp.	Układ chromatograficzny	Warunki rozdzielania	Substancje rozdzielane	Uwagi
1	Układ faz odwróconych (RP);	<p>Kolumna C-18 300A 250x4,6 mm (1,6 μm), T=20°C, v=0,6 ml/min, Eluenty: A - 0,1% TFA w H₂O, B - 0,1% TFA w AcCN, Program elucji: 0-48 min - 39-45% B, Detekcja UV 220-280 nm;</p> <p>Kolumna C-4 300A (15μm), T=36°C, v=2 ml/min, Eluenty: A - bufor fosforanowy pH 7 + odpowiednia sól, B - 30% iPr w A, Program elucji: 0-40 min - 0-100% B, Detekcja UV 280 nm;</p> <p>Kolumny C-8 150x4,6 mm (5μm) + C-18 250x4,6 mm (5μm), T=21°C, v=1 ml/min, Eluenty: A - 9% MeOH + 70 mM AcNa, pH 5,75, B - 90% MeOH, 8,2% H₂O, 1,8% iPr, Program elucji: 0-15 min 10-40% B, 15-35 min 40-80% B, Detekcja FLD, wzb. 330 nm, em. 450 nm;</p> <p>Kolumna C-18 300A 150x4,6 mm (5μm), T=40°C, v=1,0 ml/min, Eluenty: A - 0,1% TFA w H₂O, B - 0,085% TFA w AcCN, Program elucji: start od 5% B, prędkość przyrostu stężenia od 1% do 3%/min, Detekcja UV 280 nm;</p>	<p>interferon γ IFNγ i jego analog AII</p> <p>bovine pancreatic trypsin inhibitor BPTI w grupie mod- elowych peptydów</p> <p>F-β-Ala i β-Ala</p>	<p>Warunki oddziaływań hydrofobowych (HIC) - dodatek różnych soli do eluentu A (NaCl, NaAc, (NH₄)₂SO₄)</p> <p>RP MPLC z wykorzy- staniem dwóch różnych kolumn</p>

Tabela 7.1. Przykłady praktycznego zastosowania HPLC do rozdzielania peptydów i białek wraz z warunkami chromatograficznymi. cd na str. 111

cd ze str. 110

cd na str. 112

		<p>Kolumna C-4 300A 150x2,1 mm (5µm), T=400°C, v=0,25 ml/min, Eluenty: A - 10% AcCN + 0,1% TFA w H₂O, B - 10% H₂O + 0,1% TFA w AcCN</p> <p>Program elucji: 0-7 min - 26,5-28,6% B, 7-17 min - 28,6-30,6% B, 17-28 min - 30,6-36,1% B, 28-46 min - 36,1-43,3% B, Detekcja UV 214 nm;</p>	Oznaczenie jakościowe i ilościowe białek w mleku	
2	Chromatografia jonowymienna	<p>Kolumny EMD SO₃⁻, EMD COO⁻, Spherodex, Sepharose, 60x10 mm, T=50°C, v=2 ml/min, Eluent: 0,3M NaCl w 10 mM Na₃PO₄, pH 7, Detekcja UV 280 nm;</p>	lysozyme, α-chymotrypsinogen A, cytochrome C,	Chromatografia kationowymienna - porównanie selektywności różnych kationitów wobec białek
		<p>Kolumna DEAE 50x7,5 mm, v=1 ml/min, Eluenty: A - 0,05 M Tris HCl w H₂O, pH 8, B - 0,05 M Tris HCl + 0,5 M NaCl w H₂O, pH 8, Program elucji: 0-60 min - 0-100% B, Detekcja UV 260 nm;</p>	peptydowe kwasy nukleinowe - PNAs	Chromatografia anionowymienna
3	Chromatografia żelowa	<p>Kolumna: Superose 6, 300x10 mm, temperatura pokojowa, v=0,5 ml/min, Eluent: 200 mM NaCl + 15 mM Tris HCl w H₂O, pH 7,4, Detekcja UV 280 nm;</p>	Thyroglobin, immunoglobulin G, ovalbumin, myoglobulin	Białka o wysokich masach cząsteczkowych

cd ze str. 111

		<p>Kolumna Superdex 200, 61,5x7,5 cm, Temperatura pokojowa, v=44 ml/min, Eluent: 40 mM Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ + 0,2M NaCl w H₂O;</p>	Rozdzielanie immunoglobulin monomerów od polimerów	Ciągła chromatografia
4	Układy faz normalnych	<p>Kolumna TSK gel Amide-80 250x4,6 mm, T=40°C, v=1 ml/min, Eluenty: A - AcCN-H₂O 97:3 + 0,1% TFA, B - AcCN-H₂O 55:45 + 0,1% TFA, Program elucji: 0-70 min - 0-100% B, Detekcja UV 215 nm;</p>	<p>FY, FGGF, FLEEI, DYMGMWMDP-NH₂, NFTYGGF, AGSE, WAGGDASGE, YGGFMTSQKSQTPLVT, ASTTTNYT</p>	<p>Badanie wpływu dodatków na retencję (0,1% TFA, 0,1% TFA+0,1% TEA, 0,2% TFA+0,2% TEA)</p>

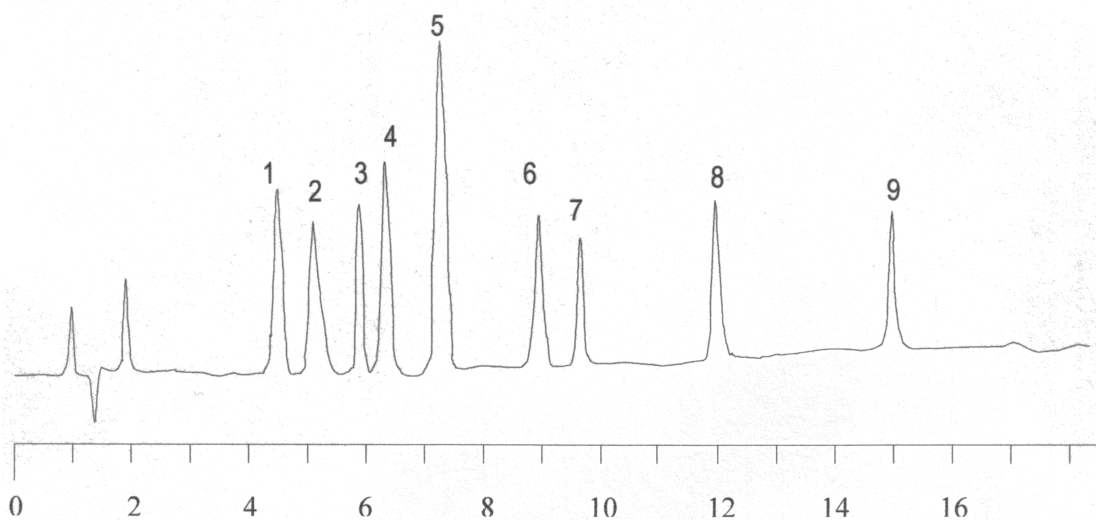
7.3. ROZDZIELANIE PEPTYDÓW I BIAŁEK W UKŁADACH FAZ ODWRÓCONYCH

Rozdzielanie peptydów i białek w układach faz odwróconych odbywa się na powierzchni fazy stacjonarnej o określonym stopniu hydrofobowości, z zastosowaniem sorbentów typu C18, C8, C4 (C5, C6), C2, fenyl, alkilofenyl, alkilonitryl i inne.

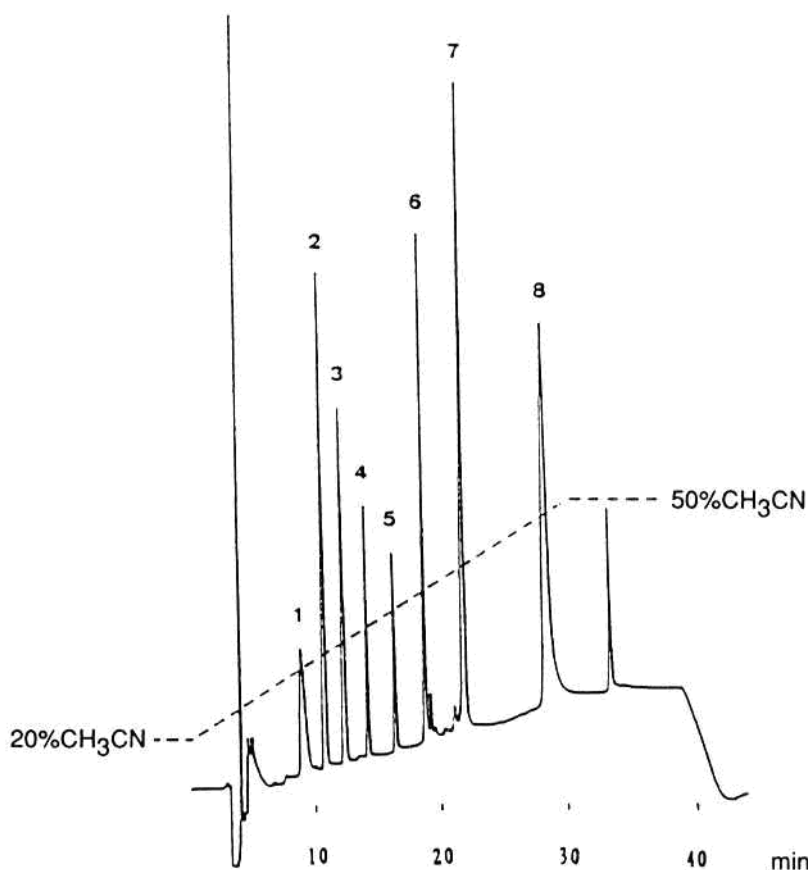
Rozdzielane cząsteczki peptydów i białek są, jak wiadomo, złożone z różnych aminokwasów (hydrofobowych lub hydrofilowych), ułożonych w zróżnicowanej kombinacji. Retencja zależy od wynikowej hydrofobowości rozdzielanych cząsteczek, albo ich solwatów, tzn. zarówno od struktury i rozkładu hydrofobowości w cząsteczkach, jak i od hydrofobowości solwatów istniejących w równowadze ze składnikami eluentu.

Podczas rozdzielania dużych cząsteczek polipeptydów i białek w układach faz odwróconych dość często obserwowane są niekorzystne przypadki zmian konformacyjnych łańcucha aminokwasowego i w konsekwencji denaturacja produktu. Nie polarna faza stacjonarna, organiczna faza ruchoma i kwaśne, albo alkaliczne dodatki do fazy ruchomej (kwas trifluorooctowy TFA lub inny, albo amina) - to czynniki mające potencjalne działanie denaturujące, a nawet hydrolityczne. Denaturacja objawia się najczęściej zmianą retencji substancji, a hydroliza - zwiększeniem ilości pików. Aby uniknąć hydrolizy trzeba kontrolować pH i temperaturę rozdzielania. Denaturacji można czasem uniknąć przez dodatek do eluentu soli stabilizujących strukturę białka (np. NaCl, AcNa, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Trzeba się, jednak, liczyć z tym, że taki dodatek często modyfikuje retencję substancji.

Najczęściej do rozdzielania peptydów i białek w układach faz odwróconych są stosowane sorbenty siloksanowe modyfikowane grupami alkilowymi, fenyłowymi i difenyłowymi. Wśród grup alkilowych najczęściej wykorzystuje się grupę butylową (C4), kolejno pentyłową (C5) i oktyłową (C8). Wiele jest też zastosowań oktadecylowych (C18) faz stacjonarnych. Rys. 7.2 przedstawia przykład rozdzielania 9 białek w kolumnie wypełnionej sorbentem typu C5, a chromatogram na rys. 7.3 to przykład rozdzielania 8 peptydów i białek w kolumnie C8.



Rys. 7.2. Rezultaty rozdzielania mieszaniny peptydów w kolumnie typu C5. Kolumna Discovery® BIO Wide Pore C5, 150x4,6 mm (5µm). Eluenty: A-H₂O:AcCN:PFPA 81:19:0,1; B-H₂O:AcCN:PFPA 62:38:0,1. Program elucji: 0-19 min 0-100% B, v=1,0 ml/min, T=30°C. Detekcja UV 215 nm.
1-Arg8-Vassopressina, 2-Bradykinina fragment 1-5, 3-Oxytocyna, 4-Met-Enkephalina, 5-Luteinizing Hormone, 6-Leu-Enkephalina, 7-Bradykinina, 8-Bombesina, 9-Substancja P.



Rys. 7.3. Przykład rozdzielania peptydów i białek układzie faz odwróconych w kolumnie typu C8. Kolumna YMC8 Octyl S-5 120A, 250x4,6 mm (5 μ m); Eluenty: A-0,1% TFA, B-AcCN; Program elucji: 0-30 min 20-50% B, $v=1,0$ ml/min; Detekcja UV 200 nm; Piki: 1-Bradykinina, 2-Met-Enkephalina, 3-Angiotensyna I, 4-Leu-Enkephalina, 5-Substancja P, 6-Insulina, 7-Lysozym, 8-Mioglobina.

Głównym ograniczeniem stosowania kolumn z chemicznie modyfikowanym wypełnieniem siloksanowym jest ograniczone pH fazy ruchomej, które jest bezpieczne dla wiązań grup funkcyjnych z żelazem krzemionkowym i nie powoduje ich hydrolizy (typowo 2 - 8,5, a skrajnie 1,5 - 10, w przypadku specjalnie opracowanych faz stacjonarnych).

Okazjonalnie stosowane są wypełnienia polimerowe oparte o kopolimer styrenu-diwinyllobenzenu, albo poli-metakrylan alkilu. Do powierzchni sorpcyjnej najczęściej dodatkowo związane są cząsteczki oktadekanu (C18). Ostatnio, mimo wysokiej ceny, rośnie znaczenie polimerowych sorbentów. Powodem jest ich trwałość w szerokim zakresie pH od 0,8 - 13,5. Brak wolnych grup siloksanowych poprawia symetrię pików i w konsekwencji sprawność rozdzielania. Wadą kolumn wypełnionych polimerowymi sorbentami są niskie prędkości przepływu, jakie powinno się stosować podczas rozdzielania substancji o wysokich masach cząsteczkowych. Zbyt duże prędkości przepływu prowadzą do otrzymywania nadmiernie poszerzonych pików, szczególnie pików substancji nisko polarnych. Jest to wynikiem niekorzystnej kinetyki procesów sorpcji / desorpcji spowodowanej tendencją do rozpuszczania się cząsteczek rozdzielanych substancji w powierzchniowej warstwie niepolarnego sorbentu.

Sporadycznie stosowane są inne wypełnienia, np. sorbenty siloksanowe modyfikowane równocześnie grupami C8 i hydrofilowymi grupami -COOH, pochodzącymi z nienasyconych

kwasów karboksylowych, albo specyficznie modyfikowane sorbenty siloksanowe o podwyższonej stabilności mechanicznej i chemicznej.

Długość łańcucha alkilowego ma istotny wpływ na selektywność rozdzielania peptydów i białek. *River* i współpracownicy stwierdzili, że krótkie kolumny wypełnione polisiloksanem modyfikowanym C4 sprawdzają się najlepiej w rozdzielaniu dużych peptydów i białek. Natomiast *Hartman* i współpracownicy udowodnili przydatność kolumn siloksanowych modyfikowanych C8 do rozdzielania naturalnych i syntetycznych peptydów oraz niewielkich białek posiadających charakter hydrofilowy. W przypadku polipeptydów, szczególnie, jeśli zawierają w łańcuchu pierścienie aromatyczne, skuteczne okazują się kolumny siloksanowe modyfikowane grupami difenylowymi.

Kolumny siloksanowe modyfikowane grupami oktadecylowymi (C18), o małych średnicach porów, są najskuteczniejsze do rozdzielania małych, hydrofilowych peptydów i fragmentów białek złożonych z 2-10 aminokwasów. Przy czym do rozdzielania peptydów stosuje się ostatnio coraz częściej krótkie kolumny mikropakowane o średnicy 1 - 1.5 mm, wypełnione nieporowatym sorbentem o kulistych ziarnach wielkości 1 do 2 μm , zapewniające bardzo wysoką sprawność rozdzielania (do 350 tys. pólk teoretycznych na metr długości wypełnienia kolumny).

Fazy stacjonarne zawierające krótkie alifatyczne łańcuchy uniemożliwiają skuteczne rozdzielanie silnie hydrofobowych peptydów i białek, a długie łańcuchy alkilowe są odpowiedniejsze do rozdzielania peptydów i białek o charakterze mniej hydrofobowym.

Wskazane jest, aby sorbenty o modyfikowanej chemicznie powierzchni sorpcyjnej były zabezpieczone przed oddziaływaniem z fazą ruchomą resztkowych grup hydroksylowych, tzn. aby miały tzw. "end-capping" - zastąpienie wolnych grup OH grupami OCH_3 , albo poprzez silanizację. Polepsza to symetrię pików, a stąd stopień rozdzielania w przypadku mniejszych peptydów i umożliwia wysoki stopień odzysku w przypadku białek.

Szeroko badany był wpływ rozkładu wielkości ziaren i porowatości złoża w kolumnie na rozdzielanie peptydów i białek. Stwierdzono wpływ takich parametrów jak rozmiar i kształt ziaren, średnica i kształt porów oraz powierzchnia wymiany masy. W zależności od wielkości rozdzielanych peptydów i białek, dobiera się złożo o odpowiednich średnicach porów. I tak, dla małych peptydów (do 10 aminokwasów) *Krstulovic* i *Brown* zalecają kolumny z wypełnieniem o średnicy porów do 60A, dla średnich peptydów (10-30 aminokwasów) i małych białek najskuteczniejsze są kolumny o średnicy porów 100A, 120A i 150A, natomiast dla większych peptydów (ponad 30 aminokwasów) i dla białek, polecają sorbenty o porach 300A i większych.

Tweeten i *Tweeten* stwierdzili w przypadku kolumn wypełnionych makroporowatym poli-styrenem-diwinylbenzenem, że dalszy wzrost wielkości porów (do 1000A) nie wpływa na polepszenie retencji białek o dużej masie cząsteczkowej (do 335 kD).

W celu maksymalizacji sprawności kolumny do zastosowań analitycznych wykorzystuje się sorbenty o małych ziarnach 5 i 3 μm , a nawet coraz częściej, wspomniane wyżej, nieporowate sorbenty o ziarnach 1 μm . Wtedy stosowane kolumny mogą mieć nawet tylko 10 mm długości. Najczęściej stosuje się kolumny o długościach 125, 150 i 250 mm. Im mniejsza wielkość ziaren sorbentu, tym krótsza może być kolumna. Obecnie duże zainteresowanie budzą tzw. monolityczne kolumny o porowatym wypełnieniu zajmujących całą objętość kolumny. Charakteryzują się one szczególnie niskimi wartościami tzw. impedancji rozdzielania.

7.4. ELUENTY, MODYFIKATORY ELUENTU I PROGRAMY ELUCJI STOSOWANE W UKŁADACH FAZ ODWRÓCONYCH

W układach faz odwróconych głównym czynnikiem wpływającym na retencję jest zawartość organicznych składników w eluencie, takich jak acetonitryl (AcCN), metanol (MeOH), etanol (EtOH), izopropanol (iPrOH), tetrahydrofuran (THF), czy dioxan (DX). Dodatkowo, w celu optymalizacji warunków rozdzielania należy wpływać na retencję substancji

o charakterze zarówno kwaśnym jak i zasadowym, do których należą peptydy i białka, poprzez dodatek kwaśnego lub zasadowego modyfikatora do eluentu.

Rozdzielanie peptydów i białek najczęściej przeprowadza się w warunkach elucji gradientowej, programując zmianę stężenia organicznego składnika eluentu (AcCN, MeOH) w zakresie od 10 - 25 % v/v do 75 - 90 % v/v, dodając do eluentu A i B modyfikatora zmieniającego pH eluentu i cofającego dysocjację kwasowo - zasadową i w konsekwencji modyfikującego hydrofobowość i polarność cząsteczek peptydów / białek.

Najczęściej wykorzystywanym organicznym składnikiem eluentu jest acetonitryl. Powodem tego jest jego wysoka transparentność przy niskich długościach fali w zakresie UV, jego niska lepkość oraz wysoka lotność, która ułatwia dalszą izolację produktu.

Znacznie rzadziej wykorzystywane są alkohole. Niekiedy stosuje się izopropanol, aby zwiększyć rozpuszczalność w fazie ruchomej solwatów dużych peptydów i białek. Użycie izopropanolu lub jego mieszaniny z acetonitrylem (w proporcji od 1:2 do 2:1) jest uzasadnione w przypadku rozdzielania peptydów i białek stosunkowo bardzo hydrofobowych. Izopropanol, jako

Tabela 7.2. Modyfikatory fazy ruchomej najczęściej stosowane w układach faz odwróconych.

Modyfikator	Działanie (korzystne i niekorzystne)
Kwas trójchloro- octowy (TFA)	<ul style="list-style-type: none"> - Eliminuje jonizację ewentualnych wolnych grup siloksanowych; - Cofa dysocjację grupy karboksylowej na "C-końcu" aminokwasu, co zwiększa hydrofobowość tej części peptydu; - Powoduje wzrost polarności cząsteczki przez tworzenie kationu $R-NH_3^+$ na "N-końcu" peptydu; - Dostarcza anionów CF_3COO^-, które stanowią przeciwjon dla "N-końcowego" kationu amoniowego tworząc z nim parę jonową; - Powoduje solwatację wiązań peptydowych, co ma znaczenie szczególnie przy dużych peptydach i białkach; - Podwyższa absorpcję światła przez eluent przy niskich długościach fali światła w przypadku detekcji UV - pogarsza granicę oznaczalności związku; - Najczęściej stosowane stężenie 0,05 - 0,13% (v/v), stężenie poniżej 0,075% może prowadzić do poszerzenia pików i obniżonej retencji peptydów, a powyżej 0,1% do hydrolizy wiązań fazy stacjonarnej z powierzchnią żelu krzemionkowego zwłaszcza w podwyższonej temperaturze (!);
H_3PO_4 i jego sole (np. $(NH_4)_3PO_4$)	<ul style="list-style-type: none"> - Obniżenie retencji peptydów (w porównaniu do dodatku TFA, czy do braku H_3PO_4 lub jego soli);
HFBA (kwas heksa fluoro butyrowy)	<ul style="list-style-type: none"> - Działanie podobne do TFA, jednak mniej selektywne;
HCOOH, CH ₃ COOH, HCl	<ul style="list-style-type: none"> - Działanie podobne do TFA, jednak mniej selektywne; - Kwas solny powoduje jedynie protonowanie grupy karboksylowej "C-końca" peptydu bez tworzenia pary jonowej na "N-końcu" związku; - Pewne podwyższenie retencji, ale wpływ na retencję mniejszy niż TFA;
NH_4HCO_3	<ul style="list-style-type: none"> - Podwyższa pH i zmienia nieco hydrofobowość peptydu / białka;
CH_3COONH_4	<ul style="list-style-type: none"> - Działanie podobne do NH_4HCO_3;
Trójetyloamina (TEA)	<ul style="list-style-type: none"> - Dodawana jednocześnie z H_3PO_4 lub HCOOH w celu zmiany pH; - Blokuję wolne grupy hydroksylowe sorbentu, co może przyczynić się do polepszenia kształtu pików;

rozpuszczalnik o wyższej sile elucyjnej w układach faz odwróconych od AcCN, silniej oddziałuje z centrami alkilo - siloksanowymi sorbentu niż np. metanol.

Najczęściej stosowaną szybkością narostu objętościowego udziału składnika organicznego do rozdzielania peptydów i białek jest 2-5% / min. Zbyt wolny wzrost stężenia hydrofobowego składnika eluentu może powodować zbytne rozcieńczenie otrzymywanych frakcji eluatu. Końcowe stężenie rozpuszczalnika organicznego w programie elucji nie powinno prowadzić do całkowitego usunięcia wody z kolumny. Utrudniałoby to doprowadzanie fazy stacjonarnej do równowagi z początkowym eluentem. To może prowadzić do braku powtarzalności retencji peptydów i białek, szczególnie wcześniej eluowanych. Najczęściej nie przekracza się 95% substancji organicznej w eluencie.

Nateżenie przepływu fazy ruchomej przez kolumnę o średnicy 4 - 4,6 mm jest rzędu 0,8-2,0 ml/min. Od nateżenia przepływu zależy sprawność rozdzielania oraz ciśnienie na włocie do kolumny. *Bylina* i współpracownicy zauważyli wpływ ciśnienia panującego w kolumnie na retencję podczas rozdzielania insuliny w warunkach izokratycznych. Wzrost ciśnienia w kolumnie o 1 bar powodował wzrost czasu retencji białka o 1-5 s. Ostatnio *Guiochon* i współpracownicy potwierdzili występowanie tych efektów i podali próbę ich wyjaśnienia. Najważniejsze modyfikatory fazy ruchomej, stosowane w układach faz odwróconych, zestawiono w tabeli 7.2.

Modyfikatory wymienione w tabeli 7.2. zmieniają pH eluentu i hydrofobowość cząsteczek rozdzielanych substancji przez cofanie dysocjacji, tworzenie par jonowych, a także na drodze solwatacji. Modyfikatory kwaśne mają na celu zmniejszenie stopnia kwaśnej dysocjacji peptydu, a dodatki zasadowe eliminują protonowanie terminalnych grup NH_2 i powodują dysocjację grupy karboksylowej. Zarówno kwaśne, jak i zasadowe modyfikatory fazy ruchomej zawierające hydrofobowe fragmenty cząsteczki mogą, dodatkowo, wpływać na hydrofobowość poprzez solwatację cząsteczek rozdzielanych peptydów.

7.5. ROZDZIELANIE PEPTYDÓW I BIAŁEK W UKŁADACH JONOWYMIENNYCH

W chromatografii jonowymiennej jest zasadą, że substancje posiadające ładunek elektryczny są rozdzielane na kolumnie, która ma na powierzchni sorpcyjnej odwrotny ładunek elektryczny do substancji rozdzielanych. Grupy jonowe wymiennicza jonowego są kowalencyjnie związane z powierzchnią sorbentu i ich ładunki elektryczne są kompensowane przez jony obecne w eluencie (buforze). Po wprowadzeniu próbki do kolumny centra jonowe słabo związane z eluentem, ulegają wymianie na jony substancji rozdzielanych. Wykorzystuje się okoliczność, że peptydy i białka mogą posiadać zarówno ładunek dodatni, jak ujemny. Podczas stosowania buforów o charakterze kwaśnym, peptydy występują w postaci kationów (zahamowanie dysocjacji grup karboksylowych i sprotonowanie grup aminowych oraz najbardziej polarnych grup NH_2 w połączeniach peptydowych). W przypadku stosowania buforów zasadowych, peptydy i białka występują w postaci anionów (sprotonowane grupy aminowe są zasadami wiążącymi grupy hydroksylowe, a grupy karboksylowe są zdysocjowane, albo tworzą pary jonowe ze sprotonowanymi kationami zasadowych dodatków). Netto dodatni lub ujemny elektryczny ładunek peptydu / białka umożliwia jego związanie z odpowiednimi centrami fazy stacjonarnej. Z zastosowaniem gradientu soli, lub niekiedy dodatkowo zmiany pH buforu, powoduje się stopniową elucję substancji związanych z powierzchnią wymiennicza jonowego.

Na retencję peptydów i białek wpływają głównie trzy czynniki: siła jonowa eluentu, jego pH i powierzchnia właściwa wymiennicza jonowego (gęstość obsadzenia molekułami wymiennicza jonowego) a także rozkład wielkości porów adsorbentu. Zwiększając siłę jonową eluentu obniżamy retencję peptydów i białek w przypadku obu wymienniczy, kationów i anionów. Zwiększając pH buforu obniżamy retencję na kationitach, a podwyższamy na anionitach i odwrotnie - zmniejszając pH buforu podwyższamy retencję na kationitach, a obniżamy na anion-

itach. Poszerzenie zakresu średnic porów w stosunku do hydrodynamicznej średnicy cząsteczek rozdzielanych białek przyczynia się do podwyższenia retencji w przypadku stosowania kationitów i prawdopodobnie także w przypadku anionitów.

Wzrost stopnia obsadzenia powierzchni jonitu grupami jonowymiennymi wpływa oczywiście na wzrost retencji w konkretnych warunkach rozdzielania. Jednak, do rozdzielania peptydów i białek w warunkach chromatografii elucyjnej nie są zalecane wymiennicze jonowe o bardzo wysokim stopniu nasycenia powierzchni sorpcyjnej grupami jonowymiennymi w przeciwieństwie do chromatografii jonowymiennej wykonywanej w warunkach selektywnej sorpcji - desorpcji jonowymiennej, gdy pojemność jonowa wymiennicza jonowego powinna być możliwie jak najwyższa.

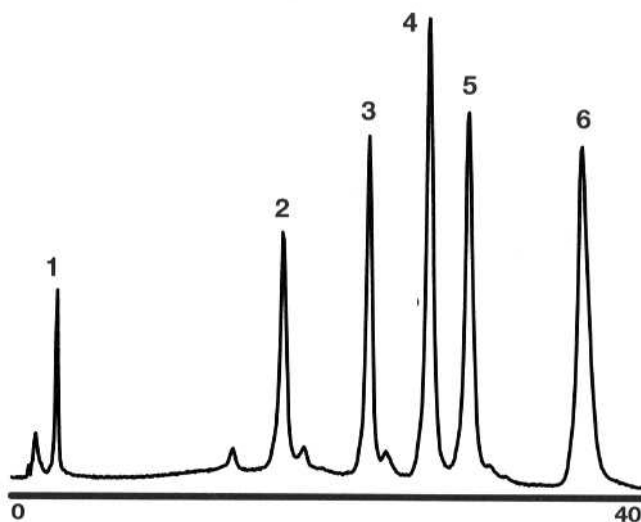
Do rozdzielania peptydów i białek stosuje się wiele rodzajów kolumn jonowymiennych, równorzędnie kationowymienne i anionowymienne. Oba wymiennicze mogą być stosowane w wariantach słabym i mocnym.

W przypadku mocnych wymienniczy jonowych wszystkie grupy funkcyjne są w szerokim zakresie pH w postaci zjonizowanej i powinowactwo jonowe kolumny jest mało zależne od pH eluentu, ale retencja peptydów od pH eluentu zależy silnie, ponieważ w zależności od pH ich cząsteczki są w różnym stopniu zjonizowane.

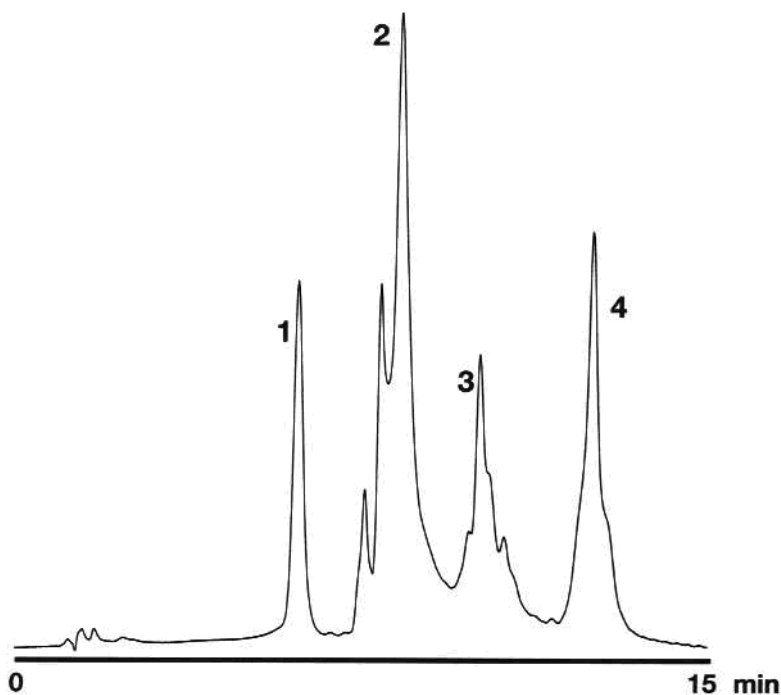
W zależności od właściwości rozdzielanego peptydu / białka dobiera się odpowiedni wymienniczy jonowy.

Jako kationity stosowane są kolumny ze związanymi na powierzchni sorpcyjnej ligandami alkilo-, albo arylo- sulfonowymi: $R-SO_3^-$ (mocne wymiennicze, np. Fractogel SO_3 , Cellufine sulfate, SP), karboksylowymi $R-COO^-$ (słabe wymiennicze, np. Fractogel COO, Toyopearl), a także inne polimery o słabo kwaśnych grupach funkcyjnych, takie, jak Sepharoza czy SpheroDEX. Na rys.4 przedstawiono przykład rozdzielania 6 peptydów z zastosowaniem kolumny kationowymiennej.

Jako anionity stosowane są kolumny o ligandach w postaci grup alkilo, albo arylo amoniowych, np. mocny wymienniczy z grupami trimetyloaminoetylowymi (TMAE), średnio mocny wymienniczy z grupami dietyloaminoetylowymi (DEAE), oraz słaby wymienniczy z grupami dietyloaminoetylowymi (DMAE). Ligandy jonowymienne najczęściej osadzone są na matrycy,



Rys. 7.4. Przykład rozdzielania małych peptydów z użyciem chromatografii kationowymiennej [28]. Kolumna Vydac 400VHP5410, 100x4,6 mm (5 μ m); Eluenty: A-20mM TEAP w 50% AcCN, pH 2; B-100mM NaClO₄ w A; Program elucji: 0-50 MIN 0-100% B, $v=0,7$ ml/min; Detekcja UV 220 nm. Piki: 1-Oxytocyna, 2-odpowiednik Eledoisiny, 3-Neurotensyna, 4-Angiotensyna II, 5-Bradykinina, 6-Angiotensyna I.



Rys. 7.5. Przykład rozdzielania białek z użyciem chromatografii anionowymiennej. Kolumna Wydac 300VHP575, 50x7,5 mm (5 μ m); Eluenty: A-10mM CHES/TEA, pH 9,53; B- 0,5M NaCl w A; Program elucji: 0-20 min 0-100% B; 1-Bovine carbonic anhydrase (pI 7,3), 2-Conalbumin (pI 6; 6,3; 6,6), 3-Ovalbumin (pI 4,7), 4-Soybean trypsin inhibitor (pI 4,5).

którą może być kopolimer styrenu-divinylobenzenu, żywica syntetyczna, poliwęglowodany, poliamidy, a niekiedy polimery nieorganiczne. Na rys. 7.5 zamieszczono przykład wyników rozdzielania czterech białek w kolumnie anionowymiennej.

W przypadku większości komercyjnie stosowanych kolumn jonowymiennych, stosunkowo małe grupy jonowymienne znajdują się na powierzchni sorbentu. W takim przypadku tylko pojedyncze, ewentualnie kilka jonowych grup peptydu / białka zostaje związane ze złożem, z powodu ograniczeń przestrzennych. W wymienniczkach jonowych o ruchomych ligandach (tzw. "tentacle"), łańcuchy cząsteczek wymienniczkowego są kowalencyjnie związane z matrycą. Są to liniowe łańcuchy polimerowe z rozłożonymi wzdłuż łańcucha grupami jonowymiennymi. Grup jonowymiennych jest znacznie więcej niż na powierzchni "klasycznego" wymienniczkowego i w konsekwencji znacząco wzrasta pojemność takich wymienniczkowych wobec peptydów i białek. Elastyczność ruchomych ligandów wymienniczkowego powoduje dodatkowo, że mogą się one wiązać do molekuł białek bez odkształcenia cząsteczek tych ostatnich. Ma to szczególne znaczenie dla uniknięcia denaturacji w trakcie rozdzielania białek o dużych masach molekularnych.

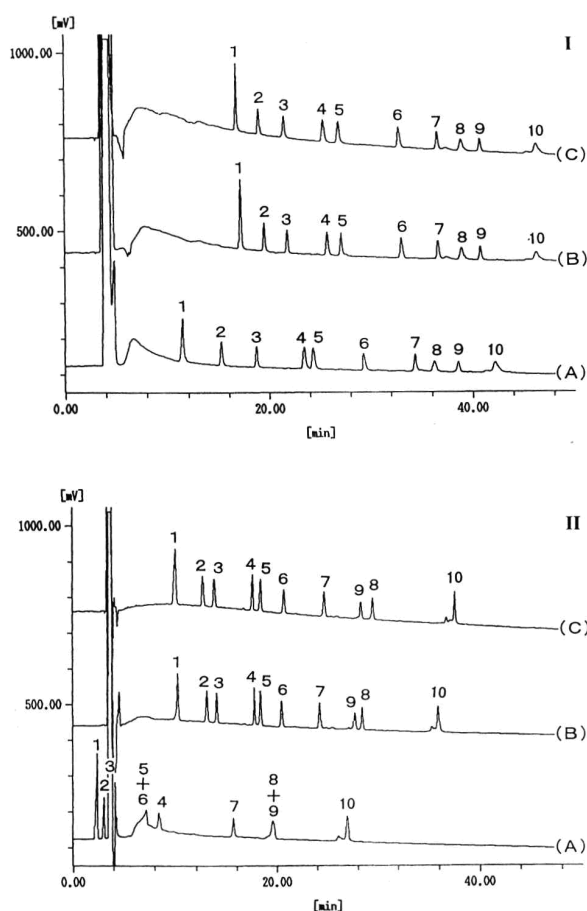
Podczas rozdzielania peptydów i białek z użyciem chromatografii jonowymiennej regułą jest stosowanie krótkich kolumn o dużych średnicach. Zalecane są kolumny o długościach od 5 cm (szczególnie w metodach sorpcyjno - desorpcyjnych) do 25 cm (dla warunków jonowymiennej chromatografii elucyjnej) i o średnicach 5 - 26 mm lub wyższych.

7.6. UKŁADY ADSORPCYJNE I ADSORPCYJNO - JONOWYMIENNE W NORMALNYM UKŁADZIE FAZ

Układy chromatograficzne faz normalnych nie znajdują tak szerokiego zastosowania do rozdzielania peptydów i białek jak układy faz odwróconych i jonowymienne. Yoshida i Okada

wykonali badania przydatności do rozdzielania peptydów kilku różnych wypełnień w układach faz normalnych. Stwierdzili przydatność kolumn wypełnionych związanym z żelem krzemionkowym sorbentem amidowym i diolem w warunkach elucji gradientowej AcCN - H₂O, z rosnącym udziałem wody w trakcie programu elucji i z zastosowaniem kwaśnych modyfikatorów fazy ruchomej (TFA albo TFA+TEA), zwiększających retencję peptydów (patrz rys. 6 - porównanie rozdzielania 10 peptydów na kolumnie amidowej i diolowej z różnymi dodatkami do eluentu). Odrzucili kolumny napelnione sorbentem aminowym (NH₂) i nitylowym (CN) jako nieprzydatne do rozdzielania peptydów oraz kolumny z żelem krzemionkowym jako powodujące obniżenie stopnia odzysku peptydów.

Do rozdzielania białek i peptydów zastosowano też z powodzeniem kolumny wypełnione hydroksyapatytem, wykorzystując jednocześnie adsorpcyjne i słabe jonowymienne oddziaływania.



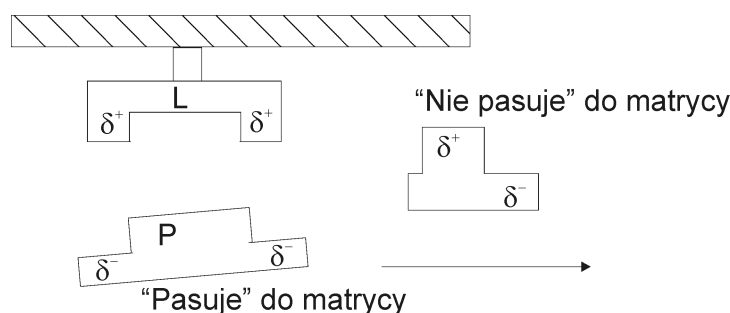
Rys.7.6. Porównanie rozdzielania peptydów w układzie faz normalnych w kolumnie amidowej (I) i diolowej (II) z różnymi dodatkami do eluentu. Kolumna I - TSK gel Amide-80 250x4,6 mm; kolumna II - TSK gel OH-120 250x4,6 mm; Eluenty: (A) A - AcCN-H₂O 97:3 + 0,1% TFA, B - AcCN-H₂O 55:45 + 0,1% TFA; (B) A - AcCN-H₂O 97:3 + 0,1% TFA+TEA, B - AcCN-H₂O 55:45 + 0,1% TFA+TEA; (C) A-AcCN-H₂O 97:3+0,2% TFA+TEA, B-AcCN-H₂O 55:45+0,2% TFA+TEA; Program elucji: 70 min, liniowy gradient H₂O od 3 do 45% (0,6% H₂O/min), T=40°C, w=1,0 ml/min. Detekcja UV 215 nm; Substancje rozdzielane:1-FY, 2-FGGF, 3-FLEEI, 4-DYMGWMDP-NH₂, 5-NFTYGGF, 6-AGSE, 7-WAGGDASGE, 8-YGGFMTSQKSQTPLVT, 9-ASTTTNYT, 10-M homoseryna: LSEGEWQLVLHVWAKVEADVAGHGQDILIRLFKSHPETLEKFDKFKHLKTEAEM *)

7.7. CHROMATOGRAFIA POWINOWACTWA

Chromatografia powinowactwa (*Affinity Chromatography*) znajduje bardzo szerokie zastosowanie do rozdzielania białek. Jest przede wszystkim wykorzystywana do specyficznych zastosowań i do białek o konkretnych właściwościach. Jedynie tzw. chromatografia metalopowinowactwa ma dość ogólne zastosowanie do rozdzielania białek i peptydów posiadających atomy siarki w cząsteczce. W innych zastosowaniach chromatografii powinowactwa metodyka postępowania może być związana z enzymatycznymi lub koenzymatycznymi właściwościami wyodrębnianego białka, albo z innymi specyficznymi oddziaływaniami sorpcyjnymi.

Mimo stosowania nazwy "chromatografia" powinowactwa, metody powinowactwa winny być raczej zaliczane do grupy metod selektywnej chemisorpcji niż do metod chromatografii elucyjnej.

Wykorzystują one wysoce selektywną, specyficzną sorpcję niektórych molekuł do odpowiednio przygotowanej fazy stacjonarnej, a następnie odszczepienie całego związanego materiału, po uprzednim "odmyciu" niezwiązanej z sorbentem części "wsadu" z przestrzeni między-ziarnowej i z porów. Należy zapewnić dostatecznie duże pory sorbentu, aby cząsteczki substancji wiązanych specyficznie do ligandu immobilizowanego na powierzchni nośnika i stanowiącego powierzchnię sorpcyjną, nie były wykluczane.



Rys. 7.7. Schematyczne przedstawienie specyficznych oddziaływań sorpcyjnych w warunkach chromatografii powinowactwa.

Etapy postępowania:

- 1) związanie ligandu z nośnikiem,
- 2) sorpcja specyficzna cząsteczek P (substancji wykazującej / wykazujących powinowactwo)
- 3) odszczepienie P:
 - czynnikiem o silniejszym powinowactwie,
 - poprzez zmianę pH,
 - poprzez wykorzystania nadmiarowego stężenia jonów
- 4) reaktywacja sorbentu

Przykłady (istnieje ogromna ilość w literaturze specjalistycznej)

- oznaczanie glukoheoglobiny HbG1 - metoda kliniczna,
- przeciwciała z zastosowaniem Anty IgG - ligandów
- proteiny roślinne z zastosowaniem Concanavaliny A i inne.

7.8. CHROMATOGRAFIA ŻELOWA PEPTYDÓW I BIAŁEK

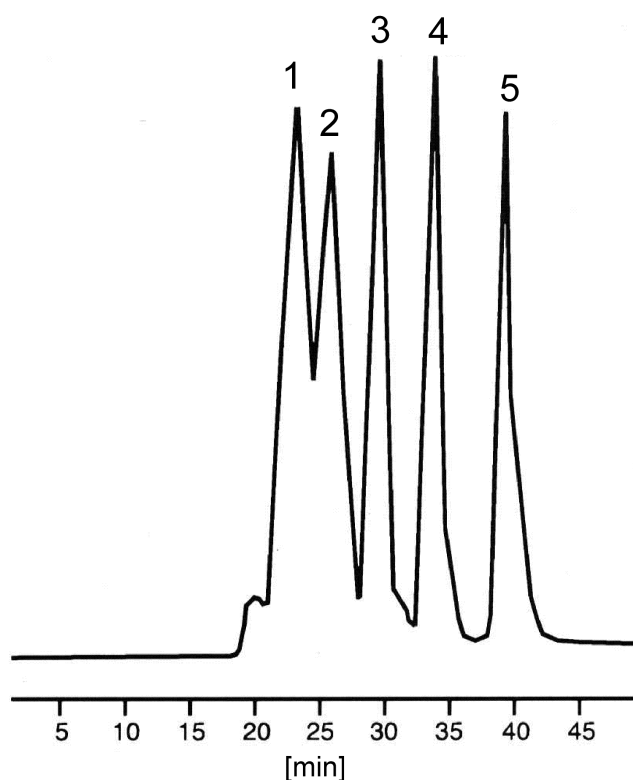
Chromatografia żelowa (SEC), zwana jest również filtracją żelową (GPC), znalazła bardzo szerokie zastosowanie separacyjne dla peptydów i białek. Bazuje na wykorzystaniu różnicy

wielkości i kształtu, a w konsekwencji różnic w wartości efektywnego promienia hydrodynamicznego rozdzielanych substancji. Molekuły o różnych rozmiarach w różnym stopniu penetrują pory sorbentu. Małe cząstki są w większym stopniu zatrzymywane w kolumnie, a duże są szybciej eluowane (patrz rys. 7.7 - przykład rozdzielania 5 białek na kolumnie diolowej). SEC ma zastosowanie do rozdzielania peptydów i białek o masie molowej w zakresie 2 do 1000 kDa. Technika ta może być stosowana do wyznaczania masy molowej białek. Jednak nie tylko masa cząsteczkowa, ale również kształt cząsteczki białka oraz oddziaływania sorpcyjne trudne do całkowitego wyeliminowania w przypadku biopolimerów, mają wpływ na retencję, dlatego też konieczna jest staranna kalibracja przy użyciu odpowiednich białek kalibracyjnych.

Dużego znaczenia nabierają ostatnio złoża SEC wykonane w technologii ruchomych ligandów, „*tentacle*” (podobnie jak w przypadku złożów jonowymiennych). Rozmiary porów i ich rozkład gwarantują rozdzielanie białek zgodnie z wielkością i kształtem cząsteczek. „Dynamiczne” ligandy uniemożliwiają małym cząstkom wniknięcie wewnątrz porów, a większe molekuły mają utrudnioną głębszą penetrację.

SEC jest szczególnie użyteczna jako początkowy etap frakcjonowania do izolacji dużych ilości zanieczyszczeń, lub jako końcowy etap rozdzielania oczyszczonych białek, tzw. „*polishing step*”.

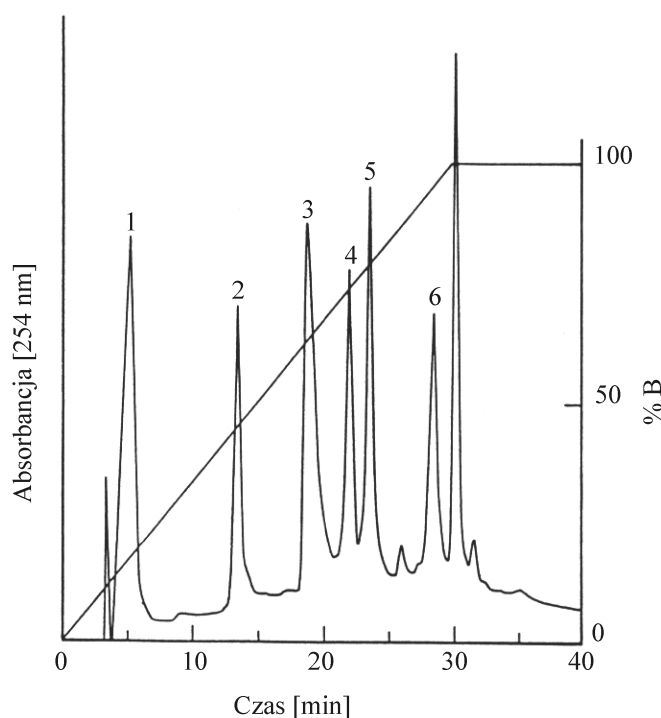
Należy też zwrócić uwagę na szczególną przydatność chromatografii żelowej do odsalania peptydów i białek. Do tego celu stosuje się często jeszcze tzw. miękkie sita molekularne typu Sephadex z grupy G, ale coraz większe znaczenie mają „twarde” wypełnienia kolumn w tych zastosowaniach, takie jak DIOL, a także szkła porowate o zdezaktywowanej powierzchni i inne.



Rys.7.8. Przykład rozdzielania białek na kolumnie DIOL w warunkach chromatografii żelowej. Kolumna Bio GPC-DIOL 250, 300x10 mm (5 μ m); Eluent; 10mm NaH₂PO₄ + 300mm NaCl, Ph 7,2; w=0,5 ml/min, detekcja UV 280 nm.

7.9. CHROMATOGRAFIA ODDZIAŁYWAŃ HYDROFOBOWYCH

Należy zwrócić uwagę na duże znaczenie chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC - *Hydrophobic interaction Chromatography*), zarówno do wstępnego monitorowania składu białkowego badanego materiału biologicznego, jak i szczególnie w zastosowaniach preparatywnych. Metoda ta charakteryzuje się stosunkowo bardzo łatwym doбором optymalnych warunków rozdzielania. Jako fazę stacjonarną stosuje się sorbent typu C4, C5, albo C6, niekiedy C8, albo ze związanymi grupami fenyłowymi. Należy zapewnić odpowiedni zakres wielkości porów (300 Å, albo większe). Program elucji polega na ustaleniu optymalnej i stałej wartości pH eluentu oraz na stopniowym, albo gradientowym obniżaniu stężenia soli w eluencie, w zakresie od wysokiego stężenia - bliskiego (jednak niższego) stężeniu wysalania białek w badanej próbce - do zerowego stężenia soli. W przypadku nieobecności szczególnie silnie hydrofobowych białek, nie ma konieczności dodawania składników organicznych do eluentu i w konsekwencji nie obserwuje się, raczej zjawisk denaturacji i, co najważniejsze, praktycznie wszystkie białka opuszczają kolumnę z wysoką wartością stopnia odzysku. Nie wszystkie, jednak, białka obecne w badanej próbce zawsze się rozdzielają, więc, nie można metody HIC traktować jako metody w pełni uniwersalnej. Jednak, należy ją brać pod uwagę, gdy konieczne jest rozdzielanie białek i peptydów o wysokich masach molekularnych (powyżej 50 tys. Daltonów). Na rys. 7.9. zamieszczono przykład rozdzielania mieszaniny białek z wykorzystaniem warunków oddziaływań hydrofobowych (HIC).



Rys 7.9. Przykład zastosowania warunków oddziaływań hydrofobowych (HIC) do rozdzielania białek - aplikacja YMC (Japonia). Warunki: Kolumna YMC-Pack HIC®, 4,6x250mm-HIC 03-6 (6µm;300 Å); Eluent A - 2,0M (NH₄)₂SO₄ i 0,1M KH₂PO₄ - pH 6,8; Eluent B - 0,1M KH₂PO₄ pH 6,8; Program elucji (jak na rysunku): 0-100% B, 30 minut; W=1,0ml/min; Detekcja UV-254 nm; Substancje rozdzielane: 1-Cytochrom C; 2-Mioglobina; 3-β-Lactoglobulina; 4-Rybonucleaza A; 5-Lysozym; 6-α-Chymotrypsyna; 7-Chymotrypsynogen A. Linią ciągłą narysowano program elucji.

7.10. METODY DETEKCJI W CHROMATOGRAFII PEPTYDÓW I BIAŁEK

Do oznaczania peptydów i białek po rozdzielaniu ich w kolumnie chromatograficznej najczęściej wykorzystywane są detektory spektrofotometryczne w zakresie nadfioletu UV, albo w zakresie widzialnym VIS (po zastosowaniu tzw. derywatywacji postkolumnowej, ninhydryna). Detektory UV stosuje się w zakresie 215 nm, gdy rozdzielane peptydy zawierają jedynie chromofory pochodzące od wiązań peptydowych. Gdy w cząsteczkach peptydów zwarte są struktury aromatyczne, albo mostki disiarczkowe, wykorzystuje się wyższe długości fali (260 - 280 nm).

Gdy rozdzielane peptydy / białka występują w śladowych stężeniach wykorzystuje się fluorescencję (spowodowaną postkolumnowym, albo prekolumnowym zastosowaniem odczynnika derywatyzującego) i stosuje się detektor fluoroescencyjny (FLD). Jako odczynniki derywatyzujące stosuje się różne związki lub mieszaniny związków, np. kwas jodoctowy z aldehydem o-ftalowym i 2-merkaptoetanołem; 6-aminoquinolyl-N-hydroksysuccinimidyl carbamate; czy dialdehyd o-ftalowy. Detekcja fluorescencyjna jest bardzo specyficzna, wiele razy czulsza od detekcji spektrofotometrycznej.

Coraz powszechniej wykorzystywane są spektrometry mas w połączeniu LC-MS i LC-MS-MS, szczególnie do detekcji i oznaczenia masy molekularnej małych peptydów i fragmentów białek o niskim stężeniu w badanej próbce w, burzliwie rozwijającej się, proteomice.

Zastosowanie w analityce śladowych zawartości peptydów znajdują też detektory elektrochemiczne.

7.11. PODSUMOWANIE

Przez wiele lat wykorzystywania chromatografii cieczowej do rozdzielania peptydów i białek udało się opracować szereg metod rozdzielania tych substancji i różnych sposobów wpływu na retencję w kolumnie chromatograficznej. Jednak, nie opracowano dotychczas ogólnych reguł racjonalnego doboru warunków rozdzielania w zależności od struktury cząsteczek rozdzielanych peptydów i białek. Nie istnieje też całkowicie uniwersalny sposób rozdzielania wszystkich mieszanin peptydów / białek, ponieważ elektroforeza żelowa nie jest przydatna do rozdzielania peptydów o niskich masach cząsteczkowych, a elektroforeza kapilarna ciągle jeszcze nie jest w pełni wdrożona do zastosowań dla peptydów i białek.

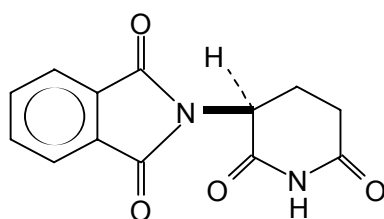
W konsekwencji metody chromatografii cieczowej stanowią bardzo cenne uzupełnienie metod rozdzielania i oznaczania, szczególnie peptydów o niskich masach cząsteczkowych. Są to molekuly o skomplikowanej, wielocząsteczkowej budowie, a ich zachowanie chromatograficzne bywa często dalekie od utartych reguł i poglądów.

Nieocenione znaczenie ma chromatografia cieczowa dla otrzymywania peptydów i białek, tak w skali preparatywnej, jak i produkcyjnej. Trzeba mieć świadomość, że trudny może być dobór takich warunków wyodrębniania peptydów / białek, aby zachować w pełni aktywność biologiczną izolowanej substancji.

8. CHROMATOGRAFICZNE METODY ROZDZIELANIA ZWIĄZKÓW OPTYCZNIE CZYNNYCH

Magdalena Śliwka-Kaszyńska

Możliwość bezpośredniego rozdzielania chiralnych izomerów ma niezwykle istotne znaczenie w chemii i to zarówno z analitycznego, jak i preparatywnego punktu widzenia, a w szczególności dla preparatów farmakologicznych. Według najnowszych danych z ponad 200 najczęściej przepisywanych leków, 114 posiada przynajmniej 1 centrum chiralne, a 25% z nich sprzedawanych jest w postaci racemicznej, mimo, że najczęściej tylko jeden z optycznie czynnych izomerów wykazuje pożądaną czynność farmakologiczną, podczas gdy drugi może być balastem lub działać wręcz szkodliwie. Klasycznym przykładem takiego oddziaływania jest imid kwasu *N*-ftaliloglutaminowego znany w handlu pod nazwą Talidomid (rys.8.1). Lek ten był szeroko stosowany w latach 60-tych przez kobiety ciężarne, ze względu na jego właściwości uspokajająco-nasenne, osłabiające tym samym przykre dolegliwości występujące w pierwszym okresie ciąży. Jednak tylko forma (*R*) tego leku wykazuje pożądaną aktywność, podczas gdy enancjomer (*S*) działa teratogennie na płód. Wynikiem stosowania Talidomidu przez kobiety ciężarne w formie racemicznej lub zanieczyszczonej enancjomerem (*S*), były narodziny wielu kalekich dzieci, pozbawionych właściwie uformowanych kończyn.

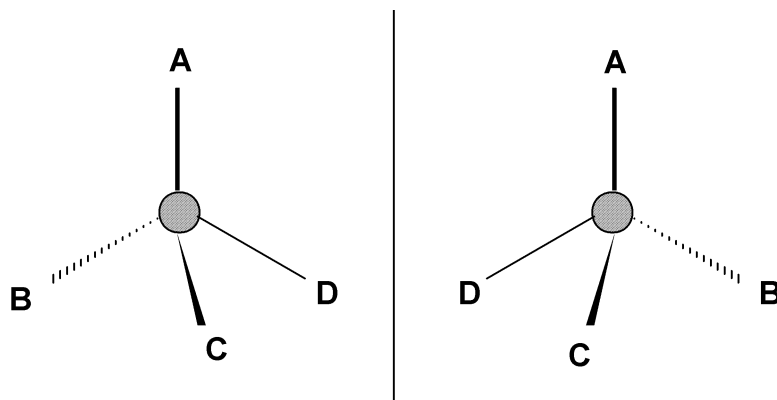


Rys. 8.1. Struktura chemiczna (*R*)-Talidomidu.

Jedną z najbardziej efektywnych technik pozwalających na rozdzielanie enancjomerów i sprawdzenie ich czystości optycznej jest chiralna chromatografia cieczowa. Szybki rozwój chiralnej chromatografii datuje się od wprowadzenia chiralnych faz stacjonarnych, chiralnych dodatków do fazy ruchomej i ich komercjalizacją. Do rozwoju tej techniki przyczyniło się także pojawienie się teorii wyjaśniającej mechanizm chiralnego różnicowania. Chromatograficzne metody rozdzielania mieszanin racemicznych przeżywają ostatnio szczególnie burzliwy rozwój. Związane jest to przede wszystkim z wkroczeniem stereochemii do farmakologii teoretycznej i klinicznej, w wyniku badań nad wpływem przestrzennego zróżnicowania leków na ich oddziaływanie z receptorem oraz na zachowanie się w ustroju. Możliwość rozdzielania stereoizomerów, oznaczenia ich czystości chiralnej i przypisania im właściwej konfiguracji, są niezbędnymi etapami przed podjęciem badania korelacji między stężeniem leku we krwi a jego aktywnością czy też kliniczną skutecznością. Przeprowadzenie takich badań wymagają instytucje wydające zgodę na wprowadzenie leku do praktyki klinicznej.

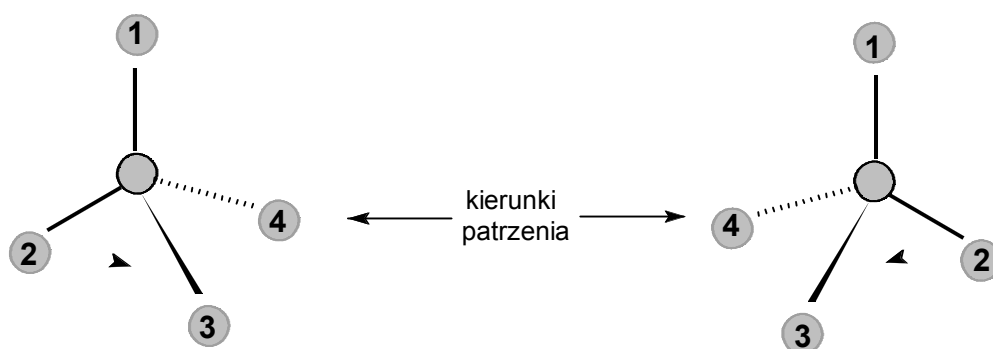
8.1. CHIRALNOŚĆ CZĄSTECZEK CHEMICZNYCH

Dwie cząsteczki mogą różnić się mimo, że są zbudowane z takich samych atomów rozmieszczonych w identycznych odległościach od siebie, o ile ich struktura przestrzenna spełnia pewne warunki symetrii. Takim warunkiem jest możliwość tworzenia nie nakładających się na siebie odbić lustrzanych. Izomery, których cząsteczki mają się do siebie jak przedmiot do odbicia w lustrze, nazywają się enancjomerami lub antypodami optycznymi (rys.8.2).



Rys. 8.2. Przestrzenna struktura enancjomerów

Izomeria typu przedmiot - odbicie zwierciadlane została nazwana izomerią optyczną, ponieważ najłatwiejszym sposobem rozróżnienia większości takich izomerów było oznaczenie ich zachowania się wobec światła spolaryzowanego. Związki, które mają zdolność skręcania płaszczyzny przechodzącego przez nie światła spolaryzowanego, nazwano związkami optycznie czynnymi, a samo zjawisko skręcania czynnością optyczną. Centralny atom, wokół którego tetraedrycznie rozmieszczone są cztery różne podstawniki, nazywany jest atomem asymetrycznym lub chiralnym. Warunkiem niezbędnym i wystarczającym do wystąpienia enancjomerii, jest nieidentyczność cząsteczki z jej obrazem lustrzanym. Enancjomery posiadają identyczne fizyczne i chemiczne właściwości skalarne w środowisku achiralnym. Enancjomer, który skręca płaszczyznę światła spolaryzowanego w prawo oznaczony jest symbolem (+) lub d, natomiast enancjomer, który skręca płaszczyznę światła spolaryzowanego w lewo oznaczony jest symbolem (-) lub l. Enancjomery skręcają płaszczyznę światła spolaryzowanego o taki sam kąt, ale w przeciwnych kierunkach. Mieszanina równomolowych ilości enancjomerów jest więc optycznie nieczynna. Mieszanina taka, nazywana racematem lub mieszaniną racemiczną, posiada często odmienne właściwości fizyczne od poszczególnych enancjomerów.



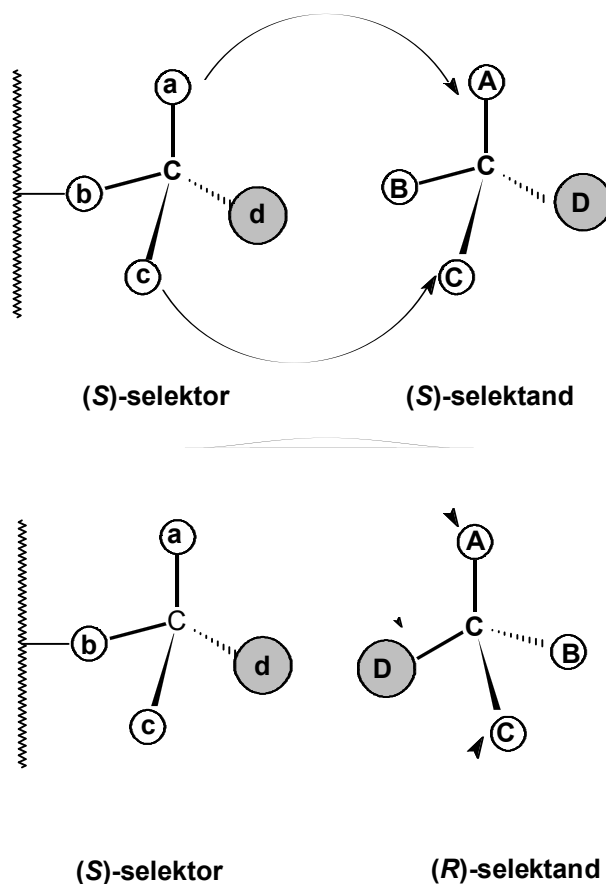
Rys. 8.3. Określenie konfiguracji enancjomerów przy ustalonym pierwszeństwie podstawników.

Rozmieszczenie atomów w przestrzeni, charakterystyczne dla określonego enancjomeru, nazywa się konfiguracją. Jednoznaczny sposób określenia konfiguracji i zapisania jej w nazwach umożliwia konwencja Cahn, Ingolda i Preloga, nazywana systemem (*R*), (*S*) lub zapisem konfiguracji absolutnej (rys.8.3).

8.1.1. ZASADY RÓZNICOWANIA ENANCJOSELEKTYWNEGO

Fundamentalną zasadę wyjaśniającą mechanizm chiralnego różnicowania sformułował Dalgleish, a pod koniec lat 80-tych sprecyzował Pirkle i obecnie jest ona znana jako reguła trzech punktów (rys.8.4). Zgodnie z tą zasadą, aby nastąpiło chromatograficzne różnicowanie racemicznych cząsteczek na danej fazie, niezbędne jest wystąpienie minimum trzech oddziaływań pomiędzy enancjomerami a chiralnym selektorem, przy czym minimum jedno z tych oddziaływań powinno być stereochemicznie zależne, to znaczy zależeć od konfiguracji centrum chiralnego danego enancjomeru.

Rozdzielenie enancjomerów z wykorzystaniem techniki HPLC przy użyciu chiralnych faz stacjonarnych (CSP) lub chiralnych dodatków do fazy ruchomej, oparte jest na tworzeniu się przejściowych diastereoizomerycznych kompleksów pomiędzy cząsteczką różnicującą (selektorem), będącą elementem CSP lub chiralnej fazy ruchomej, a cząsteczką rozdzielanej substancji (selektandem). Różnica w stabilności tych kompleksów prowadzi do różnicy czasów retencji. Enancjomer, który tworzy mniej trwały kompleks, szybciej wymywany jest z kolumny. Jakkol-



Rys. 8.4. Model oddziaływań pomiędzy selektandami a chiralnym selektorem.

wiek oba izomery mogą podobnie łączyć się z fazą chiralną w dwóch punktach, to tylko jeden, ze względu na konfigurację cząsteczki, może jednocześnie uczestniczyć w trzecim oddziaływaniu. Jeżeli oddziaływania mają charakter wiążący, to taki trójwiązący kompleks będzie charakteryzował się wyższą stabilnością niż dwuwiązący. Konsekwencją tego będzie silniejsza retencja pierwszego i późniejsze jego wymywanie z kolumny chromatograficznej. W procesie "chiralnego rozpoznania" mogą być zaangażowane wszystkie z możliwych oddziaływań międzycząsteczkowych np.: wiązania wodorowe, oddziaływania dipol-dipol, efekty przeniesienia ładunku, odpychania sterycznego czy wiązania Van der Waalsa.

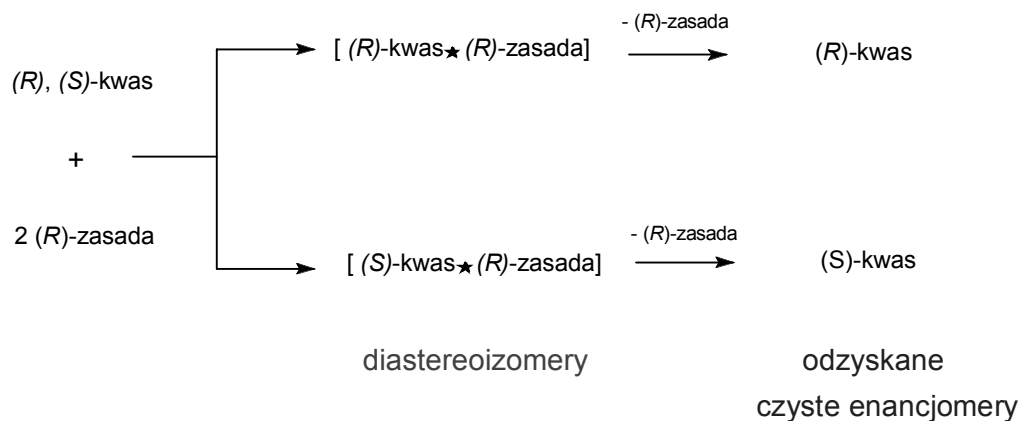
8.2. TECHNIKI ROZDZIELANIA ENANCJOMERÓW ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM HPLC

Istnieją dwa podstawowe sposoby, za pomocą których można przeprowadzić rozdzielanie enancjomerów. Pierwszy z nich, zwany pośrednim, polega na przeprowadzeniu obu enancjomerów w pochodne diastereoizomeryczne. Te ostatnie, w przeciwieństwie do enancjomerów, mają zróżnicowane właściwości fizykochemiczne i można je rozdzielić powszechnie stosowanymi technikami, w tym chromatograficznymi, a po rozdzielaniu, jeżeli zachodzi taka potrzeba, odzyskać wyjściowe enancjomery, usuwając, na drodze chemicznej, uprzednio wprowadzony chiralny podstawnik. Drugi sposób, bezpośredni, to rozdzielanie enancjomerów na chiralnych fazach stacjonarnych CSP's (*Chiral Stationary Phases*) lub za pomocą chiralnych dodatków do fazy ruchomej. W obu przypadkach, rozdzielanie polega na powstawaniu labilnych diastereoizomerycznych kompleksów o różnej trwałości.

Powyższe sposoby mogą być realizowane za pomocą wszystkich podstawowych technik chromatograficznych, a więc chromatografii gazowej i cieczowej w wersji kolumnowej i planarnej. Warto przy tym zaznaczyć, że najpopularniejszą z nich jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC).

8.2.1. SPOSÓB POŚREDNI

Pośredni sposób rozdzielania enancjomerów opiera się na reakcji mieszaniny racemicznej selektanda z optycznie czystym chiralnym reagentem, w celu utworzeniu pary diastereoizomerów. Przykładowo mieszanina enancjomerów kwasu organicznego w reakcji z optycznie czynną zasadą organiczną daje dwie diastereoizomeryczne sole (rys.8.5).



Rys. 8.5. Schemat rozdzielania mieszaniny racemicznej poprzez odwracalną derywatyzację (konwersję chemiczną).

Zamiast soli można otrzymać pochodne diastereoizomeryczne, w których oba reagenty zostają połączone wiązaniem hydrofobowym, np. amidy, czy estry. Diastereoizomery, z uwagi na to, że posiadają odmienne właściwości fizykochemiczne, mogą być rozdzielone tradycyjnymi metodami chemicznymi takimi jak: frakcjonowana krystalizacja, destylacja lub też chromatograficznie na niechiralnych kolumnach. Po rozdzieleniu diastereoizomerów można odzyskać wyjściowe enancjomery usuwając, wcześniej wprowadzony, chiralny reagent.

Stosując sposób pośredni, najważniejszą sprawą jest dobór odpowiedniego odczynnika derywatyzującego. Powinien on spełniać szereg wymogów:

- być wysokiej czystości chiralnej,
- mieć stereochemiczną trwałość,
- reagować z odpowiednią grupą funkcyjną szybko, w łagodnych warunkach i z podobną wydajnością dla obu enancjomerów,
- być łatwy do usunięcia z diastereoizomerycznej cząsteczki.

8.2.2. SPOSÓB BEZPOŚREDNI

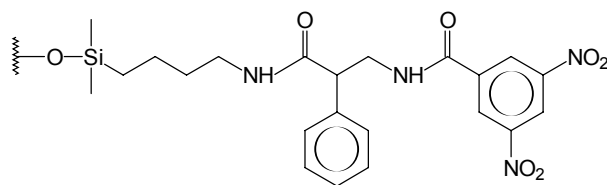
Chiralne fazy stacjonarne CSP's

Najczęściej stosowanym sposobem bezpośredniego rozdzielania enancjomerów za pomocą chromatografii gazowej jak i HPLC, jest użycie chiralnych faz stacjonarnych. Fazy te, chemicznie związane z nośnikiem stałym lub dynamicznie na nim obsadzone, ze względu na budowę i zasadę działania, można podzielić na szereg grup. Według Wainera, jako kryterium podziału przyjmuje się sposób tworzenia kompleksowego połączenia pomiędzy chromatografowaną substancją a chiralną fazą stacjonarną.

Fazy typu pierwszego działają poprzez utworzenie kompleksowego połączenia na zasadzie oddziaływań elektrono-donoro-akceptorowych (EDA) i zjawiska przeniesienia ładunku. W drugim typie faz oddziaływania te również występują, ale dużą rolę odgrywa także tworzenie się kompleksów inkluzyjnych. Zjawisko to zachodzi na wypełnieniach typu estrowych pochodnych celulozy i na chiralnych polimerach. Typ trzeci, to fazy posiadające chiralne wnęki, dzięki którym tworzą się połączenia inkluzyjne. Należą do nich etery koronowe i cyklodekstryny. Typ czwarty obejmuje fazy tworzące połączenia kompleksowe na zasadzie wymiany ligandów (fazy ligandowymienne). Typ piąty, to fazy proteinowe tworzące kompleksy z cząsteczkami rozdzielanej substancji poprzez oddziaływania polarne i hydrofobowe, których mechanizm działania nie jest jeszcze dobrze poznany.

Typ I. Fazy wykorzystujące zjawisko przeniesienia ładunku

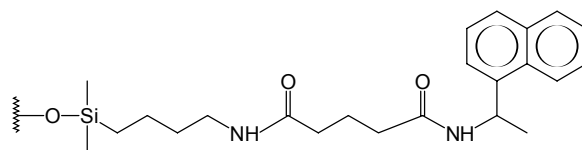
Fazy typu pierwszego zawierają grupy funkcyjne, które są zdolne do przenoszenia ładunku, np. pierścienie aromatyczne. Rozdzielanie mieszanin racemicznych, na tego typu fazach, jest jednak możliwe dzięki jednoczesnemu tworzeniu wiązań wodorowych, oddziaływa-



N-(3,5-dinitrobenzoil)-fenyloglicyna

Rys. 8.6. Struktura chemiczna chiralnej fazy stacjonarnej Pirkle'a.

niom π -donorowo-akceptorowych oraz występowaniu różnych efektów sterycznych pomiędzy molekułami fazy i związku rozdzielanego. Fazy te można ogólnie podzielić na związane jonowo lub kowalencyjnie z żelom krzemionkowym. Wzrost efektywności rozdzielania tych wypełnień można osiągnąć w wyniku zwiększenia liczby chiralnych centrów w obrębie cząsteczki modyfikowanej fazy. Rozdzielanie mieszanin racemicznych przeprowadza się zwykle w normalnym



1-naftylo-etyloamina

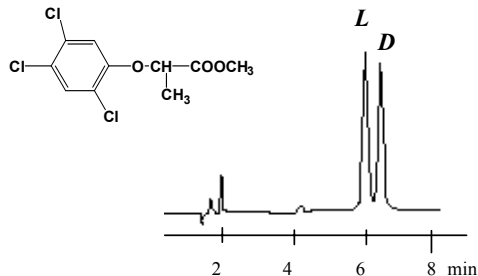
(Sumipax OA-1000)

Rys. 8.7. Struktura chemiczna chiralnej fazy stacjonarnej Si

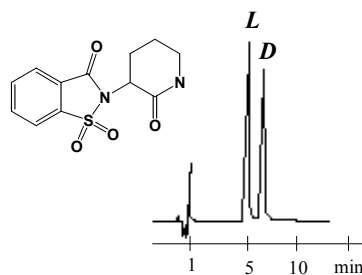
układzie faz. Do szeroko stosowanych tego typu faz, należą połączenia wprowadzone przez Pirkle'a. Historycznie pierwsze były fazy zawierające 3,5-dinitrobenzoiłofenyloglicynę (rys.8.6) lub 3,5-dinitrobenzoiłoleucynę, które jonowo lub kowalencyjnie związane były z γ -aminopropylowymi ugrupowaniami odpowiednio modyfikowanego żelu krzemionkowego.

Znaczna liczba wypełnień opartych na pochodnych chiralnych kwasów karboksylowych, amin i aminokwasów, została wprowadzona przez grupę badawczą Si . Należą do nich, między innymi, fazy zawierające chiralne atomy węgla w grupie mocznikowej, będące donorami lub akceptorami w tworzonych wiązaniach wodorowych lub fazy zawierające 1-fenyletyloaminę (rys.8.7) czy kwas 4-chlorofenilo-izowalerianowy. Enancjomery aminokwasów rozdzielane są na tego typu fazach najczęściej w postaci pochodnych *N*-dinitrobenzoiłowych. Mechanizm chiralnego różnicowania zachodzi dzięki oddziaływaniom typu π - π , wiązaniom wodorowym, a także oddziaływaniom dipol-dipol. Badano także wpływ efektów przestrzennych i elektrycznych, stwierdzając, że te pierwsze odpowiadają głównie za różnicowanie migracji chro-

kolumna: Sumipax OA
 analit: fenoprop
 faza ruchoma: n-heptan / izopropanol / TFA
 (100:0.5:0.5, v/v)
 przepływ: 1 ml/min
 detekcja: UV 230 nm



kolumna: Sumipax OA-1000
 analit: supimid
 faza ruchoma: THF / n-heptan (10:3, v/v)
 przepływ: 1 ml/min
 detekcja: UV 220 nm

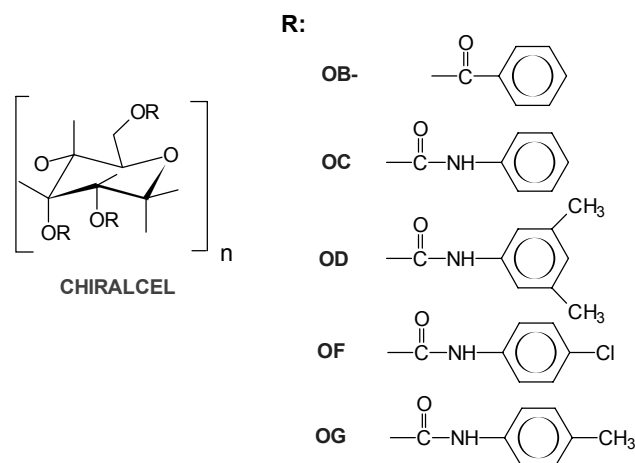


Rys. 8.8. Chromatogramy rozdzielania optycznych izomerów fenopropu i supimidu.

matograficznej enancjomerów, podczas gdy drugie determinują tworzenie diastereoizomerycznych kompleksów pomiędzy chiralną fazą a rozdzielanymi związkami. Na rys. 8.8 przedstawione są przykładowe chromatogramy rozdzielania enancjomerów fenotropu i supidimidu na tego typu chiralnych wypełnieniach.

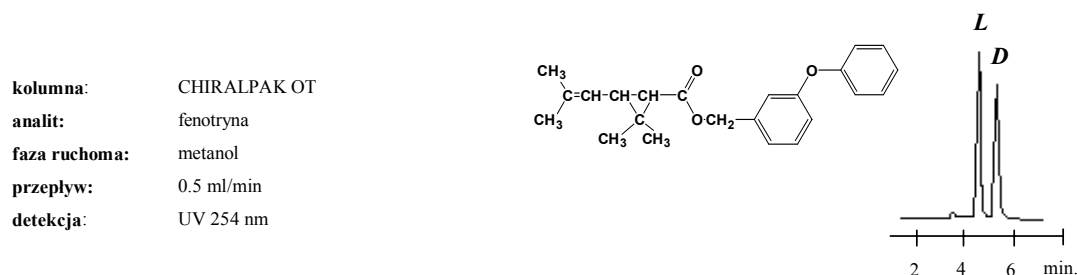
Typ II. Chiralne polimery i pochodne celulozy

Syntetyczne polimerowe CSPs otrzymywane są na drodze kopolimeryzacji monomeru w obecności chiralnego inicjatora lub katalizatora. Polimery, które posiadają wystarczającą wytrzymałość mechaniczną i mogą być otrzymywane w postaci ziaren o odpowiedniej średnicy, używane są bezpośrednio jako wypełnienie kolumn. Pozostałe obsadza się na nośniku stałym.



Rys. 8.9. Struktury chemiczne wypełnień Chiralcel.

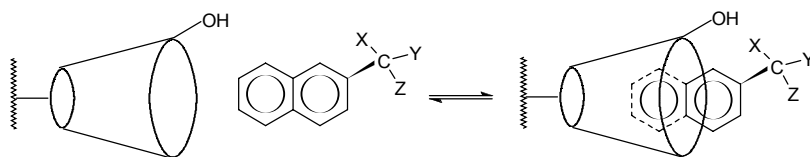
Przypuszczalny mechanizm działania faz polimerowych polega na inkluzji cząsteczek związków rozdzielanych do chiralnych wnęk sieci krystalicznej polimeru. Różny stopień dopasowania i siła oddziaływań w wyniku, np. tworzenia wiązań wodorowych, powoduje różną retencję enancjomerów. Proces różnicowania na tych syntetycznych fazach polega również na oddziaływaniach typu dipol-dipol pomiędzy fragmentami selektora i selektanda oraz na oddziaływaniach typu π - π . Fazy polimerowe produkowane są przede wszystkim przez japońską firmę Chiralcel (rys.8.9) pod handlowymi nazwami Chiralpak lub ChiraSpher. Na rysunku 8.10 przedstawiony jest chromatogram rozdzielania enancjomerów fenotryny przy użyciu kolumny Chiralpak OT.



Rys. 8.10. Chromatogram uzyskany w trakcie rozdzielania optycznych izomerów fenotryny.

Typ III. Cyklodekstryny

Dużą grupę CSP stanowią wypełnienia zawierające cyklodekstryny, czyli cykliczne oligosacharydy zbudowane z jednostek glukopiranozowych połączonych wiązaniami 1,4.

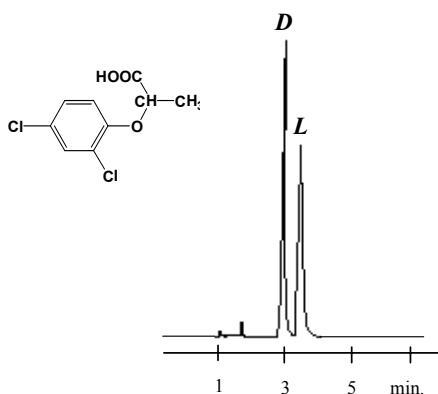


Rys. 8.11. Schemat tworzenia inkluzyjnego kompleksu cyklodekstryny z cząsteczką pochodnej naftalenu.

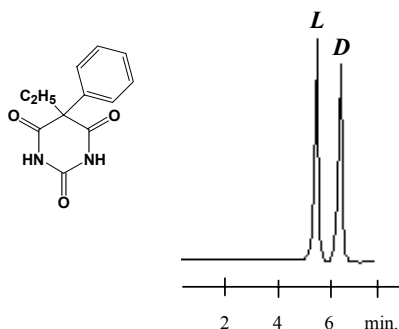
Otrzymywane są one w wyniku działania szczepu *Bacillus macerans* na krochmal. W handlu dostępne są 6-, 7- i 8-pierścieniowe cyklodekstryny, oznaczone odpowiednio literami α , β , γ , które po związaniu z żelazem krzemionkowym tworzą chiralne fazy stacjonarne. Cyklodekstryny tworzą z rozdzielanymi związkami kompleksy inkluzyjne. Hydrofobowa wnęka wewnątrz molekuly cyklodekstryny umożliwia kompleksowanie substancji trudno rozpuszczalnych w wodzie (rys.8.11).

Steryczne dopasowanie cząsteczek do wnętrza cyklodekstryny nie jest jednak jedynym wymogiem zaistnienia chiralnego rozpoznanie. Musi być ono uzupełnione oddziaływaniami elementów strukturalnych rozdzielanej cząsteczki z grupami hydroksylowymi, obecnymi na

kolumna: NUCLEODEX α -PM
analit: dichlorprop
faza ruchoma: metanol / 50 mMNaH₂PO₄; pH 3;
 (65:35, v/v)
przepływ: 0.7 ml/min
deteckcja: UV 230 nm



kolumna: NUCLEODEX β -PM
analit: prominal
faza ruchoma: Metanol/ 0.1% TEA; pH 4.0;
 (55:45; v/v)
przepływ: 0.7 ml/min
deteckcja: UV 254 nm

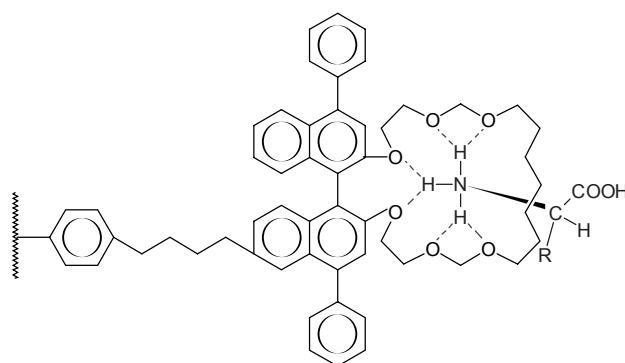


Rys. 8.12. Chromatogramy uzyskane w trakcie rozdzielania optycznych izomerów dichloropropu i prominalu

krawędzi toroidalnej struktury cyklodekstryny. Wypełnienia cyklodekstrynowe mogą być używane w normalnym lub odwróconym układzie faz. Jako fazę ruchomą w systemach RP, stosuje się najczęściej roztwory buforów z niewielką zawartością modyfikatora organicznego. Możliwa jest także elucja gradientowa. Na rys. 12 podane są przykłady separacji enancjomerów dichloropropu i prominalu na kolumnach obsadzonych pochodnymi α - i β -cyklodekstryny.

Typ IV. Etery koronowe

Etery koronowe mają zdolność kompleksowania szeregu kationów, np. Na^+ , K^+ , NH_4^+ , R_3NH . Ze względu na swą helikalną strukturę, cząsteczki te po obsadzeniu na nośniku stałym, okazały się również enancjoselektywne w stosunku do wielu chiralnych związków. Stabilność kompleksów, tworzonych przez etery koronowe, w znacznym stopniu zależy od dopasowania się jonu do ich wnęki inkluzyjnej. Kation amoniowy o rozmiarach zbliżonych do rozmiarów kationu potasowego, doskonale dopasowuje się do eteru 18-koronowego. Sytuacja taka ma na przykład miejsce w protonowanych aminokwasach, gdzie jon amoniowy związany jest z chiralnym atomem węgla (rys.8.13).



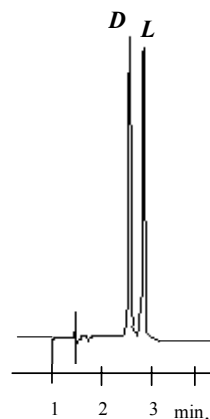
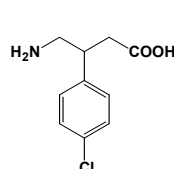
Rys. 8.13. Struktura inkluzyjnego kompleksu utworzonego przez eter 18-koronowy i cząsteczkę aminokwasu.

Wypełnienia różnicujące chiralne cząsteczki poprzez tworzenie inkluzyjnych kompleksów z eterami koronowymi, wymagają stosowania fazy ruchomej o odczynie kwaśnym. Jest to najczęściej 0.02 molowy wodny roztwór kwasu nadchlorowego. Użycie innych kwasów powoduje znaczne obniżenie enancjoselektywnych właściwości tego typu CSP's. Zastosowanie eterów koronowych do rozdzielania mieszanin racemicznych ograniczone jest tylko do związków chiralnych zawierających pierwszorzędowe grupy aminowe. Wadą tych faz jest także wysoki koszt ich syntezy. Produkowane są one przede wszystkim przez firmę Daicel i dostępne pod handlową nazwą Crownpak CR (rys.8.14).

Typ V. Fazy ligandowymienne (LEC)

Chromatografia ligandowymienna LEC (*Ligand-Exchange Chromatography*) jest techniką wykorzystywaną do rozdzielania enancjomerów wolnych aminokwasów i ich pochodnych, aminoalkoholi, hydroksykwasów oraz innych klas związków chiralnych, które zdolne są do tworzenia kompleksów z jonami metali przejściowych (M) i ligandami (L) zakotwiczonymi na fazie stacjonarnej lub będącymi składnikiem fazy ruchomej. Koordynacyjne kompleksy tworzą się tylko wtedy, gdy ligandy są donorami elektronów i tym samym zapełniają nieobsadzone orbitale d metali przejściowych. W LEC najczęściej stosowane są dwuwartościowe jony Cu, Ni, Co, Zn, Mg lub Cd, ponieważ tworzone przez nie kompleksy są kinetycznie labilne. Pionierami w rozdzielaniu enancjomerów z wykorzystaniem chromatografii ligandowymiennej byli

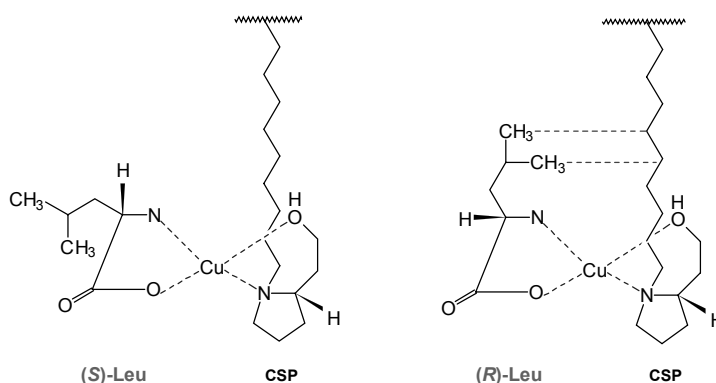
kolumna: CROWNPAK CR
 analit: baklofen
 faza ruchoma: H₂O / HClO₄ pH 2
 przepływ: 0.8 ml/min
 detekcja: UV 200 nm



Rys. 8.14. Chromatogram uzyskany w trakcie rozdzielania optycznych izomerów baklofenu.

Dawankow i współpracownicy. W pierwszych próbach rozdzielania za pomocą tej techniki, używali oni żywicy styrenodiwinylobenzenowej, do której, poprzez łańcuch alkilowy, przyłączona była reszta (*S*)-proliny. Fazę tę nasycono jonami miedzi (II), otrzymując w ten sposób odwracalny kompleks z enancjomerami rozdzielanego związku, np. aminokwasu (rys.8.15).

Znaczne udoskonalenia procesu rozdzielania enancjomerów uzyskał Gübitz, gdy zaczął stosować, jako chiralne selektory, aminokwasy obsadzone na żelu krzemionkowym. Technika ta pozwalała otrzymywać rozdzielania o współczynniku $\alpha=5-10$ i była z powodzeniem stosowana do rozdzielania enancjomerów nie tylko wolnych aminokwasów i ich pochodnych, ale także zasad Schiffa, aminoalkoholi i α -hydroksykwasów. Rysunek 8.16 przedstawia rozdzielanie izomerów optycznych kwasu mlekowego oraz alaniny na fazach Dawankowa.

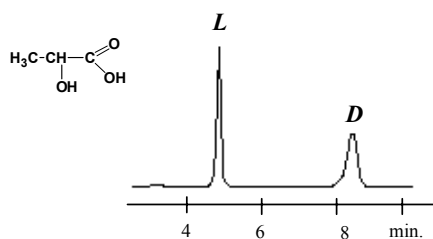


Rys. 8.15. Model oddziaływań enancjomerów leucyny ze związanym powierzchniowo kompleksem Cu(II) z (*S*)-proliną

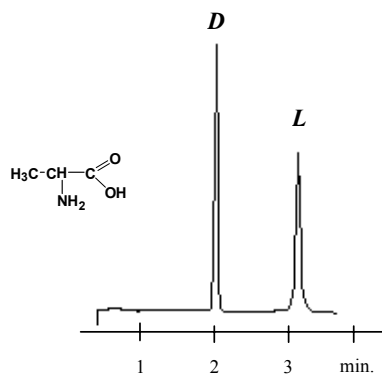
Typ VI. Fazy proteinowe

Wśród wielu białek stosowanych do wytwarzania tego typu faz, poprzez obsadzenie na różnego typu nośnikach stałych, wymienić należy wprowadzoną przez Hermanssona kwaśną α -glikoproteinę, występującą w osoczu krwi ludzkiej oraz albuminę surowicy wołowej, zastosowaną przez Allenmarka. Fazy te dostępne są na rynku pod nazwami EnantioPac, Chiral-AGP i Resolvosil (rys.8.17). Znane są również modyfikacje tych faz, a ostatnio wprowadzono także do handlu immobilizowaną albuminę surowicy ludzkiej. Oprócz wymienionych, badano również

kolumna: CHIRAL-1 (S-Leu)
analit: kwas mlekowy
faza ruchoma: H₂O / 5 mM CuSO₄ pH 5
przepływ: 0.8 ml/min
detekcja: UV 240 nm
temperatura: 80^o C



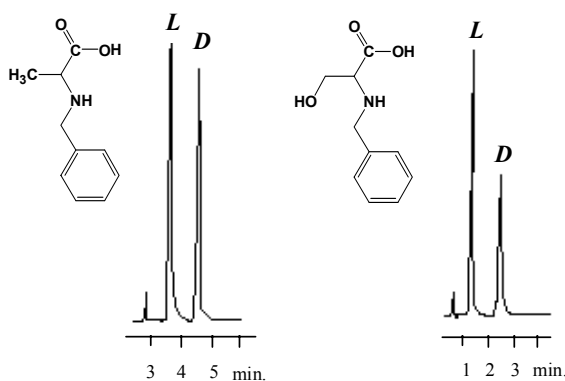
kolumna: CHIRAL-2 (S-HyPro)
analit: alanina
faza ruchoma: H₂O / 5 mM CuSO₄ pH 5.5
przepływ: 0.7 ml/min
detekcja: UV 250 nm
temperatura: 60^o C



Rys. 8.16. Chromatogram uzyskany w trakcie rozdzielania optycznych izomerów kwasu mlekowego i alaniny.

chiralne kolumny z enancjoselektywnymi ligandami białek i enzymów takich jak: *awidyna*, *mioglobina* i *dehydrogenaza mleczanowa*, *trypsyna*, *chymotrypsyna* i *cellulaza* z grzyba *Trichoderma reesei*. Fazy proteinowe mogą być stosowane w normalnym lub odwróconym układzie faz, wodnych lub wodno-organicznych. Pomimo intensywnej badań i uzyskaniu zadawalających wyników w rozdzielaniu mieszanin racemicznych *N*-benzoilo- i *N*-naftoilo- pochodnych aminokwasów, mechanizm działania faz proteinowych nie jest w pełni wyjaśniony. Skomplikowana struktura białek pozwala jedynie na wyciągnięcie bardzo ostrożnych jakościowych wniosków. Stwierdzono na przykład, że enancjoselektywność kolumny wypełnionej albuminą surowicy wołowej wzrasta wraz ze wzrostem oddziaływań hydrofobowych. Dla faz zawierających albuminy surowicy ludzkiej stwierdzono podobną zależność. W przypadku stosowania jako fazy stacjonarnej immobilizowanego enzymu, takiego np. jak α -*chymotrypsyna*, brano pod uwagę dwa mechanizmy chiralnego różnicowania. W pierwszym przyjęto, że enzym działa stereoselektywnie dzięki strukturze chemicznej swego aktywnego centrum i związanej z nim funkcji enzymatycznej. Według drugiego założenia, enzym może działać przez tworzenie

kolumna: RESOLVOSIL
analit: N-benzoilalanina
 N-benzoiloseryna
faza ruchoma: Propanol / 50mM KH₂PO₄ pH 6.5
 (10:90, v/v)
przepływ: 0.8 ml/min



Rys. 8.17. Chromatogram uzyskany w trakcie rozdzielania optycznych izomerów baklofenu.

diastereoizomerycznych kompleksów poza centrum aktywnym, a ich zróżnicowana względna trwałość jest powodem rozdzielania enancjomerów.

8.2.3 CHIRALNE DODATKI DO FAZY RUCHOMEJ

Rozdzielenie enancjomerów, poprzez dodatek do fazy ruchomej chiralnych odczynników różnicujących, polega na utworzeniu w tej fazie diastereoizomerycznych kompleksów z rozdzielanymi związkami, które różnią się trwałością bądź też adsorpcją na fazie stacjonarnej. Aby osiągnąć zadawalające parametry rozdzielania odpowiednich racemicznych selektandów, szczególną uwagę należy zwrócić na kontrolę zawartości chiralnego selektora, mocy jonowej i pH fazy ruchomej, temperatury oraz stężenia organicznego modyfikatora, czy też wody w fazie ruchomej. Rozdzielanie enancjomerów prowadzi się na klasycznych achiralnych kolumnach. Są to zwykle żele krzemionkowe lub modyfikowane żele krzemionkowe, np. RP-18.

W zależności od typu rozdzielanego racematu, można stosować, jako chiralne dodatki do fazy ruchomej, wiele różnorodnych odczynników stanowiących integralną część, wcześniej omawianych, chiralnych faz stacjonarnych. Tak więc mogą to być odczynniki działające na zasadzie wymiany ligandów, gdzie faza ruchoma zawiera jony metali Cu (II) lub Ni (II), odczynniki tworzące kompleksy typu par jonowych, na przykład kwas kamforosulfonowy czy chinina, α , β lub χ -cyklodekstryny i ich pochodne, chiralne etery koronowe, a także różne estry kwasu winowego. Dużą zaletą stosowania chiralnych dodatków w fazie ruchomej jest niska cena konwencjonalnych kolumn, na których przebiega proces rozdzielania, możliwość szybkich zmian warunków chromatograficznych, np. poprzez zmianę stężenia reagenta różnicującego, a także szeroki wybór chiralnych dodatków. Niestety technika ta posiada i wady. Najważniejszymi z nich są: wysoki koszt chiralnych dodatków, konieczność doboru takiego odczynnika różnicującego, który byłby z łatwością usuwany z eluatu, a także fakt, że obecność dodatku znacznie ogranicza możliwość detekcji. Z tych też powodów, do rozdzielania mieszanin racemicznych, coraz częściej stosuje się chiralne fazy stacjonarne.

9. APARATURA, KOLUMNA, SPRAWNOŚĆ ROZDZIELANIA, PRZEPUSZCZALNOŚĆ KOLUMNY

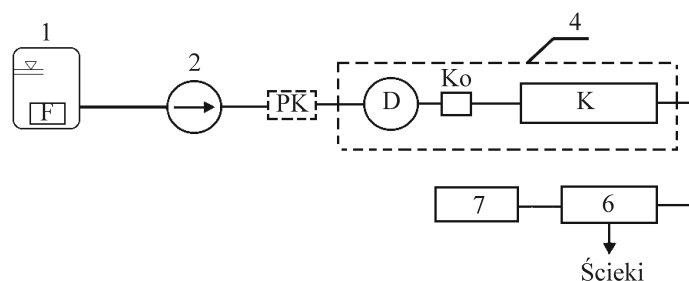
Marian Kamiński

9.1. APARATURA

Najważniejsi producenci chromatografów ciekowych oferują obecnie aparaty HPLC o budowie modułowej i o bardzo zbliżonych zasadach konstrukcji poszczególnych modułów. Różnice polegają na jakości materiałów i części elektronicznych, a także jakości wykonania i trwałości. Większe różnice mają miejsce w zakresie funkcji oprogramowania i wygody użytkownika. Istotne różnice bywają w zakresie wyposażenia aparatu w detektory różnego typu i różne często są parametry użytkowe oferowanych detektorów. Warto zwrócić uwagę czy producent aparatury legitymuje się certyfikatem systemu za-pewnienia jakości w/g normy ISO 9001.

Najważniejsze schematy ideowe (układy modułów i elementów) chromatografu ciekowego:

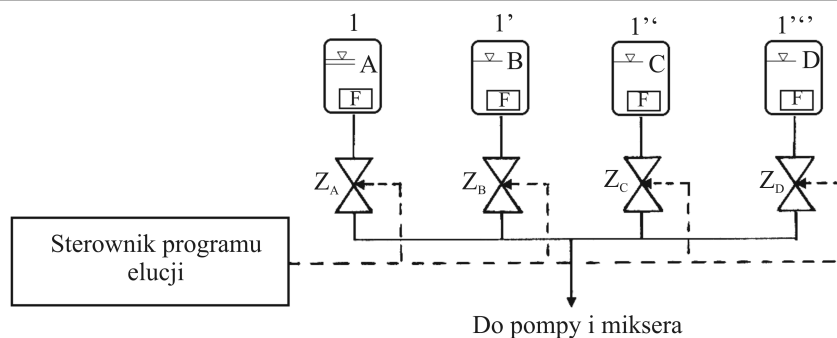
A) Aparat typu izokratycznego (stały skład eluentu)



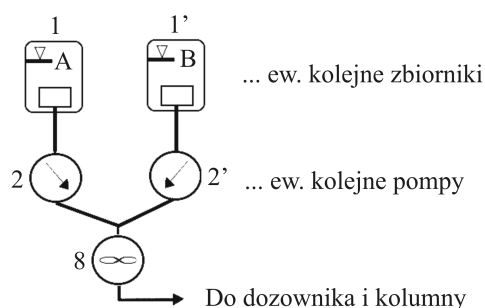
Rys. 9.1. Schemat ideowy wysokosprawnego chromatografu ciekowego HPLC do zastosowań w warunkach elucji izokratycznej; (znaczenie symboli opisano nieco dalej)

B) Aparat typu gradientowego (programowanie zmian składu eluentu albo programowanie stałego składu eluentu kilkuskładnikowego).

Różnica dotyczy tylko modułów 1 i 2. na rys. 9.1., tzn. systemu zasilania kolumny eluentem. Systemy zasilania kolumny występują w aparatach różnego typu i różnej ceny w dwóch opcjach:



Rys 9.2. Schemat ideowy modułu programowania składu cieczy po stronie ssącej pompy w aparacie chromatograficznym (programowanie składu eluentu złożonego z jednego do czterech składników)



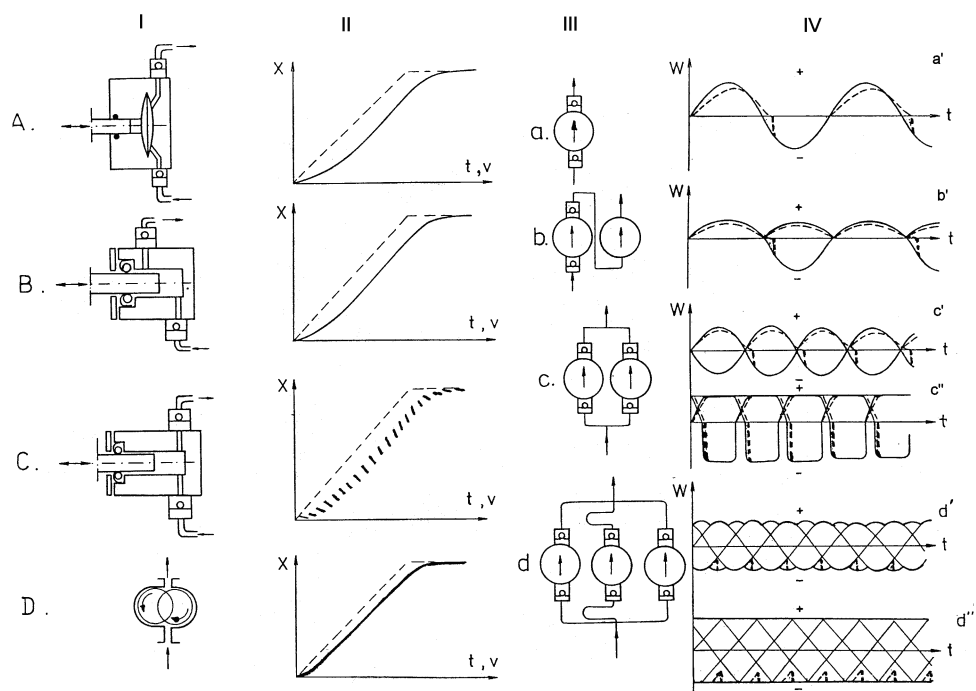
Rys. 9.3. Schemat ideowy zespołu zasilania kolumny HPLC eluentem o programowanym składzie z zastosowaniem kilku równolegle pracujących pomp i mikromieszalnika 8 (tzw. "gradient wysokociśnieniowy")

- a) z zastosowaniem zaworów proporcjonujących Z_A do Z_D (rys. 9.2) - doprowadzanie na przemian poszczególnych składników eluentu do pompy i mieszalnika w czasie okresu proporcjonowania T (2-4 zawory proporcjonujące) po stronie ssącej pompy (tzw. "gradient niskociśnieniowy" - opcja tańsza, lecz ma wady)
- b) z zastosowaniem dwóch do czterech równolegle pracujących pomp o wzajemnie zmienianej wydajności (rys. 9.3).

Znaczenie symboli na rys. 9.1- 9.3:

- 1, 1', 1'', 1''' - Pojemniki z eluentem otrzymanym poprzez zmieszanie cieczy lub ze składnikami eluentu (A, B, C, D), niekiedy wyposażone w system odgazowania helmem (należy pamiętać, aby nie dopuścić do rozwoju życia biologicznego w eluencie !).
- F - filtr cieczy z porowatego spieku ze stali kwasoodpornej, albo ceramiki.
- 2, 2' - pompa
- 3 (D) - zawór dozujący albo automatyczny podajnik próbek,
- Ko - kolumna ochronna - zwana często "prekolumną",
- (5) K - właściwa kolumna rozdzielająca,
- 4 - termostat kolumny i pętli dozującej (korzystnie w zakresie od 4 do 140°C)
- 6 - detektor lub szeregowo, albo równolegle połączone detektory
- 7 - integrator lub komputerowy system rejestracji i przetwarzania danych oraz sterowania modułami aparatu

- 8 - mieszalnik statyczny lub dynamiczny
 PK - prekolumna - bywa stosowana w celu nasycenia eluentu fazą stacjonarną (dla zabezpieczenia właściwej kolumny przed "zdzieraniem" fazy stacjonarnej przez eluent i zwiększenia czasu życia kolumny).



Rys. 9.4. Charakterystyki pomp stosowanych w chromatografii cieczowej.

Kolumna I: schematy budowy pomp;

- A. - pompa membranowa,
- B. - pompa tłokowa "nie odwracająca" odcinków przebiegu programu elucji,
- C. - pompa tłokowa "odwracająca" odcinków przebiegu programu elucji,
- D. - pompa zębata, śrubowa, helikoidalna albo perystaltyczna

kolumna II: schematyczne wykresy stężenia na wylocie z odpowiedniej pompy liniowego programu elucji wprowadzonego po stronie ssącej (w przypadku pompy typu C zaznaczono zjawisko "odwracania" odcinków przebiegu linii prostej);

kolumna III: alternatywne sposoby wzajemnego usytuowania i współpracy głowic pompy:

- a) pompa z jedną głowicą czynną;
- b) pompa z jedną głowicą czynną i jedną głowicą bierną (antypulsacyjną);
- c) pompa z dwiema głowicami czynnymi o przesunięciu fazowym ruchu tłoków 180°;
- d) pompa trójgłowicowa (120° przesunięcie fazowe ruchu tłoków);

kolumna IV: wykresy zmian natężenia przepływu cieczy po stronie ssania (-) i po stronie tłoczenia (+) pompy: - o sinusoidalnej (a', b', c', d'), prostokątnej (c'') i trapezowej (d'') charakterystyce po stronie ssania i tłoczenia;

- przebiegi wydajności bez oporu przepływu ($\Delta P = 0$),
- - - - - przebiegi wydajności w warunkach podwyższonego ciśnienia pompowania ($\Delta P > 0$),
gdy na początku cyklu ssącego ciecz nie wpływa do głowicy pompy;

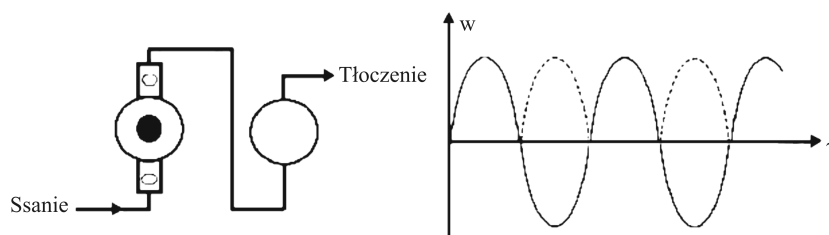
Oznaczenia: t - czas, v - objętość; n - prędkość obrotowa pompy; w - natężenie przepływu eluentu, X - stężenie składnika B, C w eluencie na wylocie z pompy.

9.1. NAJWAŻNIEJSZE MODUŁY SKŁADOWE APARATU HPLC

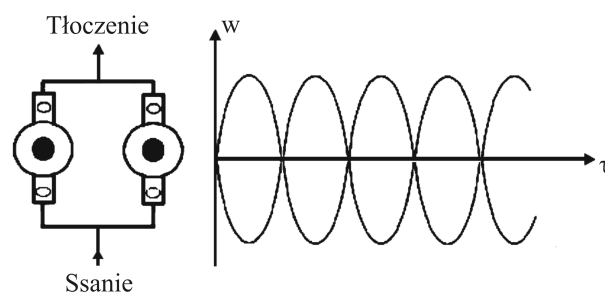
1. Pompa

Najczęściej jest to pompa tłokowa o posuwisto - zwrotnym ruchu tłoka i o niewielkiej pojemności skokowej. Głównie, z jednym czynnym i z jednym biernym tłokiem. Tłok "czynny" pompuje ciecz, pracując jako pompa ssąco tłocząca. Ta część głowicy posiada samoczynnie działające zawory zwrotne, których elementy wykonano z syntetycznego szafiru, rubinu, albo z ceramiki. Drugi tłok jest tłokiem "biernym". Wykonuje ruch posuwisto - zwrotny przesunięty w fazie o 180° i pracuje z wydajnością ok. 50% wydajności tłoczenia tłoka czynnego. Pełni on rolę antypulsatora i ta część głowicy nie ma zaworów zwrotnych. Wydajność pompy jest najczęściej regulowana automatycznie w zakresie 0,1 - 10 ml/min przy maksymalnym ciśnieniu do 43 / 45 MPa. Może być też utrzymywana stałe ciśnienie pracy pompy i wtedy może ona służyć do wypełniania kolumn HPLC.

Stosowane też bywają pompy z dwiema lub trzema równoległymi głowicami czynnymi, wyposażonymi w zawory ssąco-tłoczące, zwłaszcza w aparatach do preparatywnych zastosowań HPLC (10 - 100 ml/min). Wtedy tłoki są napędzane w ten sposób, aby w maksymalnym stopniu eliminowane były pulsacje ciśnienia (przesunięcie fazowe odpowiednio o 180 , albo 120 stopni kątowych). Tego typu pompy nie posiadają głowic biernych, pełniących rolę antypulsatora. Pulsacje są eliminowane dzięki przesunięciu fazowemu pracy tłoków. Na rys 9.4 przedstawiono charakterystyki pracy pomp.



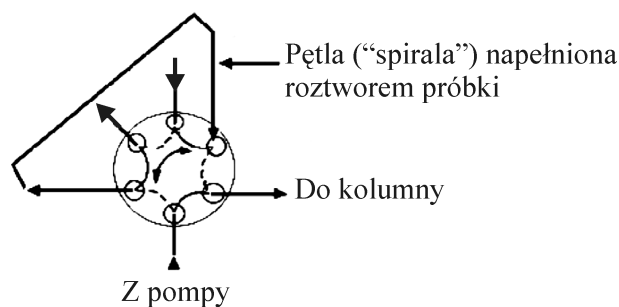
Rys. 9.5. Schemat ideowy pompy ssąco tłoczącej do HPLC z jednym czynnym i jednym biernym tłokiem oraz uproszczony przebieg natężenia przepływu cieczy po stronie ssania i tłoczenia (w rzeczywistości przebiegi cykli tłoczenia nakładają się wzajemnie, a czas trwania każdego cyklu ssania jest skrócony, a amplituda zwiększona - patrz rys. 4)



Rys. 9.6. Schemat ideowy pompy dwugłowicowej do HPLC z dwoma czynnymi tłokami oraz uproszczony przebieg natężenia przepływu cieczy po stronie ssania i tłoczenia (w rzeczywistości przebiegi cykli tłoczenia nakładają się wzajemnie, a czas trwania każdego cyklu ssania jest nieco skrócony, a amplituda nieco zwiększona - patrz rys. 4).

Elementy pomp, mające styczność z cieczą, wykonane są z wysokiej jakości stali kwasoodpornej, teflonu, szkła, węgla szklistego, szafiru, rubinu i ceramiki. W tzw. zastosowaniach "biokompatybilnych" zamiast stali kwasoodpornej stosuje się tytan, albo tworzywo o nazwie PEEK. W tym ostatnim przypadku pompy mogą najczęściej pracować tylko do ciśnienia 15 MPa.

Innego typu pompy, albo tzw. bezpompowe urządzenia transportujące eluent do i przez kolumnę, takie, jak pompy membranowe, strzykawkowe, albo tzw. bezpompowe systemy zasilające, oparte o bezpośrednie wykorzystanie sprężonego gazu obojętnego, znajdują obecnie marginalne zastosowanie. Pompy membranowe bywają stosowane do chromatografii cieczowej w skali preparatywnej, a pompy strzykawkowe w chromatografach cieczowych z tzw. kolumnami mikropakowanymi o średnicy wewnętrznej 0.5 do 1 mm. Urządzenia bezpompowe zasilane



Rys. 9.7. Uproszczony schemat działania zaworu dozującego z pętlą
 ————— połączenie przewodów w czasie napełniania pętli dozującej ("load")
 - - - - - połączenie przewodów w czasie dozowania próbki do kolumny ("inject")

sprężonym He, Ar lub N₂ (mają znaczenie historyczne i zastosowanie w mało kosztownych i niezawodnych aparatach do zastosowań dydaktycznych).

2. Zawór dozujący lub automatyczny podajnik próbek

Prawie zawsze jest stosowany zawór Rheodyne Rh 7125 lub inny zawór dozujący tego producenta, charakteryzującego się szczególnie wysoką jakością wykonania.

Pojemności pętli: $\left. \begin{matrix} 20\mu\text{l} \\ 5\mu\text{l} \end{matrix} \right\}$ "klasyczne"; $1\mu\text{l} - \mu\text{kolumny}$; $\left. \begin{matrix} 100\mu\text{l} \\ 1000\mu\text{l} \end{matrix} \right\}$ skala

semipreparatywna chromatografia lub oznaczanie składników śladowych.

Można dozować całą objętość pętli. Wtedy w celu całkowitego wypełnienia pętli i otrzymywania powtarzalnych wyników trzeba wprowadzić ponad 2.5-krotną objętość pętli dozującej do zaworu ustawionego w pozycji "load". Można wprowadzać też część objętości pętli dozującej (poniżej 0.5 objętości pętli), oddzielając w strzykawce próbkę od małych porcji eluentu, pęcherzykami powietrza.

3. Kolumny HPLC

Kolumny są zbudowane z wysokiej jakości stali kwasoodpornej, albo szkła oraz z teflonu. Wypełnienie: porowaty sorbent, albo faza stacjonarna o możliwie kulistych i jak najmniejszych ziarnach. Stosuje się bardzo wiele rodzajów wypełnień kolumn HPLC o zróżnicowanych mechanizmach oddziaływań sorpcyjnych. Złoża wypełnień kolumn HPLC otrzymuje się najczęściej "na mokro" pod wysokim ciśnieniem. Kolumny preparatywne są często wyposażone, dodatkowo, w system zapewniający osiową kompresję złoża. Dla zachowania dobrej rozdzielczości kolumny szkodliwe mogą być szybkie zmiany ciśnienia eluentu, udary mechaniczne, a

Tabela 9.1. Zestawienie typowych parametrów kolumn HPLC, stosowanych w różnej skali wykorzystania chromatografii

	Mikrokolumny pakowane	Klasyczne kolumny analityczne	Kolumny semi-preparatywne	Kolumny preparatywne
średnice dc [mm]	0,5 - 1	2.0; 3.2; 4.0; 4.6	6 - 12	12-100 więcej
długość Lc [mm]	50 - 250	50 - 250	150 - 500	250 - 1000
wielkość ziaren [µm]	3; 5; 10	3; 5; 10	5; 10; 15 - 25	10; 22; 25 - 75
liczba pólk teoretycznych na 1 m wypełnienia kolumny	odpowiednio, co najmniej 100; 50; 15 tys.	odpowiednio, co najmniej 100; 50; 15 tys.	50 - 5 tys.	15 - 1 tys.

niekiedy także, dopuszczenie do wyschnięcia wypełnienia. W ostatnich latach trwa rozwój tzw. monolitycznych wypełnień kolumn, nie posiadających wypełnienia w postaci ziarnistej. Kolumny te cechują się szczególnie korzystną, bardzo niską wartością tzw. "impedancji rozdzielania".

4. Termostat do kolumn

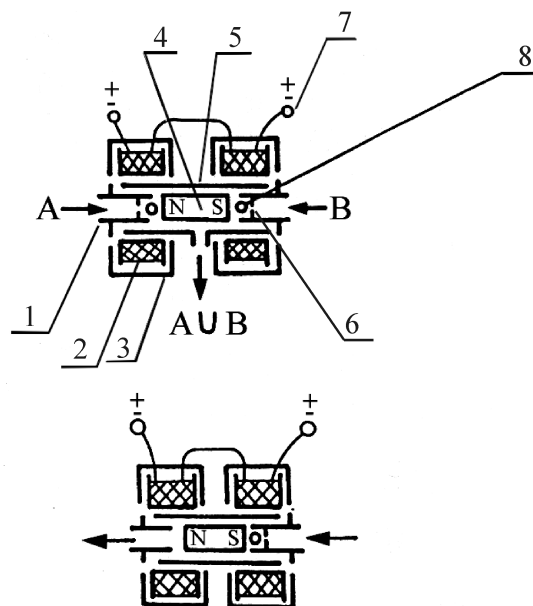
Urządzenie bardzo pomocne w uzyskiwaniu powtarzalnych wyników oznaczania. Zakres temperatur: pokojowa do 80°C, albo +4°C do nawet 140°C (biochromatografia i chromatografia żelowa) Korzystne jest, aby termostatowany była również ta część zaworu dozującego, która ma pętlę dozującą. Należy też termostatować ciecz doprowadzaną do zaworu dozującego.

5. Zawory proporcjonujące

Najczęściej są to elektromagnetyczne zawory membranowe. Przed kilku laty zostały opracowane w Zespole Chromatografii Cieczowej PG, znacznie szybsze, przepływowe zawory elektromagnetyczne typu suwakowego (czas przełączania w wodzie ok. 3 msec.) Dzięki ich zastosowaniu można by zasadniczo obniżyć tzw. okres proporcjonowania i w konsekwencji poprawić precyzję programowania składu cieczy. Na rys. 9.8 pokazano schemat budowy tych nowego typu zaworów proporcjonujących.

Uwagi użytkowe dotyczące bieżącej bezawaryjnej eksploatacji pompy

- Warto co jakiś czas przepłukać przestrzeń za uszczelką tłoków w głowicy pompy, szczególnie w przypadku użycia buforu jako eluentu oraz zawsze gdy eluent zawiera substancję tworzącą fazę stałą.
- Pulsacje ciśnienia, albo brak pompowania eluentu powoduje z reguły "przyklepanie" się kulki w zaworze ssącym do gniazda. Należy oczyścić zespół kulka - gniazdo (albo cały zawór bez rozbierania) - po pięć minut w łaźni ultradźwiękowej: w acetonie, wodzie i de-tergencie oraz ponownie w wodzie i acetonie. (Należy zwrócić uwagę, aby nie spadła na podłogę kulka, lub gniazdo, bo bardzo trudno je potem odnaleźć!).



Rys. 9.8. Schemat budowy zaworów proporcjonujących opracowanych w Politechnice Gdańskiej o wyjątkowo korzystnej szybkości przełączania (poniżej 5 ms w wodzie), stosowanych w urządzeniach programowania składu fazy ruchomej używanych w badaniach tej pracy:

- a) trzydrogowy zawór proporcjonujący,
 - b) jednodrogowy zawór proporcjonujący zablokowany z mieszalnikiem,
- 1 - głowica , 2 - cewka elektromagnesu, 3 - magnetowód, 4 - magnes stały, 5 - korpus zaworu , 6 - gniazdo zawieradła, 7 - zasilanie elektromagnesu, 8 - zwieradło kuliste (kulka rubinowa lub cermiczna)

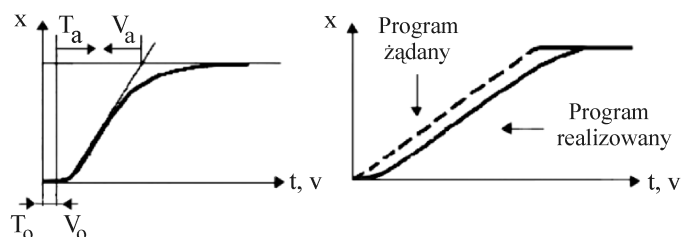
- Ważne, aby wszystkie filtry były drożne - przepłukiwać co jakiś czas w przepływie w przeciwnym kierunku niż praca filtru, stosując wibracje ultradźwiękowe. Filtry mogą być zapychane przez bakterie - stosować NaN_3 lub inne substancje bakteriobójcze jako dodatki do eluentu nie trującego, a szczególnie, do eluentu będącego pożywką dla bakterii, czy drożdży.

9.3. ELUCJA GRADIENTOWA - PROBLEMY ZWIĄZANE ZE STOSOWANIEM ELUCJI GRADIENTOWEJ I ZALECENIA PRZYDATNE W PRAKTYCE

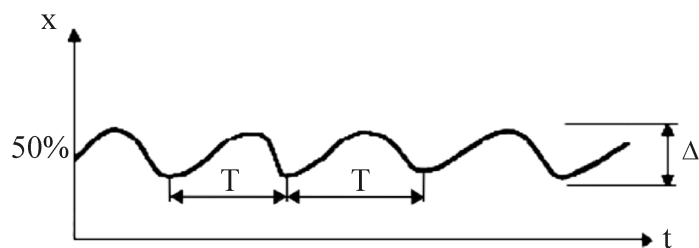
1. Odpowietrzenie komponentów eluentu zapobiega złej pracy pompy, wysokim szumom detektora, utlenianiu katalitycznemu badanych substancji w kolumnie. Metody odpowietrzania: przedmuchiwanie cieczy helem w czasie ok. 5 min. i utrzymywanie atmosfery helu nad cieczą, odpowietrzanie ultradźwiękowe (co najmniej 15 min, jednak dla wody całkowicie nieskuteczne), odpowietrzanie cieczy pod próżnią bez wrzenia, doprowadzenie cieczy do wrzenia i ochłodzenie cieczy, permeacja gazu przez membranę do próżni (tzw. próżniowe odgazowywacze membranowe - metoda najczęściej obecnie stosowana).
2. Brak powietrza we wszystkich przewodach przyłączonych do pompy po stronie ssącej jest absolutnie niezbędny dla uniknięcia błędów programowania składu eluentu (do-tyczy to także przewodów doprowadzających składniki eluentu aktualnie nie stosowane w programie

elucji). Może być celowe odłączenie rurek doprowadzających aktualnie nie stosowane składniki eluentu i zaślepienie kanałów ich wlotu do pompy.

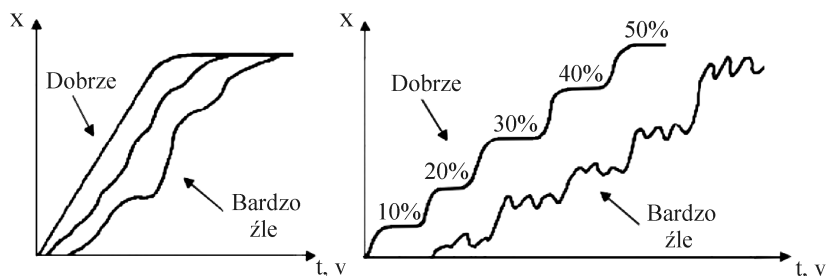
3. Należy brać pod uwagę możliwość występowania interakcji objętości, wzrostu temperatury, a szczególnie wzrostu lepkości i wydzielania powietrza podczas mieszania wody z metanolem, (MeOH), acetonitrylem (AcCN), czterowodorofuranem (tetrahydrofuranem - THF itp.)
4. Należy zwrócić uwagę na wzajemną mieszalność składników programowanego eluentu i czy nie mogą się wytrącać sole w czasie ich mieszania. Wytrącanie soli może spowodować uszkodzenie pompy i inne problemy.
5. Mogą mieć miejsce różne zniekształcenia przebiegu programu elucji spowodowane przez podwyższoną objętość elementów aparatu, w których ma miejsce mieszanie cieczy przed wlotem do kolumny chromatograficznej, albo przez zbyt małą objętością mieszalnika, albo/i przez nakładanie się cyklicznej pracy zaworów proporcjonujących i pompy (dotyczy urządzeń z zaworami proporcjonującymi). W konsekwencji w warunkach programowania składu cieczy występują wahania linii bazowej detektora oraz niezadowalająca powtarzalność i odtwarzalność wyników oznaczeń, mimo braku pulsacji ciśnienia. Gdy odchylenie programu elucji otrzymanego na wlocie do kolumny od zaprogramowanej postaci jest spowodowane tylko mieszaniem cieczy w pompie, w przewodach łączących i w mieszalniku, należy określić opóźnienie transportowe i zastępczą objętość mieszania cieczy przed wlotem do kolumny i można zastosować odpowiednią korektę programu elucji oraz odpowiednie przesunięcie momentu dozowania próbki. Gdy wahania przebiegu programu elucji są spowodowane przez niedoskonałość systemu synchronizacji pompa - zawory proporcjonujące, to użytkownik aparatu może spróbować je ograniczyć poprzez dokładne odpowietrzenie



Rys. 9.9. Ilustracja wpływu opóźnienia transportowego (T_0 , V_0) i objętości mieszania cieczy przed (V_a) wlotem do kolumny na przebieg programu elucji (z lewej: w warunkach elucji izokratycznej, z prawej: w warunkach elucji gradientowej) oraz najprostsza zasada wyznaczania opóźnienia transportowego (T_0) i zastępczej objętości mieszania cieczy w aparacie (V_a).



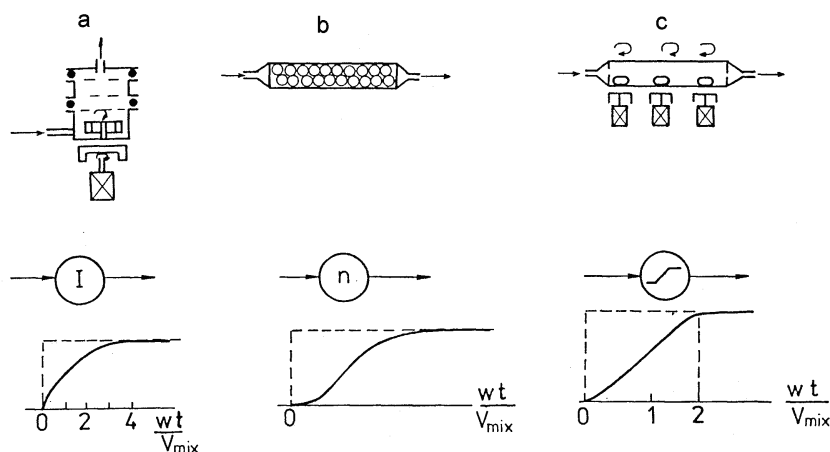
Rys. 9.10. Wahania składu eluentu w przypadku zbyt małej objętości mieszalnika w aparacie gradientowym z zaworami proporcjonującymi; T - okres proporcjonowania, t - czas, Δ - amplituda wahań stężenia (efekt ma znaczenie, w aparacie preparatywnym z zaworami proporcjonującymi, gdy dobrano za mały mieszalnik, albo po odłączeniu mieszalnika w aparacie analitycznym).



Rys. 9.11. Ilustracja wpływu poprawnej i niedoskonałej synchronizacji cyklicznej pracy zaworów proporcjonujących i pompy na przebieg otrzymanego programu elucji (po lewej: w warunkach elucji gradientowej, po prawej: w warunkach elucji izokratycznej)

całego układu i zabezpieczenie przed dopływem powietrza do pompy. Jeżeli jednak to nie pomaga, należałoby zmienić gradientowy zespół zasilający kolumnę na doskonalszy, np. zastosować tzw. “wysokociśnieniowy system gradientowy”.

- Należy zbadać wpływ zanieczyszczeń eluentu oraz składników rozpuszczalnika próbki na przebieg linii bazowej podczas programowania składu cieczy. Należy w tym celu zarejestrować “chromatogram” bez dozowania jakiegokolwiek próbki oraz z dozowaniem tylko rozpuszczalnika próbki (chromatogram “ślepej próbki”). We współczesnych chromatografach istnieje możliwość odejmowania tych przebiegów od chromatogramów badanych próbek, ale jest to dość ryzykowne i może prowadzić do znacznych błędów oznaczania, gdy powtarzalność programowania składu cieczy nie jest idealna. Bardziej celowe jest stosowanie dostatecznie czystych składników eluentu (czystość “gradient grade”) i unikanie innych składników rozpuszczalnika próbki poza składnikami eluentu. Ze względu na konieczność stabi-



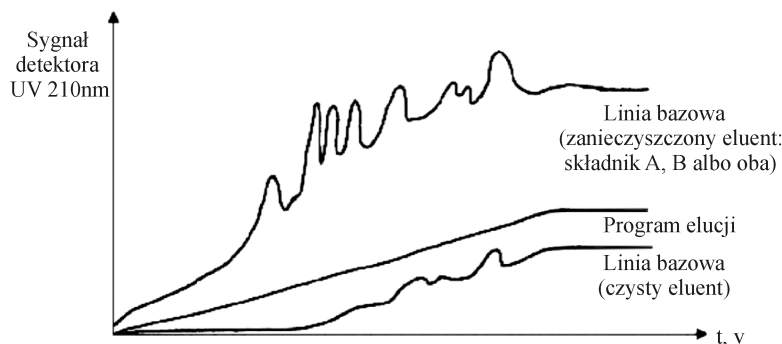
Rys. 9.12. Mieszalniki stosowane w gradientowych chromatografach cieczowych oraz orientacyjne przebiegi krzywych odpowiedzi tych mieszalników na wymuszenie skokowe.

- a - mieszalnik z mieszadłem - element inercyjny I rzędu;
 - b - zbiornik wypełniony kulkami - element inercyjny rzędu zbliżonego do I - szego;
 - c - zbiornik z kilkoma obracającymi się lub wibrującymi magnesami - mieszalnik o liniowej odpowiedzi na skok jednostkowy, bywa stosowany jako moduł wytwarzania liniowej postaci programu elucji w chromatografii cieczowej z tzw. kolumnami mikropakowanymi;
 - wiersz górny - schemat budowy mieszalnika,
 - wiersz środkowy - symboliczne oznaczenie mieszalnika,
 - wiersz dolny - odpowiedź mieszalnika na wymuszenie skokowe;
- Oznaczenia: t - czas, w - objętościowe natężenie przepływu, V_{mix} - objętość mieszania mieszalnika.

lizowania substancji biologicznie czynnych poprzez dodatek odpowiednich substancji do próbki i eluentu (EDTA, surfaktanty, β -merkpto-etanol i inne), albo z powodu zbyt małej rozpuszczalności substancji rozdzielanych w eluencie A o początkowym składzie - nie zawsze jest to możliwe.

Praktyczne sprawdzenie aparatu pod względem poprawności programowania składu cieczy:

- zminimalizować zbędne objętości mieszania, odłączyć kolumnę i w jej miejsce umieścić łącznik o znikomej objętości; Zarejestrować kilkakrotnie odpowiedź na skokową oraz na liniową zmianę stężenia składnika B (0.075% acetonu w wodzie, albo metanolu) względem cieczy A (0.025% acetonu w wodzie, albo w metanolu), stosując typowe natężenie przepły-



Rys. 9.13. Ilustracja wpływu koncentrowania się i elucji zanieczyszczeń składników eluentu (w tym także wody!), a tworzenie się fałszywych pików oraz wpływu absorpcji światła przez składnik B eluentu na przebieg sygnału detektora (szczególnie UV) w warunkach elucji gradientowej realizowanej z zanieczyszczonymi składnikami A, B, ... eluentu

wu, np. 1.5 ml/min typowy detektor UV (265 nm) i ok. 30 - to minutowy program elucji 0 do 100% B; Wyznaczyć graficznie v_o , v_a (parametry testu aparatury) oraz sprawdzić prostoliniowość oraz powtarzalność zrealizowanego kilkakrotnie programu elucji. Stosując tę samą ciecz A i B (oprócz różnicy stężenia acetonu), unika się wpływu zanieczyszczeń na przebieg linii bazowej, jak to zilustrowano na rys. 9.13.

Niekiedy celowe jest stosowanie dodatkowego oczyszczania takich składników eluentu, jak H_2O , CH_3OH , THF, Heksan - metody oczyszczania: Vogel "Preparatyka organiczna".

9.4. DETEKCJA W HPLC

Detektor HPLC to instrument mierzący stężenie, albo strumień masy substancji w eluacie wypływającym z kolumny chromatograficznej i przepływającym przez naczynie pomiarowe detektora lub dopływającym do czujnika pomiarowego detektora. Detektor jest, więc, urządzeniem określającym zmiany w składzie eluatu, na podstawie różnic pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi eluentu i substancji oznaczanej (analitu). Niezależnie od rodzaju detektora i właściwości wykorzystanej podczas detekcji, eluent zawierający substancję oznaczaną (eluat), po wyjściu z kolumny jest kierowany do przepływowego naczynka pomiarowego. W większości przypadków o wyborze detektora decyduje skład zastosowanego eluentu i właściwości substancji rozdzielanych.

Zasady i pojęcia ogólne są identyczne jak dla wszystkich instrumentów analitycznych. Dodatkowo istotnego znaczenia nabierają cechy detektora w zakresie dynamiki odpowiedzi i minimalizacji pozakolumnowych efektów rozmycia stref w detektorze.

Pojęcia ogólne:

- poziom szumów: średnia wartość amplitudy szumów sygnału detektora liczona jako odległość szczyt - szczyt, np. gdy czułość wynosi 10^{-3} AU/FS dla tzw. pełnej skali (100%), to poziom szumów powinien być mniejszy od 10^{-5} Jedn. Absorbancji. Wartość poziomu sygnału bywa wyrażona bezpośrednio w jednostkach mierzonej przez detektor wielkości fizycznej;
- czułość: stosunek wartości sygnału, otrzymanego dla określonej wartości wielkości fizycznej mierzonej przez detektor do amplitudy szumów: $Cz = S / Sz$;
dryf : powinien być mniejszy od ok. < 10% najczulszej skali w czasie godziny, np.: 10^{-4} AU/h;
- zakres liniowości: jedna z użytecznych definicji wymaga sprawdzenia w jakim zakresie stężeń analitu [C], albo w jakim zakresie wartości jednostek fizycznych mierzonych przez detektor [F] sygnał detektora (np. powierzchnia pików, albo wskazywana absorbancja) jest proporcjonalny do stężenia, albo do rzeczywistej wartości mierzonej wielkości fizycznej, tzn. w jakim zakresie stężeń, spełniony jest warunek $S = k C^x$, albo $S = F^x$ dla $x \in (0,98; 1,02)$;
- granica detekcji: stężenie analitu powodujące pik o wysokości ok. 3-5 krotności poziomu szumów detektora; (zależy od czułości detektora, ale i od wielkości próbki oraz od warunków rozdzielania);
- granica oznaczalności: stężenie analitu powodujące pik o wysokości ok. 5-10 krotności poziomu szumów detektora; (zależy od czułości detektora, ale i od wielkości próbki oraz od warunków rozdzielania);

Tabela 9.2. Zestawienie najważniejszych metod detekcji w HPLC - cechy charakterystyczne detektorów i metod detekcji

Typ detektora	Zakres przydatności	Granica oznaczalności	Zakres liniowości	Uwagi
Spektrofotometryczny w zakresie UV-VIS, (fotoabsorpcyjometryczny)	selektywny, oznacza substancje absorbujące światło w zakresie 200-800nm), można wykorzystać odwróconą detekcję w UV, detektor stężeniowy, pomiar w [Jednostkach Absorbancji]	~0,2 ng/ml ~2 10^{-5} Jednostki Absorbancji	$10^3 - 10^4$	Bardzo szeroki zakres wykorzystania, najważniejszy detektor w HPLC, monochromator może być z siatką dyfrakcyjną, albo z pryzmatem, w tańszych bywają też wykorzystywane filtry interferencyjne
UV-VIS typu "DAD" ("diode array detector")	190-800 nm, od 90-1024 fotoelementów, bardzo przydatny, także do analityki jakościowej	~0,5 ng/ml ~5 10^{-5} Jednostki Absorbancji	$10^3 - 10^4$	Szczególnie użyteczny podczas doboru warunków rozdzielania,
Refraktometryczny ("RI", albo "RID")	"uniwersalny", szczególnie w chromatografii żelowej, elucja gradientowa wykluczona	~0,7 g/ml ~2 10^7 Jednostki Refrakcji	10^3	Zasady działania: - refleksyjny, - odchyleniowy, - interferencyjny

Tabela 9.2 cd. Zestawienie najważniejszych metod detekcji w HPLC - cechy charakterystyczne detektorów i metod detekcji

Typ detektora	Zakres przydatności	Granica oznaczalności	Zakres liniowości	Uwagi
Fluorescencyjny ("FL" albo FLD)	selektywny, tylko dla substancji fluoryzujących naturalnie lub odpowiednich pochodnych	~0,8 pg/ml	10 ³ - 10 ⁴	WWA (PAH), katecholaminy, leki, płyny fizjologiczne., bardzo czuły i łatwy w stosowaniu
Elektrochemiczny ("EC")	selektywny, przydatny tylko dla łatwo redukowalnych lub utleniających substancji	~1 pg/ml		trudny w stosowaniu, możliwość "zatrucia" elektrod; b.czuły, typ kulometryczny (rzadko), typ amperometryczny (często stosowany, 3 elektrody)
Konduktometryczny ("KD")	stosowalny wobec substancji jonowych i jonizowalnych	od 0,2% różnicy przewodnictwa	10 ⁵	detekcja i oznaczanie jonów w chromatografii jonowej
Wykorzystanie mikroreaktora do postkolumnowej detekcji reakcyjnej	wysoka selektywność, zależna od typu detektora stosowanego za mikroreaktorem	jak fluorescencyjny, UV-VIS itd.		potencjalnie bardzo szerokie zastosowanie, problem zniwelowania dodatkowego rozmycia stref w mikroreaktorze
Radiometryczny	selektywność - ogromna, przydatny tylko dla substancji znaczonej	najczulszy, od ok. 2000 rozkł. / min.	10 ⁵	konieczny scyntylator
Spektrometr Mas LC-MS, lub LC-MS-MS	uniwersalny i b.czuły, jakościowy i ilościowy	do 0,1 pg/ml	10 ⁷	b. przydatny, jednak kosztowny i ciągle w fazie rozwoju

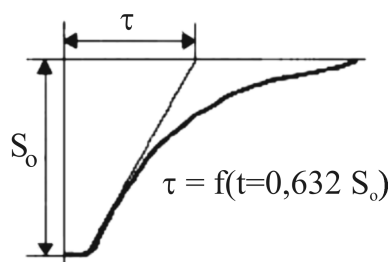
- selektywność: stosunek sygnału dla dwóch różnych substancji: $s = (C_2/C_1) > 10^n$; im n bardziej większe od 0, tym bardziej selektywny detektor (jeżeli n w zakresie 0-3 detektor nie jest selektywny, albo jest mało selektywny);

Inne parametry i cechy szczególne detektorów do chromatografii cieczowej:

- stała czasowa (T), czas jaki upływa do osiągnięcia ok. 63% pełnej odpowiedzi detektora na wymuszenie skokowe;
- detektor stężeniowy: proporcjonalność sygnału do stężenia substancji w eluacie ($S_s = f(C_i)$);

$$S_s = C_{z_s} \cdot C_i \left[\frac{mV}{mg/ml} \right]; \text{ np. detektor UV-VIS, RI, fluorescencyjny, konduktometryczny i inne;}$$

- detektor masowy: proporcjonalność sygnału do strumienia masy substancji w eluacie, tzn do



Rys. 9.14. Ilustracja pojęcia "stała czasowa detektora" i uproszczony sposób doświadczalnego określenia wartości stałej czasowej T .

stężenia substancji i do natężenia przepływu eluatu ($S_m = f\left(\frac{dm}{dt}\right)$);

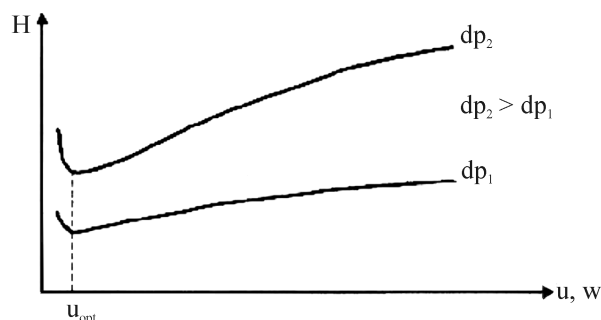
$$S_m = Cz_m \cdot w \cdot C_i \left[\frac{mV}{mg/S} \right]; \text{ np. detektor FID, MS, skulometryczny, radiometryczny i inne.}$$

9.5. DYSPERSJĄ MASY W KOLUMNIE I OCENA JAKOŚCI (SPRAWNOŚCI, PRZEPUSZCZALNOŚCI I SELEKTYWNOŚCI) KOLUMNY ORAZ POZAKOLUMNOWEGO ROZMYCIA STREF

1. Dyspersja masy (stref rozdzielanych substancji w kolumnie) to zjawisko niekorzystne, lecz nieuniknione. Należy je w jak największym stopniu zminimalizować;
2. Ogólne równanie opisujące rozdzielanie dwóch substancji w warunkach braku przeładowania kolumny:

$$Rs_{2/1} = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k_2'}{k_2' + 1} \right) \cdot \sqrt{N_2} \quad (1)$$

3. Zależność ogólna liczby pólki teoretycznych N od długości warstwy wypełnienia kolumny (L_c) oraz wysokości równowaznej półki teoretycznej (HETP) od liniowej prędkości przepływu ulentu (u) i od wielkości ziaren wypełnienia (dp)



Rys. 9.15. Szkic typowych przebiegów zależności $H = f(u)$ dla kolumn o różnych wartościach średniej wielkości ziaren wypełnienia dp_1 i dp_2 .

4. Zjawiska powodujące dyspersję stref substancji

4.1. Wewnątrz wypełnienia kolumny

Sorbenty stosowane we współczesnej chromatografii cieczowej mają jednolite wymiary ziaren w zakresie od 3 μm do 10 μm , a w skali preparatywnej do ok. 40 μm . Im mniejsze są ziarna i im bardziej właściwe upakowanie kolumny, tym wyższa jest sprawność kolumny. Wymiary kolumn wynoszą zazwyczaj 25-100 cm (długość warstwy wypełnienia) i 2-5 mm (średnica wewnętrzna). Jakość kolumny chromatograficznej określa się sprawnością charakteryzowaną wysokością równoważną półce teoretycznej ($WRPT = H$), tzn. najmniejszą długością odcinka kolumny, w której osiąga się stan równowagi między stężeniami substancji chromatografowanej w fazie ruchomej i nieruchomej.

Im wartość $WRPT$ jest mniejsza, tym kolumna ma więcej półek i jest sprawniejsza. Na podstawie długości kolumny (L_C), z zależności (2) oblicza się wysokość równoważną jednej półce teoretycznej:

$$WRPT = H = \frac{L}{N} \quad (2)$$

N jest liczbą półek teoretycznych w kolumnie i oblicza się ją na podstawie jednej z poniższych zależności (3):

$$N = 5,54 \left(\frac{l_r}{w_{0,5h}} \right)^2 \quad \text{albo} \quad N = 16 \left(\frac{l_r}{w_p} \right)^2 \quad (3)$$

gdzie:

- l_r - odległość retencji zmierzona na taśmie rejestratora lub wydruku komputerowym, odpowiadająca czasowi od momentu dozowania substancji testowej do kolumny do pojawienia się maksimum piku;
- $w_{0,5h}$ - szerokość piku w połowie jego wysokości;
- w_p - szerokość podstawy piku wyznaczona przez styczne do boków piku na linii podstawy (patrz też rys. 9.19).

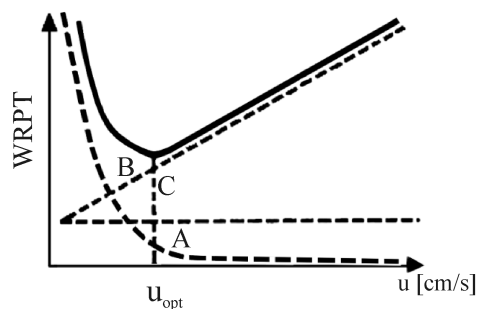
Najlepszą sprawność rozdzielania otrzymuje się przy optymalnym przepływie fazy ruchomej przez kolumnę, którą wyznacza się z wykresu $H = f(u)$. Prędkość fazy ruchomej odpowiadająca minimum jest w chromatografii cieczowej bardzo niska i z reguły wykorzystuje się wyższe prędkości przepływu eluentu. Zależność $H = f(u)$ może być, także w cieczowej chromatografii opisana w przybliżeniu tzw. równaniem Van Deemtera (4):

$$WRPT = H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (4)$$

gdzie:

- u - liniowa prędkość fazy ruchomej;
- A, B i C - wielkości stałe dla danej kolumny, fazy stacjonarnej, fazy ruchomej i temperatury; A - charakteryzuje dyfuzję wirową, B - dyfuzję molekularną w fazie ruchomej, C - opór przenoszenia masy (zakłócenie równowagi spowodowane przepływem fazy ruchomej).

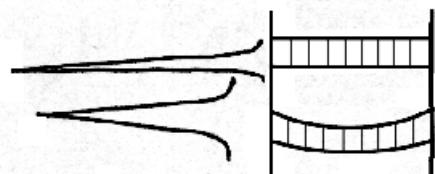
Na rys. 9.16 przedstawiono przebieg krzywej opisanej równaniem Van Deemtera



Rys. 9.16. Wykres Van Deemtera - zależność wysokości równoważnej półce teoretycznej ($WRPT = H$) od prędkości fazy ruchomej (u); u_{opt} - prędkość fazy ruchomej odpowiadająca największej sprawności kolumny; A, B, C - stałe w równaniu Van Deemtera. W tabeli 3. zestawiono zjawiska, decydujące o wynikowej sprawności kolumny

Tabela 9.3. Zestawienie najważniejszych zjawisk, decydujących o dyspersji (rozmyciu) stref substancji rozdzielanych w kolumnie chromatograficznej (GC, HPLC, SFC)

$H_c \equiv \frac{\sigma^2}{L} \cong$	$\frac{B}{u}$	+	A	+	$(C_m + C_s) \cdot u$	Równanie Van Deemtera
	↑		↑		↑	
	Dyfuzja molekularna		Dyfuzja wirowa (mieszanie strumieni)		Opory przenoszenia masy w fazie ruchomej (m) i stacjonarnej (s)	Założenie addytywności efektów rozmycia stref - addytywności wariacji efektów składowych



Rys. 9.17. Kształty pików chromatograficznych w przypadku tłokowego i nierównomiernego profilu przepływu cieczy w kolumnie.

Tłokowy profil przepływu cieczy w kolumnie jest podstawowym warunkiem otrzymania kolumny o sprawności wynikającej z powyższych teoretycznych zależności. Gdy Profil przepływu w kolumnie nie jest "tłokowy", należy oczekiwać znacznie wyższych wartości WRPT (rys. 9.17).

4.2. Rozmycie stref "poza kolumną" (poza warstwą wypełnienia - w związku ze skończoną objętością dozowanej próbki (V_i), rozmycie w dozowniku, w rurkach, na wlocie i wylocie z kolumny, w detektorze itp.):


Łączna wysokość wypełnienia równoważna półce teoretycznej powinna być jak najmniejsza. Jest w przybliżeniu sumą powyższych efektów składowych i teoretycznie może, a w praktyce powinna osiągać podane poniżej wartości

$$H = H_c + H_{ext} + H_{poz}$$

$$\begin{matrix} \Downarrow & \Downarrow \\ 2d_p & 0 \end{matrix}$$

W konsekwencji, tym mniejsze poza-kolumnowe rozmycie stref rozdzielanych substancji, im mniejsze objętości wewnętrznych elementów i przestrzeni w detektorze, dozowniku, kolumnie, im mniejsze długości, a szczególnie średnice kapilar łączących, a także, jeżeli wartości stałych czasowych odpowiedzi detektora nie są nadmierne (koniecznie najmniej poniżej 0.5 sek).

5. Oczekiwane w praktyce sprawności kolumny HPLC (jeżeli $d_c = 2 - 4$ mm, $w = 1-1,5$ ml/min) podano w tabeli 9.4 w przeliczeniu na 1m długości wypełnienia kolumny
6. Warunki, jakie należy spełnić, podczas wykonywania testu sprawności i selektywności kolumny:
 - należy zapewnić odtwarzalność warunków testu; wybrać substancje zdolne charakteryzować różne cechy oddziaływań sorpcyjnych w kolumnie (charakteryzujące się zróżnicowaną

- w związku z dozowaniem określonej porcji cieczy : $\sigma_v^2 = \frac{V_i^2}{12} + \tau$; $\sigma_L^2 = \frac{\sigma_v^2}{S_c^2}$; 


- w związku z przepływem cieczy w pętli dozującej i w kapilarach łączących




$$\sigma_v^2 = \frac{1}{124} L_k \cdot d_k^4 \cdot w \cdot \frac{1}{D_m}$$


- w kuwecie detektora i w innych przestrzeniach z mieszaniem: $\sigma_v^2 \cong V_M^2$ 

- w ewentualnych „kieszeniach”, a także w innych „martwych” przestrzeniach aparatu:



$$\sigma_v^2 \cong \frac{x^2 \cdot w^2}{D_m}$$


- w związku z niedostateczną dynamiką odpowiedzi detektora oraz niekorzystną dynamiką układu detektor – rejestrator, albo przetwornik analogowo – cyfrowy: efekt „pozornej dyspersji”



$$\sigma_v^2 = \tau^2 \cdot w^2$$

Rys. 9.18. Zestawienie zjawisk i efektów powodujących tzw. poza-kolumnowe rozmycie stref substancji w chromatografii.

Tabela 9.4. Oczekiwane sprawności kolumny HPLC, wypełnionej ziarnistym sorbentem (w przeliczeniu na 1 metr długości wypełnienia kolumny).

d_p [μm]	N_o [1/m]
10 μm	15 - 20 tys.
7 μm	30 - 35 tys.
5 μm	50 - 60 tys.
3 μm	100 - 130 tys.

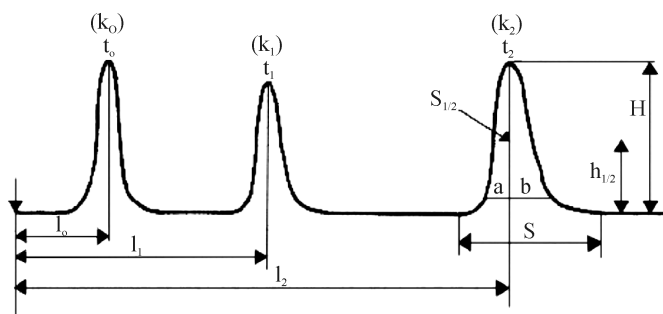
energią oddziaływać, w tym - mogące, w konkretnych warunkach rozdzielania, być przyczyną asymetrii pików; można np. wybrać jedną z mieszanin testowych Engelhardta, albo inną); ogólnie, do testowania kolumny powinno się wybrać:

- substancje łatwo rozdzielające się o prostej budowie cząsteczek,
- niskie stężenie substancji w próbce testującej (w liniowym zakresie izotermi sorpcji),
- małą objętość dozowania ($V_i \leq 20 \mu\text{l}$, gdy $d_c=4 \text{ mm}$, $L_c > 100 \text{ mm}$),
- warunki dobrej dynamiki układu detektor - rejestrator.

7. Pełny test kolumny powinien opisywać:

- sprawność kolumny (N),
- selektywność kolumny (k' , α),
- przepuszczalność kolumny (Φ),
- impedancję separacji (E)
- efekty poza-kolumnowego rozmycia stref ($\sigma_{v\ ext}^2$)
- asymetrię pików ($A_{s0,1}$)

8. Zależności i sposoby wyznaczania w praktyce rzeczywistych i oczekiwanych parametrów kolumny



Rys. 9.19. Schemat, przedstawiający chromatogram testowy i sposób wyznaczania parametrów do obliczenia parametrów sprawności kolumny.

- Obliczanie sprawności i innych parametrów na podstawie chromatogramu testowego:

$$H = \frac{L_c}{5,54} \left(\frac{S_{1/2}}{l} \right)^2 \quad \text{albo:} \quad H = \frac{L_c}{16} \left(\frac{S}{l} \right)^2 \quad \text{albo:} \quad H = L_c \frac{\mu_2}{(M_1)^2} \quad (6, 6', 6'')$$

$$N = \frac{L_c}{H} = 5,54 \cdot \left(\frac{l}{S_{1/2}} \right)^2 \quad (7)$$

$$As_{0,1} = \frac{b}{a} \quad (8)$$

$$u = \frac{L_c}{t_0} = \frac{4w}{\Pi \cdot d_c^2 \cdot \varepsilon_T} \quad (9)$$

przy czym dla sorbentów całkowicie porowatych: $\varepsilon_T \cong 0,75$ do $0,80$

$$k = (t_i - t_0) / t_0 \quad (10)$$

$$\alpha = k_{i+1} / k_i \quad (11)$$

- Obliczanie sprawności osiągalnej teoretycznie w chromatografii cieczowej niezależnie od skali rozdzielania - równanie Knoxa (uznane za najbardziej adekwatne w warunkach HPLC) - z zastosowaniem bezwymiarowych parametrów (12):

$$h_{teor} = \frac{B}{v} + A \cdot v^{0,33} + C \cdot v \quad (12)$$

gdzie: $h = \frac{H}{d_p}$; $v = \frac{u \cdot d_p}{D_M}$ (13)

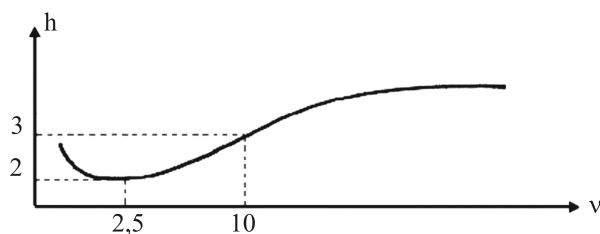
dla dobrze wypełnionych i bardzo sprawnych kolumn: $B = 2$, $A = 1$, $C = 0,1$.

- Obliczanie rzeczywistej i oczekiwanej przepuszczalności kolumny

$$\Phi = \frac{d_p^2}{K} \quad \text{gdzie:} \quad K = \frac{u \cdot L_c \cdot \eta}{\Delta P} \quad (14)$$

Oczekuje się, że dla kolumn pakowanych $500 < \Phi < 2000$, najczęściej ok. 1000, gdy $\Phi > 2000$, to albo wypełnienie kolumny jest nadmiernie zwarte, albo ma miejsce niedrożność (częściowe zatkanie) w układzie filtrów i połączeń z kolumną, albo z innymi elementami aparatu.

- Obliczenie wartości tzw. impedancji rozdzielania w testowanej kolumnie



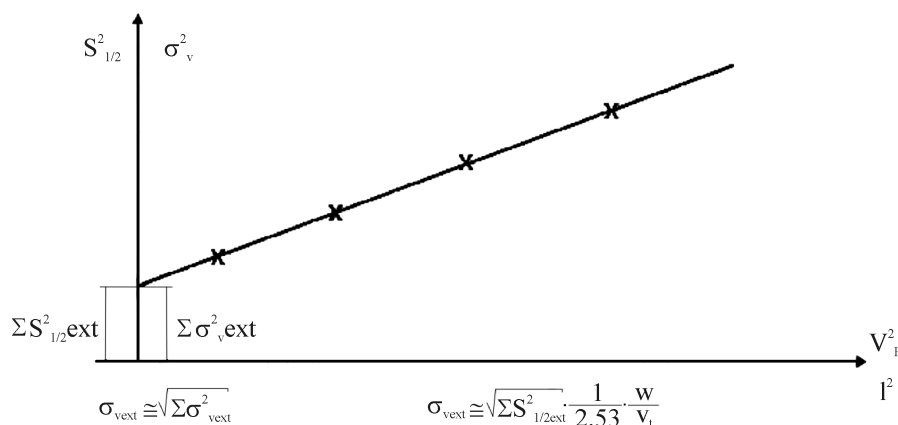
Rys.9.20. Typowy przebieg wykresu zależności zredukowanej wysokości równoważnej półce teoretycznej (h) od zredukowanej prędkości (v) przepływu eluentu w kolumnie HPLC.

$$E = \frac{t_0 \Delta P}{N^2 \eta} \quad (15)$$

Wartość E powinna być w zakresie 2500 do 10000 dla kolumny pakowanej oraz w zakresie 800 do 2500 dla tzw. kolumny monolitycznej.

- Wyznaczanie poza-kolumnowej dyspersji stref na podstawie chromatogramu testowego:

$$\sigma_{V_{ext_{cak}}} \cong \sqrt{\sum \sigma_{v_{ext}}^2} \quad \sigma_{V_{ext_{cak}}} \cong \sqrt{\sum S_{1/2_{ext}}^2} \cdot \frac{1}{2,53} \cdot \frac{w}{v_t}$$



Rys. 9.21. Ilustracja zasady postępowania przy wyznaczaniu poza - kolumnowego (tzw. "postkolumnowego rozmycia stref") rozdzielanych substancji.

Znaczenie symboli

Aparatura HPLC oraz sprawność, efekty poza-kolumnowe i ocena kolumny

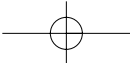
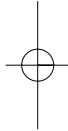
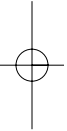
- a, b - część szerokości piku w 0,1 wysokości (patrz rys. 19);
- $A_{s0,1}$ - współczynnik asymetrii piku w 0,1 wysokości;
- C, B, A, C_m, C_s - stałe dla konkretnej kolumny i równania;
- C_m - czułość detektora masowego;
- C_s - czułość detektora stężeniowego;
- C_z - czułość detektora;
- d_c - średnica wewnętrzna kolumny; średnica wypełnienia kolumny;
- d_k - średnica wewnętrzna kapilary;
- D_m - współczynnik dyfuzji molekularnej substancji rozdzielanej w eluencie
- dm/dt - szybkość doprowadzania masy do detektora;
- d_p - średnica ziaren wypełnienia kolumny; wielkość ziaren wypełnienia kolumny;
- E - tzw. impedancja separacji (wskaźnik charakteryzujący ciśnienie konieczne na jed-nostkę czasu rozdzielania i na jedną półkę teoretyczną);
- F_c - pole przekroju poprzecznego wypełnienia kolumny;
- h - tzw. zredukowana wysokość półki teoretycznej;
- H - wysokość wypełnienia równoważna półce teoretycznej (HETP);
- H_c - j.w., dla samego wypełnienia (po odjęciu tzw. efektów poza-kolumnowych);
- H_e - udział efektów pozakolumnowych w H ;
- H_{ext} - wysokość równoważna półce teoretycznej od efektów pozakolumnowego rozmycia;

H_{poz}	- wysokość równoważna półce teoretycznej od zlej dynamiki detektora;
h_{teor}	- wartość h otrzymana z równania Knoxa;
K	- przepuszczalność kolumny;
k_2	- współczynnik retencji substancji drugiej spośród dwu rozpatrywanych;
L	- droga elucji;
l	- odległość mierzona na chromatogramie (w warunkach elucji izokratycznej i stałego natężenie przepływu eluentu);
L_c	- długość wypełnienia kolumny;
L_k	- długość kapilary;
m	- masa substancji wpływającej do detektora;
M_1	- pierwszy moment zwykły piku jako krzywej rozkładu stężenia (położenie "środką ciężkości" piku);
N_0	- liczba pólk teoretycznych kolumny w przeliczeniu na 1 m długości wypełnienia;
N_2	- liczba pólk teoretycznych kolumny dla substancji 2;
$R_{s1/2}$	- stopień rozdzielenia substancji 2/1 ;
s	- selektywność detektora;
S	- szerokość piku przy podstawie;
$S_{1/2}$	- szerokość piku w $1/2$ wysokości;
S_c	- powierzchnia przekroju poprzecznego wypełnienia kolumny;
S_i, S_s, S_m, S_0	- sygnał detektora, odpowiednio: S_i - w odpowiedzi na stężenie c_i , S_s - detektora stężeniowego, S_m - detektora masowego, S_0 - pełny sygnał odpowiedzi;
t	- czas;
t_0	- czas retencji substancji niesorbowanej;
T	- okres proporcjonowania;
u	- liniowa prędkość przepływu eluentu w kolumnie;
UV-VIS	- detektor fotoabsorbjometryczny w zakresie UV i światła widzialnego;
V_i	- objętość dozowania;
V_m	- objętość mieszania;
V_{mix}	- objętość mieszalnika;
V_t	- prędkość przesuwu papieru w czasie rejestracji chromatogramu testowego;
V_R	- objętość retencji;
w	- natężenie przepływu eluentu (objętościowo) [cm^3/min];
X	- ułamek objętościowy składnika B w eluencie albo wymiar "znamienny" kolumny;

Symbole greckie

σ_v^2, σ_l^2	- liczone objętościowo (v) i liniowo (l) wariancje składowe rozkładu stężenia wzdłuż kolumny;
$\sum \sigma_{v\ ext}^2$	- objętościowo liczona wariancja pozakolumnowego rozmycia stref substancji;
$\sum S_{1/2\ ext}^2$	- udział rozmycia poza-kolumnowego w wartości kwadratu szerokości piku w połowie wysokości;
Δ	- amplituda wahań stężenia składnika B w eluencie;
η	- lepkość dynamiczna eluentu;
v	- objętość eluentu;
Φ	- przepuszczalność właściwa kolumny;
α	- retencja względna (opisuje selektywność kolumny);
τ	- stała czasowa detektora (0,632 amplitudy S_0 osiągnane jest po czasie);

-
- v - tzw. zredukowana prędkość przepływu eluentu;
 v_0 - opóźnienie transportowe wyrażone w jednostkach objętości;
 μ_2 - drugi moment centralny piku jako krzywej rozkładu;
 v_a - zastępcza objętość mieszania w elementach chromatografu cieczowego;
 v_t - prędkość przesuwu papieru rejestratora;



10. SPOSÓB UZYSKIWANIA ZGODNOŚCI PRZEBIEGU PROGRAMU ELUCJI GRADIENTOWEJ W KOLUMNIE Z WYMAGANĄ POSTACIĄ PROGRAMU ORAZ ZAPEWNIENIA ODTWARZALNOŚCI PARAMETRÓW RETENCJI NA DRODZE KOREKTY PROGRAMU ELUCJI.

Marian Kamiński, Bogdan Kandybowicz

10.1. WPROWADZENIE

W gradientowej aparaturze HPLC z zaworami proporcjonującymi - przebieg programu elucji na wlocie do kolumny chromatograficznej często, z kilku różnych przyczyn, odbiega od programu oczekiwanego. Rozbieżność między zaprogramowanym i zrealizowanym programem elucji jest spowodowana przede wszystkim mieszaniem cieczy w elementach aparatu oraz opóźnieniem transportowym. W konsekwencji otrzymuje się nie tylko odchylenia czasu retencji od wartości przewidywanych teoretycznie, albo wyznaczonych przez oprogramowanie optymalizujące program elucji, ale także niekorzystną powtarzalność czasu retencji. Jeszcze większy problem jest związany z uzyskiwaniem dobrej odtwarzalności wyników rozdzielania, z zastosowaniem różnych aparatów i konkretnej metody analitycznej.

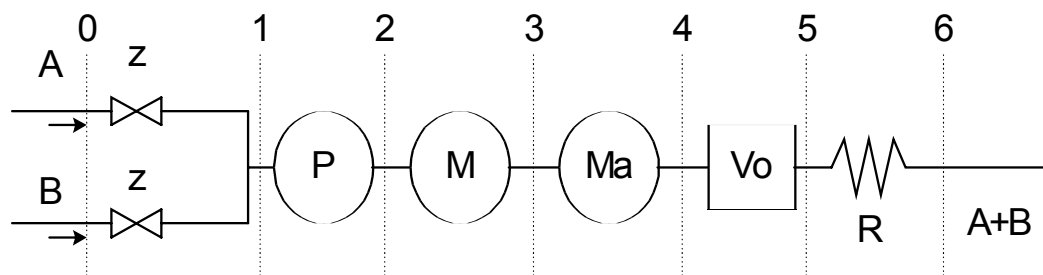
Oczekuje się, aby program elucji na wlocie do kolumny chromatograficznej był zgodny z przebiegiem pożądanym. Ten ostatni warunek z reguły nie jest spełniony w praktyce, ponieważ aparaty różnych producentów charakteryzują się różnymi wartościami objętości mieszania cieczy w przestrzeni między wylotem z układu programowania składu cieczy i wlotem do kolumny chromatograficznej. To powoduje, że ten sam program elucji wprowadzony do sterownika programatora eluentu różnych aparatów chromatograficznych, prowadzi do otrzymywania na wlocie do kolumny HPLC różnych funkcji przebiegu programu elucji i różnych wartości czasu retencji tych samych substancji rozdzielanych z zastosowaniem tej samej kolumny.

Nasze badania wykazały, że można zastosować takie procedury sterowania modulem wykonawczym systemu programowania składu eluentu (przede wszystkim, zaworami proporcjonującymi), że następuje eliminacja odchylenia programu elucji otrzymanego na wlocie do kolumny chromatograficznej od żądanej postaci programu.

Korekta ta powinna zapewnić nie tylko powtarzalność programu elucji (która zależy głównie od powtarzalności działania modułu programowania składu cieczy), ale także odtwarzalność wyników oznaczeń. Taki sposób programowania składu cieczy (wytwarzanie na wlocie do kolumny programu elucji, dokładnie o żądanej postaci), powinien też zapewnić efektywne stosowanie istniejących narzędzi doboru optymalnego programu elucji oraz możliwość weryfikacji ich skuteczności.

10.2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Przeprowadzono analizę teoretyczną kilku wariantów modelu mieszania cieczy w elementach gradientowego aparatu chromatograficznego, przedstawionego na rys. 1. w formie uogólnionej, aktualnej dla gradientowego aparatu chromatograficznego z zaworami proporcjonującymi, umieszczonymi po stronie niskiego ciśnienia pompy (tzw. niskociśnieniowy system programowania składu cieczy).



Rys. 10.1. Zastępczy model przyjęty dla matematycznego opisu zmian składu cieczy w układzie zasilania eluentem kolumny chromatograficznej. Oznaczenia: A, B - składniki eluentu, Z - zawory proporcjonujące, P - pompa, M - mieszalnik o objętości V, Ma - mieszalnik o objętości Va zastępujący mieszanie cieczy w aparacie poza mieszalnikiem M, Vo - pojemność o tłokowym profilu przepływu zastępująca opóźnienie transportowe, R - opór powodujący podwyższone ciśnienie pracy pompy, 1-6 - przekroje rozpatrywane w pełnym opisie modelu.

Model na rys. 10.1. może zostać zastosowany opisu mieszania cieczy w gradientowym aparacie chromatograficznym z zaworami proporcjonującymi, zarówno, umieszczonymi po stronie wysokiego, jak i niskiego ciśnienia, a także dla aparatu, w którym programowanie składu cieczy odbywa się na drodze sterowania kilkoma równocześnie pracującymi pompami (tzw. wysokociśnieniowy system programowania składu cieczy). Ścisły opis matematyczny uwzględniający wszystkie elementy modelu na rys. 10.1 jest stosunkowo skomplikowany.

Do analizy teoretycznej problemu zgodności programu elucji na wlocie do kolumny z żadaną funkcją zastosowano uproszczony model, który pozwala łatwo otrzymać ścisły opis teoretyczny. Otrzymane wyniki okazały się, jednocześnie, w zadowalającym stopniu przydatne praktycznie. Model ten składa się z połączonych wzajemnie szeregowo elementów: "Z" (programator programu elucji, generujący w przekroju "1" określoną funkcję programu elucji), mieszalników "M i Ma", które zastąpiono jednym mieszalnikiem "M" o objętości Vz oraz elementu Vo, zastępującego opóźnienie transportowe (które zawsze ma miejsce na drodze: programator programu elucji - kolumna chromatograficzna). Model składa się, więc, tylko z jednego mieszalnika o objętości $V_z = V + V_a$, zastępującego mieszanie cieczy w przestrzeni między elementami wykonawczymi programatora składu eluentu oraz z elementu (V_o), zastępującego opóźnienie transportowe między wylotem z programatora składu eluentu i wlotem do kolumny chromatograficznej.

Analiza teoretyczna takiego modelu, w przypadku liniowego programu elucji, żadanego na wlocie do kolumny chromatograficznej (w przekroju "5"), prowadzi do następujących wniosków:

- Gdy programator składu eluentu realizuje w przekroju "1" liniową funkcję programu elucji (1) w postaci:

$$X = at + b \quad (1)$$

- to w stanie ustalonym ($t \gg T_A = V_z/w$), otrzymamy na wylocie z mieszalnika Vz (w przekroju "4") następujący przebieg (2) funkcji programu elucji :

$$X_1(t) = a t + b - a T_A \quad (2)$$

Czytelnik może samodzielnie wyprowadzić odpowiednie zależności, jeżeli ma chęć "poćwiczyć" układanie i rozwiązywanie prostych równań różniczkowych, mających praktyczne zastosowanie.

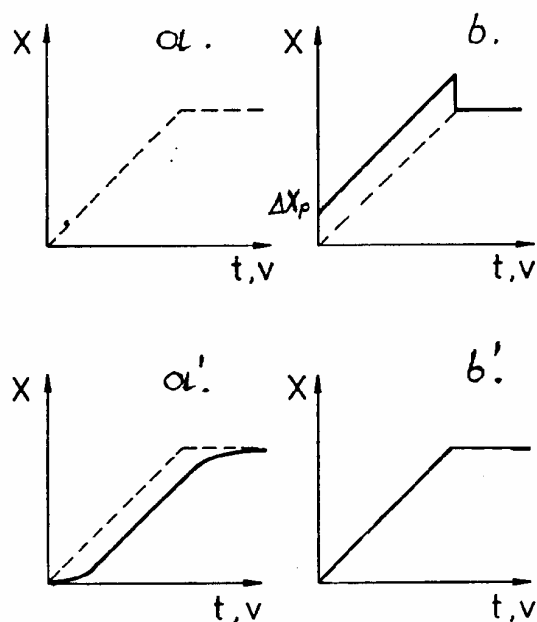
Analiza równań, prowadzących do otrzymania zależności (2) w okresie, zarówno stanu ustalonego, jak i w stanie nieustalonym, sugeruje możliwość takiego przekształcenia programu sterowania elementami wykonawczymi urządzenia gradientowego (zaworami proporcjonującymi, lub równolegle pracującymi pompami), aby na wlocie do kolumny otrzymywać pożądany program elucji, zgodny z równaniem (1).

W przypadku liniowego programu elucji, przebieg skorygowany programu przedstawia się następująco:

$$X_k(t) = (at + b) + TA \cdot a + \delta(t) \cdot TA \cdot [b - X_1(0)] \quad (3)$$

gdzie: w - objętościowe natężenie przepływu eluentu w kolumnie;
 $\delta(t)$ - delta Diraca;
 $X_1(0)$ - początkowa zawartość składnika B w mieszalniku Vz w czasie $t = 0$ (w praktyce wartość b), a więc ostatni składnik zależności (3) wynosi zero;

W konsekwencji, gdy do programatora składu eluentu, w przypadku żądania otrzymywania liniowego programu elucji w kolumnie, zostanie wprowadzona skorygowana funkcja programu o postaci zależności (3) oraz zostanie skorygowany moment wprowadzenia próbki do kolumny o wartość opóźnienia transportowego ($t' = V_0 / w$) - to na wlocie do kolumny chro-



Rys. 10.2. Schematyczne wykresy, związane ze zniekształceniem i korektą liniowego programu elucji, gdy aparat chromatograficzny można modelować obiektem inercyjnym I rzędu (idealnym mieszalnikiem) o objętości $Vz = V + Va$. Program pożądany: $X = at + b$; Program skorygowany: $X = at + b + (a TA)$.
 a - pożądany przebieg programu elucji na wlocie do kolumny chromatograficznej,
 a' - rzeczywisty przebieg programu elucji (linia ciągła), otrzymany na wlocie do kolumny chromatograficznej, gdy programator wykonuje program naszkicowany linią kreskową;
 b - programator wykonuje program skorygowany, zgodny z linią ciągłą;
 b' - przebieg programu elucji, zrealizowany na wlocie do kolumny w wyniku wprowadzenia do programatora programu skorygowanego "b".

matograficznej (w przekroju "5"), powinna zostać otrzymana dokładnie funkcja programu elucji w postaci równania (1).

Schematy przedstawione na rys. 10.2. stanowią graficzną ilustrację wyniki studiów teoretycznych, dla oczekiwania liniowego przebiegu funkcji programu elucji w kolumnie (przy czym, wartość Xp na rys. 2 jest tożsama z "b" w równaniach (1) do (3)). Podobne wnioski otrzymano także dla wybranych, nieliniowych postaci programu elucji. W konsekwencji, w myśl streszczonych tu wyników rozważań teoretycznych, program elucji, otrzymywany na wlocie do kolumny chromatograficznej, może być dokładnym odwzorowaniem postaci funkcji, która jest oczekiwana.

10.3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Zastosowano dwa różne komercyjne analityczne gradientowe chromatografy cieczowe z zaworami proporcjonującymi po stronie ssącej pompy, charakteryzujące się zróżnicowanymi wartościami parametrów dynamiki mieszania cieczy w przestrzeni przed wlotem do kolumny chromatograficznej. W tabeli 10.1 podano dla obu aparatów wartości parametrów dynamiki mieszania cieczy oraz przebiegi funkcji programu elucji, wprowadzone do programatora. Zastępczą objętość mieszania Vz w elementach aparatu na drodze od zaworów proporcjonujących do wlotu do kolumny chromatograficznej oraz wynikającą z niej zastępczą stałą czasową TA ($TA = Vz/w$) wyznaczono stosując metodę "0.632".

Tabela 10.1 Parametry dynamiki mieszania cieczy w aparatach wykorzystanych w doświadczeniach, których wyniki przedstawiono na rysunku 5 i w tabeli 2 oraz 3.

Lp.	Nazwa aparatu	Opóźnienie transportowe [cm ³] / [min]	Zastępcza objętość mieszania cieczy [cm ³] / [min]	Postać skorygowanego programu elucji (a * t + b)
1	LaChrom (Ap.1)	0.6 / 0.4	0.35 / 0.23	4.3 %/min * t + 1%
2	Lichrograph (Ap.2)	2.4 / 1.6	1.05 / 0.7	4.3 %/min * t + 3%

Wpływ korekty programu elucji na wartość parametrów retencji substancji rozdzielanych w warunkach elucji gradientowej badano dla wartości natężenia przepływu $w=1,5$ cm³/min., z zastosowaniem typowej kolumny Lichrospher Rp18 5 μ m o wymiarach 125x4 mm i 250 x4 mm, rozdzielając acetanilid i węglowodory aromatyczne. Zastosowano, często wykorzystywaną w praktyce, wartość gradientu stężenia ok. 4,5 %/min. w zakresie od 4% do 90% metanolu w wodzie. Analizowano też wpływ opóźnienia transportowego.

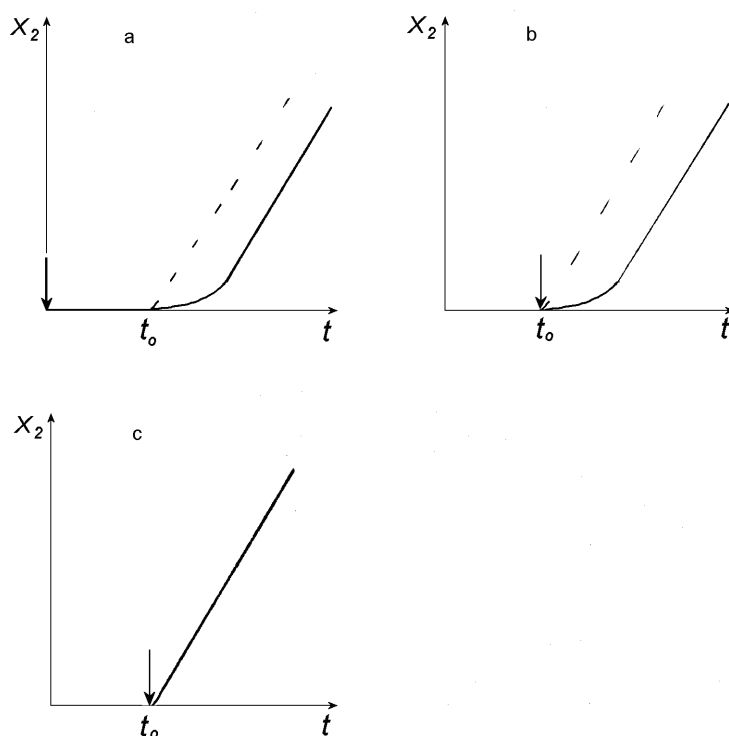
Dzięki obecności acetonu w cieczy A (0,025% v/v) i cieczy B (0,1% v/v) i zastosowaniu detektora UV dla długości fali 265 nm otrzymywano jednocześnie chromatogramy oraz orientacyjne przebiegi zmian udziału składnika B w eluencie na wylocie z kolumny (zniekształcone z powodu sorpcji acetonu na powierzchni sorbenta Rp18).

10.4. WYNIKI I WNIOSKI

W badaniach zastosowane dwa różne gradientowe aparaty chromatograficzne, scharakteryzowane w tab. 1 pod względem wartości parametrów dynamiki mieszania cieczy i odpowiednich skorygowanych postaci programu elucji.

Rozpatrywano trzy warianty korekty programu elucji i momentu wprowadzenia próbki do kolumny, zilustrowane na rysunku 10.4:

- Próbkę dozowano ignorując istnienie zarówno opóźnienia transportowego, jak i mieszania cieczy przed wlotem do dozownika (tak jak, ma to miejsce dotychczas, bez korekty - rysunek 10.4a),
- Próbkę dozowano z opóźnieniem w stosunku momentu uruchomienia programatora gradientu elucji; wielkość opóźnienia, tak dobrana, by próbka "trafiła" w kolumnie na początek realizacji programu elucji, jednak nie korygowano programu elucji ze względu na mieszanie cieczy przed wlotem do kolumny (rysunek 10.4b),
- Uwzględniono obydwa efekty powodujące odchylenie programu elucji odżądanego przebiegu, tj. dozowano z uwzględnieniem opóźnienia transportowego oraz skorygowano program elucji (rysunek 10.4c).



Rys. 10.3. Schematyczne przedstawienie przebiegów programu elucji (X_2) na wlocie do kolumny chromatograficznej w relacji do momentu dozowania próbki:

- przy braku korekty programu elucji i nie uwzględnieniu opóźnienia transportowego
- po uwzględnieniu opóźnienia transportowego ale bez korekty programu elucji,
- po uwzględnieniu opóźnienia transportowego oraz zastosowaniu korekty programu elucji.

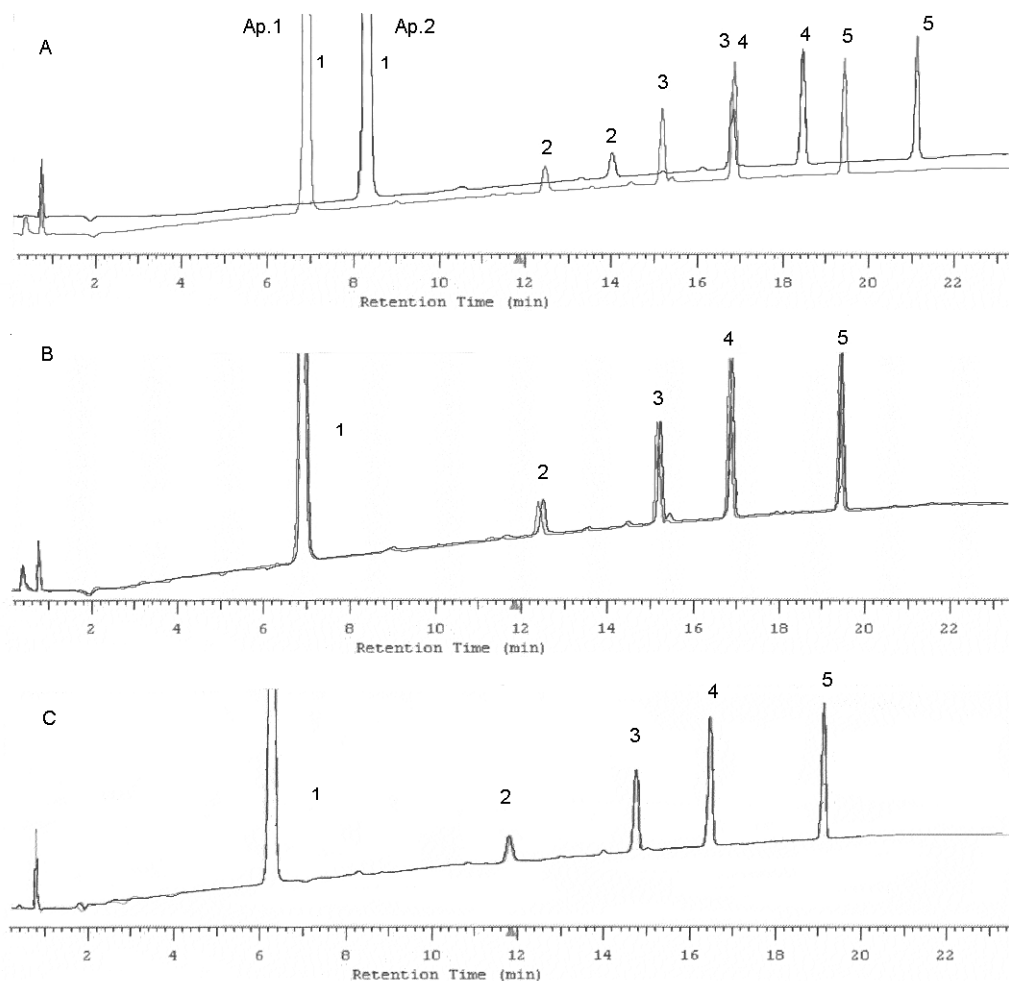
Linia kreskowa - pożądaný przebieg programu elucji, linia ciągła - zrealizowany przebieg programu elucji, strzałką zaznaczono moment dozowania próbki. t_0 opóźnienie transportowe.

Na rysunku 10.3 linią kreskową zaznaczono pożądaný przebieg programu elucji, linią ciągłą zrealizowany przebieg programu elucji, zaś strzałką moment dozowania próbki. Jak widać, przy uwzględnieniu tylko korekty opóźnienia transportowego (rysunek 10.3b), następuje przesunięcie programu elucji w kolumnie wzdłuż osi czasu względem momentu dozowania próbki. W przypadku całkowitej korekty (rysunek 10.3.c) następuje także zmiana charakteru funkcji

opisującej przebieg funkcji programu elucji zrealizowany na wlocie do kolumny i dostosowanie jej do pożądanego (w tym przypadku - liniowego) przebiegu. Ma miejsce usunięcie

początkowego zagięcia krzywej programu elucji oraz eliminacja dodatkowego przesunięcia tej linii spowodowanego mieszaniem cieczy przed wlotem do kolumny.

Różnice przebiegu programu elucji w kolumnie przekładają się na różnice czasu i objętości retencji rozdzielanych substancji. Różnice objętości retencji są względnie tym większe im



Rys. 10.4. Zestawienie trzech do sześciu nałożonych chromatogramów otrzymanych w warunkach elucji gradientowej z zastosowaniem dwóch typów aparatów chromatograficznych (Ap.1 i Ap.2) :

- A. przy braku korekty programu elucji i nieuwzględnieniu opóźnienia transportowego,
- B. po uwzględnieniu opóźnienia transportowego, ale bez korekty programu elucji,
- C. po uwzględnieniu opóźnienia transportowego oraz zastosowaniu korekty programu elucji.

Pożądaný program elucji $X = 4,3[\%/min.] * t$, w zakresie 4% do 90%, ciecz A - woda + 0,025% acetonu, ciecz B - metanol + 0,1% acetonu, $w=1,5 \text{ cm}^3/min.$, kolumna - Lichrospher RP 18 $5\mu\text{m}$, $125 \times 4 \text{ mm}$, $t=30^\circ\text{C}$. Ap. 1 - LaChrom (Merck-Hitachi), Ap. 2 - Lichrograph (Merck-Hitachi). Rozdzielane substancje: 1 - acetanilid, 2 - benzen, 3 - toluen, 4 - *o*-ksylen, 5 - *n*-butylobenzen.

Tabela 10.2. Zestawienie średnich wartości czasu retencji bez i po zastosowaniu korekty programu elucji

- A. przy braku korekty programu elucji i nie uwzględnieniu opóźnienia transportowego,
 B. po uwzględnieniu opóźnienia transportowego, ale bez korekty programu elucji,
 C. po uwzględnieniu opóźnienia transportowego oraz zastosowaniu korekty programu elucji.

	A		B		C	
Aparat: Substancja:	Ap. 1 [min.]	Ap.2 [min.]	Ap. 1 [min.]	Ap.2 [min.]	Ap. 1 [min.]	Ap.2 [min.]
Acetanilid	6,82	8,21	6,88	6,85	6,09	6,08
Benzen	12,5	14,06	12,46	12,38	11,65	11,66
Toluen	16,62	16,81	15,20	15,11	14,64	14,65
o-ksylen	16,91	18,47	16,90	16,84	16,34	16,35
n-butylo-benzen	19,51	21,37	19,45	19,41	18,99	19,01

większe jest opóźnienie transportowe, im większa jest wartość zastępczej stałej czasowej TA oraz im mniejsza jest objętość wypełnienia kolumny. Dodatkowo, przesunięcie czasu retencji jest tym większe, im mniejsze jest natężenie przepływu eluentu (w).

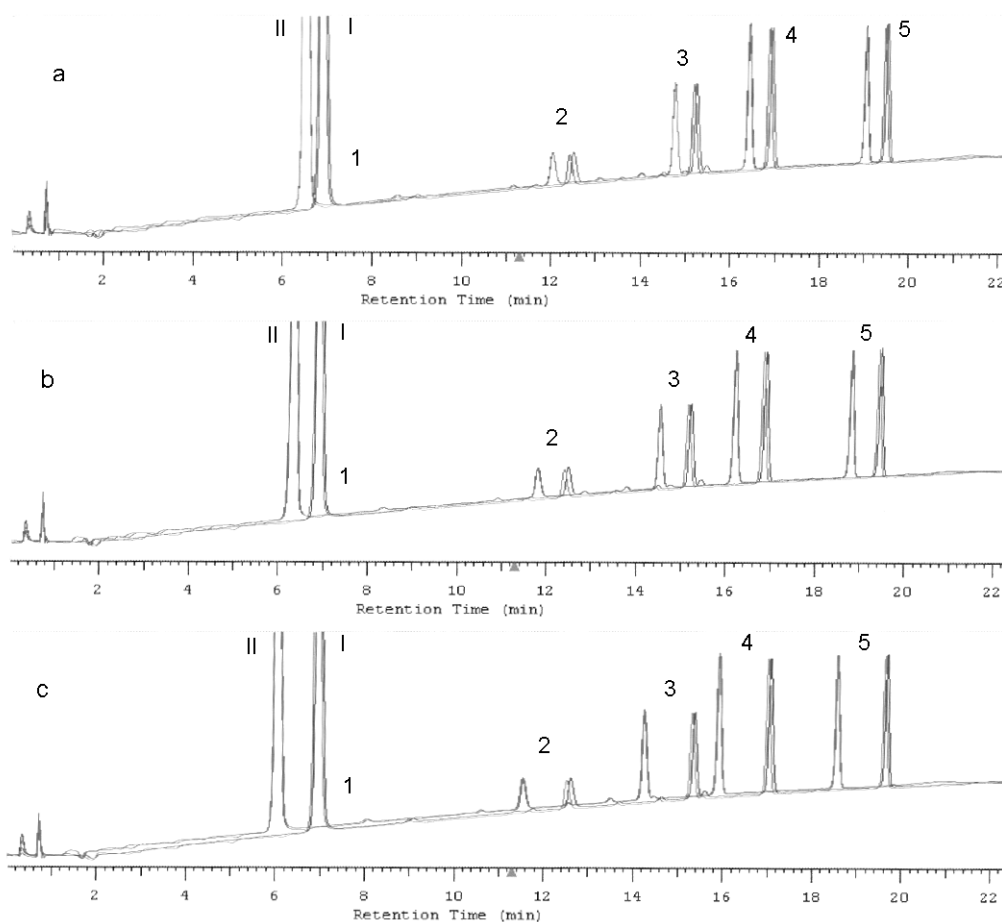
Potwierdzają to, przedstawione na rysunku 10.4 i 10.5, przykłady chromatogramów uzyskanych dla dwóch aparatów w warunkach elucji gradientowej oraz zawarte w tabeli 1 wartości czasu retencji i zawarte w tabeli 10.3 wartości powierzchni pików, otrzymane:

- A. przy braku korekty programu elucji i nie uwzględnieniu opóźnienia transportowego, rysunek 10.4a, Tabele 10.2 i 10.3 kolumna A ;
 B. po uwzględnieniu opóźnienia transportowego, ale bez korekty programu elucji, rysunek 10.4b, Tabele 10.2 i 10.3 kolumna B ;
 C. po uwzględnieniu opóźnienia transportowego oraz zastosowaniu korekty programu elucji, rysunek 10.4c, Tabele 10.2 i 10.3 kolumna C.

Na podstawie chromatogramów na rys 10.4 i 10.5 oraz wartości czasu retencji, zamieszczonych w Tabeli 10.2, widać, że czas retencji substancji rozdzielanych w warunkach elucji gradientowej różni się znacznie bez i z zastosowaniem korekty programu elucji. Widać też, że największe znaczenie przy przenoszeniu parametrów retencji między aparatami o różnych wartościach dynamiki mieszania, ma uwzględnienie opóźnienia transportowego, a dopiero w następnej kolejności korekta programu elucji uwzględniająca mieszanie cieczy. Jednak, w przypadku chromatografii cieczowej z tzw. kolumnami mikropakowanymi znaczenie obu rodzajów korekty będzie podobne.

Powyższe wyniki dobitnie też dokumentują, że bez zastosowania odpowiedniej korekty programu elucji nie można oczekiwać zadowalającej odtwarzalności parametrów retencji między aparatami o różnych wartościach parametrów dynamiki mieszania cieczy przed wlotem do kolumny chromatograficznej, szczególnie, gdy znaczne są różnice opóźnienia transportowego.

Widać też, że stosowanie w praktyce narzędzi programowych przewidujących parametry retencji na podstawie przebiegu funkcji programu elucji, wymiarów kolumny i natężenia przepływu eluentu musi być obarczone określonym błędem, gdy nie uwzględnia się wpływu mieszania cieczy w przestrzeni przed wlotem do kolumny chromatograficznej, a zwłaszcza wpływu opóźnienia transportowego.



Rys. 10.5. Ilustracja wpływu rodzaju korekty programu elucji na czas retencji dla aparatu Lichrograph. Symbolem "I" oznaczono chromatogramy otrzymane przy braku korekty programu elucji, a symbolem "II", odpowiednio, chromatogramy:

- gdy skorygowano tylko wpływ mieszania cieczy przed wlotem do kolumny,
- gdy skorygowano tylko wpływ opóźnienia transportowego,
- gdy skorygowano oba efekty jednocześnie.

Pożądaný program elucji $X = 5[\%/min.] * t$, ciecz A - woda, ciecz B - metanol + 0,1% acetonu, $w=1,5 \text{ cm}^3/min.$, kolumna - Lichrospher RP 18 5 m, 125x4 mm, $t=30^\circ\text{C}$.

Substancje: 1 - acetanilid, 2 - benzen, 3 - toluen, 4 - *o*-ksylen, 5 - *n* butylobenzen.

Można dodać, że wtedy, gdy eluent A (tzn. eluent, od którego rozpoczyna się program elucji) posiada znikomą siłę elucyjną, wówczas korygowanie momentu dozowania próbki o wartość opóźnienia transportowego nie jest konieczne. Dopóki eluent ma zerową siłę elucyjną, to znaczy do czasu, gdy nie zacznie wpływać do kolumny składnik B eluentu, substancje rozdzielane nie podlegają elucji. Wtedy wystarczy zastosować tylko korektę uwzględniającą mieszanie cieczy.

Na podstawie danych w Tabeli 10.3 widać, natomiast, że stosowanie korekty programu elucji ma przede wszystkim znaczenie dla otrzymywania oczekiwanych wartości czasu (objętości) retencji i nie ma dużego wpływu na odtwarzalność oraz powtarzalność powierzchni pików, w konsekwencji, na możliwość przenoszenia parametrów kalibracyjnych między różnymi aparatami, gdy czułości detektora i warunki dozowania i "chromatografowania" są takie same. Jedyne,

Tabela 10.3. Zestawienie średnich wartości powierzchni pików bez i po zastosowaniu korekty programu elucji uwzględniającej wpływ zastępczej objętości mieszania cieczy przed wlotem do kolumny oraz bez i po uwzględnieniu wpływu opóźnienia transportowego na przebieg programu elucji (prowadzących do otrzymania odpowiednich chromatogramów przedstawionych na rysunku 4)

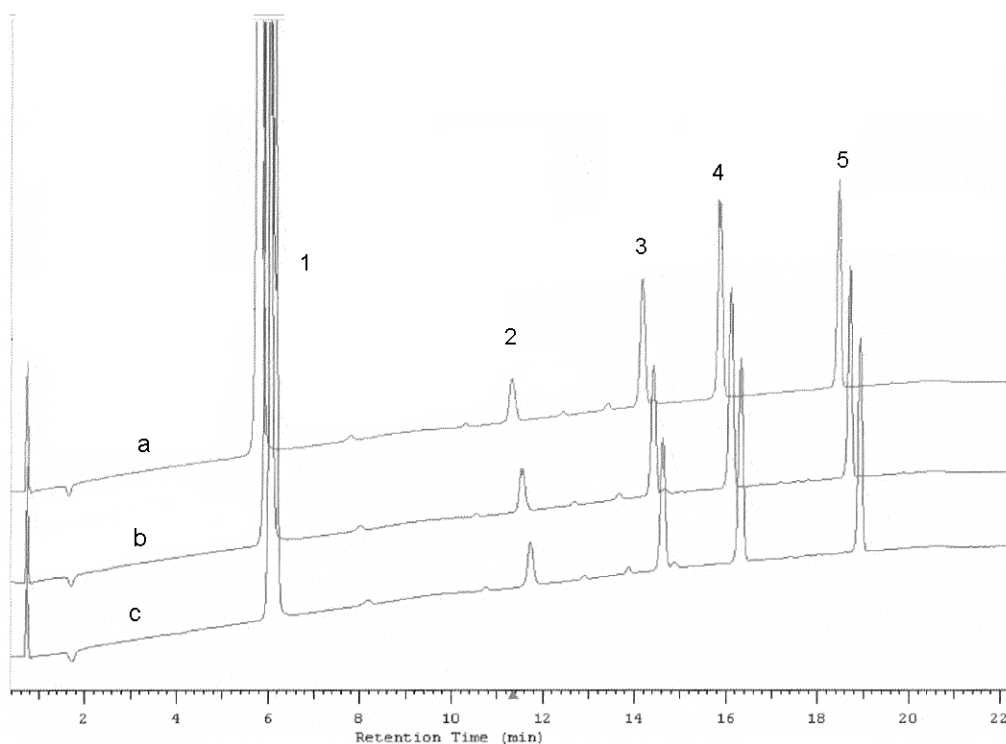
- A) brak korekty programu elucji i nie uwzględnienie opóźnienia transportowego;
 B) po uwzględnieniu opóźnienia transportowego ale bez korekty programu elucji ze względu na dynamikę mieszania cieczy przed wlotem do kolumny;
 C) po uwzględnieniu opóźnienia transportowego oraz zastosowaniu korekty programu elucji eliminującej mieszanie cieczy.

*) - w nawiasach podano różnice wartości średnich powierzchni pików.

Aparat: Substancja:	A		B		C	
	Ap. 1 [mVs]	Ap.2 [mVs]	Ap. 1 [mVs]	Ap.2 [mVs]	Ap. 1 [mVs]	Ap.2 [mVs]
Acetanilid	10679	10836 (157) *)	10634	10710 (76)	10640	10700 (60)
Benzen	266	271 (5)	264	267 (3)	263	265 (2)
Toluen	631	639 (8)	651	658 (7)	662	668 (6)
o-ksylen	911	924 (13)	916	925 (9)	922	926 (4)
n-butylobenzen	776	796 (20)	779	791 (12)	783	788 (5)

Tabela 10.4. Zestawienie wartości czasu retencji, zastępczych objętości mieszania, stałych czasowych oraz odpowiadające im równania skorygowanego programu elucji, wykorzystane do otrzymania chromatogramów na rysunku 6.

Chromatogram na rysunku 5	A	B	C
V_0 [cm ³] / t_0 [min]	3,0 / 2,0	3,0 / 2,0	3,0 / 2,0
V_z [cm ³] / TA [min.]	1,05 / 0,7	1,40 / 0,93	1,74 / 1,16
Równanie skorygowanej funkcji programu elucji	4,3[%/min.]*t+3[%]	4,3[%/min.]*t+4[%]	4,3[%/min.]*t+5[%]
Substancja	Czas retencji [min]		
1. Acetanilid	6,14	5,99	5,81
2. Benzen	11,71	11,56	11,33
3. Toluen	14,6	14,4	14,2
4. o-ksylen	16,3	16,1	15,8
5. n-butylobenzen	18,9	18,7	18,4



Rys. 10.6. Ilustracja wartości wpływu zastępczej objętości mieszania przyjętej do obliczenia korekty programu elucji na czas retencji dla aparatu Lichrograph.

Pożądany program elucji $X = 4,3[\%/min.] * t$, w zakresie 4% do 90%, opóźnienie transportowe $v_0=3 \text{ cm}^3$, $t_0 = 2 \text{ min.}$, ciecz A - woda, ciecz B - metanol + 0,1% acetonu, $w=1,5 \text{ cm}^3/min.$, kolumna - Lichrospher RP 18 5 m, 125x4 mm, $t=30^\circ\text{C}$.

Przyjęte wartości zastępczych objętości mieszania, stałych czasowych oraz odpowiadające im równania skorygowanego programu elucji :

a - $V_z=1,05 \text{ cm}^3$, $TA_z = 0,7 \text{ min.}$, $X = 4,3[\%/min.] * t + 3[\%]$,

b - $V_z=1,40 \text{ cm}^3$, $TA_z = 0,93 \text{ min.}$, $X = 4,3[\%/min.] * t + 4[\%]$,

c - $V_z=1,74 \text{ cm}^3$, $TA_z = 1,16 \text{ min.}$, $X = 4,3[\%/min.] * t + 5[\%]$,

Rozdzielane substancje: 1 - acetanilid, 2 - benzen, 3 - toluen, 4 - *o*-ksylen, 5 - *n* butylobenzen.

gdy zastosowanie korekty programu elucji znacznie zmieni czas retencji, to można spodziewać się różnic wartości powierzchni pików i w konsekwencji, różnic wartości współczynników kalibracyjnych, szczególnie dla substancji o niskich i wysokich wartościach czasu retencji.

Zbadano też wpływ niedokładnego wyznaczenia zastępczej objętości mieszania V_z zastosowanej do określenia skorygowanego programu elucji na uzyskiwane wartości czasu retencji. Na rysunku 6 przedstawiono chromatogramy otrzymane dla trzech programów elucji, różniących się wartością zastępczej objętości mieszania przyjętą do obliczenia korekty programu elucji, a co za tym idzie, różniących się parametrem "b" w równaniu prostej, opisującej skorygowany program elucji wprowadzany do programatora.

W tabeli 10.4 zestawiono wartości zastępczej objętości mieszania przyjęte do korekty, odpowiadające im wartości zastępczej stałej czasowej, postaci skorygowanych równań programu elucji dla odpowiednich chromatogramów oznaczonych na rysunku 10.6 jako a, b, c oraz podano uzyskane czasy retencji poszczególnych rozdzielanych substancji.

Widać, że przy dość dużej zmianie zastępczej objętości mieszania, o $0,4 \text{ cm}^3$, wykorzystywanej dla korygowania programu elucji, zmiany uzyskiwanych wartości czasu retencji są

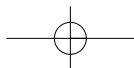
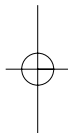
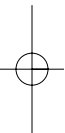
względnie nieduże (na poziomie ok. 0,2 min). Oznacza to, że niewielkie błędy w wyznaczaniu zastępczej objętości mieszania nie powinny poważnie pogorszyć odtwarzalności czasu retencji.

Wszystkie wykonane badania wykazały też, niewielki, praktycznie pomijalny, wpływ sposobu i stopnia korekty programu elucji na powtarzalność: czasu retencji oraz powierzchni pików - dla tego samego aparatu, kolumny i tych samych warunków rozdzielania. Wydaje się to oczywiste, także intuicyjnie, ponieważ charakter funkcji programu elucji powinien mieć drugorzędny wpływ na powtarzalność otrzymywanych wartości czasu retencji oraz powierzchni pików chromatograficznych. O powtarzalności uzyskiwania w/w parametrów w warunkach kolumnowej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem programowania składu cieczy decyduje przede wszystkim powtarzalność wytwarzania przez aparat określonej wartości składu eluentu, czy powtarzalność wytwarzania określonej (niekoniecznie żądanej) postaci programu elucji, w tym dokładność i stabilność pracy pompy.

Zupełnie inaczej ma się sprawa z odtwarzalnością czasu retencji z zastosowaniem różnych aparatów HPLC. Wykazano, że z wykorzystaniem tej samej kolumny i programu elucji, czas i objętość retencji mogą znacznie różnić się co do wartości tego samego, gdy nie zostanie zastosowana korekta programu elucji, a wartości opóźnienia transportowego i zastępcze objętości mieszania dwóch aparatów są różne.

Znaczenie symboli

a, b	- współczynniki w liniowym programie elucji gradientowej ($X = at+b$),
t	- czas, wyrażony w [s] albo [min.],
t_0, T_0	- opóźnienie transportowe, wyrażone w [s], albo [min.],
TA	- zastępcza stała czasowa mieszalnika i aparatu, modelowana pojedynczym elementem inercyjnym I rzędu, [s] albo [min.],
V_0, v_0	- opóźnienie transportowe wyrażone w [cm ³],
V_Z	- zastępcza objętość mieszania w mieszalniku i aparacie chromatograficznym modelowanym elementem inercyjnym I rzędu, wyrażona w [cm ³],
w	- objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej przez kolumnę chromatograficzną, wyrażone w [cm ³ /min.],
X	- stężenie objętościowe składnika B, C, ... w eluencie, wyrażone jako udział objętościowy [v/v] (ułamek objętościowy), albo [% v/v] (procent objętościowy).



11. OZNACZANIE ILOŚCIOWE W HPLC

Rafał Kartanowicz

Celem rozdzielania mieszaniny substancji na poszczególne składniki, bądź tylko wybranych substancji od innych, jest najczęściej ich ilościowe oznaczenie, tj. ustalenie zawartości lub masy analitu w bardzo dużej próbce.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) jest wykorzystywana do oznaczenia zawartości składników głównych, tj. występujących w próbce na poziomie stężeń w zakresie od 1 do 100 %, składników pośrednich - od 0.001 do 1% oraz substancji obecnych w analizowanej próbce poniżej 0.001%, tj. składników śladowych.

Oznaczenie ilościowe w HPLC polega na ustaleniu zależności pomiędzy sygnałem detektora, czyli powierzchnią pod pikiem lub ewentualnie wysokością pików, a stężeniem lub masą składnika, którego zawartość zamierzamy oznaczyć. W praktyce mamy do dyspozycji cztery metody oznaczania: metodę wzorca zewnętrznego (metodę krzywej kalibracyjnej ang. "external standard"), metodę wzorca wewnętrznego (ang. "internal standard"), metodę dodatku wzorca (metodę fortyfikacji) oraz metodę prostej normalizacji lub normalizacji ze współczynnikami korekcyjnymi (ang. "normalization").

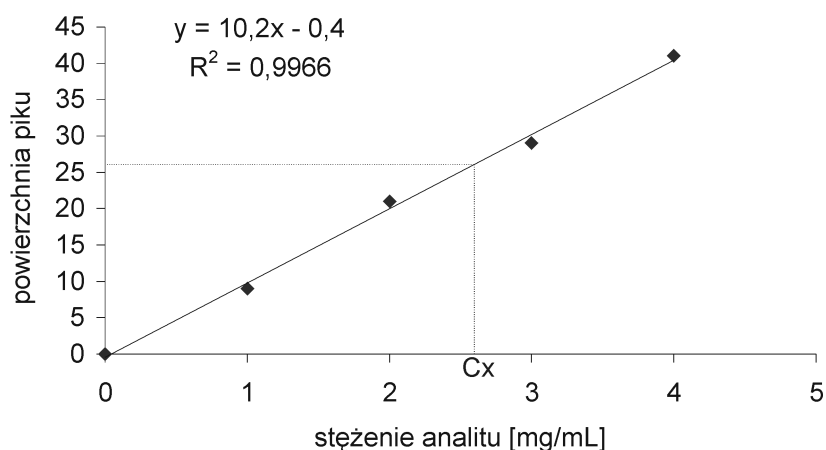
11.1. METODA WZORCA ZEWNĘTRZNEGO (METODA KRZYWEJ KALIBRACYJNEJ)

Istotą metody wzorca zewnętrznego jest wyznaczenie zależności pomiędzy powierzchnią (wysokością) pików dla każdej z oznaczanych substancji i ich stężeniem lub masą.

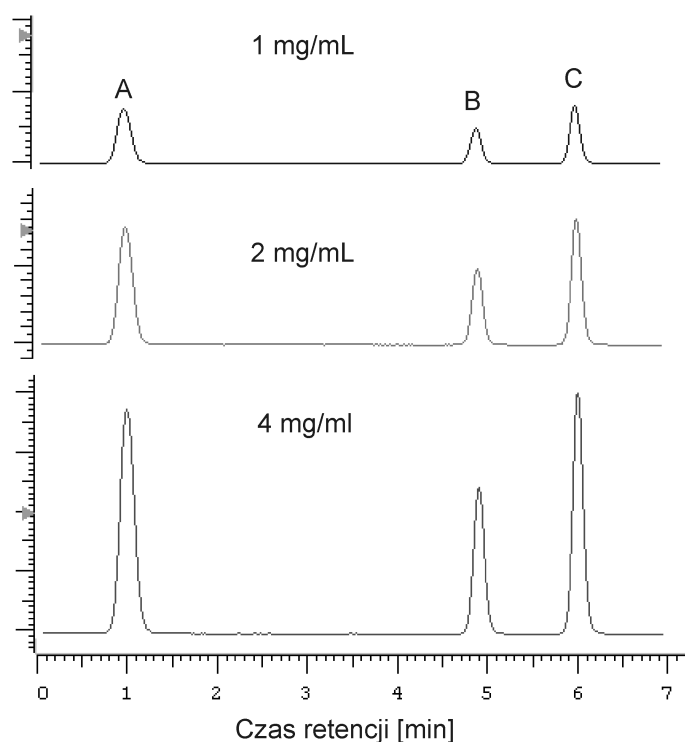
W tym celu przygotowuje się roztwory kalibracyjne, tzn. roztwory substancji oznaczanej albo mieszaniny analizowanych substancji w kilku różnych stężeniach (np. 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/mL). Każdy z przygotowanych roztworów, dozowany jest do kolumny chromatograficznej. Na podstawie powierzchni lub wysokości pików, na podstawie uzyskanych chromatogramów wyznacza się przebieg krzywej kalibracyjnej, bądź oblicza się wartości współczynników w równaniu kalibracyjnym dla każdej z oznaczanych substancji. Następnie, dozowane do kolumny i rozdzielane są próbki, w których oznaczona ma być zawartość substancji. Uzyskane powierzchnie pików substancji oznaczanych w nieznannej próbce, umożliwią oznaczenie ich zawartości, tj. stężenia (masy). W praktyce wykonuje się to metodą graficznej interpolacji na wykresie krzywej kalibracyjnej, w oparciu o równanie krzywej kalibracyjnej lub z wykorzystaniem równania (1).

$$C_x = \frac{A_x}{R_f} \quad \text{albo} \quad C_x = A_x \cdot r_f \quad (1)$$

gdzie: C_x - oznaczona zawartość składnika "x", A_x - powierzchnia pików, R_f , r_f - współczynniki odpowiedzi, tj. iloraz powierzchni pików i stężenia substancji o znanym stężeniu w roztworze wzorcowym albo odwrotnie. Gdy równanie kalibracyjne wyrażone jest funkcją typu $f(x) = a_1x$,



Rys. 11.1. Wykres krzywej kalibracyjnej otrzymanej metodą wzorca zewnętrznego.



Rys. 11.2. Chromatogramy roztworów wzorcowych substancji A, B, C o stężeniach 1.0, 2.0 i 4.0 mg/mL.

to współczynnik odpowiedzi jest współczynnikiem kierunkowym a_1 tej prostej, dla których wykonano kalibrację.

Na rysunku 11.1 i 11.2 przedstawiono odpowiednio: typową krzywą kalibracyjną uzyskaną metodą wzorca zewnętrznego oraz chromatogramy roztworów wzorcowych.

Stosowanie tej metody kalibracji wymaga, aby zarówno roztwory wzorcowe jak i analizowane próbki były rozdzielane ("chromatografowane") w tych samych warunkach temperatu-

Oznaczenie ilościowe w HPLC

ry, objętościowego natężenie przepływu eluentu, typu i wymiarów kolumny chromatograficznej, z reguły tej samej kolumny, składu eluentu oraz takiego samego programu elucji. Ponadto trzeba brać też pod uwagę następujące czynniki:

- Równanie kalibracyjne jest najczęściej zależnością prostoliniową typu $y = a_1x + a_2$, ale niekiedy do opisu przebiegu krzywej kalibracyjnej wykorzystuje się inne funkcje:

$$y = a_1x,$$

$$y = a_1x^2 + xa_2 + a_3$$

$$y = a_1x^3 + a_2x^2 + xa_3 + a_4$$

$$y = a_1x^n$$

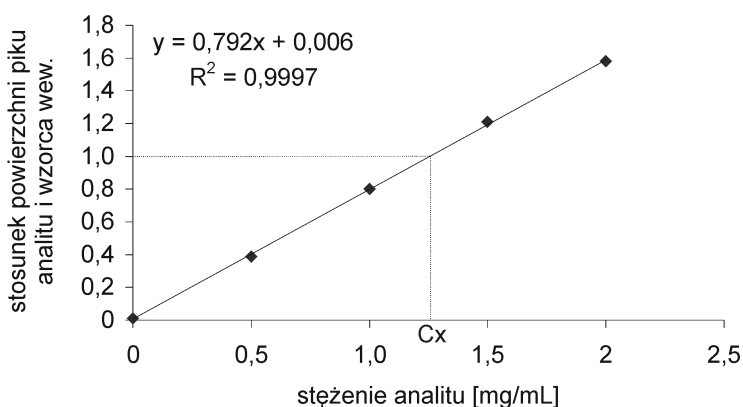
gdzie: y - powierzchnia piku (wysokość), x - stężenie (masa) substancji,
 $a_{1,2,3,4}$ - współczynniki, n - wykładnik potęgi.

- Dozowanie do kolumny chromatograficznej powinno być powtarzalne.
- Oznaczanie zawartości substancji w próbkach nieznanymi może być wykonywane tylko w zakresie stężeń, w jakim została wykonana kalibracja, dotyczy to także innych metod tj. metody wzorca wewnętrznego czy fortyfikacji. Ekstrapolacja przebiegu krzywej kalibracyjnej poza zakres wykonanej kalibracji, może być źródłem niedokładnych wyników oznaczeń ze względu na nieliniowy przebieg odpowiedzi detektora.

11.2. METODA WZORCA WEWNĘTRZNEGO

Jest to metoda polegająca na dodaniu do próbki znanej ilości składnika, tzw. wzorca wewnętrznego (IST), który jest jednak inny od substancji oznaczanych i nie może być obecny w analizowanych próbkach przed jego dodaniem.

W celu uzyskania krzywej kalibracyjnej, do kilku roztworów wzorcowych o różnych stężeniach substancji oznaczanej, dodaje się najczęściej stałą i znaną ilość wzorca wewnętrznego. Na podstawie uzyskanych chromatogramów roztworów wzorcowych, wykreśla się zależność stężenia analitu w funkcji stosunku powierzchni piku analitu i wzorca wewnętrznego. Na rysunku 11.3 przedstawiono krzywą kalibracyjną dla substancji oznaczanej metodą wzorca wewnętrznego.



Rys. 11.3. Wykres krzywej kalibracyjnej otrzymanej przy zastosowaniu techniki wzorca wewnętrznego.

W celu oznaczenia zawartości substancji metodą wzorca wewnętrznego (o znanej masie lub objętości), dodaje się znaną ilość wzorca wewnętrznego do próbki badanej. Następnie z chromatogramu oblicza się stosunek powierzchni piku analitu i wzorca wewnętrznego. Zawartość substancji oznaczanej wyznacza się metodą graficznej interpolacji. Oblicza się ją z równania krzywej kalibracyjnej lub z wykorzystaniem zależności (2) i (3) - w sytuacji, kiedy krzywa kalibracyjna jest zależnością liniową typu $f(x) = a_1x$:

$$C_x = \frac{A_x / A_{ist}}{R_f} \quad (2)$$

$$R_f = \frac{A_i / A_{ist(i)}}{c_i} \quad (3)$$

gdzie:

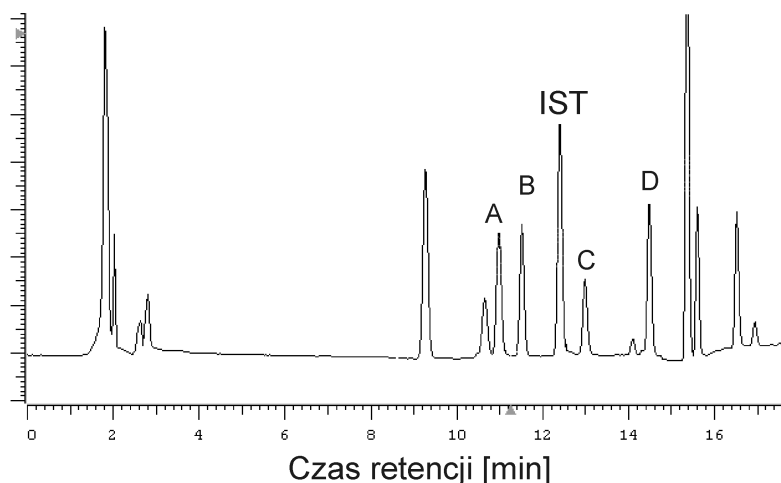
- C_x - oznaczona zawartość składnika "x",
- A_x - powierzchnia piku analitu "x",
- A_{ist} - powierzchnia piku wzorca wewnętrznego,
- R_f - współczynnik odpowiedzi,
- $A_i, A_{ist(i)}$ - powierzchnia piku analitu i wzorca wewnętrznego w roztworze kalibracyjnym,
- c_i - stężenie analitu w roztworze kalibracyjnym.

Na rysunku 11.4 przedstawiono chromatogram mieszaniny wzorcowej substancji oznaczanych oraz wzorca wewnętrznego.

W praktyce, aby uniezależnić wyniki od stopnia rozcieńczenia próbki spowodowanego dodawaniem roztworu wzorca wewnętrznego, kalibracja jest wykonywana w oparciu o stężenia substancji wzorcowych, a oznaczenie zawartości analitów, w oparciu o masę próbki i o masę dodanego wzorca wewnętrznego.

Wzorec wewnętrzny powinien spełniać następujące wymagania:

- musi być rozdzielony od innych składników występujących w próbce
- czas retencji powinien być zbliżony do czasu retencji analitu(ów)



Rys. 11.4. Chromatogram mieszaniny substancji oznaczanych A, B, C, D oraz wzorca wewnętrznego (IST).

Oznaczanie ilościowe w HPLC

- nie występuje w próbkach pierwotnych
- właściwości fizyko-chemiczne są podobne do analitu. Jest to szczególnie istotne na etapie przygotowania próbek (oczyszczania, wzbogacania czy derywatywacji)
- powinien być możliwie wysokiej czystości
- stabilny chemicznie
- odpowiedź detektora dla wzorca wewnętrznego powinna być zbliżona do odpowiedzi substancji oznaczanych

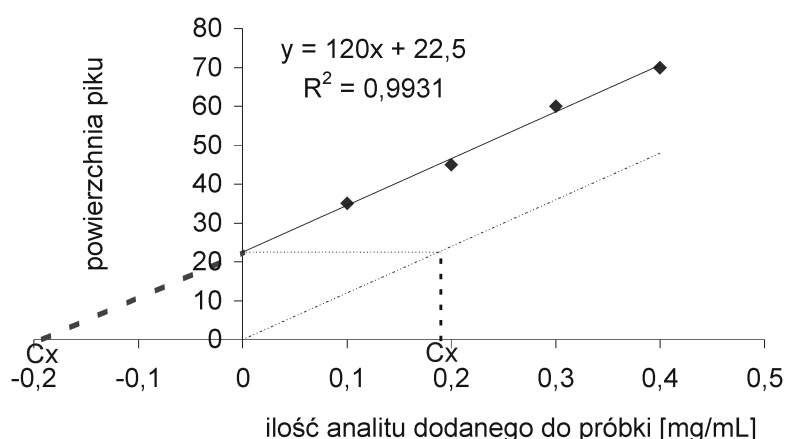
Metoda ta ma zastosowanie szczególnie w przypadku metod analitycznych wymagających złożonej, wieloetapowej procedury przygotowania próbki (izolacja, wzbogacanie, derywatywacja itp.), co może powodować straty analitów. Dodanie wzorca wewnętrznego do badanej próbki jeszcze przed przystąpieniem do przygotowania próbki do analizy chromatograficznej pozwala na skorygowanie tych strat.

Stosowanie metody wzorca wewnętrznego pozwala również na uniezależnienie otrzymywanych wyników od wahań ilości dozowanej próbki. Ograniczaniem w stosowaniu tej metody może być bardzo bogata matryca, w której znajdują się anality. Trudne może być wtedy dobranie odpowiedniej substancji jako wzorca wewnętrznego. W praktyce metoda ta jest nieco bardziej pracochłonna niż metoda krzywej kalibracyjnej.

11.3. METODA DODATKU WZORCA

Metoda ta polega na dodaniu do próbki znanych ilości (najkorzystniej znanej masy) substancji oznaczanych (analitów) np. 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 i 0,5 mg/mL, zwykle jest to od 50 do 150% oczekiwanej zawartości oznaczanej substancji. Na podstawie uzyskanych chromatogramów, wykreśla się krzywą kalibracyjną, tj. zależność powierzchni piku analitu w funkcji ilości analitu dodanej do próbki (rys. 11.5).

Następnie przeprowadza się graficzną ekstrapolację krzywej kalibracyjnej do punkt przecięcia z osią odciętych i odczytuje się wartość C_x . Innym sposobem określenia zawartości substancji oznaczanej w próbce bez dodatku wzorca jest graficzne wyznaczenie przebiegu nowej linii kalibracyjnej typu $f(x) = a_1x$, o tym samym współczynniku nachylenia prostej, co krzywa kalibracyjna. Przeprowadza się wówczas graficzną interpolację, bądź oblicza się stężenie analitu w próbce bez dodatku substancji oznaczanej z równania (4), na przykład: $C_x = 22,5/120 = 0,19$.



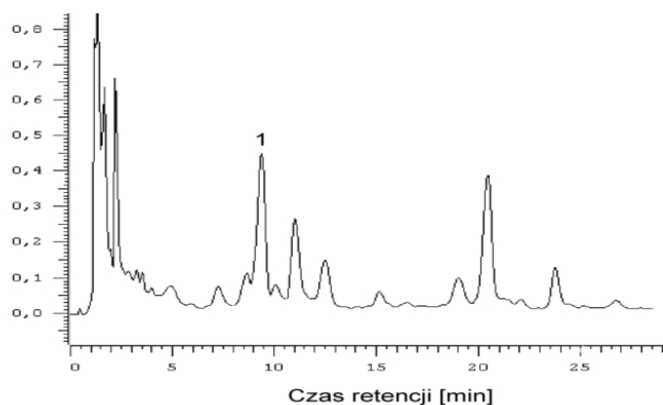
Rys. 11.5. Wykres krzywej kalibracyjnej otrzymanej przy zastosowaniu metody dodatku wzorca.

$$c_x = \frac{a_2(x=0)}{a_1} \quad (4)$$

gdzie: a_1 - współczynnik kierunkowy prostej,
 a_2 - wartość w punkcie przecięcia się prostej z osią rzędnych.

Należy nie zapominać o uwzględnieniu stopnia rozcieńczenia w przypadku dodawania wzorca w postaci rozcieńzonego roztworu!

Zaletą metody dodatku wzorca jest wykonanie kalibracji w takich warunkach, że anality znajdują się w rzeczywistej matrycy. Szczególnie, kiedy jest bardzo trudne bądź niemożliwe otrzymanie matrycy (*placebo*), w której nie znajdowałaby się substancja oznaczana, np. w przypadku próbek klinicznych i środowiskowych. Szczególną cechą tej metody jest jej wysoka "odporność" na sytuację niepełnego rozdzielania analitu oraz, gdy pik substancji oznaczanej nie jest rozdzielony do linii podstawowej, od innych substancji, których piki są jednak znacznie mniejsze w stosunku do substancji oznaczanej. Na rysunku 11.6 przedstawiono przykład takiego chromatogramu, na którym pik substancji oznaczanej zaznaczono symbolem "1". W wyżej wymienionych sytuacjach tylko metoda dodatku wzorca pozwalała na oznaczenie zawartości substancji w próbce. Wykonanie oznaczenia zawartości substancji metodą dodatku wzorca jest jednak pracochłonne.



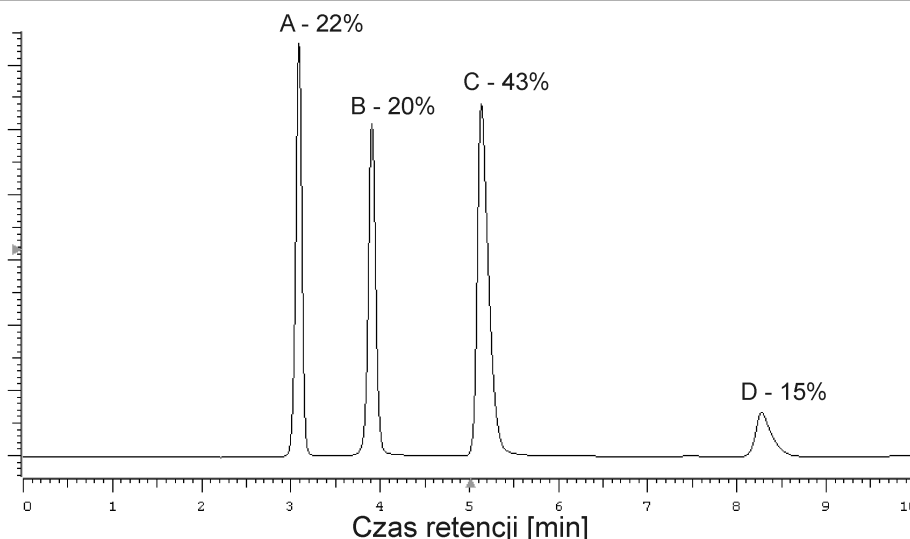
Rys. 11.6. Chromatogram mieszaniny substancji, w której analit (1) nie jest w rozdzielony do linii bazowej od innych substancji.

11.4. METODA PROSTEJ NORMALIZACJI

Metoda prostej normalizacji nie jest metodą kalibracji. Nie stosuje się w niej odniesienia do znanej ilości wzorca. Jednakże metoda ta umożliwia oszacowanie względnych ilości substancji np. zawartości zanieczyszczeń w badanej próbce.

Na podstawie chromatogramu oblicza się sumaryczną powierzchnię pików, którą traktuje się jak 100%. Następnie oblicza się udział powierzchni określonego piku względem sumy powierzchni wszystkich lub tylko wybranych pików na chromatogramie. Otrzymanej wartości

Oznaczenie ilościowe w HPLC



Rys. 11.7. Chromatogram mieszaniny substancji, na którym podano udziały procentowe składników otrzymane metodą prostej normalizacji.

dla danej substancji przypisuje się procentową zawartość względem innych substancji obecnych w mieszaninie. Obliczenia wykonuje się zgodnie z poniższym równaniem (5):

$$c_i = \frac{A_i}{\sum A_i} \times 100 \quad (5)$$

gdzie: c_i - udział % substancji i względem innych pików na chromatogramie,
 A_i - powierzchnia pików,
 $\sum A_i$ - suma powierzchni wszystkich lub wybranych pików na chromatogramie

Na rysunku 11.7 chromatogram mieszaniny substancji oznaczonych oraz ich udziały procentowe w próbce uzyskaną metodą prostej normalizacji.

Metoda prostej normalizacji opiera się na założeniu, że współczynniki odpowiedzi dla każdego składnika próbki są takie same, tzn. takie same stężenia różnych substancji odpowiadają takim samym powierzchniom ich pików chromatograficznych. Taką charakterystyką cechuje się detektor FID (płomieniowo-jonizacyjny) stosowany w chromatografii gazowej do oznaczania węglowodorów. W chromatografii cieczowej metoda uproszczonej normalizacji jest stosowana bardzo rzadko. Wynika to stąd, że detektory stosowane w HPLC charakteryzują się zróżnicowaną czułością względem substancji. Stosowanie detektora typu UV-VIS i metody prostej normalizacji jest nie celowe, ponieważ nawet substancje należące do tego samego szeregu homologicznego charakteryzują się zróżnicowanymi molowymi współczynnikami absorpcji (ϵ). Zatem odpowiedź detektora UV-VIS zależy od stężenia substancji jak i molowego współczynnika absorpcji

Korzystne może być stosowanie metody prostej normalizacji, gdy wykorzystywany jest detektor refraktometryczny lub detektor światła rozproszonego. Detektory te wykazują zbliżoną odpowiedź dla różnych substancji o zbliżonej strukturze i masie cząsteczkowej, szczególnie dla substancji należących do tej samej grupy związków chemicznych.

11.5. METODA NORMALIZACJI ZE WSPÓŁCZYNNIKAMI KOREKCYJNYMI

Metoda ta, podobnie jak metoda prostej normalizacji, polega na określeniu względnej powierzchni piku substancji badanej względem wybranych bądź wszystkich pików na chromatogramie z uwzględnieniem współczynników korekcyjnych, uwzględniających zróżnicowaną odpowiedź detektora dla różnych składników próbki.

Współczynniki korekcyjne wykorzystuje się w celu oznaczenia rzeczywistego udziału procentowego poszczególnych substancji w próbce analizowanej zgodnie z równaniem (6).

$$c_i = \frac{A_i \times R_{fi}}{\sum(A_i \times R_{fi})} \times 100 \quad (6)$$

gdzie: c_i - udział %-owy substancji i ,
 A_i - powierzchnia piku,
 $\sum A_i$ - suma powierzchni wszystkich lub wybranych pików na chromatogramie,
 R_{fi} - współczynnik odpowiedzi (współczynnik korekcyjny) dla substancji i

W celu wyznaczenia współczynników korekcyjnych postępuje się w sposób następujący. Na podstawie chromatogramu mieszaniny o znanych zawartościach substancji badanych oblicza się pola powierzchni pików, a następnie względny udział procentowy poszczególnych substancji metodą prostej normalizacji. W dalszej kolejności oblicza się wartość współczynnika korekcyjnego dla określonej substancji korzystając z równania (7).

$$R_{fi} = \frac{c_i(\text{znane})}{c_i(\text{obliczone})} \quad (7)$$

gdzie: $c_i(\text{znane})$ - zawartość składnika i w roztworze wzorcowym,
 $c_i(\text{obliczone})$ - udział składnika i w roztworze wzorcowym obliczony metodą prostej normalizacji.

Na przykład, dla substancji A, B, C, D, przedstawionych na chromatogramie na rysunku 7 wyznaczone współczynniki korekcyjne wynoszą: $R_{fA} = 1$, $R_{fB} = 1.1$, $R_{fC} = 1.1$, $R_{fD} = 1.2$, stąd uzyskane zawartości po uwzględnieniu współczynników korekcyjnych poszczególnych składników wynoszą: A - 20.1, B - 20.0, C - 43.5, D - 16.4 [%].

12. CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA

Bogumiła Makuch

12.1. WPROWADZENIE

Proces chromatograficznego rozdzielania może być wykonany również, gdy faza stacjonarna jest w postaci cienkiej warstwy. Tak realizowaną chromatografię cieczową nazwa się chromatografią planarną lub cienkowarstwową (*Thin Layer Chromatography - TLC*). Gdy faza stacjonarna jest warstwą bibuły, jest to chromatografia bibułowa, natomiast, gdy jest rozprowadzona jako warstwa na płytce szklanej, ewentualnie aluminiowej lub z tworzywa sztucznego, nazywamy ją chromatografią cienkowarstwową.

Po raz pierwszy chromatografię cieczową cienkowarstwową zastosowano w 1938 roku do oznaczania zanieczyszczeń leków i od tego czasu do dnia dzisiejszego jest to metoda powszechnie stosowana praktycznie we wszystkich rodzajach laboratoriów (farmaceutyczne, kliniczne i inne). Metoda ta stała się szczególnie popularna od 1956 roku, gdy do przygotowania cienkich warstw chromatograficznych na płytkach szklanych zastosowano proste urządzenie. Od twórcy tego urządzenia nazywane powlekaaczem Stahla. Stahl był również twórcą podstaw teoretycznych i metodycznych chromatografii cienkowarstwowej.

Chromatografia cienkowarstwowa pod względem eksperymentalnym jest niezwykle techniką, gdyż może być wykonywana w "warunkach domowych", albo jak obecnie - być w pełni zinstrumentalizowaną.

Burzliwy rozwój wysokosprawnej chromatografii kolumnowej w latach siedemdziesiątych zmniejszył zainteresowanie techniką cienkowarstwową, szczególnie z powodu braku możliwości rejestracji i przechowywania wyników rozdzielania. O ponownym wzroście zainteresowania tą techniką w ostatnich latach zadecydowało zwiększenie jej możliwości rozdzielczych, dzięki wprowadzeniu tzw. wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (*High Performance Thin Layer Chromatography - HPTLC*).

Nowoczesna wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa i wysokosprawna elucyjna chromatografia kolumnowa to metody komplementarne, w których podstawą rozdzielania jest podział rozdzielanych składników pomiędzy dwie fazy tj., stacjonarną (stałą albo ciekłą) i ciekłą - ruchomą. Różnice dotyczą głównie przestrzennego ułożenia fazy stacjonarnej i kinetyki procesu rozdzielania.

Podstawowe zalety chromatografii cienkowarstwowej to możliwość przechowywania płytek z rozdzielonymi substancjami a także możliwość obserwacji stopnia rozdzielania na każdym jego etapie i przerwanie procesu w dowolnym czasie jak również detekcja w każdym etapie rozwijania chromatogramu. W przypadku kolumny chromatograficznej, można dokonać detekcji i ocenić stopień rozdzielania dopiero po opuszczeniu kolumny przez składniki rozdzielanej mieszaniny.

Postęp w rozwoju chromatografii cienkowarstwowej wiąże się z wprowadzeniem mniejszych ziaren (podobnie jak w kolumnowej), dostępnością gotowych warstw chromatograficznych oraz z instrumentalizacją metody. Ogromnym postępem w rozwoju tej techniki

było wprowadzenie detektorów, zwanych densytometrami, urządzeń do automatycznego dozowania próbki oraz komputerowego opracowania wyników.

Porównanie techniki konwencjonalnej i wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej przedstawiono w tabeli 12.1.

Tabela 12.1. Porównanie konwencjonalnej (TLC) i wysokosprawnej (HTLC) chromatografii cienkowarstwowej.

Parametr	Technika konwencjonalna	Technika wysokosprawna
Wielkość płytki cm	20x20	10x10
Grubość warstwy, μm	100- 250	200
Przeciętna wielkość ziaren, μm	20	5-15
Rozkład średnicy ziaren, dp	10- 60	wąski
Objętość próbki, μl	1-5	0,1-0,2
Średnica plamki, mm w chwili startu po rozwinięciu	3-6 8-15	1,0-1,5 2 - 6
Droga rozwijania, cm	10-15	3 - 6
Czas rozwijania, min	30-200	3 - 6
Granice wykrywalności absorpcja światła, ng fluorescencja, pg	1-5 50-100	0,1-0,5 5-10

Jak widać w przypadku HPTLC granica oznaczalności jest znacznie niższa, a sprawność wyższa. Miarą tego jest średnica pasma stężeniowego (plamki). Sprawność konwencjonalnej warstwy chromatograficznej wynosi około 600 pólerek, natomiast warstw wysokosprawnych około 6000. Ze względu na częste stosowanie chromatografii cienkowarstwowej jako metody kontrolnej wielu procesów istotny jest znacznie krótszy czas rozwijania chromatogramu niż w przypadku stosowania chromatografii kolumnowej.

12.2. ZASADA PROCESU ROZDZIELANIA

Mechanizm rozdzielania mieszaniny metodą chromatografii cienkowarstwowej jest analogiczny jak w do wysokosprawnej chromatografii kolumnowej. Jednak, warunki procesu są trudne do jednoznacznej definicji i kontroli eksperymentalnej. Wynika to z obecności par rozpuszczalnika i ich kontaktu z warstwą fazy stacjonarnej.

W wielkim uproszczeniu zjawiska zachodzące w komorze można przedstawić następująco: faza ruchoma dzięki siłom kapilarnym migruje wzdłuż warstwy sorbentu (fazy stacjonarnej) i w zależności od energii oddziaływań substancji z fazami wykazują one różny stopień retencji, tzn. mają różną drogę migracji i znajdują się w różnych miejscach warstwy.

Suchą płytkę chromatograficzną umieszcza się w komorze chromatograficznej, w której znajdują się rozpuszczalnik oraz jego para, a także pewna niewielka ilość pary wodnej. Skład pary, w przypadku mieszaniny rozpuszczalników zazwyczaj nie odpowiada składowi fazy ruchomej, a prężność cząstkowa ulega zmianie w trakcie procesu rozwijania chromatogramu. Skład par może być również niepowtarzalny w kolejnych eksperymentach, gdyż jest zależny od

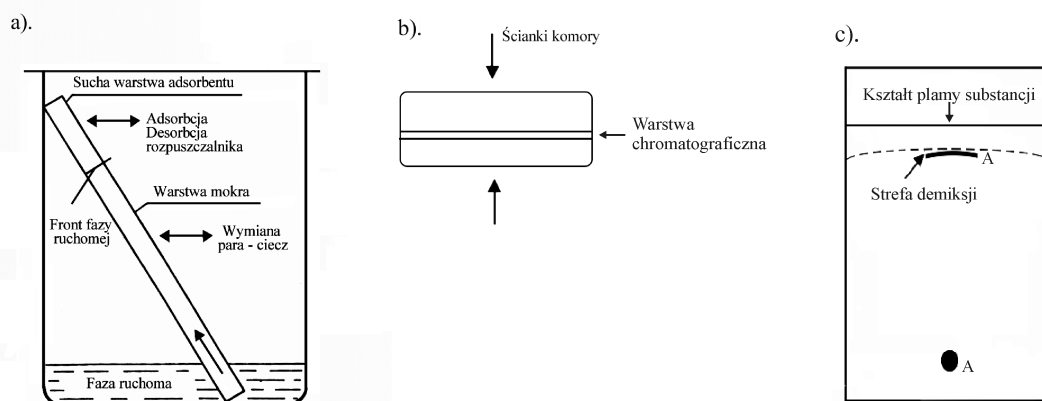
objętości komory chromatograficznej, stanu nasycenia atmosfery komory parą przed rozpoczęciem procesu rozwijania i oczywiście, od temperatury.

Z wyżej wymienionych powodów szczególne znaczenie ma dbałość o powtarzalność warunków rozwijania chromatogramu.

Schemat zachodzących procesów przedstawiono na rysunku 12.1a. Pary rozpuszczalnika adsorbują/desorbuja się na powierzchni suchej warstwy fazy stacjonarnej jak również penetrują wilgotną część sorbentu. W takich warunkach trudno jest osiągnąć stabilny stan równowagi. Opisaną powyżej niestabilność można znacznie ograniczyć (nie wyeliminować) przez stosowanie komór typu sandwich, w których przestrzeń nad warstwą jest maksymalnie ograniczona (patrz rysunek 12.1b). Podobny efekt osiąga się stosując tzw. chromatografię ciśnieniową (*Over Pressured lub Pressurized Thin Layer Chromatography-OPTLC*).

Warunki rozwijania chromatogramu w komór sandwich i w warunkach OPTLC są zbliżone do warunków w kolumnie chromatograficznej.

Innym parametrem, który nie występuje w kolumnie chromatograficznej, a prawie zawsze ma miejsce na cienkiej warstwie to gradient składu fazy ruchomej w czasie jej migracji. Zjawisko to jest szczególnie widoczne, gdy fazą ruchomą jest mieszanina rozpuszczalników znacznie różniących się właściwościami, jak np. siłą elucyjną, prężnością par, temperaturą wrzenia, lep-



Rys. 12.1.

a - schematyczny obraz procesów zachodzących w czasie rozwijania chromatogramu na płytce chromatograficznej w warunkach konwencjonalnej chromatografii cienkowarstwowej.

b - przekrój komory typu sandwich,

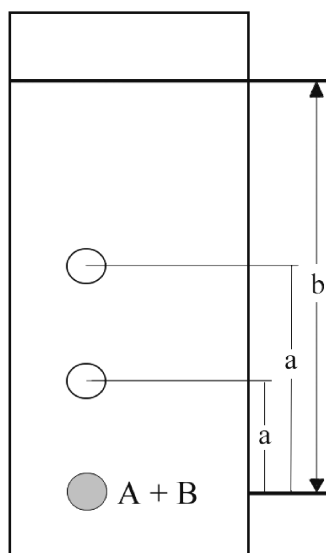
c - obraz chromatogramu gdy zachodzi demiksja fazy ruchomej

kością i inne. W skrajnych przypadkach może nawet następować rozdzielanie się (demiksja) składników fazy ruchomej, która migruje wzdłuż warstwy. W wyniku tego w każdym miejscu warstwy chromatograficznej są inne warunki rozdzielania. Przykładowy obraz zjawiska demiksji przedstawiono na rysunku 12.1c.

Parametrem stosowanym do opisu zjawisk zachodzących w warstwie chromatograficznej, jest współczynnik R_F , definiowany jako stosunek drogi przebytej przez środek plamy (pasma stężeniowego) substancji (a) do drogi czoła fazy ruchomej (b), patrz rysunek 12.2.

$$R_F = \frac{a}{b} \tag{1}$$

$$R_F = \frac{t_m}{t_m + t_s} = \frac{1}{1 + k} \tag{2}$$



Rys. 12.2. Chromatogram cienkowarstwowy mieszaniny substancji.

t_s, t_m - czas przebywania plamki substancji w fazie stacjonarnej i w fazie ruchomej,

k - współczynnik retencji.

Należy podkreślić, że oznaczanie współczynnika R_F z równania 2 jest trudne i niepraktyczne z powodu dynamicznego przebiegu procesu rozdzielania.

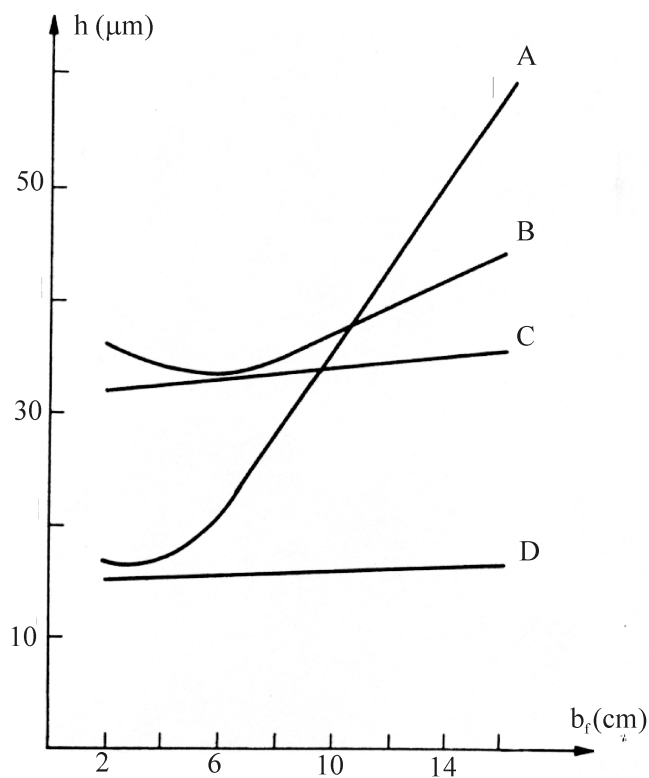
W praktyce laboratoryjnej powszechnie jest stosowany współczynnik R_F obliczony z równania 1. Wartość R_F może zmieniać się od 0 do 1, gdy $R_F = 0$ to chromatografowane substancje w stosowanym układzie chromatograficznym zbyt silnie oddziałują z fazą stacjonarną, natomiast, nie ma oddziaływań z fazą ruchomą i praktycznie nie znajdują w się w fazie ruchomej. Natomiast, gdy $R_F = 1$ to substancje praktycznie wędrują z czołem rozpuszczalnika i ma miejsce brak oddziaływań z fazą stacjonarną. Optymalna wartość współczynnika R_F powinna być w przedziale 0,2 - 0,8. Oznacza to, że warunki chromatograficzne są najbardziej stabilne. Wartość współczynnika R_F , podobnie jak innych parametrów retencji, zależy od rodzaju analitu, fazy ruchomej i fazy stacjonarnej. Wyniki rozdzielania metodą chromatografii cienkowarstwowej, podobnie, jak w kolumnie chromatograficznej, zależą nie tylko od różnic w wartościach współczynników R_F , ale również od rozmycia plam (pasm stężeniowych) wywołanego dyfuzją i dyspersją cząsteczek substancji w fazie ruchomej i stacjonarnej, a zatem, zależą od sprawności układu, czyli liczby półek teoretycznych lub wysokości równoważnej półce teoretycznej (WRTP).

Podobnie, jak dla kolumny, liczbę półek teoretycznych (n) można obliczyć z równania podanego poniżej:

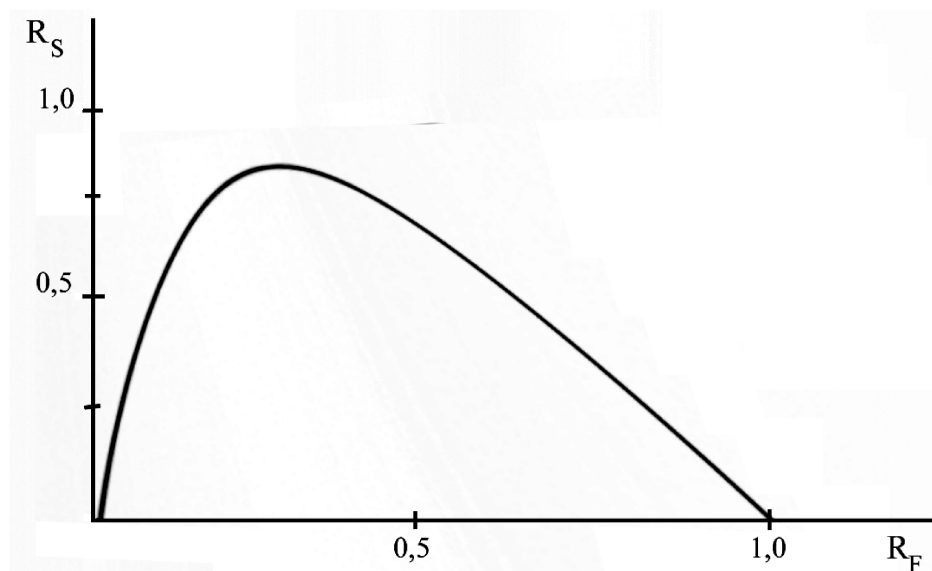
$$n = 16 \frac{a^2}{b^2} = 16 \frac{(R_F \cdot b)^2}{w_s^2} \quad (3)$$

gdzie: w_s - średnica plamki substancji, pozostałe parametry jak w równaniu 1.

Ponieważ prędkość fazy ruchomej jest różna w każdym miejscu warstwy chromatograficznej, to, również sprawność jest różna. Na rysunku 12.3 przedstawiono zmiany wysokości półki teoretycznej w funkcji odległości migracji.



Rys. 12.3. Zmiany średniej wysokości półki teoretycznej w funkcji odległości migracji :A- płytki wysokosprawna, rozwijanie konwencjonalne, B- płytki konwencjonalna , rozwijanie konwencjonalne, C- płytki konwencjonalna, rozwijanie wysokociśnieniowe, D- płytki wysokosprawna, rozwijanie wysokociśnieniowe.



Rys. 12.4. Zmiana rozdzielczości (R_s) w zależności od wartości współczynnika R_F .

W klasycznej chromatografii cienkowarstwowej (TLC), migracja fazy ruchomej wzdłuż warstwy jest zależna od sił kapilarnych, zatem prędkość fazy ruchomej jest malejącą funkcją odległości między czołem rozpuszczalnika i poziomem cieczy w komorze chromatograficznej. Ponadto siły kapilarne są zbyt małe, aby zapewnić prędkość, przy której byłaby najmniejsza wysokość półki teoretycznej w dowolnym miejscu czoła rozpuszczalnika. Optymalne wartości przepływu można uzyskać dopiero po zastosowaniu wymuszonego przepływu fazy ruchomej i zgodnie z przedstawionym rysunkiem najwyższą sprawność układów cienkowarstwowych osiąga się dla warstw wysokosprawnych z rozwijaniem wysokociśnieniowym (krzywa D). W praktyce, ze względu na brak urządzeń do rozwijania wysokociśnieniowego, najczęściej stosuje się wysokosprawne warstwy chromatograficzne z konwencjonalnym rozwijaniem. Jak widać z rysunku 12.3 dla każdego sposobu rozwijania najmniejsza wartość półki teoretycznej jest na pierwszych centymetrach rozwijania chromatogramu, co w konsekwencji prowadzi do konkluzji, że również rozdzielczość układu cienkowarstwowego jest najwyższa.

Istotnie, pomiary współczynnika rozdzielczości R_s w zależności od współczynnika R_F to potwierdzają (patrz rysunek 4). Wydłużanie drogi rozwijania obniża sprawność (rośnie wysokość półki teoretycznej) i znacznie przedłuża czas analizy.

12.3. TECHNIKA PRACY W PRZYPADKU CHROMATOGRFII CIENKOWARSTWOWEJ

W chromatografii cienkowarstwowej faza stacjonarna jest naniesiona w postaci cienkiej warstwy o grubości 0,1 - 0,25 mm za pomocą powlekiacza Stahla na płytce szklanej lub metalową lub z tworzywa sztucznego albo stosuje się handlowe płytki cienkowarstwowe na folii aluminiowej lub z tworzywa sztucznego. Powszechnie stosuje się płytki o wymiarach 200x200mm, 200x50 mm, 100x50 mm. Płytki do wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej są wykonywane przez renomowane firmy. Naniesiona warstwa musi być mechanicznie trwała, odporna na ścieranie. Najczęściej do fazy stacjonarnej dodaje się 0.1 - 10 % tzw. lepiszcza, którym mogą być gips, skrobia, sole kwasów poliakrylowych i inne. Ze względu na detekcję substancji warstwy chromatograficzne zawierają często trwale zaadsorbowany wskaźnik fluorescencyjny. Na rynku są dostępne warstwy do specjalnych zastosowań. Są to membrany z cząstkami sorbentu (fazy stacjonarnej) w matrycy teflonowej, arkusze z włókien szklanych impregnowane sorbentem, płytki z porowatego szkła, cienkie pręty szklane pokryte fazą stacjonarną przeznaczone do współpracy z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym, płytki z tzw. warstwą zagęszczania, a płytki do zastosowań preparatywnych o szczególnie dużej grubości fazy stacjonarnej i inne.

Tabela 12.2. Właściwości żelu krzemionkowego stosowanego do formowania wysokosprawnych warstw.

Właściwości	Merck Si-60	Whatman HP-K
Średnia średnica porów, nm	6	8
Objętość porów, ml/g	0,82	0,7
Powierzchnia właściwa, m ² /g	550	300
Średnia wielkość ziaren, μm	5	5
Grubość warstwy, μm	200	200
Zakres pH	1-8	1-8
pH 10 % zawiesiny	7	7-7,2

W chromatografii cienkowarstwowej, podobnie jak w kolumnowej, do rozdzielania są wykorzystywane te same mechanizmy oddziaływań międzycząsteczkowych, a więc adsorpcja, wymiana jonowa, podział, czy warunki układu faz odwróconych. Jednakże ciągle dominującą rolę (w przeciwieństwie do chromatografii kolumnowej) odgrywa adsorpcja, a najczęściej stosowanymi adsorbentami są żel krzemionkowy, tlenek glinu oraz okazjonalnie inne adsorbenty.

Ze względu na powszechność stosowania żelu krzemionkowego w Tabeli 12.1 przedstawiono właściwości tego adsorbentu produkowanego przez firmę Merck i Whatman. Firmy te przez wiele lat były najbardziej znane na rynku światowym jako producenci, między innymi wypełnień chromatograficznych i aparatury dla celów chromatograficznych. Na rynku polskim były przez wiele lat jedynymi dystrybutorami faz stacjonarnych i odczynników.

Ze względu na ogromny rozwój chromatografii, zarówno cieczowej, jak i gazowej obecnie jest bardzo wielu innych producentów wyposażenia do chromatografii i faz stacjonarnych.

Badania międzylaboratoryjne wykazały, że mogą występować znaczne różnice parametrów retencji otrzymane dla różnych sorbentów, nawet w obrębie danej szarży produkcyjnej tego samego producenta. Wynika to z faktu, że proces technologiczny otrzymywania sorbentów jest skomplikowany i zależny od wielu parametrów stąd powtarzalność właściwości chromatograficznych jest trudna do osiągnięcia. Z tych powodów użytkownik przygotowując warstwy chromatograficzne, bądź stosując gotowe, powinien zwrócić uwagę na numer szarży produkcyjnej przy porównywaniu wyników rozdzielania, szczególnie jest to istotne, gdy porównujemy wartości współczynników R_F , gdy równoległe z mieszaniną rozdzielaną nie są nałożone wzorce rozdzielanych substancji.

Fazy stacjonarne stosowane w chromatografii cienkowarstwowej podobnie jak i w kolumnowej muszą być selektywne i o tej selektywności decyduje charakter powierzchni. Na przykład o selektywności żelu krzemionkowego decyduje obecność grup hydroksylowych na jego powierzchni oraz warunki otoczenia szczególnie wilgotność jeżeli nie pracujemy w warunkach stałej wilgotności.

Drugim po żelu krzemionkowym, najczęściej stosowanym adsorbentem w chromatografii cienkowarstwowej, jest tlenek glinu, powszechnie zwany Alumina. Ten rodzaj adsorbentu dostępny jest w trzech rodzajach tj. kwaśny, obojętny i zasadowy zależnie od sposobu produkcji. Kwasowość, bądź zasadowość określa pH 10 % zawiesiny wodnej.

Tlenek glinu do chromatografii cienkowarstwowej ma średnicę porów 4-5 nm, a powierzchnię właściwą 100-250 m²/g. Warstwy tego adsorbentu z powodzeniem stosuje się do rozdzielania terpenów, fenoli, kwasów organicznych, steroidów i innych związków.

Innymi rzadziej stosowanymi adsorbentami to ziemia okrzemkowa często zwana Kieselguhem albo ziemią diamasceńską. Jest to amorficzna skamielina kwasu krzemowego. Ten adsorbent najczęściej jest stosowany jako nośnik fazy stacjonarnej w układach podziałowych. Osadzając na powierzchni skwalan, parafinę, olej silikonowy, bądź inne związki chemiczne, uzyskuje się fazy przydatne do rozdzielania w układzie ciecz-ciecz.

Inne związki krzemu stosowane jako fazy stacjonarne to krzemian magnezu popularnie zwany Florisilem. Na tym adsorbencie można rozdzielać między innymi cukry, jednak główne jego zastosowanie, to wstępne oczyszczanie próbek środowiskowych.

Z nieorganicznych adsorbentów stosowanych w chromatografii cienkowarstwowej można wymienić szkło sproszkowane, krzemian wapnia, hydroksyapatyt, siarczan wapnia, tlenek cyrkonu, tlenek tytanu a nawet tlenek żelaza. Również, jako fazy stacjonarne w chromatografii cienkowarstwowej, stosowane od wielu lat są substancje organiczne. Najbardziej popularne są warstwy z naturalnej, włóknistej, krystalicznej lub acetylowanej celulozy. Właściwości chromatograficzne poszczególnych rodzajów celulozy zależą od wielkości ziaren (długości włókien), powierzchni właściwej, stopnia polikondensacji oraz zdolności do pęcznienia. Celuloza służy głównie do rozdzielania biopolimerów oraz substancji bardzo polarnych - hydrofilowych. Najczęściej, na warstwach celulozowych rozdziela się węglowodany, kwasy karboksylowe,

pochodne kwasów nukleinowych, fosforany i inne. Celuloza odpowiednio modyfikowana może również mieć własności jonowymienne. Również, jako warstwy chromatograficzne, stosuje się skrobię, cukier, manitol oraz żele dekstranowe. Te ostatnie powszechnie są znane pod nazwą Sephadexy. Warstwy chromatograficzne z dekstranów stosowane są do rozdzielania związków hydrofilowych, różniących się masą molową a więc wykorzystuje się efekt sita molekularnego.

Fazą stacjonarną w chromatografii cienkowarstwowej może być też poliamid. Jest to syntetyczny materiał zawierający grupy amidowe. Handlowo dostępne są płytki typu Perlon lub Nylon. Najczęściej warstwy z poliamidu stosuje się do rozdzielania związków fenolowych.

W celu utrzymania warstwy sorbentu na szklanej płytce lub folii do materiału, z którego formuje się warstwy chromatograficzne dodaje się środka wiążącego. Najczęściej jest to gips, dodatek czynnika wiążącego wynosi około 15 %, a płytki oznacza się literą G.

Zaletą chromatografii cienkowarstwowej jest możliwość modyfikowania warstw impregnując je różnymi substancjami chemicznymi. W zależności od użytego czynnika impregnującego uzyskuje się warstwy hydrofilowe lub hydrofobowe. Hydrofilowe warstwy uzyskuje się stosując dimetyloformamid, dimetylosulfoamid bądź dimetylosulfotlenek natomiast warstwy hydrofobowe uzyskuje się impregnując je takimi substancjami jak olej parafinowy, skwalan, undekan, olej silikonowy i inne.

Przygotowanie takich warstw polega na zanurzeniu ich w roztworze lub substancji impregnującej a następnie pozostawieniu do wyschnięcia lub odparowania rozpuszczalnika. W przypadku stosowania warstw impregnowanych należy zwrócić uwagę na dobór fazy ruchomej, żeby nie uszkodzić impregnatu w wyniku rozpuszczania się czynnika impregnującego (fazy osadzonej) w fazie ruchomej.

Selektywność, np. żelu krzemionkowego, można również zmieniać impregnując warstwę jonami metalu np. srebra, kobaltu, miedzi bądź innymi metalami. Chromatografię cienkowarstwową na warstwach impregnowanych roztworem azotanu srebra nazywa się argentochromatografią. Warstwy te służą do rozdzielania nasyconych i nienasyconych związków w wyniku selektywnego wiązania jonów srebra z π -elektronami podwójnych wiązań. Jest wiele innych przykładów opisujących stosowanie różnych odczynników impregnujących opisanych w literaturze chromatograficznej.

Ogromnym postępowaniem w możliwościach rozdzielczych chromatografii cienkowarstwowej było wprowadzenie wiązanych faz stacjonarnych i wprowadzenie układu faz odwróconych.

Praktycznie obecnie stosuje się ten sam rodzaj faz wiązanych jak w układach kolumnowych, a więc, typowe fazy wiązane niepolarne tj. C-2, C-8, C-18 oraz polarne np. -aminowe, -cyjanowe, -fenyłowe i inne.

W początkowym okresie wprowadzenia wiązanych faz niepolarnych było możliwe ich stosowanie, gdy faza ruchoma zawierała około 30 % wody i mniej. Przy takim składzie eluentu hydrofobowe siły odpychania cząsteczek przewyższały siły kapilarne z powodu nie zwilżalności warstwy. Tego ograniczenia nie ma, gdy stosuje się chromatografię z wymuszonym przepływem fazy ruchomej. Wówczas może być dowolna zawartość w niej wody w eluencie.

W ostatnich latach problem zwilżalności został rozwiązany przez wprowadzenie warstw wykonanych z ziaren o wielkości 10-14 μm i o małym stopniu pokrycia powierzchni fazą wiążaną. Takie fazy są całkowicie zwilżalne i mogą być stosowane w układach normalnych, i odwróconych.

Bardzo często do rozdzielania anionów są stosowane warstwy z grupami aminopropylowymi, które mają właściwości słabych wymienniczy jonowych. Są też warstwy z chemicznie związaną fazą impregnowaną octanem miedzi i proliną do rozdzielania niektórych enancjomerów.

Zarówno w sprzedawanych wypełnieniach, z których użytkownik przygotowuje sobie warstwy chromatograficzne we własnym laboratorium, jak również w gotowych komercyjnych płytkach znajduje się dodatek czynnika fluoryzującego w świetle UV, jest to najczęściej fluoresceina, natomiast w opisie produktu jest podana wartość liczbowo 254 i 360 tzn. że przy takiej długości fali substancja będzie widoczna podczas detekcji za pomocą lampy UV.

12.4. PRZEBIEG PROCESU CHROMATOGRAFICZNEGO

Rozdzielanie mieszaniny metodą chromatografii cienkowarstwowej można przedstawić według następującego schematu:

- A - przygotowanie próbki, nanoszenie mieszaniny na warstwę chromatograficzną
- B - dobór faz (układu chromatograficznego),
- C - rozwijanie chromatogramu
- D - detekcja substancji na warstwie,
- E - ilościowa i jakościowa interpretacja chromatogramu.

Ad. A - metody przygotowania próbki do analizy są takie same jak w przypadku chromatografii cieczowej lub gazowej, ponieważ warstwa jest stosowana jednorazowo (w większości przypadków) może być rozdzielana próbka bez wstępnego oczyszczenia, jedynie wymagane jest jej rozpuszczenie przed naniesieniem na warstwę. Najlepiej jest rozpuścić próbkę w rozpuszczalniku, który będzie fazą ruchomą, możliwe jest również stosowanie innych rozpuszczalników pod warunkiem, że nastąpi całkowite rozpuszczenie próbki, oraz zwilżenie warstwy sorbentu na powierzchni nanoszenia.

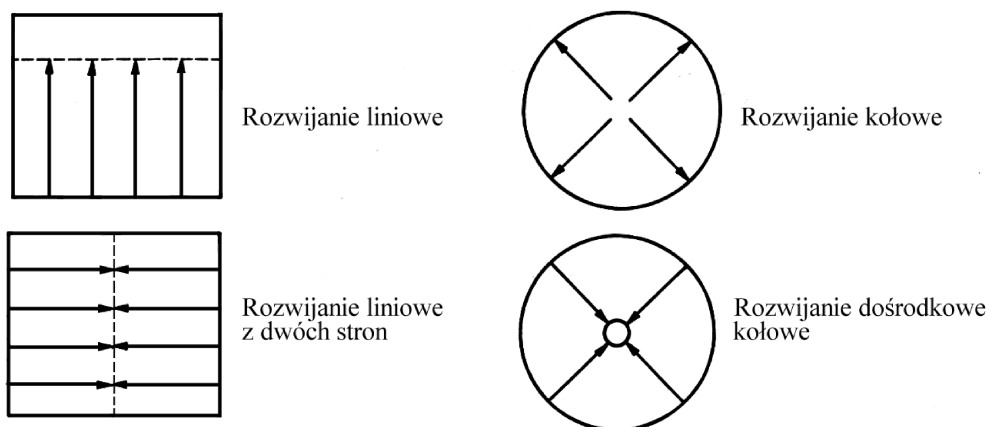
Aby zapewnić penetrację substancji w głąb warstwy ważne jest nienaruszenie struktury warstwy sorbentu na płytce. Nie spełnienie tych wymagań może spowodować nieregularne kształty pasm substancji rozdzielanych.

Doświadczenie pokazuje, że etap nanoszenia próbki istotnie wpływa na jakość rozdzielania oraz precyzję i dokładność wyników oznaczeń ilościowych. Próbkę nanosi się na warstwę sorbentu zazwyczaj w postaci plamki lub pasemka. Wielkość średnicy plamki 1mm uważana jest za optymalną. Dalsze jej zmniejszenie nie prowadzi już do wyraźnego polepszenia rozdzielczości i obniżenia granicy oznaczalności. Plamka powinna być w kształcie koła i jest korzystne by rozmieszczenie jej było jednolite na powierzchni jak i w głębi warstwy. Objętość nanoszonej próbki waha się w granicach 1 μ l, a masa próbki około 1-5 ng. W przypadku stosowania chromatografii cienkowarstwowej na skalę preparatywną objętość i masa nanoszonej próbki są wielokrotnie większe. Próbkę nanosi się zazwyczaj za pomocą urządzeń dozujących popularnie zwanych aplikatorami bądź za pomocą mikrostrzykawkę, rozpylaczy specjalnej konstrukcji. Automatyczny dozownik pozwala nanosić próbki na warstwę w sposób powtarzalny i nie naruszając struktury warstwy. W gorzej wyposażonych laboratoriach do nanoszenia używa się kapilary bądź mikropipety.

Opis różnych urządzeń do nanoszenia czytelnik może znaleźć w materiałach firm CAMAG lub DESAGA, są to wysoko wyspecjalizowane firmy w zakresie oprzyrządowania i instrumentalizacji chromatografii cienkowarstwowej.

Ad. B - doboru faz (układu chromatograficznego) dokonuje się podobnie jak w przypadku układów kolumnowych korzystając ze znajomości procesu chromatograficznego. W praktyce często korzysta się z danych literaturowych, ale również dobiera się skład fazy ruchomej metodą prób i błędów. Takie postępowanie wynika z faktu, że odtworzenie układu chromatograficznego jest dość trudne. Jest to spowodowane właściwościami chromatograficznych sorbentów produkowanych przez różnych producentów. Niewielkie zmiany w zawartości wody w rozpuszczalnikach oraz zewnętrzne warunki (wilgotność otoczenia) powodują zmianę parametrów retencji. Wyniki rozdzielania metodą chromatografii cienkowarstwowej są zależne od wielu parametrów które trudno je standaryzować.]

Ad. C - jak przedstawiono na rysunku 12.1 proces chromatograficzny w TLC jest procesem, w którym faza ruchoma przemieszcza się wzdłuż warstwy sorbentu i przenosi składniki próbki na różną odległość, powodując ich rozdzielanie. W odróżnieniu od technik z zamkniętymi złożami (np. HPLC), w tej technice faza ruchoma może przemieszczać się w więcej niż jednym kierunku dzięki temu można stosować się trzy sposoby rozwijania chromatogramów tj. lin-



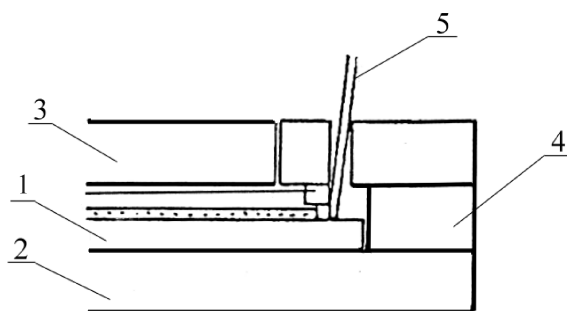
Rys. 12.5. Sposoby rozwijania chromatogramów cienkowarstwowych.

iowy, krążkowy (kołowy) i krążkowy dośrodkowy. W/w sposoby przedstawiono na rysunku 12.5.

Najbardziej powszechnym sposobem rozwijania jest sposób liniowy, który w najprostszej postaci wymaga tylko kontaktu jednego końca płytki (warstwy chromatograficznej) z rozpuszczalnikiem.

Płytkę chromatograficzną ustawia się w pozycji pionowej bądź pod kątem w kilku mililitrach rozpuszczalnika w odpowiednim pojemniku zwanym komorą chromatograficzną (patrz rys. 12.1). Odległość przebytą przez rozpuszczalnik ograniczają siły grawitacji, siłą napędową ruchu rozpuszczalnika są siły kapilarne. Lepsze warunki rozwijania zapewnia poziomy układ płytki, gdyż transport rozpuszczalnika nie jest ograniczony siłą grawitacji. Faza ruchoma do warstwy może być również dostarczana z dwóch stron (patrz rys.12.5) albo od środka (w OPTLC), uzyskując dwa chromatogramy. Rozwijanie chromatogramu w komorach poziomych zbliża warunki chromatograficzne w układach cienkowarstwowych do warunków panujących w kolumnie chromatograficznej, unika się w ten sposób niekorzystnych zjawisk jak zmiany składu fazy ruchomej na skutek parowania i adsorpcji tych par na powierzchni warstwy oraz obniża się nieco demiksję fazy ruchomej. Wymienione powyżej niekorzystne zjawiska zostały znacznie ograniczone a nawet wyeliminowane przez wprowadzenie odpowiednich komór chromatograficznych. Najbardziej znane na rynku polskim są komory typu *sandwich* skonstruowane przez Soczewińskiego. Na rysunku 12.6 przedstawiono schemat takiej komory.

W przypadku rozwijania metodą krążkową do warstwy doprowadza się fazę ruchomą za pomocą knota lub kapilary na środek krążka, co umożliwi radialne rozwijanie chromatogramu.



Rys. 12.6. Schemat komory Soczewińskiego:

1- warstwa chromatograficzna, 2- dolna płytko komory, 3- górna płytko komory, 4- płytko dystansowa, 5- kapilara dostarczająca fazę ruchomą i miejsce nanoszenia mieszaniny rozdzielanej.

Ten sposób rozwijania poprawia rozdzielczość składników, których wartość współczynnika R_F jest mała i jest szybszy niż liniowy. Mimo zalet rozwijania chromatogramu metodą krążkową ciągle dominującym sposobem rozwijania jest metoda liniowa nie wymagająca stosowania skomplikowanej aparatury, a jednocześnie zapewnia dobrą rozdzielczość i powtarzalność wymaganą dla większości oznaczeń ilościowych.

Liniowy sposób rozwijania może być wstępujący, gdy faza ruchoma wznosi się wzdłuż warstwy chromatograficznej od krawędzi zanurzenia płytki do góry bądź sposób rozwijania zstępujący - faza ruchoma jest dostarczana do warstwy ze zbiornika umieszczonego nad warstwą chromatograficzną. Ten drugi sposób rozwijania jest bardziej skomplikowany wymaga specjalnej konstrukcji zbiorników, z którego powinien być równomiernie doprowadzany rozpuszczalnik.

Ograniczenia TLC wynikające z przesuwania się rozpuszczalnika wzdłuż warstwy pod wpływem sił kapilarnych można wyeliminować przez stosowanie wymuszonego przepływu rozpuszczalnika. Najczęstszym rozwiązaniem tego typu jest cienkowarstwowa chromatografia ciśnieniowa (OPTLC), zwana również ciśnieniową chromatografią warstwową (OPLC),

Przepływ rozpuszczalnika jest wymuszony przez zastosowanie pompy, a próbki nanosi się zwykle na warstwę sorbentu przed umieszczeniem płytki w komorze. Warunki rozwijania tym sposobem są znacznie zbliżone do warunków panujących w kolumnie chromatograficznej. Jest szereg rozwiązań technicznych, które pozwalają prowadzić rozwijanie z wymuszonym przepływem fazy ruchomej np. rotacyjna chromatografia planarna, wysokociśnieniowa chromatografia planarna czy tzw. próżniowa chromatografia planarna.

Należy jednak podkreślić, że dominującym sposobem rozwijania jest rozwijanie liniowe jednokierunkowe lub dwukierunkowe i rozwijanie pojedyncze lub wielokrotne.

Rozwijanie jednokierunkowe opisano poprzednio - faza ruchoma przesuwana się w jednym kierunku zaś rozwijanie dwukierunkowe polega na tym, że po pierwszym rozwinięciu płytkę suszy się (usuwa się rozpuszczalnik z warstwy) i następnie zanurza w tym samym rozpuszczalniku lub innym, ale obróconą o 90 stopni. Przy wielokrotnym rozwinięciu płytkę po każdej analizie suszy się i ponownie rozwija stosując taką samą fazę ruchomą lub inną. Efektem tego sposobu rozwijania jest zwężenie pasma stężeniowego substancji i związane z tym zwiększenie sprawności układu jak również zwiększenie czułości metody. Zautomatyzowaną wersją rozwijania wielokrotnego jest tzw. programowane wielokrotne rozwijanie (Programmed Multiple Development, PMD). W tym przypadku całkowite rozwinięcie chromatogramu składa się z 20-25 cykli: wszystkie są w tym samym kierunku, ale przy coraz dłuższych drogach migracji (wzrost 1-5 mm), a w kolejnych cyklach stosuje się fazę ruchomą o coraz mniejszej sile elucyjnej. Zadaniem pierwszego cyklu jest zawężenie pasma i dlatego dobiera się rozpuszczalnik zapewniający małą retencję wszystkich składników próbki. W późniejszych cyklach kolejne składniki zostają unieruchomione (mała siła elucji) i zajmują ustalone pozycje na płytce. Szerokość plamek lub pasm wszystkich składników są prawie jednakowe, co jest poważną zaletą w przypadku oznaczeń ilościowych z zastosowaniem densytometru.

Uzyskanie powtarzalności współczynników R_F umożliwia osiągnięcie stanu równowagi między fazą ruchomą parami rozpuszczalnika i powierzchnią warstwy (patrz rys.12.1). Takie możliwości daje stosowanie odpowiednich komór.

Najszybciej osiąga się stany równowagi w komorach typu *sandwicz*, tj takich gdzie przestrzeń między warstwą chromatograficzną a pokrywą komory ma objętość kilku mililitrów. W laboratoriach jednak najczęściej stosuje się rozwijanie w prostych komorach chromatograficznych tzw. normalnych (*N-chamber*). W celu uzyskania stanu równowagi przed wstawieniem płytki do komory, ściany komory wyklada się bibułą zanurzoną w rozpuszczalniku, który będzie fazą ruchomą. Stosując takie postępowanie należy pamiętać o umieszczeniu jednakowej objętości cieczy w komorze, aby zapewnić powtarzalną głębokość zanurzenia warstwy chromatograficznej oraz o stosowaniu jednakowego czasu nasycania atmosfery komory parami rozpuszczalnika oraz jednakowego czasu dodatkowej adsorpcji par na powierzchni warstwy (niekiedy dodatkowo stosowane jest dodatkowe kondycjonowanie płytki zawieszanej nad lu-

strem rozpuszczalnika). Spełnienie tych warunków zapewnia powtarzalność współczynników R_F , zatem umożliwia jakościową interpretację chromatogramu. Czas rozwijania chromatogramu (zakładając taką samą drogę rozwijania) w komorach nasyconych jest znacznie dłuższy niż w komorach nienasyconych, gdyż znacznie ograniczone jest odparowywanie rozpuszczalnika z warstwy, stąd mniejsza siła wymuszająca jego ruch.

Jest wiele rozwiązań konstrukcyjnych komór chromatograficznych. Niektóre z nich są sprzedawane przez firmy produkujące oprzyrządowanie do chromatografii cienkowarstwowej najczęściej DESAGA i CAMAG, ale również w laboratoriach stosuje się własne rozwiązania, bo jak poprzednio zaznaczono zaletą chromatografii cienkowarstwowej jest jej prostota i możliwość stosowania w warunkach "domowych" i umiejętności interpretacji uzyskanych wyników.

Ad.D - sposób detekcji może znacznie ułatwić ilościową interpretację chromatogramu, który powinien być oceniany tylko wtedy gdy oznaczany składnik jest całkowicie oddzielony od innych substancji na chromatogramie. Aby uzyskać informacje o rozdzielonych substancjach najpierw należy je umiejscowić na warstwie chromatograficznej. Detekcję (czyli miejsce substancji na warstwie chromatograficznej) można wykonać za pomocą metod fizycznych, chemicznych albo biologiczno-fizjologicznych.

Metody fizyczne to fotometria absorbcyjna, fluorescencja, fosforescencja a w przypadku substancji znakowanych izotopami promieniotwórczymi, metody radiometryczne.

W/w metody należą do metod niedestrukcyjnych i są szczególnie przydatne, gdy stosuje się chromatografię cienkowarstwową dla celów preparatywnych.

Najbardziej popularny sposób detekcji to stosowanie lampy emitującej promieniowanie UV. Większość związków organicznych wykazuje absorpcję promieniowania UV i mogą być widoczne na płytce dzięki własnej fluorescencji, albo dzięki wzbudzeniu dodatkowej fluorescencji po impregnowaniu warstwy odpowiednim "wywoływaczem". Wówczas na płytce obserwuje się charakterystyczne zabarwienie (świecenie plamki). W celu lepszego uwidocznienia plam substancji stosuje się warstw chromatograficzne zawierające fluoreseinę, wtedy na tle warstwy o jasnej fluorescencji obserwuje się ciemniejsze plamy substancji absorbujących promieniowanie UV, a nie wykazujących własnej fluorescencji.

Detekcja chemiczna polega na przeprowadzeniu rozdzielanych substancji w substancje barwne za pomocą reagentów chemicznych, które reagują z wybranymi grupami funkcyjnymi. Najczęściej sposób postępowania jest następujący: po rozwinięciu chromatogramu warstwę chromatograficzną suszy się w suszarce lub w strumieniu ciepłego powietrza a następnie rozpyla się za pomocą specjalnego urządzenia (rozpylacza) roztwór substancji wywołującej. Powstają wówczas związki barwne, charakterystyczne dla danej grupy substancji rozdzielanych. Można też zanurzać płytkę na kilka sekund w odpowiednim roztworze lub pozostawić w parach danego wywoływacza, parach jodu. Zestawy reagentów dla wielu klas związków są dokładnie opisane w literaturze fachowej (jest podawanych około 250 wywoływaczy). Dla wygody użytkownika byłoby posiadanie uniwersalnego wywoływacza dla wszystkich rozdzielanych związków. Takim uniwersalnym wywoływaczem są pary stężonego kwasu siarkowego. Proces wywoływania polega na spalaniu substancji organicznych i pojawianiu się ciemnych plam na warstwie chromatograficznej. Wadą tego sposobu detekcji jest mała czułość i szkodliwość dla zdrowia.

Detekcja biologiczno-fizjologiczna wykorzystuje aktywność biologiczną rozdzielanych substancji, gdy są one specyficzne. Nieaktywne biologicznie substancje w ogóle nie interferują, dzięki czemu wstępne oczyszczenie próbki można często zupełnie pominąć. Granice oznaczalności są porównywalne z granicami uzyskiwanymi metodami klasycznymi. Metody te służą głównie do oznaczania antybiotyków, alkaloidów, insektycydów, fungicydów i innych.

Ad. E - Ocena ilościowa chromatogramu jest możliwa dzięki wprowadzeniu niezwykle kosztownej aparatury. Wcześniejsze metody oznaczania ilościowego były metodami półilościowymi. Polegają one na wizualnym porównywaniu wielkości plamki lub intensywności zabarwienia substancji rozdzielanych (analit) z wielkością plamek o znanym stężeniu i na tej podsta-

wie wykreśla się zależność powierzchni plamki w zależności od stężenia ($P = f(c)$) oczywiście jest to metoda subiektywna obarczona błędem nawet dochodzącym do 30 %.

Innym sposobem oceny ilościowej było wycinanie sorbentu z obecną na nim substancją i wyekstrahowanie substancji i następnie stosowano (najczęściej) oznaczanie zawartości analitu metodą spektrofotometryczną bądź innymi metodami instrumentalnymi. Metody te były stosowane przez wiele lat, ale są to metody bardzo pracochłonne, nieprecyzyjne i mało czułe.

Obecnie pomiary ilościowe przeprowadza się z zastosowaniem densytometrów skaningowych rejestrujących w sposób ilościowy zależność absorbancji lub fluorescencji zazwyczaj w zakresie promieniowania widzialnego lub UV. Za pomocą densytometrów mierzy się natężenie monochromatycznego światła przepuszczanego przez płytkę, odbitego od niej lub emitowanego przez wzbudzone anality (plamy składników rozdzielanej mieszaniny). Gdy stosuje się płytki zawierające sorbent z dodatkiem wskaźnika fluorescencyjnego, w miejscu analitu na płytce obserwuje się ciemną plamę. Zmniejszenie się fluorescencji w tym miejscu jest proporcjonalne do zawartości tego analitu. Ze względu na typ ośrodka, jakim jest warstwa chromatograficzna, na której następuje rozproszenie światła, prawo Beera nie jest spełniane. Zależność absorbancji od zawartości analitu jest opisana przez prawo Kubelki-Munka, w którym uwzględniono rozpraszania i przepuszczalność promieniowania w nieprzezroczystym ośrodku (warstwie chromatograficznej).

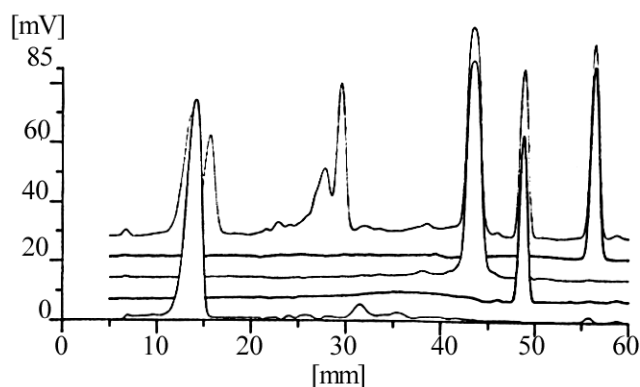
Granica oznaczalności w przypadku densytometrii skaningowej są porównywalne z uzyskiwanymi w HPLC (nanogramy substancji w przypadku stosowania detektorów UV-VIS i pikogramy substancji dla detekcji fluorescencyjnej).

W nowoczesnych aparatach przemiatanie, kalibracja i rejestracja chromatogramów odbywają się automatycznie pod kontrolą komputera. Dzięki temu uzyskuje się precyzję, mierzoną wartością względnego odchylenia standardowego, nawet 0,5-3,0%, ale dla stężeń znacznie powyżej granicy oznaczalności.

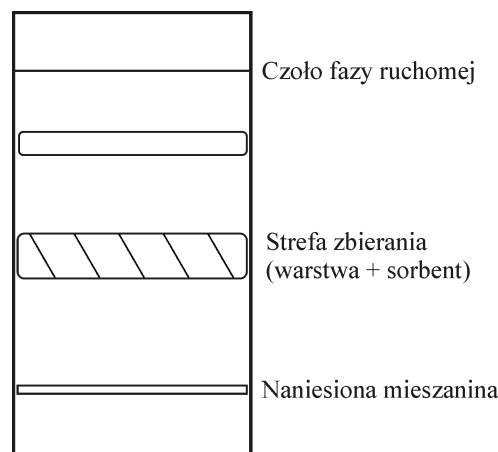
Na rysunku 12.7 przedstawiono przykłady chromatogramów uzyskanych dzięki zastosowaniu densytometru.

Preparatywna chromatografia cienkowarstwowa (PTLC) jest stosowana w celu izolacji znacznie większych ilości substancji, które następnie mogłyby być stosowane dla celów preparatywnych. Jest to możliwe gdyż stosuje się płytki o znacznie większych wymiarach niż analityczne. Najczęściej stosowane są płytki wymiarach 20x20 cm a grubość warstwy 1,0-2,0 mm.

Postępowanie w przypadku stosowania preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej jest podobne jak w przypadku stosowania konwencjonalnej czy wysokosprawnej warstwy. Na warstwę chromatograficzną nakłada się rozdzielaną mieszaninę substancji w formie paska lub plamek obok siebie, a objętość nakładanej mieszaniny może nawet dochodzić do 500 μ l. Wielkość (objętość) nanoszonej próbki zależy od trudności rozdzielczych w danym układzie



Rys. 12.7. Chromatogram cienkowarstwowy zarejestrowany za pomocą densytometru.



Rys. 12.8. Obraz chromatogramu preparatywnego z zaznaczoną strefą zbierania fazy stacjonarnej z izolowaną substancją z mieszaniny.

chromatograficznym. Po rozwinięciu chromatogramu przeprowadza się detekcję, oczywiście musi być wykorzystany sposób detekcji niedestrukcyjny a więc najczęściej stosuje się lampę UV. Plamy bądź pasm izolowanej substancji wraz z warstwą fazy stacjonarnej wydrapuje się i następnie ekstrahuje się odpowiednim rozpuszczalnikiem, pamiętając o zasadzie, żeby rozpuszczalnik miał wyższą siłę elucyjną niż stosowana faza ruchoma i dobrze rozpuszczał ekstrahowaną substancję nie reagując z nią chemicznie. Na rysunku 12.8 przedstawiono chromatogram uzyskany po rozdzielaniu mieszaniny na skalę preparatywną.

W zależności od celu stosowania warstwy preparatywnej wyekstrahowane substancje są badane innymi metodami instrumentalnymi. W wielu przypadkach jedynie preparatywna chromatografia cienkowarstwowa pozwala uzyskać taką masę substancji, dzięki której można prowadzić inne badania identyfikacyjne bądź ilościowe. Ten sposób postępowania preparatywnego jest szczególnie często stosowany do rozdzielania ekstraktów roślinnych zawierających bardzo dużo składników i trudnych do rozdzielania innymi metodami, a szczególnie takimi, które nie byłyby destrukcyjne.

Innym typem warstw stosowanych do rozdzielania i jednocześnie wstępnego oczyszczenia mieszaniny rozdzielanej są warstwy z tzw. strefą wzbogacającą (zateżającą). Płytki ze strefą zateżającą są przygotowywane z dwóch warstw żelu krzemionkowego posiadającego różne właściwości. Warstwy są nałożone jedna na drugiej na kilku cm (2-3) od dolnej krawędzi płytki tworząc bardzo wąski interface. Warstwa rozdzielająca jest na całej powierzchni płytki i jest preparowana z żelu, jaki stosuje się do HPTLC natomiast, warstwa zateżająca jest wykonana z żelu o dużych porach i maksymalnie małej powierzchni właściwej.

Strefa wzbogacania upraszcza proces nakładania, gdy chcemy, aby na warstwie właściwej (rozdzielającej) objętość наносzona próbki była znikoma.

Jest to szczególnie przydatne w laboratoriach, gdzie nie ma urządzenia (automatycznego aplikatora) pozwalającego na dozowanie bardzo małych objętości próbki.

Warstwy ze strefą wzbogacania są osiągalne na rynku i są one najbardziej użyteczne, gdy stosowane są duże próbki oraz gdy rozdzielane substancje są rozpuszczalne w wodzie. Mimo tych zalet w większości laboratoriów preferuje się stosowanie konwencjonalnych warstw chromatograficznych.

12.5. ZALETY CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

Chromatografia cienkowarstwowa jest metodą komplementarną w stosunku do wysokosprawnej chromatografii kolumnowej. Zważywszy na możliwość instrumentalizacji i pełnej komputeryzacji, można za jej pomocą rozwiązać wiele problemów analitycznych.

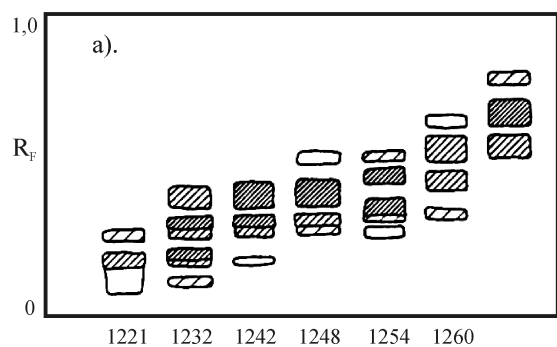
Podstawowe jej zalety to:

- stosowanie do wstępnego doboru faz dla układów kolumnowych gdyż zużycie rozpuszczalników w porównaniu z chromatografią kolumnową jest znacznie mniejsze,
- na warstwie chromatograficznej można równocześnie rozdzielać kilka różnych próbek,
- proces rozdzielania może być w każdej chwili zatrzymany,
- rozdzielane próbki nie muszą być wstępnie oczyszczane,
- na podstawie wstępnych rozdzielń na cienkiej warstwie można stwierdzić bądź nie, obecność danego składnika i dopiero na tej podstawie stosować inne bardzo kosztowne metody np. wysokosprawną chromatografię kolumnową czy gazową. Stwierdzono, że obniża to koszty analizy około 30 %. Gdy nie stwierdzi się obecności analitu nie stosuje się innych metod badań.
- metoda jest mało pracochłonna w porównaniu z innymi metodami analitycznym,
- istnieje możliwość rozwiązywania nawet skomplikowanych problemów analitycznych bez stosowania bardzo skomplikowanej aparatury.

12.6. ZASTOSOWANIE WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

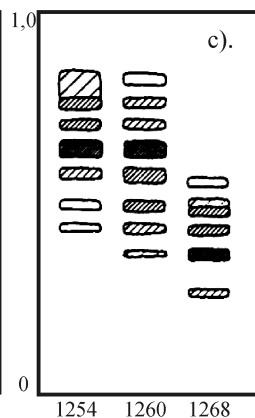
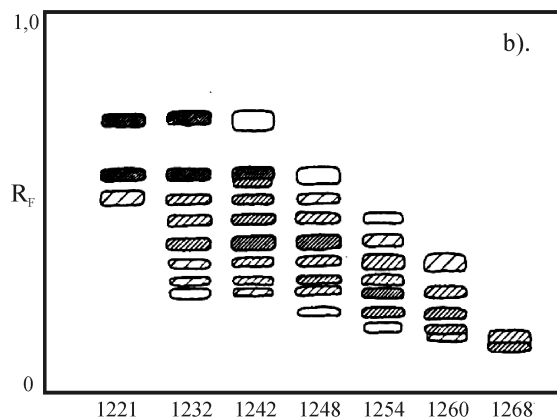
Jest wielce skomplikowane wskazać dziedziny analityki gdzie nie byłaby stosowana ta metoda rozdzielcza. Jest wiele opracowań monograficznych i artykułów gdzie opisano szczegółowo zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej z podanym rodzajem stosowanych faz, rodzaju detekcji i uzyskanych wyników.

Użytkownik chromatografii cienkowarstwowej może skorzystać z tych wyników we własnym laboratorium, pamiętając o parametrach, jakie mają wpływ na wyniki rozdzielania, a więc: producent faz, szarża produkcyjna, temperatura, stopień nasycenia komory, wilgotność otoczenia itp.

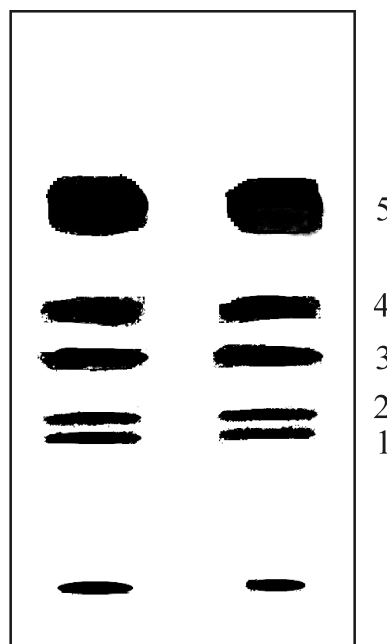


Rys 12.9. Chromatogram polichlorowanych bifenyli (PCBs), Aroclor 1221-1268

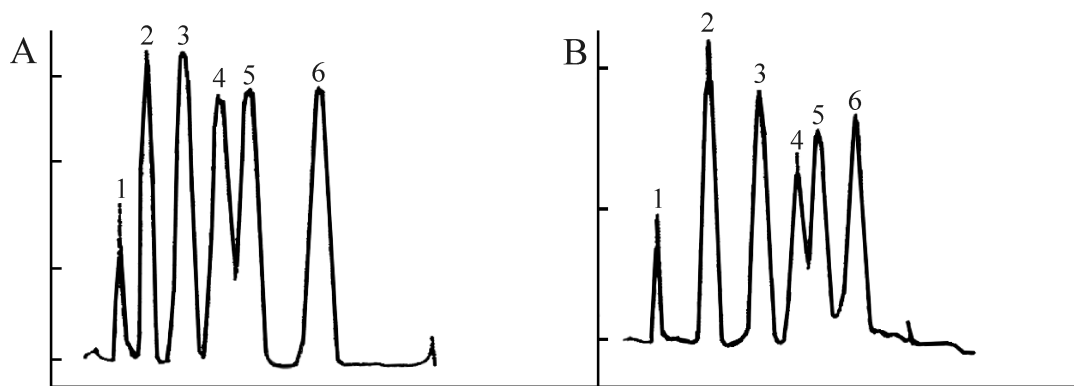
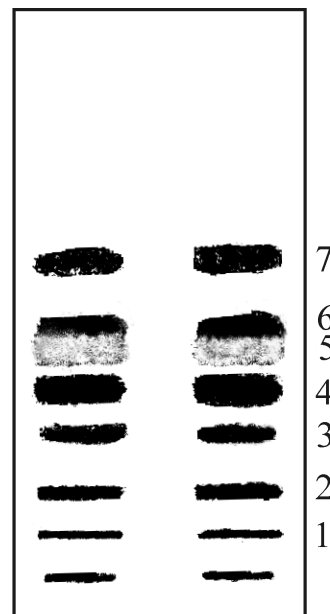
- a - warstwa żelu krzemionkowego, faza ruchoma - heksan.
- b - warstwa Kieselghur impregnowany olejem parafinowym, faza ruchoma: acetonitryl + metanol + aceton + woda 2:2:9:1 v/v. Detekcja: lampa UV - 254 nm.



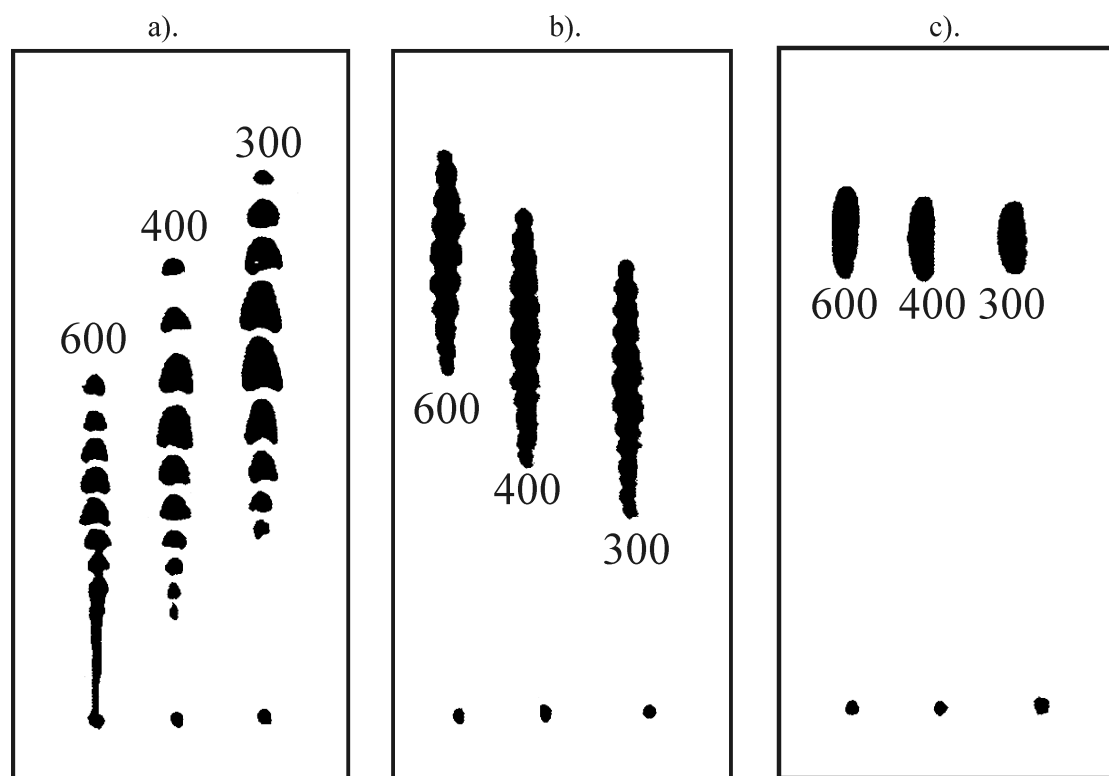
Rys 12.10. Chromatogram sterydów.
 Warstwa: żel krzemionkowy z dodatkiem fluoresceiny,
 faza ruchoma: metanol + chloroform 97:3 v/v,
 Substancje: 1- kortizon; 2- kortikosteron, 3- testosteron,
 4-deoxykortikosteron, 5- progesteron.
 Detekcja: lampa UV - 254 nm.



Rys. 12.11. Chromatogram barwników antrachinonowych.
 Warstwa : żel krzemionkowy z dodatkiem fluoresceiny,
 faza ruchoma: toluen + cykloheksan 2:1 v/v,
 Substancje: fiolet, 2- zieleń -niebieska, 3- błękit, 4- zieleń, 5- czer-
 wień, 6- fiolet 2, 7- żółcień 3.
 Detekcja: lampa UV - 254 nm.



Rys 12.12. Chromatogramy barwników antrachinonowych otrzymanych z zastosowaniem:
 A - płytek konwencjonalnych, B - płytek wysokosprawnych
 Warunki chromatograficzne i substancje jak na rys. 3.
 Detekcja: densytrometr, długość fali 254 nm.



Rys. 12.13. Chromatogram mieszaniny tlenków polietylenu o masie molowej $M=300,400$ i 600 .

a - warstwa: żel krzemionkowy, faza ruchoma: woda + pirydyna 10: 0,1 v/v,

b - warstwa: tlenek glinu, faza ruchoma: chloroform + etanol 10:1 v/v,

c - warstwa: żel krzemionkowy, faza ruchoma: chloroform + pirydyna 5:7 v/v.

Deteckja: chemiczna - stężony roztwór siarczanu molibdenu, płytki po spryskaniu ogrzewano w temp. 180°C .

13. PREPARATYWNA I PROCESOWA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA

Marian Kamiński

13.1. WPROWADZENIE

Chromatografia cieczowa to nie tylko niezastąpiona metoda analityczna o ogromnym zakresie zastosowań, ale jest to też metoda separacji służąca do otrzymywania użytkowych ilości czystych substancji ze złożonych mieszanin. Są takie problemy separacyjne, których rozwiązanie jest dotychczas możliwe tylko metodą chromatografii i jest ona, wówczas, niezastąpiona. Wiele innych problemów rozdzielczych można rozwiązać innymi metodami rozdzielania, jak ekstrakcja przeciwprądowa, metody strąceniowe, membranowe i inne oraz ich kombinacje. Często okazuje się, jednak, że chromatografia jest bardziej efektywną i tańszą od innych, metodą uzyskania użytkowych ilości substancji, szczególnie, gdy można zastosować warunki symulacji przemieszczania złoża (*Simulated Moving Bed*). Należy też na wstępie podkreślić, że proces rozdzielania prowadzony z wykorzystaniem chromatografii cieczowej w celu otrzymywania substancji w postaci czystej, jest tym bardziej efektywny, im wyższa jest selektywność zastosowanego układu rozdzielczego oraz im mniejsze zapewni się straty eluentu, tzn., im większy będzie stopień zawracania eluentu do procesu. Stąd, m.in., należy unikać stosowania warunków elucji gradientowej w przypadku stosowania chromatografii cieczowej do otrzymywania substancji w skali procesowej oraz należy zwrócić szczególną uwagę na eliminację strat eluentu.

13.2. GŁÓWNE OBSZARY ZASTOSOWAŃ CHROMATOGRAFII W SKALI PREPARATYWNEJ I PROCESOWEJ

Chromatografia służąca do otrzymywania czystych substancji ma dwie nazwy:

- chromatografia preparatywna, gdy ilości otrzymanych substancji są niewielkie, lub otrzymywane są one sporadycznie;
- chromatografia procesowa (produkcyjna), gdy proces prowadzony jest systematycznie, w sposób cykliczny lub ciągły, a ilość produktu jest znacznie większa (np. otrzymywanie produktu handlowego, składnika leku, enzymu i.t.p.).

Od początku stosowania chromatografii, technika ta była wykorzystywana dwukierunkowo: jako metoda analityczna i jako sposób na wydzielenie z mieszaniny substancji interesującego składnika (lub składników). Przez wiele lat, w okresie poprzedzającym automatyzację i mikroprocesory, analiza ilościowa z zastosowaniem chromatografii cieczowej, opierała się na zbieraniu kolejnych frakcji eluatu i ich analizie typowymi metodami analitycznymi, np. spektrofotometrycznymi. Analityk musiał użyć do dalszej analizy całą ilość rozdzielonej frakcji. Im lepsze uzyskał rozdzielenie, tym wynik był bardziej rzetelny.

Na tym etapie rozwoju chromatografii granica pomiędzy chromatografią, jako metodą analityczną, a metodą otrzymywania czystych substancji nie była wyraźna. Wprowadzenie detektorów przepływowych i rejestratorów, a później komputerów, wyraźnie rozdzieliło te dwa

obszary zastosowań chromatografii. W chromatografii analitycznej celem jest uzyskanie rozdzielania interesujących (ewentualnie wszystkich) substancji w jak najkrótszym czasie z $R_s = \text{ok. } 1$. Dąży się do zmniejszenia skali procesu przez zmniejszenie wymiarów kolumny, dbając równocześnie o jej wysoką sprawność. Ze względu na dobrą jakość detektorów ilość dozowanej mieszaniny jest bardzo mała i eluat traktowany jest jak zbędny ściek.

Dzisiaj chromatografia cieczowa jest uważana za szczególnie efektywną technikę separacyjną w zastosowaniach preparatywnych, tzn., do otrzymywania czystych substancji dla celów badawczych lub do mikrosyntez i jest w tym celu bardzo często wykorzystywana w różnych laboratoriach. Również w skali procesowej znajduje korzystne zastosowanie do długookresowego otrzymywania substancji, gdy chodzi o produkcję nisko-tonażową, rzędu do kilkudziesięciu kilogramów na dobę i gdy problem rozdzielczy należy do trudnych, lub bardzo trudnych (gdy selektywność względna niższa od 1.1). W nowoczesnym przemyśle farmaceutycznym można dzisiaj spotkać całe hale produkcyjne, gdzie znajdują się jedynie kolumny chromatograficzne i ich oprzyrządowanie oraz ewentualnie urządzenia do izolacji substancji w postaci krystalicznej z frakcji zebranego eluatu.

Najważniejsze dziedziny preparatywnych i procesowych zastosowań chromatografii to:

- izolacja produktów biotechnologii, szczególnie białek i enzymów, polisacharydów, fosfolipidów, określonych fragmentów DNA, lub RNA itp.;
- izolacja produktów naturalnych pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego,
- izolacja produktów syntezy leków (farmaceutyków, składników kosmetyków, dodatków do pasz itp.),
- izolacja lantanowców i transuranowców,
- izolacja użytkowych ilości substancji do badań i mikrosyntez w zakresie chemii organicznej, biochemii, mikrobiologii itp.,
- izolacja izomerów optycznych i
- izolacja polimerów o niskim stopniu polidispersyjności i inne.

13.3. TECHNIKI I MECHANIZMY CHROMATOGRAFII W ZASTOSOWANIACH PREPARATYWNYCH ORAZ ZASADY POWIĘKSZANIA SKALI ROZDZIELANIA

Techniki chromatograficzne stosowane w skali preparatywnej i procesowej to:

- Kolumnowa, elucyjna chromatografia cieczowa (PLC) - największe spektrum zastosowań,
- Kolumnowa, elucyjna chromatografia gazowa (PGC) - zastosowania głównie do izolacji substancji zapachowych i składników olejków eterycznych,
- Kolumnowa, elucyjna chromatografia z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym (PSFC) - potencjalnie najbardziej efektywna ekonomicznie domena zastosowań chromatografii preparatywnej, ale dla osiągnięcia tego potrzeba rozwiązać jeszcze wiele problemów technicznych i teoretycznych,
- Cienkowarstwowa chromatografia preparatywna (PTLC), przydatna do otrzymywania niewielkich ilości substancji, a więc nie mająca znaczenia procesowego. Wówczas, gdy podobna procedura postępowania zostanie wykonana z zastosowaniem kolumny wypełnionej aktywowanym sorbentem i wykorzystany zostanie wymuszony przepływ eluentu w dół kolumny, to wydajność może być już dość wysoka. Metoda bywa nazywana wtedy "Flush Chromatography".

W przypadku chromatografii cieczowej celów preparatywnych wykorzystywane są wszystkie poznane chromatograficzne mechanizmy rozdzielcze i wszystkie znane układy chromatograficzne. Wykorzystuje się chromatografię adsorpcyjną w układzie faz normalnych i

odwróconych, chromatografię jonowymienną, mechanizmy sita molekularnego i sączenia molekularnego, chromatografię powinowactwa, mechanizm oddziaływań hydrofobowych itd. Stosuje się przede wszystkim kolumnową chromatografię elucyjną, wykorzystując te same wypełnienia kolumn, jak w chromatografii analitycznej, lub o nieco większych ziarnach oraz możliwie jak najwyższy, możliwy do zastosowania stopień tzw. przeładowania kolumny, warunkujący jak najwyższą wydajność otrzymywania substancji. Na rys. 13.1. (2), zamieszczono przykłady chromatogramów, otrzymanych w warunkach braku przeładowania kolumny (w warunkach "analitycznych") oraz z zastosowaniem znacznego stopnia przeładowania stężeniowego, albo objętościowego kolumny w układach faz odwróconych albo normalnych. Warunki rozdzielania oraz masy substancji w roztworach dozowanych do kolumny podano na rysunku.

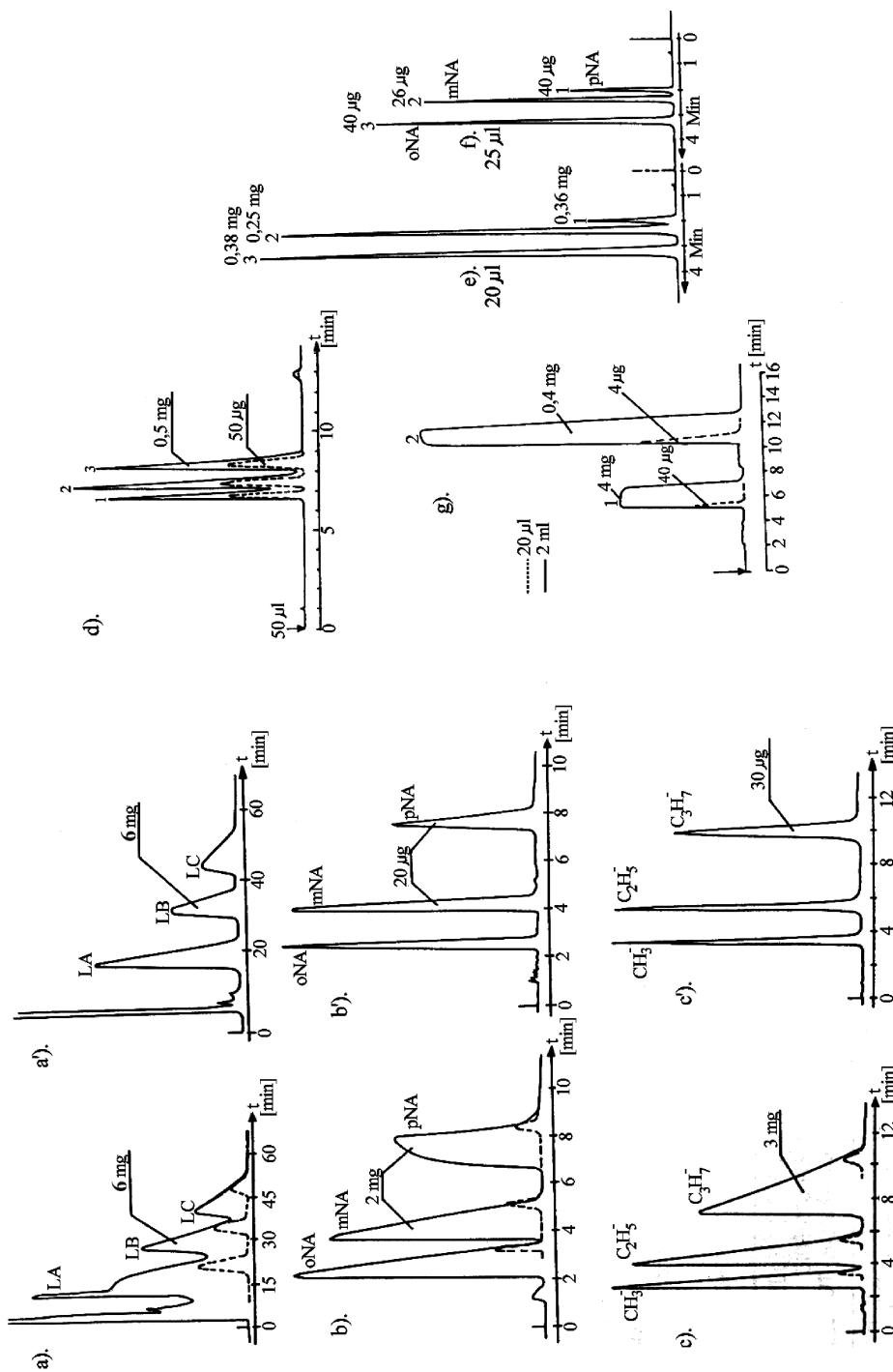
Warto dodać, że szczególne usługi w zastosowaniach preparatywnych, daje stosowanie warunków dynamicznie generowanej fazy stacjonarnej w układzie faz normalnych (np. żelu krzemionkowego jako sorbentu i mieszaniny chlorku metylenu i metanolu w różnych stosunkach, z zawartością wody o stężeniu bliskim nasycenia, np. do rozdzielania glikozydów, alkaloidów itp. substancji (przykład - chromatogramy na rys. 13.1 a i a').

Najczęściej, optymalne warunki rozdzielania (selektywność układu chromatograficznego i sprawność kolumny oraz możliwy do osiągnięcia stopień przeładowania kolumny, punkty zbierania frakcji) dobiera się najpierw w skali tzw. kolumny modelowej o małej średnicy (4-10 mm). Następnie dokonuje się powiększania skali rozdzielania, przechodząc do zastosowania kolumny o odpowiednio większej średnicy, nie zmieniając ani sorbentu i układu chromatograficznego ani długości kolumny, czy stężenia dozowanego roztworu i rozpuszczalnika do jego przygotowania. Oblicza się średnicę kolumny preparatywnej, konieczną do uzyskania potrzebnej wydajności rozdzielania, zakładając odpowiednie zwiększenie objętości dozowanej mieszaniny substancji rozdzielanych proporcjonalnie do stopnia zwiększenia pola przekroju poprzecznego wypełnienia kolumny. Opisaną zasadę postępowania w związku z doбором optymalnych warunków rozdzielania substancji w skali preparatywnej, albo procesowej naszkicowano schematycznie na rys.13.2.

Warto też zwrócić uwagę, że w prawie wszystkich w/w domenach zastosowań chromatografii, szczególnie, gdy trzeba rozdzielać tylko dwie substancje i gdy nie jest konieczne stosowanie elucji gradientowej, jest możliwe wykonywanie rozdzielania w warunkach procesu "pseudo-ciągłego" (SMB). Polega on na równoległej pracy ośmiu do kilkunastu kolumn, przy czym każda kolumna znajduje się w innej fazie elucji i w konsekwencji frakcje eluentu, zawierające poszczególne rozdzielane substancje, są zbierane praktycznie bez przerwy - w sposób ciągły. W takich warunkach chromatografia może być najbardziej opłacalna ekonomicznie ze wszystkich metod rozdzielania, możliwych potencjalnie do zastosowania.

13.4. ZJAWISKA PRZEŁADOWANIA KOLUMNY (POWIERZCHNI SORPCYJNEJ) I ICH EFEKTYWNE WYKORZYSTANIE W WARUNKACH CHROMATOGRAFII PREPARATYWNEJ I PROCESOWEJ

W warunkach preparatywnych, w odróżnieniu od warunków chromatografii analitycznej, dąży się do wykorzystania w maksymalnym stopniu tzw. przeładowania kolumny. Im wyższy udaje się osiągnąć stopień przeładowania, tym bardziej efektywny ekonomicznie jest proces rozdzielczy. Przy czym proces rozdzielania jest szczególnie efektywny, gdy można uzyskać warunki silnego przeładowania stężeniowego (możliwość rozdzielania jednorazowo do ok. $5 \cdot 10^{-2}$ g mieszaniny rozdzielanych substancji / g sorbentu typu żel krzemionkowy lub chemicznie modyfikowany żel krzemionkowy). Może to, jednak, mieć miejsce tylko wtedy, gdy rozpuszczalność rozdzielanych substancji w eluencie jest dostatecznie wysoka oraz gdy jednocześnie selektywność rozdzielania jest korzystna. Wówczas piki chromatograficzne są



Rys. 13.1. Zestawienie uzyskanych w praktyce, typowych chromatogramów, ilustrujących różne warunki preparatywnego lub procesowego otrzymywania substancji z zastosowaniem kolumnowej chromatografii cieczowej realizowanej w skali modelowej w warunkach braku przeładowania (analitycznych) oraz z przeładowaniem kolumny.

Przykłady a, a', b, b', c, c' dotyczą optymalnych warunków rozdzielania wybranych substancji, natomiast przykłady d - f dotyczą rozdzielania substancji w niekorzystnych układach chromatograficznych lub w warunkach znikomej rozpuszczalności substancji rozdzielanych w eluencie.

Opis szczegółowy na sąsiedniej stronie.

Opis do Rys. 1. na sąsiedniej stronie.

a, a' - rozdzielanie lanatozydów A (LA), B (LB), C (LC) z odpadu poprodukcyjnego powstałego podczas otrzymywania lanatozydu C metodą ekstrakcji p-prądowej. Przykład wykorzystywania chromatografii podziałowej z dynamicznie generowaną fazą stacjonarną do otrzymywania substancji.

a: ——— warunki przeładowania ($2 \cdot 10^{-3} \text{ g}_{\text{mix}}/\text{g}_{\text{sorb}}$);

----- warunki braku przeładowania ("analityczne");

a': warunki dolnej granicy przeładowania stężeniowego ($2 \cdot 10^{-3} \text{ g}_{\text{mix}}/\text{g}_{\text{sorb}}$);

Warunki chromatograficzne: kolumna 800x6mm i.d., Kieselgel SI 60 40-63 μm (Merck),

eluent: $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ 92:8:0,2 v/v, $w=5\text{ml}/\text{min}$,

detektor UV-254 (KABiD),

czułość - 1,28 AU/FS (oprócz ----- : 0,08 AU/FS).

b, b' - rozdzielanie "modelowej" mieszaniny o (oNA), m (mNA), p (pNA)-nitroaniliny w warunkach chromatografii adsorpcyjnej

b: ——— warunki przeładowania stężeniowego ($6 \cdot 10^{-3} \text{ g}_{\text{mix}}/\text{g}_{\text{sorb}}$),

----- warunki "analityczne" ($6 \cdot 10^{-3} \text{ g}_{\text{mix}}/\text{g}_{\text{sorb}}$),

b': warunki dolnej granicy przeładowania ($2 \cdot 10^{-3} \text{ g}_{\text{mix}}/\text{g}_{\text{sorb}}$);

Warunki chromatograficzne: kolumna 100x4mm i.d., Lichrosorb SI 60 5 μm ,

eluent: Heptan - dioksan 8:2 v/v, 1ml/min,

detektor UV 280nm (Knauer),

długość drogi optycznej 0,4 mm,

czułość b: ——— 2,56 AU/FS; ----- 0,08 AU/FS, b': 0,16 AU/FS.

c, c' - rozdzielanie modelowej mieszaniny estrów CH_3 -, C_2H_5 -, C_3H_7 - kwasu 4 - OH benzoowego w układzie faz odwróconych (RP18),

c: ——— warunki przeładowania stężeniowego ($10^{-2} \text{ g}_{\text{mix}}/\text{g}_{\text{sorb}}$),

----- warunki "analityczne" ($10^{-5} \text{ g}_{\text{mix}}/\text{g}_{\text{sorb}}$),

c': warunki dolnej granicy przeładowania stężeniowego ($2 \times 10^{-4} \text{ g}_{\text{mix}}/\text{g}_{\text{sorb}}$);

Warunki chromatograficzne: kolumna 120x4mm i.d., Nucleosil RP18 7 μm ,

eluent: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ 1:1 v/v, 1ml/min,

detektor UV 280 nm,

długość drogi optycznej 0,4mm (Knauer),

czułość c: ——— 2,56 AU/FS, ----- 0,08 AU/FS, c': 0,32 AU/FS.

d - rozdzielanie estrów kwasu 4-OH benzoowego: C_3H_7 - (1), C_2H_5 - (2), CH_3 - (3) w układzie faz normalnych na żelu krzemionkowym Lichrosorb SI 60 5 μm

kolumna 250x4 mm i.d.,

eluent: heptan - dioksan 8:2 V/V, 2ml/min, 254 nm;

——— warunki granicy przeładowania stężeniowego,

- - - warunki "analityczne";

e,f - rozdzielanie *o*, *m*, *p* - nitroaniliny (patrz rys. 1b, b') w układzie faz odwróconych: Nucleosil C18 7 μm , kolumna 120x4 mm, eluent: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ 1:1 v/v, 2 ml/min, e - warunki granicy przeładowania stężeniowego, f - warunki "analityczne";

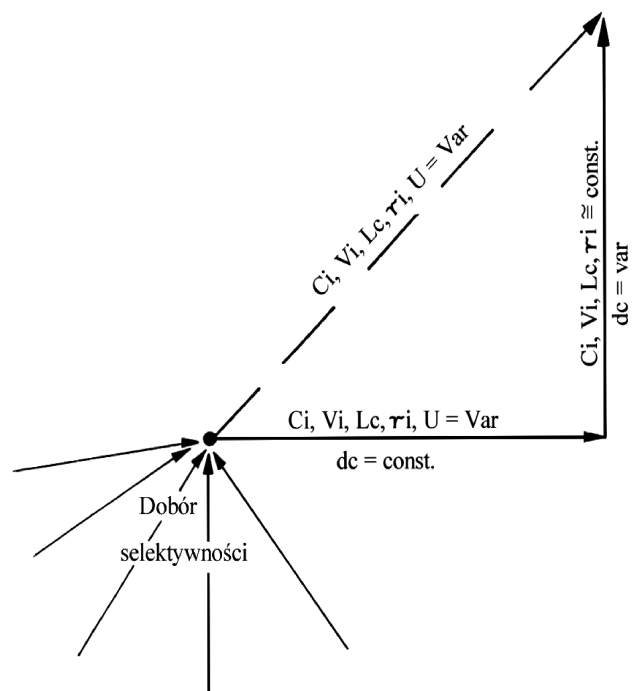
g - rozdzielanie benzenu ($c_i = 2 \text{ mg}/\text{ml}$, pik 1) i naftalenu ($c_i = 0,2 \text{ mg}/\text{ml}$, pik 2) w warunkach znikomej rozpuszczalności substancji w eluencie:

——— obj. dozowania 2 ml, warunki typowego przeładowania objętościowego,

----- obj. dozowania 20 μl warunki "analityczne";

kolumna: Nucleosil C18 7 m, 250x4mm i.d., 1ml/min;

W przypadku chromatogramów e-f: detektor UV 254 nm, droga optyczna 0,4 mm.



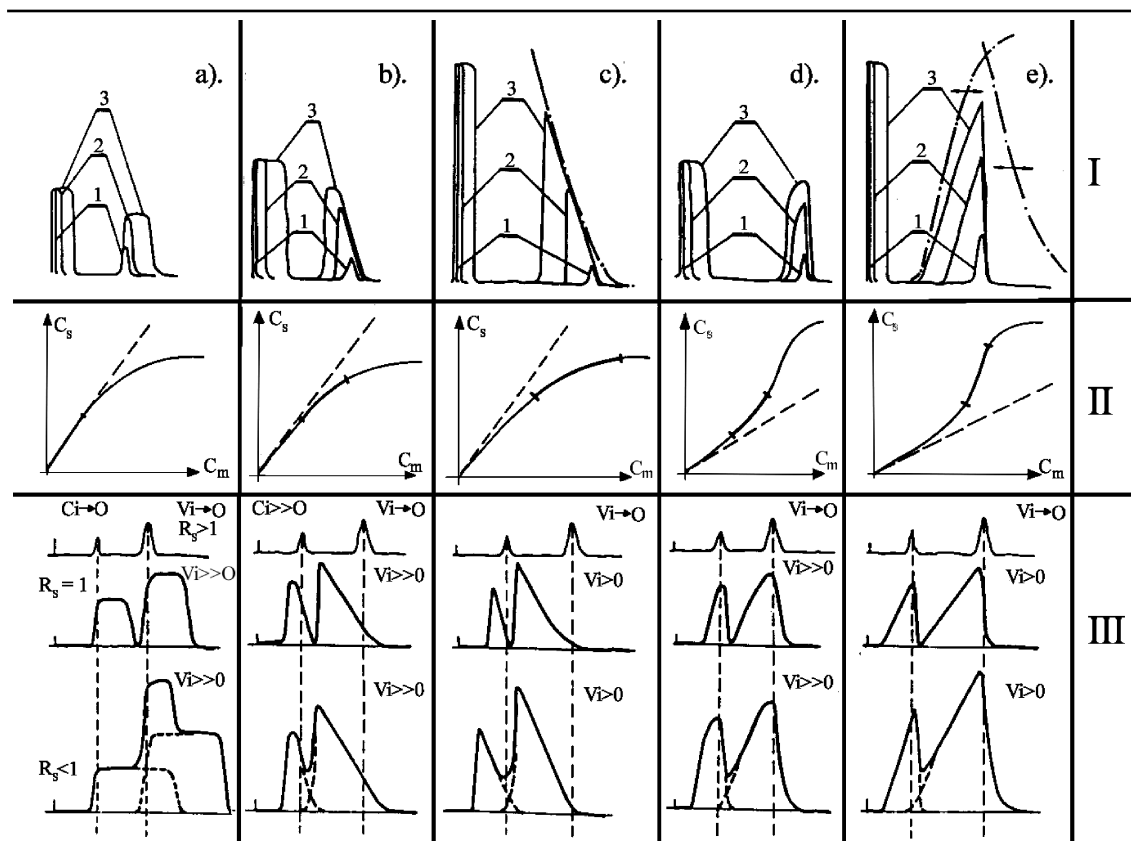
Rys. 13.2. Ilustracja dwuetapowego postępowania podczas powiększania skali procesu otrzymywania substancji z wykorzystaniem metod chromatograficznych.

kształtem zbliżone do trójkąta prostokątnego, którego prawy dolny wierzchołek ma objętość elucji, jaka by została uzyskana dla piku odpowiedniej substancji w warunkach analitycznych (patrz rys. 13.1.a,b,c).

W przypadku niskiej rozpuszczalności rozdzielanych substancji w elucie możliwe jest uzyskanie jedynie przeładowania objętościowego. Nie można już osiągnąć tak wysokiej efektywności ekonomicznej rozdzielania. Piki chromatograficzne mają, wówczas, kształt zbliżony do prostokąta, co jest spowodowane koniecznością dozowania dużych objętości roztworu substancji rozdzielanych (patrz rys. 13.1.g).

W przypadku trudnych, lub bardzo trudnych problemów separacyjnych (współczynnik selektywności zbliżony do 1.0), dąży się również do prowadzenia procesu w warunkach przeładowania kolumny, lecz w praktyce konieczne jest poprzestanie na dozowaniu jednorazowo do kolumny tylko takiej ilości mieszaniny substancji rozdzielanych, aby nie przekraczać granicy liniowości odpowiedniej izotermy sorpcji (w praktyce do ok. $5 \cdot 10^{-4}$ g/g sorbentu typu żel krzemionkowy i fazy stacjonarne związane z żelem krzemionkowym). W przeciwnym razie strefy rozdzielanych substancji zbyt szybko będą się na siebie wzajemnie nakładały i czystość izolowanej substancji będzie niewielka. Wówczas efektywność ekonomiczna separacji staje się niewysoka (patrz rys. 13.1. d, e).

Opisane powyżej reguły mają bezpośredni związek ze zjawiskami sorpcji substancji rozdzielanych na powierzchni wypełnienia kolumny i z typem izotermy sorpcji. Najczęściej izoterma sorpcji ma w warunkach chromatografii cieczowej charakter izotermy Langmuira, ale są też bardzo korzystne dla wydajności rozdzielania, przypadki sorpcji wielowarstwowej, gdy charakter izotermy sorpcji jest wklęsły (typu "S"). Na rys. 13.3. zamieszczono zestawienie różnych warunków rozdzielania, wykorzystywanych w chromatografii preparatywnej przy



Rys. 13.3.

Część I: Zestawienie form pików chromatograficznych dla pojedynczej substancji eluowanej w zależności od typu przeładowania kolumny (po lewej stronie cyfr odniesienia naszkicowano profile stężenia w chwili dozowania roztworu substancji do kolumny).

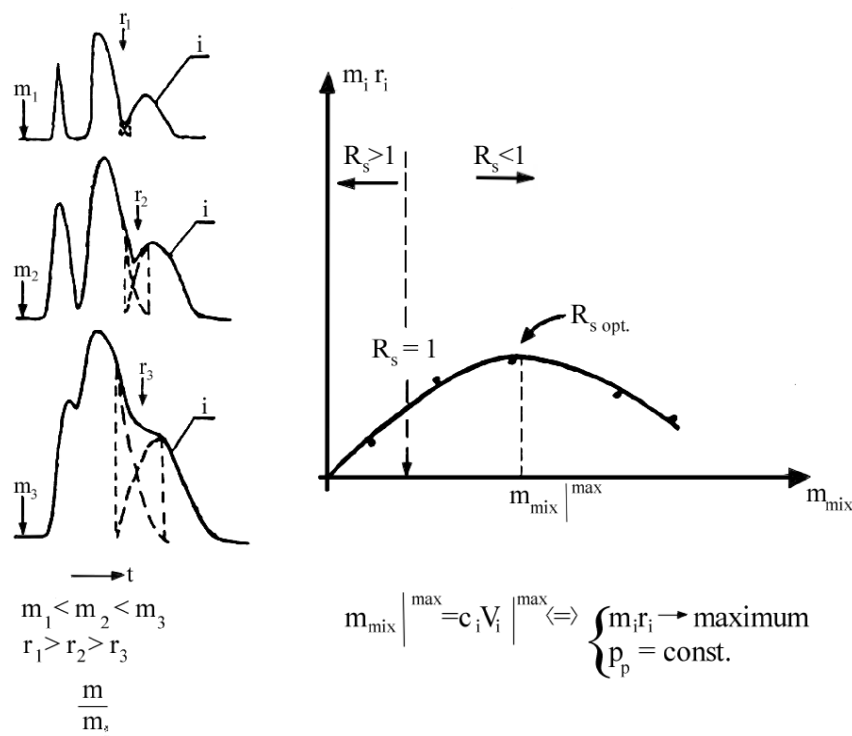
Oznaczenia: 1 - brak przeładowania kolumny, 2 - dolna granica przeładowania określonego typu, 3 - typowy przykład przeładowania określonego typu;

Część II: Kształty i zakresy izoterm sorpcji odpowiednie dla pików chromatograficznych zamieszczonych powyżej (linią pogrubioną zaznaczono zakresy izoterm sorpcji charakterystyczne dla określonego typu przeładowania kolumny);

Część III: Zestawienie charakteru typowych chromatogramów otrzymanych w przypadku rozdzielania dwóch substancji w warunkach określonego typu przeładowania kolumny, odpowiednio: z zachowaniem warunku $R_s=1$ (środką części fragmentu III - piki rozdzielane praktycznie do poziomu linii bazowej) i po zwiększeniu ilości substancji wprowadzonej do kolumny (piki częściowo "nałożone" wzajemnie). W górnym fragmencie cz.III naszkicowano odpowiednie chromatogramy otrzymane w warunkach braku przeładowania (w "warunkach analitycznych");

niewielkim i znacznym stopniu przeładowania kolumny oraz rodzaje spotykanych izoterm sorpcji, a także związek zakresu stężenia substancji w roztworze dozowanym do kolumny z zakresem izoterm sorpcji oraz kształtem pików i zmianą retencji substancji w porównaniu do warunków braku przeładowania (warunków "analitycznych"). W podpisie pod rysunkiem zamieszczono dodatkowe wyjaśnienia.

Optymalne przeładowanie kolumny w warunkach pracy preparatywnej jest najczęściej takie, aby wartość R_s między izolowaną substancją, a najbliższymi zanieczyszczeniami, widocznymi na chromatogramie wynosiła ok. 1.



Rys. 13.4. Ilustracja zasady określania ilości substancji dozowanych jednorazowo do kolumny oraz wyznaczania punktów zbierania frakcji w warunkach chromatografii procesowej.

W warunkach rozdzielania procesowego korzystne jest stosowanie wyższego stopnia przeładowania, utrzymując R_s na optymalnym poziomie (często ok. 0,75) i “wycinając” oraz zawracając do ponownego rozdzielania, odpowiednie międzyfrakcje. Trzeba dodać, że eksperymentalne określenie tej optymalnej wartości R_s jest bardzo pracochłonne i warto to wykonać tylko, gdy optymalizuje się przeładowanie kolumny i zbieranie frakcji dla warunków procesowego rozdzielania i produkcji substancji. Zasadę doboru optymalnej ilości (masy m_{mix}) jednorazowo dozowanej do kolumny mieszaniny substancji w warunkach chromatografii preparatywnej, albo procesowej zilustrowano na rys. 13.4, przy czym symbol “ r ” oznacza stopień odzysku lub 1- stopień recykulacji “międzyfrakcji” zawracanej do roztworu dozowanego; “ i ” oznacza substancję otrzymywaną; cyframi 1, 2, 3 opisano rosnące ilości substancji dozowane do kolumny o oraz wzrost stopnia recykulacji.

13.5. ZASADY OPTIMALNEGO STOSOWANIA PREPARATYWNEJ I PROCESOWEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

Wydajność (produktywność) chromatografii preparatywnej i procesowej definiowana jest najogólniej w następujący sposób:

$$P_t = \frac{Q_r}{Q_i} \cdot \frac{Q_i}{t_c A} \cdot \frac{kg}{godz \cdot m^2} \quad (1)$$

gdzie: P_t -wydajność wyrażona jako masa substancji otrzymana w ciągu jednostki czasu i dla jednostki powierzchni przekroju kolumny;

- Q_i - masa substancji wprowadzona do kolumny;
 Q_r - masa substancji otrzymana z kolumny;
 t_c - czas trwania procesu rozdzielania (w warunkach repetycyjnego dozowania - czas trwania jednego etapu rozdzielania);
 A - powierzchnia przekroju poprzecznego wypełnienia kolumny.

Wyrażenie $\frac{Q_r}{Q_i}$ nazwane jest stopniem odzysku.

Przedstawione wyrażenie uwzględnia stronę "korzyści". Do strony "koszty", należą koszty związane ze zużyciem rozpuszczalników, wyodrębnianiem substancji (usuwaniem eluentu) z frakcji eluatu, odzyskiem eluentu, cena kolumny i urządzeń pomocniczych, robocizną itp.

Do parametrów, które mają istotny wpływ na wydajność preparatywnego, albo procesowego rozdzielania należą: ilość dozowanej substancji ($V_i \cdot C_i$), średnica kolumny (d_c), długość wypełnienia kolumny (L_c), natężenie przepływu eluentu (w), powierzchnia właściwa materiału stanowiącego wypełnienie kolumny (F), wielkość ziaren wypełnienia (d_p), wartość współczynnika retencji substancji izolowanej (k_i) i współczynnika retencji ostatniego piku (k_n). Wpływ każdego z tych parametrów na wydajność rozdzielania wymaga oddzielnego omówienia.

Ilość dozowanej substancji

Ilość dozowanej substancji (m_i) określona jest iloczynem objętości (V_i) i stężenia (c_i) substancji (i) w roztworze dozowanym do kolumny:

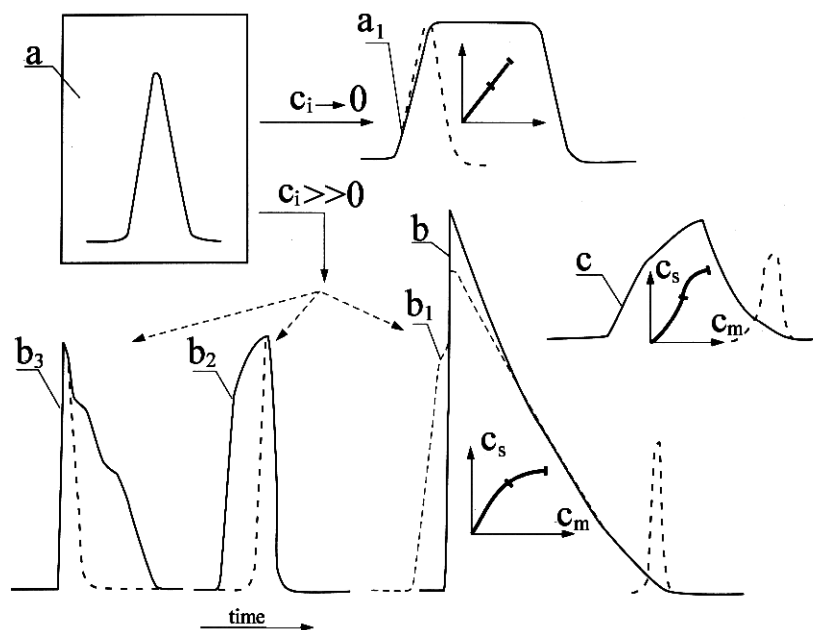
$$m_i = V_i \cdot c_i \quad (2)$$

- przeładowanie objętościowe

W chromatografii analitycznej próbka jest dozowana w taki sposób, aby ze wzrostem dozowanej ilości m_i rosła tylko wysokość piku. Aby spełnić ten warunek objętość próbki nie powinna przekroczyć około $1/4$ szerokości piku (wyrażonej w jednostkach objętości), mierzonej przy podstawie piku, a stężenie nie powinno być większe niż 10^{-4} grama substancji na gram wypełnienia kolumny.

Zwiększenie objętości dozowania (bez wzrostu stężenia - warunki przeładowania objętościowego), powoduje wzrost wysokości i szerokości piku. Jeżeli objętość przekroczy graniczną wartość, dalszy wzrost powoduje wyłącznie poszerzenie pasm. W takim przypadku stężenie substancji w eluacie obserwowane jako wysokość piku nie zmienia się (pojawia się plateau o stałej wysokości). Objętość, od której obserwuje się pik z plateau wynosi około 6 odchyleń standardowych piku otrzymanego po dozowaniu próbki analitycznej, tj. o małej objętości i małym stężeniu.

Wzrost szerokości piku będący wynikiem dużej objętości dozowania odbywa się poprzez wzrost objętości elucji opadającej części piku, podczas gdy położenie frontu piku nie ulega zmianie. Odpowiada położeniu piku na chromatogramie w warunkach chromatografii analitycznej i nie zależy od retencji substancji, tzn. od jej rodzaju. Maksymalną objętość, którą można dozować w celu zwiększenia wydajności procesu można oszacować z chromatogramu, otrzymanego dla próbki analitycznej. Jest to, zmierzona na poziomie linii podstawowej i wyrażona w jednostkach objętości - odległość pomiędzy pikami substancji, które są celem rozdzielania.



Rys. 13.5 Zestawienie zaobserwowanych w praktyce rodzajów zniekształceń pików chromatograficznych w warunkach chromatografii preparatywnej z uwzględnieniem warunków, gdy inna ciecz niż faza ruchoma pełni rolę rozpuszczalnika dla sporządzenia roztworu dozowanego do kolumny.

Oznaczenia

- a - kształt pików w warunkach górnej granicy braku przeładowania
- a₁ - naturalny kształt pików w warunkach przeładowania objętościowego
- b - naturalny kształt pików w warunkach przeładowania stężeniowego
- b₁ - zniekształcenie pików spowodowane zbyt wysoką różnicą lepkości i napięć powierzchniowych między roztworem dozowanym do kolumny i eluentem
- b₂ - zniekształcenie pików w sytuacji niedostatecznej rozpuszczalności substancji rozdzielonej w eluencie - przypadek "wypadania oleju" podczas dozowania
- b₃ - zniekształcenie pików w sytuacji niedostatecznej rozpuszczalności substancji rozdzielonej w eluencie - przypadek "wypadania kryształów" podczas dozowania
- - kształt pików bez przeładowania, lub w warunkach górnej granicy braku przeładowania oraz usytuowanie pików w tych warunkach
- c - naturalny kształt pików w warunkach izoterm sorpcji typu "s" (dość rzadki, lecz korzystny przypadek w praktyce)
- c_s, c_m - stężenia substancji rozdzielanej odpowiednio: w fazie stacjonarnej (s) i ruchomej (m) jako oznaczenia osi odpowiednich izoterm sorpcji naszkicowanych w pobliżu odpowiadającym im

- przeładowanie stężeniowe

Wzrost stężenia substancji w próbce dozowanej do kolumny (przy zachowaniu małej objętości dozowania (V_i)), powoduje poszerzenie pasma, a kształt pików zależy od rodzaju izoterm sorpcji (patrz rys. 13.4 i 13.1), a także od stopnia nieliniowości odpowiedzi detektora. Zależności retencji od kształtu izoterm sorpcji przedstawiono schematycznie na rys. 13.4., a w praktyce - na rys. 13.1.

Adsorpcja substancji z roztworów w układach ciecz - ciało stałe najczęściej przebiega wg izoterm Langmuira. W nieliniowym zakresie tej izoterm, dla wysokiego stężenia substancji, wartość współczynnika retencji (k) maleje ze wzrostem stężenia, tzn., że ta część pasma, gdzie jest wyższe stężenie wędruje szybciej. Pasma staje się niesymetryczne, w kształcie trójkąta, ze stromym frontem. Wzrost stężenia próbki powoduje wzrost wysokości maksimum pików i po-

szerzenie pasma przez zmniejszenie objętość elucji frontu. Tył piku pozostaje w przybliżeniu w tym samym miejscu, jak dla piku analitycznego.

Zwiększanie wydajności procesu rozdzielania preparatywnego, poprzez wzrost stężenia dozowanego roztworu, jest bardziej korzystne, niż zachowywanie przeładowania objętościowego (ze względu na większe stężenie substancji w eluacie, można uzyskać ponad 5-cio krotki wzrost wydajności kolumny). Ograniczeniem jest rozpuszczalność składników rozdzielanej mieszaniny w eluencie, która z reguły maleje ze wzrostem retencji rozdzielanego składnika.

Powyższe stwierdzenia są poprawne, przy założeniu, że rozpuszczalnikiem roztworu dozowanego do kolumny jest eluent (albo ciecz o początkowym składzie programu elucji - w przypadku elucji gradientowej) oraz gdy lepkość roztworu dozowanego jest niewiele wyższa od lepkości eluentu. Gdy rozpuszczalnikiem jest ciecz o wyższej sile elucyjnej niż eluent i/albo roztwór jest bardzo lepki, to ze wzrostem stężenia roztworu dozowanego do kolumny chromatograficznej mogą być związane dodatkowe problemy, powodujące w konsekwencji różnego typu zniekształcenia pików chromatograficznych. Efekty te przedstawiono na rys. 13.5.

Średnica kolumny

Najbardziej celowe jest powiększanie skali rozdzielania substancji z zastosowaniem dwóch kolumn tej samej długości, wypełnionych tym samym sorbentem, z zachowaniem tego samego układu chromatograficznego i warunków pełnego podobieństwa fizycznego. Zwiększeniu powinna, więc, ulec tylko średnica kolumny. Wydajność wzrośnie proporcjonalnie do zmiany powierzchni przekroju poprzecznego kolumny, a więc proporcjonalnie do drugiej potęgi zmiany średnicy kolumny. Według tej samej proporcji wzrasta również, niestety, natężenie przepływu eluentu, a więc, i zużycie eluentu. Natomiast, liniowa prędkość przepływu eluentu powinna być zachowana bez zmiany. Nie powinien zmienić się czas rozdzielania, sprawność kolumny i ciśnienie.

Takie postępowanie upoważnia do uzależnienia wydajności i niektórych innych parametrów procesu rozdzielania w funkcji średnicy kolumny, zgodnie z wyrażeniem (3):

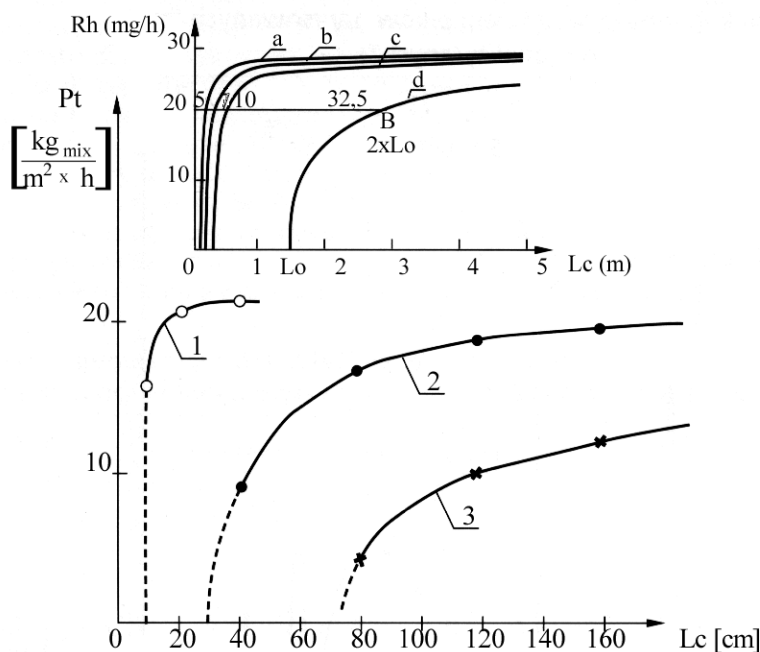
$$m_2 = m_1 \cdot \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \quad (3)$$

m_1, m_2 - masy substancji, dozowanych, odpowiednio, do kolumny o średnicy d_{c2} i d_{c1} ; (Zależność (3) dotyczy także zmiany wydajności otrzymywania substancji (P_{ii}), objętości dozowania (V_i) i natężenia przepływu eluentu (w))

Długość kolumny

Wraz z długością kolumny (L_c), proporcjonalnie rośnie masa wypełnienia, powierzchnia i pojemność sorpcyjna, lecz liczba pól teoretycznych jest proporcjonalna do $\sqrt{L_c}$, stąd w dłuższej kolumnie pasma substancji są względnie bardziej rozmyte. Wzrost długości kolumny powoduje też zwiększenie oporów przepływu, co może uniemożliwić uzyskanie optymalnego natężenia przepływu.

Istnieje najmniejsza, krytyczna długość kolumny wypełnionej określonym sorbentem, a w istocie najmniejsza liczba tzw. pól teoretycznych kolumny, która warunkuje minimalny konieczny stopień rozdzielania interesujących nas substancji, wzajemnie od siebie i od niepożądanych zanieczyszczeń. Zwiększenie długości kolumny, dość znacznie powyżej tej krytycznej, minimalnej długości, jest konieczne. Umożliwia wzrost wydajności rozdzielania. Zależność jest, jednak, nieliniowa. Osiąga się optymalną długość kolumny, jednak, dużo większą, niż potrzebna



Rys. 13.6. Zależność produktywności czasowej kolumny chromatograficznej od długości kolumny w warunkach stałej prędkości przepływu eluentu.

do rozdzielania analitycznego. Dalsze zwiększanie długości kolumny jest już niecelowe. Zilustrowano to na rys. 13.5., pokazującym u góry wykresy zależności produktywności kolumny od długości wypełnienia, otrzymane na podstawie równań uzyskanych teoretycznie przez Hupe i Lauera oraz poniżej, wykresy uzyskane doświadczalnie, podczas pracy nad optymalizacją warunków otrzymywania lantozylu C z ekstraktów suszu brunatnicy wełnistej.

Średnica ziaren wypełnienia kolumny

Średnica ziaren wypełnienia ma zasadniczy wpływ na sprawność kolumny. Krytyczną liczbę tzw. półek teoretycznych, niezbędną do preparatywnego rozdzielania mieszaniny substancji można osiągnąć zmieniając długość kolumny, albo / i średnicę ziaren wypełnienia kolumny. Przy zmianie skali procesu rozdzielania w warunkach przeładowania objętościowego, ważna jest nie tyle sama długość kolumny L_c , lecz stosunek L_c/d_p^2 , tj. proporcja długości kolumny do kwadratu średnicy ziaren wypełnienia. W warunkach przeładowania stężeniowego korzystne jest też jednocześnie zmniejszanie wielkości ziaren wypełnienia i długości kolumny, jednak, zachowanie stałej wartości proporcji L_c/d_p^2 nie jest wówczas optymalną regułą. Bardziej korzystne jest zastosowanie o ok. 30% dłuższej kolumny, niż to wynika z obliczenia otrzymanego na podstawie tej reguły. Zachowując te proporcje oraz zwiększając jednocześnie prędkość przepływu eluentu, można uzyskać znaczący wzrost wydajności procesu rozdzielania substancji.

Można generalnie stwierdzić, że zmniejszanie wielkości ziaren wypełnienia kolumny preparatywnej jest zawsze bardzo korzystne dla uzyskiwania wzrostu wydajności procesu rozdzielania oraz czystości otrzymywanych substancji i jest tym bardziej celowe, im trudniejszy jest problem rozdzielczy (im mniejsze wartości α). Ograniczeniem może być, jednak, maksymalna wartość ciśnienia, jakie można zastosować do rozdzielania, a w przypadku substancji

makromolekularnych, ich bardzo niekorzystna kinetyka dyfuzji (niskie wartości współczynników dyfuzji). W tych warunkach można określić optymalną wielkość ziaren wypełnienia kolumny. Jest to, jednak, wartość stosunkowo niska (z reguły w zakresie 10 - 25 mikrometrów).

Prędkość przepływu fazy ruchomej.

Wzrost prędkości przepływu fazy ruchomej powoduje zmniejszenie czasu trwania rozdzielania i tym samym wzrost wydajności. Wzrost prędkości przepływu eluentu wpływa, jednak, ujemnie na sprawność kolumny, powodując poszerzenie pasm. To, przy założonej czystości wydzielanej substancji, wymusza konieczność zmniejszenia masy dozowanej próbki albo zmniejszenie objętości zbieranych frakcji. Spadek sprawności kolumny powoduje też zmniejszenie stężenia substancji w eluacie. Należy, jednocześnie, brać pod uwagę możliwość uzyskana odpowiednio wysokiego ciśnienia na wlocie do kolumny.

W konsekwencji, zależność wydajności od szybkości przepływu eluentu nie jest liniowa i posiada maksimum, którego wartość jest tym wyższa im mniejsze są ziarna wypełnienia kolumny. Dalsze zwiększanie prędkości eluentu jest nieopłacalne i z wielu powodów niekorzystne. zilustrowano to na rys. 13.7 pokazującym u góry wykresy zależności, na podstawie równań otrzymanych teoretycznie przez Hupe i Lauera oraz poniżej, krzywe, otrzymane na podstawie wyników uzyskanych doświadczalnie podczas pracy nad optymalizacją warunków otrzymywania lantozylu C z ekstraktów suszu brunatnicy welnistej.

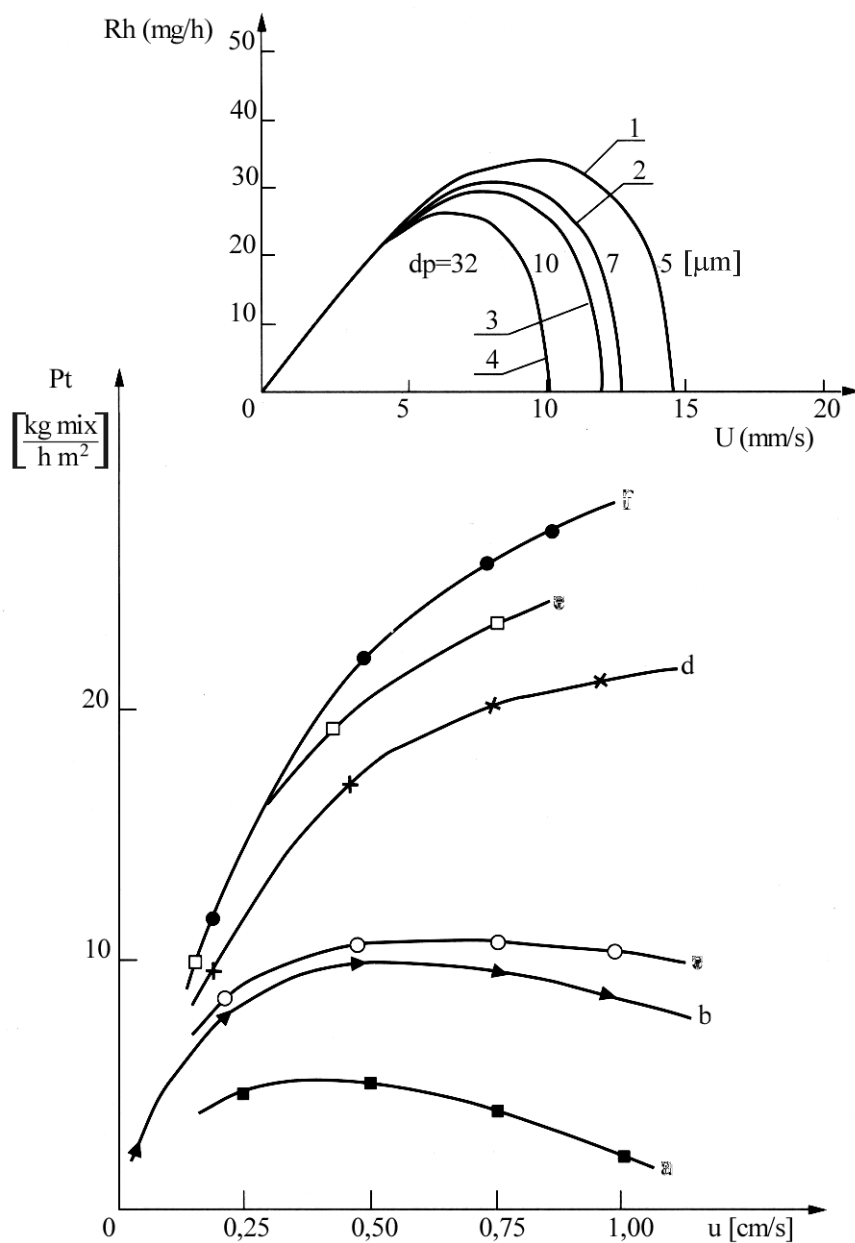
Retencja

Silna retencja składników mieszaniny jest niekorzystna ze względu na nadmierne zużycie eluentu, a przede wszystkim, wzrost czasu rozdzielania. Ponadto, dla dwóch substancji o różnej retencji, szybciej rośnie szerokość pasma wraz z ilością dozowanej próbki dla substancji o większej retencji, niż dla substancji o niższej wartości k . Odpowiednia wartość współczynnika retencji (k) dla pierwszego rozdzielanego składnika mieszaniny substancji nie powinna przekraczać 2, a dla ostatniego musi być większa od 2-óch, ale tak mała, jak to możliwe i nie wyższa niż ok. 12.

Maksymalizacja selektywności, czyli wartości α (tzn., odległości między pikami substancji otrzymywanych i substancji sąsiadujących), jest najważniejszym parametrem umożliwiającym wzrost wydajności preparatywnego rozdzielania. Konieczny jest, więc, kompromis pomiędzy selektywnością i retencją.

Korzystne jest stosowanie sorbentów o dużej powierzchni właściwej (o ziarnach wypełnienia całkowicie porowatych, albo posiadających nieporowate "jądro", o bardzo niewielkiej średnicy).

Odkrycie, ostatnio, technologii otrzymywania, tzw., monolitycznych wypełnień kolumn HPLC o bardzo niskiej wartości impedancji rozdzielania, jest szczególnie ważne dla rozwoju wykorzystania chromatografii cieczowej w skali preparatywnej i procesowej. Tego typu kolumny umożliwiają otrzymywanie zasadniczo wyższych wydajności preparatywnego rozdzielania substancji o niewysokich masach cząsteczkowych, niż kolumny "klasyczne", wypełnione zianistym sorbentem.



Rys. 13.7. Zależność produktywności czasowej kolumn chromatograficznych wypełnionych sorbentem o różnych wielkościach ziaren od prędkości przepływu eluentu.

Krzywe teoretyczne wzięto z pracy. Krzywe doświadczalne otrzymano podczas badań nad doborem optymalnych warunków procesu otrzymywania lanatozydu C.

Oznaczenia:

a, b - $d_p = 100 \mu\text{m}$, L_c odpowiednio: 800mm (a) i 1600mm (b)

c, d, e - $d_p = 50 \mu\text{m}$, L_c odpowiednio: 400, 800 i 1200mm

f - $d_p = 10 \mu\text{m}$, $L_c = 250\text{mm}$

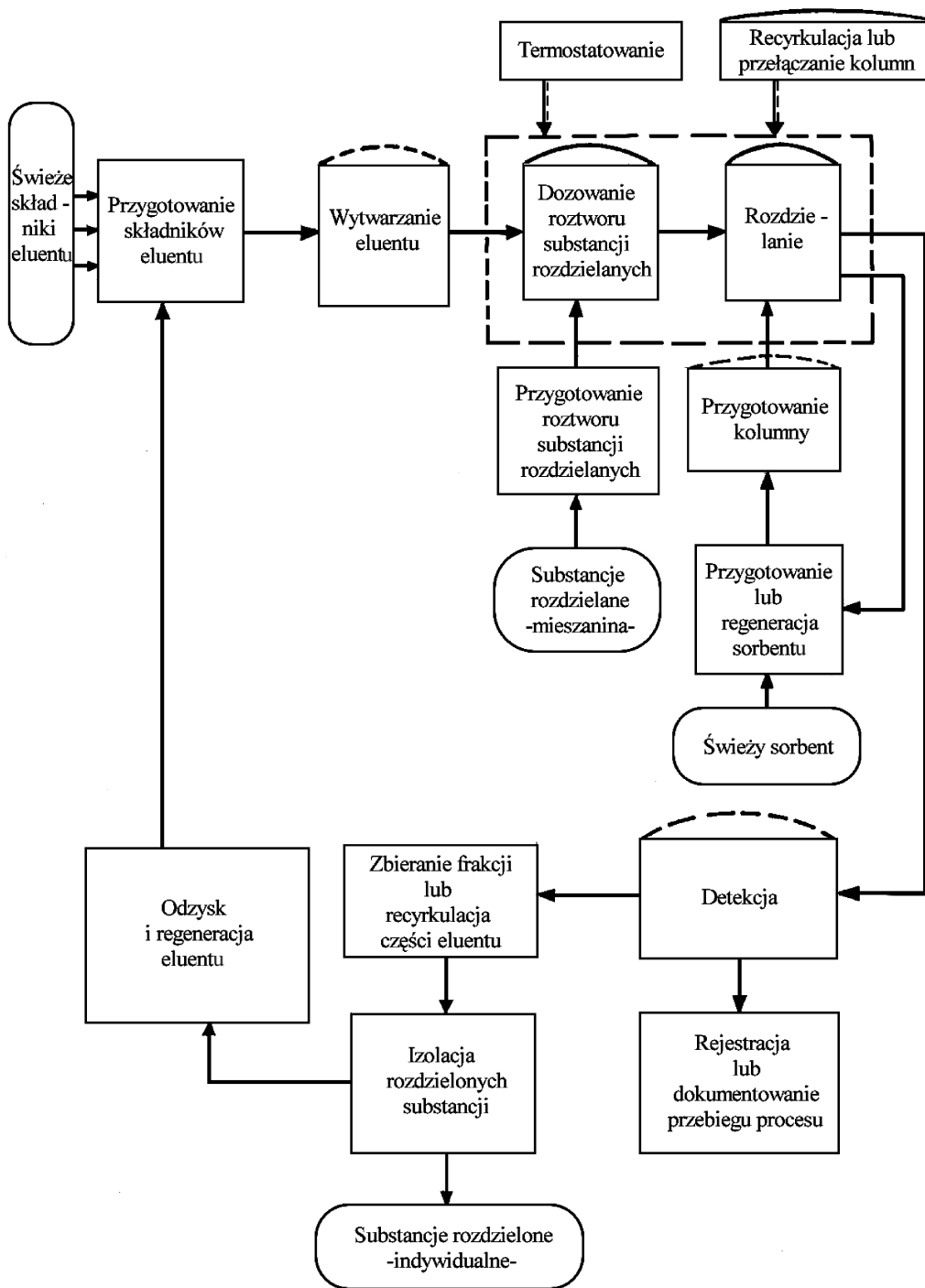
Optymalne warunki preparatywnego, albo procesowego otrzymywania substancji

Podsumowując omówione powyżej reguły optymalizacji warunków preparatywnego rozdzielania substancji z wykorzystaniem chromatografii cieczowej, można podać następujące ogólne zasady maksymalizacji wydajności otrzymywania substancji z zastosowaniem chromatografii w skali preparatywnej, albo procesowej:

- W przypadku rozdzielania substancji o niskich masach cząsteczkowych, w układach chromatograficznych, charakteryzujących się dobrą kinetyką zjawisk sorpcji - desorpcji i gdy ograniczeniem nie jest dopuszczalne ciśnienie, najbardziej korzystne jest stosowanie stosunkowo krótkich wysokosprawnych kolumn (jednak zasadniczo dłuższych, niż wynosiłaby konieczna długość kolumny analitycznej), wypełnionych sorbentem typu HPLC, o małych ziarnach wypełnienia (albo należy zastosować wysokosprawne kolumny monolityczne). Jednocześnie należy stosować optymalną, stosunkowo wysoką, prędkość przepływu eluentu.
- W przypadku rozdzielania substancji o wysokich masach molekularnych, albo, gdy kinetyka zjawisk sorpcja - desorpcja jest niekorzystna, można stosować dłuższe kolumny wypełnione sorbentem o nieco większych ziarnach, jednak, stosowanie wysokosprawnej kolumny jest nadal najkorzystniejsze. Przede wszystkim, konieczne jest stosowanie mniejszych prędkości przepływu eluentu i w konsekwencji nie jest możliwe otrzymanie tak wysokiej produktywności, jak w warunkach opisanych powyżej.
- W każdym przypadku, korzystne jest stosowanie sorbentu o wysokiej powierzchni właściwej oraz zachowanie niezbyt wysokich wartości k , ostatniej substancji, eluowanej z kolumny. Stosowanie elucji stopniowej, w celu skrócenia ogólnego czasu elucji (czasu jednego etapu rozdzielania), bywa korzystne. Należy, jednak, wówczas wykonywać reaktywację powierzchni wypełnienia kolumny, co najczęściej wymaga zastosowania eluentu o początkowym składzie w ilości ok. 7 objętości martwych kolumny.
- Stosowanie elucji gradientowej nie jest korzystne (czasem, jednak, konieczne). Powoduje obniżenie wydajności otrzymywania substancji (z powodu zwiększenia czasu jednego etapu rozdzielania o czas reaktywacji kolumny) oraz powoduje istotny wzrost kosztów repetycyjnego, preparatywnego otrzymywania substancji z zastosowaniem chromatografii cieczowej, tym większy im wyższa jest cena eluentu, im wyższy koszt odzysku eluentu oraz im większa część eluentu ulega utracie i nie może zostać zawrócona do procesu.

13.6. OPERACJE JEDNOSTKOWE, TECHNOLOGIA OTRZYMYWANIA SUBSTANCJI Z ZASTOSOWANIEM PREPARATYWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

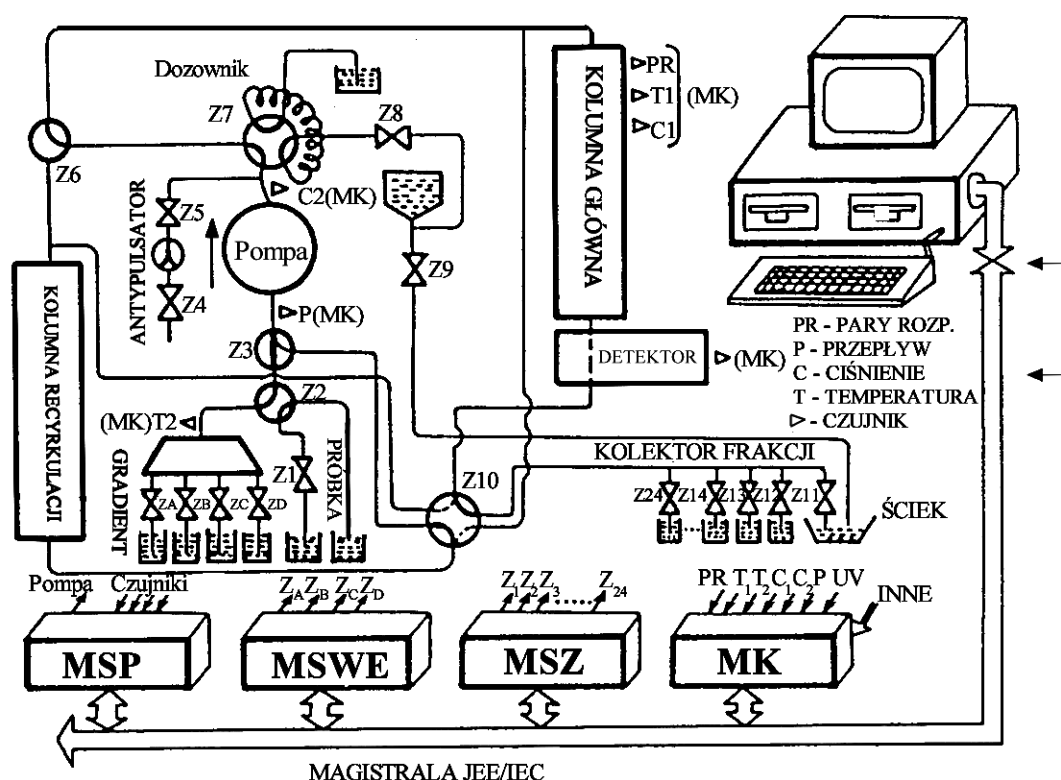
Na rys. 13.8 przedstawiono operacje jednostkowe, z których jest złożona technologia otrzymywania substancji z zastosowaniem chromatografii cieczowej, a w Tabeli 13.1 typowe wartości najważniejszych parametrów w zależności od skali rozdzielania.



Rys. 13.8. Schemat technologiczny procesu otrzymywania substancji z wykorzystaniem chromatografii cieczowej procesowej lub preparatywnej.

Tabela 13.1. Typowe wartości natężenia przepływu (w), objętości dozowania (V_i) oraz masy substancji rozdzielanych z zastosowaniem różnej skali rozdzielania w warunkach przeładowania kolumny

Skala rozdzielania	Modelowa	Semipreparatywna	Preparatywna	Procesowa
Średnica kolumny	$d_c = 4$ mm	$d_c = 8$ mm	$d_c = 25$ mm	$d_c = 50$ mm
w^* (ml min ⁻¹)	1	4	40*	160*
V_i	50 μ l 200 μ l 1000 μ l	200 μ l 800 μ l 4 ml	1.8 ml 7 ml 36 ml	7 ml 30 ml 150 ml
m_i^{max} **	0.2 - 30 mg	0.7 - 150 mg	6 mg - 1.4 g	25 mg - 10 g

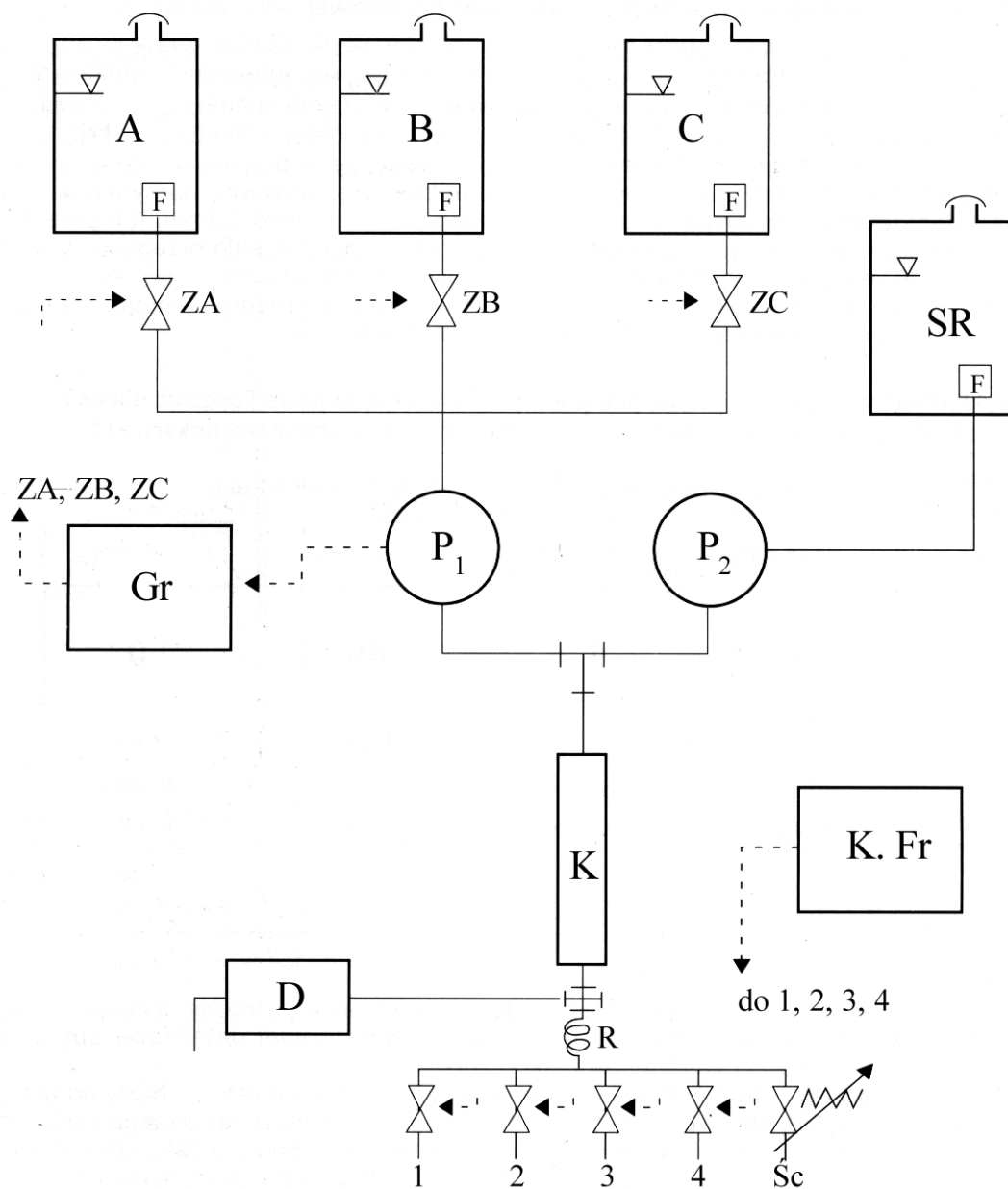


Rys. 13.9. Schemat ideowy i funkcjonalny układu zautomatyzowanego - sterowanego komputerem - gradientowego chromatografu preparatywnego z zaworami dwustanowymi (Z1 ... Z24), z możliwością recykulacji części eluenta oraz z podwójnym systemem automatycznie kontrolowanego dozowania roztworu substancji rozdzielanych (dozownik pętlicowy z samoczynnym repetycyjnym napełnianiem pętli z regulowaną objętością cieczy lub dozowanie dużych objętości poprzez zawory Z2 i Z3), oraz z systemem samoczynnego wykrywania ewentualnych przecieków eluenta.

Znaczenie symboli, które nie zostały wyjaśnione na rysunku lub powyżej:

P - pompa ssąco-tłocząca o małej objętości skokowej, Z - zawory (A - D: programowanie składu eluenta, 1 - 10: sterowania przebiegiem procesu separacji, 11 - 24: kolekcji frakcji).

MSP - moduł sterowania pompą, MSWE - moduł sterowania "niskociśnieniowym systemem gradientowym", MSZ - moduł sterowania zaworami, MK - moduł komunikacji z użytkownikiem, wzajemnej koordynacji programów, obsługi awarii oraz kontroli warunków pracy kolumn (moduł o nadrzędnych priorytetach, może umożliwić wykorzystywanie komputera do innych zadań w przypadku bezawaryjnej pracy aparatu, a w przyszłości ewentualne wyeliminowanie konieczności stosowania komputera).



Rys. 13.10. Schemat ideowy chromatografu preparatywnego w dużej skali separacji lub chromatografu procesowego.

Oznaczenia:

A, B, C - składniki eluentu i odpowiednie zbiorniki

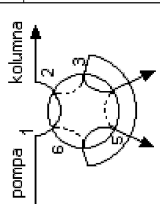
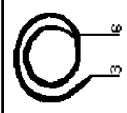
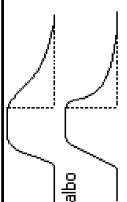
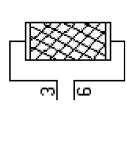
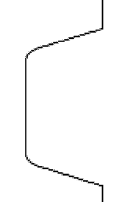
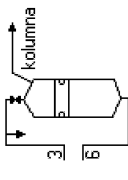
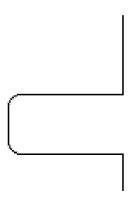
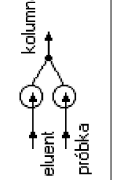
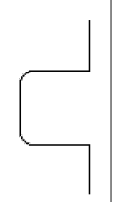
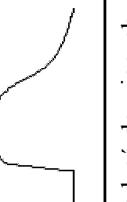
SR - roztwór substancji rozdzielonych i odpowiedni zbiornik

P1 - pompa główna z programowaniem składu eluentu

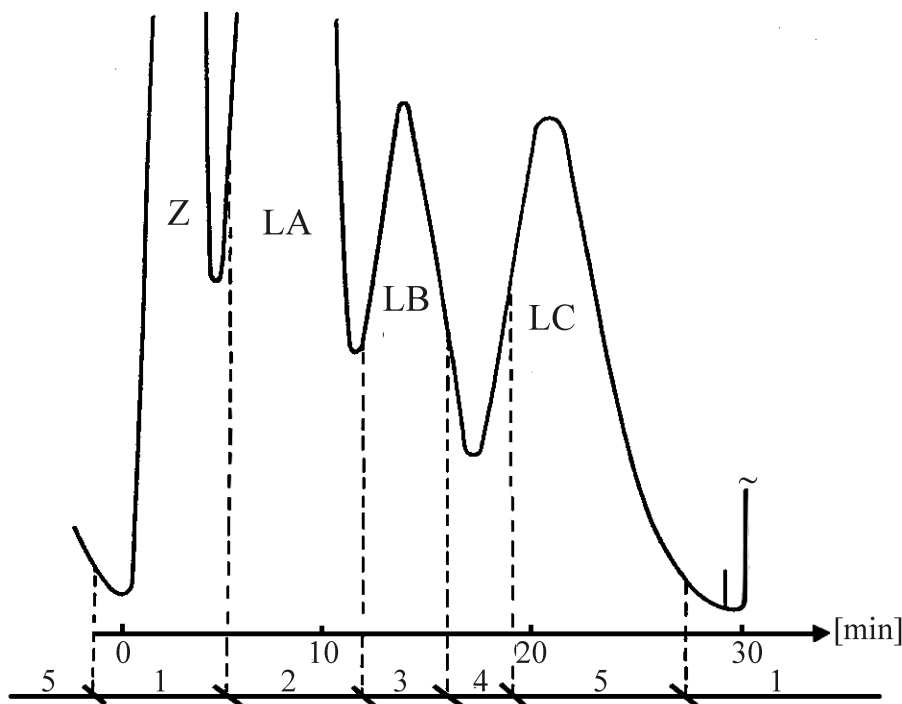
P2 - pompa dozująca roztwór substancji rozdzielanych (P1 i P2 włączane alternatywnie)

Gr - programator i sterownik programu elucji, K - kolumna PLC, D - detektor (0,1% do 1% eluatu),

R - ogranicznik wpływu (*restryktor*), K.Fr - sterownik kolektora frakcji, ZA, ZB, ZC - zawory proporcjonujące, 1, 2, 3, 4 - zawory kolektora frakcji, F - filtry ssawne, Śc - ścieki

L. p.	Typ	Opis	Schemat	Kształty impulsu stężeniowego	Zakres przydatności			Uwagi:	
					V_i	ΔP_{max}	Skala rozdż.		
1.	Zawór z pętlowym zasobnikiem próbki	Najczęściej sześciodrogowy dwupołożeniowy zawór dozujący z zasobnikiem próbki w formie pętli wykonanej z rurki. Możliwie różne kształty pętli: 	 a. pętla „zwykła” b. pętla o małym promieniu Krzywizny c. pętla typu „8”	 albo	0-5 ml (do 50 ml)	W pełnym zakresie ciśnienia pracy aparatu chromatogr. – do 40 MPa (do 15 MPa)	Analityczna modelowa preparat.	$\sigma_v^2 = V_i^2/B-12$ 1. $Re < 2100$: Im większe natężenie przyływu cieczy wymywającej, im mniejsza średnica rurki zasobnika, oraz im bardziej zbliżone lepkości i napięcia powierzchniowe cieczy wymywanej i wymywającej tym bardziej korzystny profil dozowania 2. $Re > 3000$ j.w., lecz korzystniejszy profil dozowania	
2.					j.w.			j.w.	
3.					j.w.			j.w.	
4.	Zawór dwustawny z innym zasobnikiem niż pętla	Zasobnik w postaci kolumny z warstwą porowatą			0,1 ml do 1000 ml			Modelowa do procesowej	Rzadko używany w praktyce ze względu na konieczne nadciśnienie podczas napełniania pojemnika
5.	Zawór dwustawny z innym zasobnikiem niż pętla	Zasobnik w postaci „pseudostrzykawki”			0,5 ml do 500 ml (do 5000 ml)			j.w.	Oferowany komercyjnie przez firmę Amicon. Bardzo korzystny profil dozowania
6.	Dozowanie pompą	6a. Dodatkowa pompa 6b. Dozowanie pompą tłoczącą eluent			Od 0,5 ml			j.w.	Rozwiązanie kosztowne, gwarantujące bardzo korzystny profil dozowania
					Od 10 ml		j.w.	Rozwiązanie przydatne w praktyce tylko z pompą o względnie niskiej pojemności skokowej	

Rys. 13.11. Zestawienie cech charakterystycznych różnego typu urządzeń dozujących w chromatografii preparatywnej i procesowej.



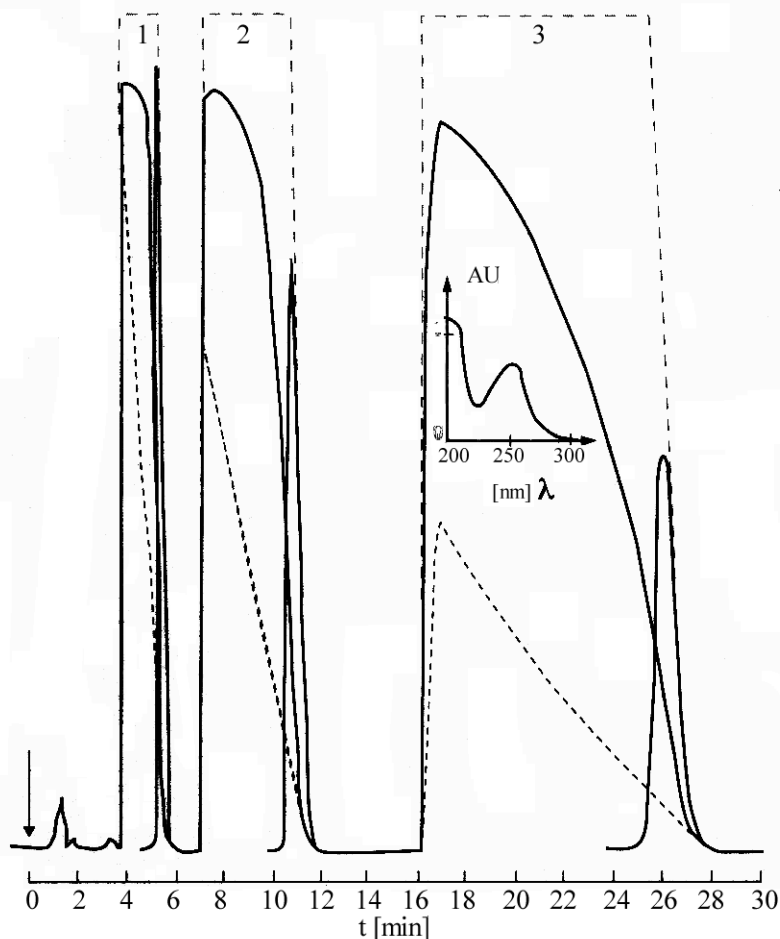
Rys. 13.12. Przykład chromatogramu uzyskanego w czasie trwania jednego etapu cyklicznej izolacji lanatozydu C z odpadu produkcyjnego z wykorzystaniem kolumny 800x150 mm, wypełnionej żelem krzemionkowym 60A $d_p=50 \mu\text{m}$ ($N_0=1600$); Warunki: eluent - $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$ 92:8:0,2 v/v, natężenie przepływu 2200 ml/min, ciśn. 26 bar, temperatura pokojowa, detektor UV 254nm. Poniżej osi czasu oznaczono numery zbiorników, gdzie zostają kierowane poszczególne frakcje.

- * W celu uniknięcia nadmiernego ciśnienia w naczyniu przepływowym detektora i jego ewentualnego zniszczenia, należy zmienić przewody wyprowadzające ciecz na posiadające większą średnicę wewnętrzną, niż w detektorze do celów analitycznych, albo usytuować detektor z zastosowaniem bocznikowania
- ** Masa mieszaniny substancji, które mogą zostać rozdzielone w kolumnie (mi max), zależy od masy sorbentu w kolumnie (wymiarów kolumny), ale także od trudności problemu rozdzielczego. Dane w tabeli zostały określone dla zakresu 10^{-4} do 2×10^{-2} g of mieszaniny na 1 g sorbentu, typy żel krzemionkowy, albo chemicznie modyfikowany żel typu, RP18, RP8, CN, NH_2 , DIOL itd. dane w tabeli 1 zostały określone w zakresie od wartości 10^{-4} g/g sorbentu (od dolnej granicy przeładowania stężeniowego), do wartości 2×10^{-2} g/g sorbentu, odpowiadającej silnemu przeładowaniu stężeniowemu.

Na rys. 13.9 i 13.10 pokazano schematy układu dwóch alternatywnych aparatów, odpowiednio: do chromatografii preparatywnej (rys. 13.9) i do chromatografii w skali procesowej (rys. 13.10).

Na rys. 13.11 zamieszczono i porównano efektywność różnych alternatywnych metod dozowania substancji do kolumny preparatywnej, albo procesowej.

Na rys. 13.12 zamieszczono przykład chromatogramu otrzymanego w czasie jednego etapu repetycyjnego rozdzielania zanieczyszczonej mieszaniny lanatozydów A, B, i C w warunkach chromatografii procesowej - produkcja lanatozydu C (LC) z metanolowego ekstraktu z suszu ziola - brunatnica wełnista (*digitalis lanata*), z wykorzystaniem kolumny chromatograficznej o średnicy wypełnienia: 150 mm.



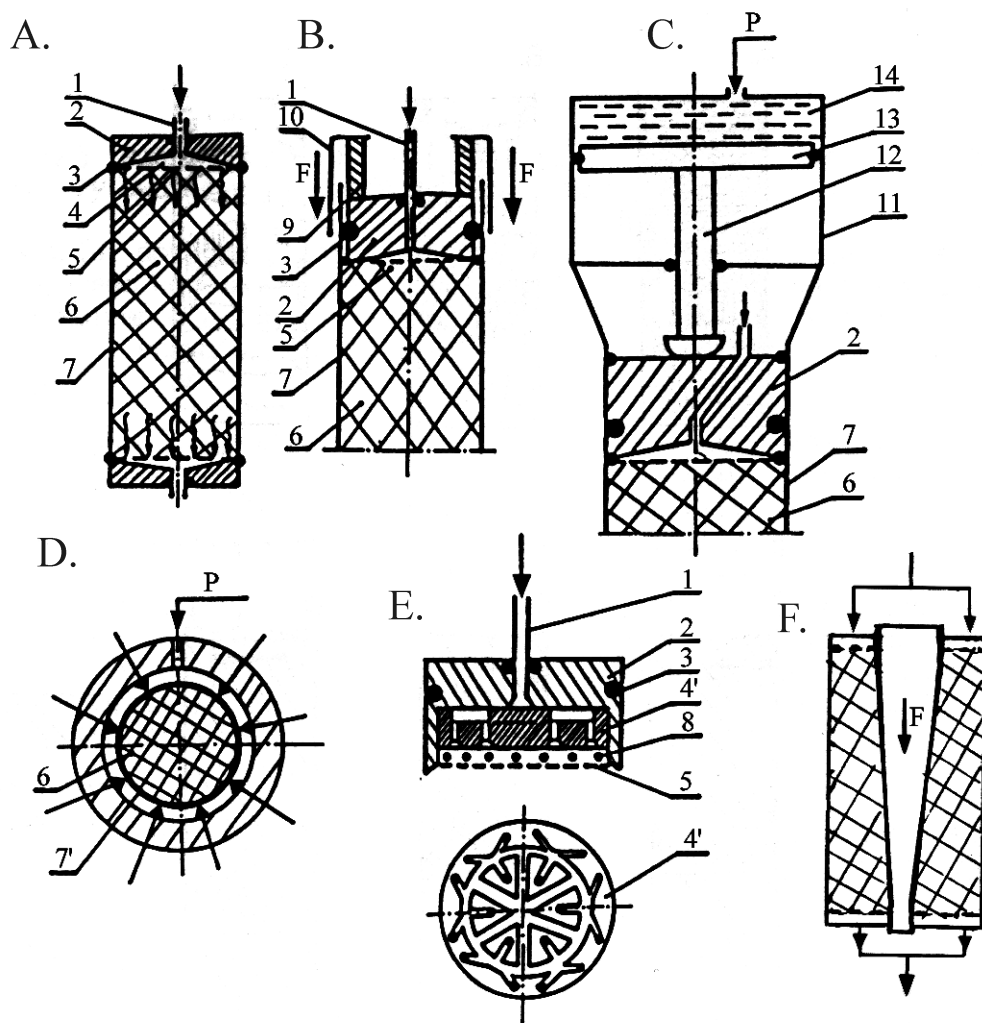
Rys. 13.13. Przykłady kilku chromatogramów uzyskanych dla tych samych ilości estrów kwasu 4 - OH benzoowego rozdzielanych w warunkach typowego przeładowania stężeniowego kolumny (z wyjątkiem wąskich pików narysowanych linią ciągłą, które dotyczą chromatografii analitycznej).

Zastosowano następujące warunki detekcji:

- 280 nm, 2,56 AU/FS, kuweta 10 mm
- 254 nm, 1,28 AU/FS, kuweta 0,5 mm
- 280 nm, 1,28 AU/FS, kuweta 0,5 mm

Na rys. 13.13 pokazano kilka chromatogramów otrzymanych w bez przeładowania kolumny (w warunkach "analitycznych") i w warunkach przeładowania stężeniowego, zarówno z przekroczeniem liniowego zakresu odpowiedzi detektora UV, jak i zastosowaniem kilku sposobów postępowania, dla uniknięcia przekroczenia liniowego zakresu wskazań detektora (bardzo mała droga optyczna, i / albo wybór długości fali o niskich wartościach absorpcyjności molowej rozdzielanych substancji).

Zamieszczone ilustracje i podpisy pod nimi, umożliwiają uzyskanie przez czytelnika ogólnej orientacji, co do stosowanych operacji jednostkowych i co do alternatywnych sposobów ich realizacji w praktyce. Opis bardziej szczegółowy przekracza ramy tego opracowania i zainteresowany czytelnik powinien skorzystać ze specjalistycznej literatury, albo bardziej obszernego podręcznika na temat preparatywnej i procesowej chromatografii cieczowej.



Rys. 13.14. Zasady budowy i działania najważniejszych typów kolumn i głowic dystrybucyjnych do preparatywnej i procesowej chromatografii cieczowej.

Typy kolumn:

- A - kolumna z nieruchomymi głowicami,
- B - kolumna z co najmniej jedną głowicą przesuwaną, dociskaną śrubami lub poprzez połączenie gwintowe nakrętki (10) z korpusem (7),
- C - kolumna z co najmniej jedną głowicą dociskaną do złoża z wykorzystaniem siłownika hydraulicznego lub pneumatycznego, tzn. kolumna wyposażona w tzw. "system dynamicznej kompresji aksjalnej złoża"(DAC),
- D - kolumna o elastycznych ścianach wyposażona w system promieniowej kompresji złoża,
- F - kolumna o radialno-aksjalnej kompresji złoża,

Typy głowic dystrybucyjnych:

- A, B, C - głowice z wolną przestrzenią dystrybucyjną w formie stożka o kącie wierzchołkowym 140-165°,
- E - jedna z uproszczonych form typoszeregu głowic dystrybucyjnych opracowanych w Politechnice Gdańskiej,

Opis do Rys. 14. cd

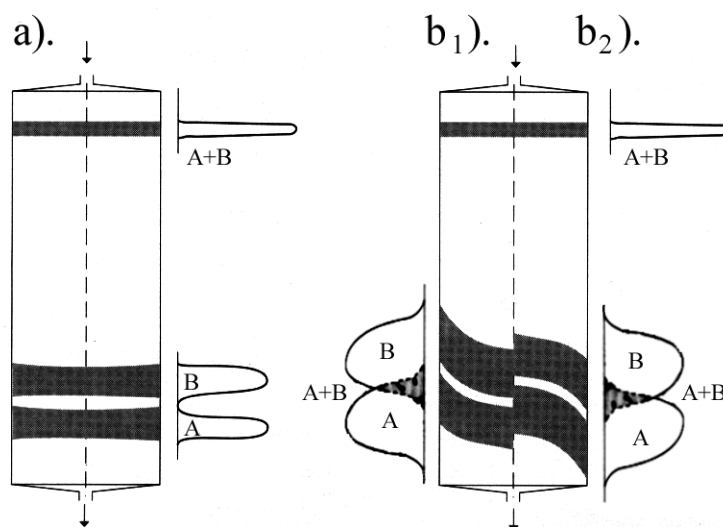
Oznaczenia:

1 - przewód doprowadzający eluent lub roztwór dozowany, 2 - korpus głowicy, 3- uszczelka główna, 4 - przestrzeń dystrybucyjna, 4' - wkładka dystrybucyjna z systemem rowków poziomych i poprzecznych otworków, 5 - spiek porowaty lub "tkanina" z drutu kwasoodpornego, 6 - materiał wypełnienia kolumny, 7, 7' - korpus kolumny, odpowiednio: rura kwasoodporna lub z elastycznego chemoodpornego tworzywa sztucznego, 8 - siatka tkana ze stosunkowo grubego drutu (0,3-1,0 mm) lub wkładka z rowkami zapewniającymi promieniowy rozptyw cieczy w głowicy, 9 - tuleja dystansowa, 10 - nakrętka lub pokrywa dociskana śrubami, 11 - korpus siłownika hydraulicznego lub pneumatycznego, 12 - trzpień tłoczyska, 13 - tłoczysko, 14 - plyn tłoczący.

13.7. WYMAGANIA STAWIANE KOLUMNOM DLA CEŁÓW PREPARATYWNYCH I PROCESOWYCH ORAZ SPOSOBY ICH SPEŁNIENIA W PRAKTYCE

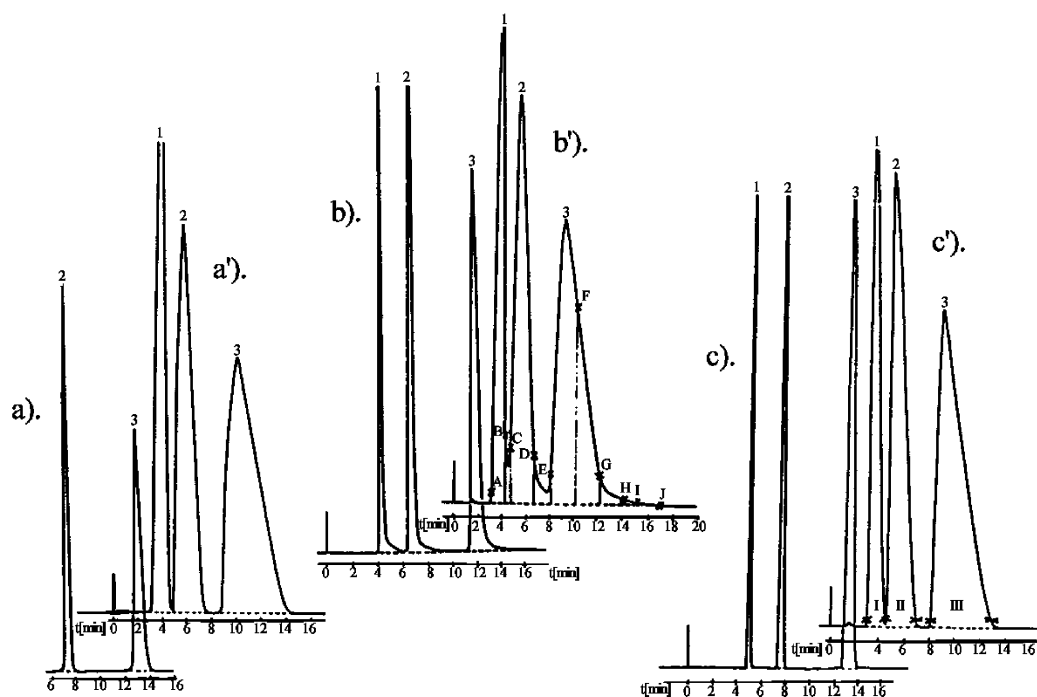
W kolumnach preparatywnych zachodzą takie same zjawiska fizykochemiczne i hydrodynamiczne jak w kolumnach analitycznych. Dotyczy to opisu selektywności układu chromatograficznego, a także zjawisk decydujących o tzw. sprawności rozdzielania wpływających na liczbę pól teoretycznych kolumny, z zastrzeżeniem konieczności rozpatrywania, dodatkowo, warunków przekroczenia zakresu liniowości izotermy sorpcji, tzn. rozpatrywania warunków przeładowania kolumny.

W związku z wykorzystywaniem do celów preparatywnych i procesowych, kolumn o znacznie większej średnicy niż kolumny analityczne, pojawiają się dodatkowe trudności oraz



Rys. 13.15. Ilustracja uzasadniająca konieczność istnienia tłokowego (płaskiego) profilu przepływu cieczy w przestrzeni wypełnienia kolumny preparatywnej oraz pokazująca niekorzystny wpływ zniekształcenia stref w kolumnie z p-tu widzenia wymagań, co do czystości substancji.

- Kolumna charakteryzująca się tłokowym profilem przepływu eluentu
- Kolumna o niższej przepuszczalności w rejonie przyściennym niż w pobliżu osi - półprzekrój
- Kolumna o wyższej przepuszczalności w rejonie w przyściennym niż w pobliżu osi - półprzekrój

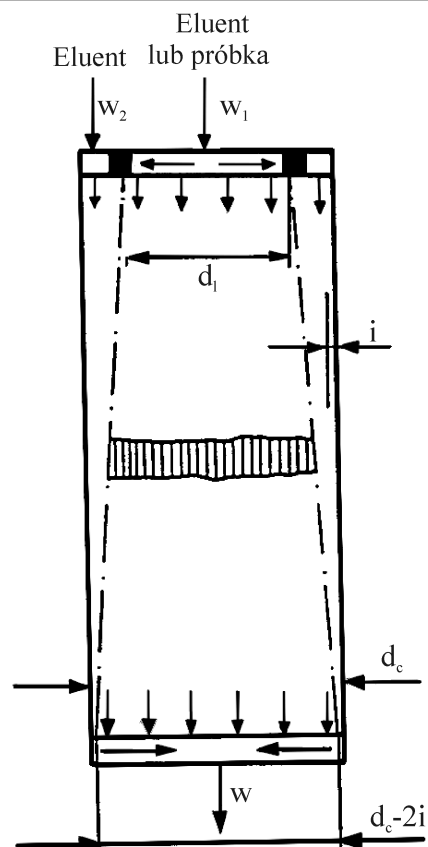


Rys. 13.16. Zestawienie odpowiadających sobie chromatogramów otrzymanych w warunkach braku przeładowania (warunki testu kolumny) - a, b, c oraz w warunkach typowego przeładowania stężeniowego - a', b', c' z wykorzystaniem kolumny analitycznej (120x4mm i.d.) - a, a' oraz preparatywnej (120x32mm i.d.) - b, b', c, c'. Wypełnienie: Nucleosil C18 7 μ m, kolumny wypełnienie na mokro sposobami stosowanymi dla kolumn komercyjnych.

Kolumna preparatywna była eksploatowana w sposób "klasyczny", tzn. z wykorzystaniem całej powierzchni przekroju poprzecznego dla rozdzielania substancji - chromatogramy b, b', a także z optymalnym stosowaniem warunków nieskończonej średnicy - chromatogramy c, c' ($s=76\%$). Na chromatogramach b' i c' oznaczono zakresy zbierania frakcji eluentu, poddanych następnie analizie. Substancje rozdzielane: estry kwasu 4 OH benzoowego, masa substancji dozowanych do kolumny w warunkach przeładowania stężeniowego: ester etylowy - 95 mg, ester etylowy 120 mg, ester propylowy 137 mg, masa substancji dozowanych do kolumny analitycznej ok. 60 razy mniejsza niż do kolumny preparatywnej; eluent: CH₃OH - H₂O 1:1 v/v, $w=0,97$ ml/min ($d_c=4$ mm) oraz $w=58$ ml/min ($d_c=32$ mm) (74 bar), detektor UV 280 nm, czułość 1,28 AU/FS, kuweta o drodze optycznej 0,5mm.

problemy. Jednym z nich jest konieczność zapewnienia równomiernego rozprowadzenia roztworu rozdzielanych substancji w całym przekroju poprzecznym wypełnienia kolumny i takich samych warunków odbierania eluatu z kolumny. Musi to zapewnić optymalna konstrukcja głowic rozprowadzających i zbierających. Istnieje wiele konstrukcji preparatywnych kolumn chromatograficznych, w których to zagadnienie zostało w różny sposób, najczęściej poprawnie rozwiązane. Na rys. 13.14 zamieszczono kilka przykładów schematów budowy kolumn chromatograficznych, stosowanych do preparatywnego, albo procesowego rozdzielania substancji.

Szczególnie ważny jest też problem zapewnienia długookresowej stabilności wypełnienia kolumny, gdy stosunek średnicy kolumny do średnicy ziarna wypełnienia często jest większy od 1000, a nawet 10000, a ziarna wypełnienia są małych rozmiarów. Szczególne znaczenie ma poprawne, równomierne i zwarte (ale nie zbyt zwarte) upakowanie kolumny. Wykorzystywane też są, dodatkowo, specjalne sposoby stabilizacji struktury złoża w czasie rozdzielania, takie jak tzw. "kompresja aksjalna", lub kompresja "aksjalno - radialna" (patrz rys. 13.14. C i F).



$$w = w_1 + w_2 \quad \left[\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right]$$

$$\frac{w_1}{w_2} = \text{const.}$$

$$S = \frac{w_1}{w_1 + w_2} \approx \frac{d_i^2}{d_c^2}$$

Rys. 13.17. Model optymalnego wykorzystania kolumny preparatywnej w warunkach nieskończonej średnicy z ograniczeniem penetracji przez substancje eluowane strefy przyściennej w kolumnie o grubości "i".

Na rys. 13.15 zilustrowano wpływ profilu przepływu cieczy w warstwie wypełnienia kolumny na szerokość i kształt pików chromatograficznych otrzymywanych na wylocie z kolumny. Widać, jak zasadnicze znaczenie ma takie wypełnienie kolumny, aby profil prędkości przepływu cieczy w całym przekroju poprzecznym kolumny i wzdłuż całej długości wypełnienia kolumny był płaski, tzn., "łokowy", a także taki sposób wprowadzania strefy dozowanej do kolumny, aby już na początku nie było zniekształcenia, którego już nie można zmienić w czasie trwania elucji.

Można stwierdzić, że w praktyce, większość niepowodzeń preparatywnego zastosowania chromatografii cieczowej jest spowodowane nieumiejętnością zapewnienia łokowego profilu przepływu eluentu w kolumnie oraz stabilności mechanicznej wypełnienia kolumny.

Nie opanowany do końca problem stanowi m.in. występowanie nie wyjaśnionego dotychczas w pełni, efektu tzw. "ogonowania" pików przy linii bazowej (przy "podstawie" pików po stronie zstępującej), w przypadku większości komercyjnych kolumn preparatywnych HPLC, wypełnionych metodami "na mokro". Tego typu zniekształcenie pików skutkuje otrzymywaniem mniej czystych substancji, jak by to było możliwe, gdyby efektu tego nie było (98,5% zamiast 99,99%).

Na rys. 13.16. i 13.17. zilustrowano ten problem oraz pokazano, że najbardziej efektywnym sposobem uniknięcia jego skutków, jest stosowanie kolumny preparatywnej HPLC, w warunkach tzw. nieskończonej średnicy, zaproponowanej przed laty przez J.H.Knoxa. Wiąże się

to ze zmniejszeniem wydajności rozdzielania, ale -może być ono, tym mniejsze, im większa jest średnica kolumny i im mniejsza jest wielkość ziaren wypełnienia.

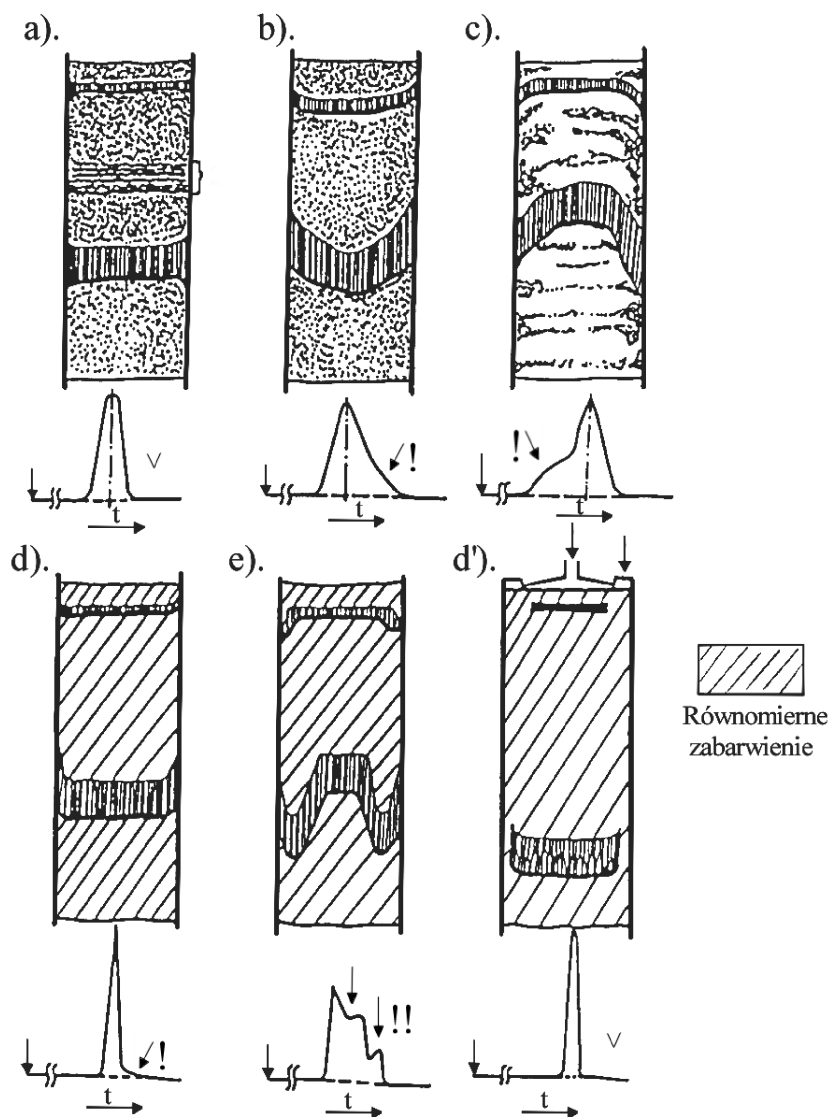
W przypadku wypełnień o wielkości ziaren ponad ok. 25 mikrometrów, kolumny można napępiać na sucho, stosując, np. metodę udarową. (Udary o bardzo niewielkiej intensywności są bardziej korzystne od intensywnych).

W przypadku stosowania wypełnień o ziarnach poniżej ok. 25 mikrometrów, nie można w sposób zadowalający wypełnić kolumn chromatograficznych metodami "na sucho" i konieczne jest stosowanie metod "na mokro" z wykorzystaniem zawiesiny wypełnienia w odpowiednio dobranej cieczy. Często stosuje się pompowanie cieczy, albo jej wytłaczanie za pomocą tłoka, tworząc wypełnienie kolumny w czasie filtracji złoza, narastającego na powierzchni dolnej głowicy odbiorczej kolumny, albo pompując zawiesinę w kierunku ku górze, z zastosowaniem górnej głowicy umieszczonej w kolumnie.

Na rys. 13.18 przedstawiono przykłady wyników badania związku między profilem przepływu cieczy w preparatywnej kolumnie do chromatografii cieczowej, warunkami wypełnienia kolumny i występowaniem tzw. efektu auto-segregacji ziaren wypełnienia kolumny pod względem wielkości. Widać, że także wówczas, gdy nie występuje auto-segregacja ziaren pod względem wielkości, może mieć miejsce nie-tłokowy profil przepływu cieczy w kolumnie i zniekształcenie pików chromatograficznych, a w konsekwencji zmniejszenie wydajności kolumny i czystości otrzymywanych substancji. Widać też, że przyczyną efektu "ogonowania" pików w przypadku kolumn preparatywnych HPLC, wypełnionych "na mokro" nie jest zjawisko auto-segregacji" ziaren wypełnienia w kolumnie. Widać również, że stosowanie warunków nieskończonej średnicy może skutkować otrzymywaniem czystych substancji tylko wtedy, gdy przyczyną problemu jest "ogonowanie" pików.

Na rys. 13.19 pokazano schematycznie, kilka alternatywnych sposobów wypełniania "na mokro" kolumn preparatywnych HPLC. Warto zwrócić uwagę na metodę pokazaną na rys. 19b, nie tyle dlatego, że jest oryginalna i autor nie spotkał w literaturze propozycji jej stosowania, ale przede wszystkim, dlatego, że jest prosta w realizacji, bardzo skuteczna w praktyce i może zostać zastosowana w każdym laboratorium, które ma możliwość wykonania w warsztacie mechanicznym kilku prostych metalowych elementów oraz posiada jakąkolwiek pompę, posiadającą ograniczenie maksymalnego ciśnienia pompowania.

Izolacja w postaci krystalicznej substancji rozdzielonych zastosowaniem chromatografii cieczowej jest wykonywana z wykorzystaniem takich metod, jak: odparowywanie próżniowe, liofilizacja, krystalizacja i inne.



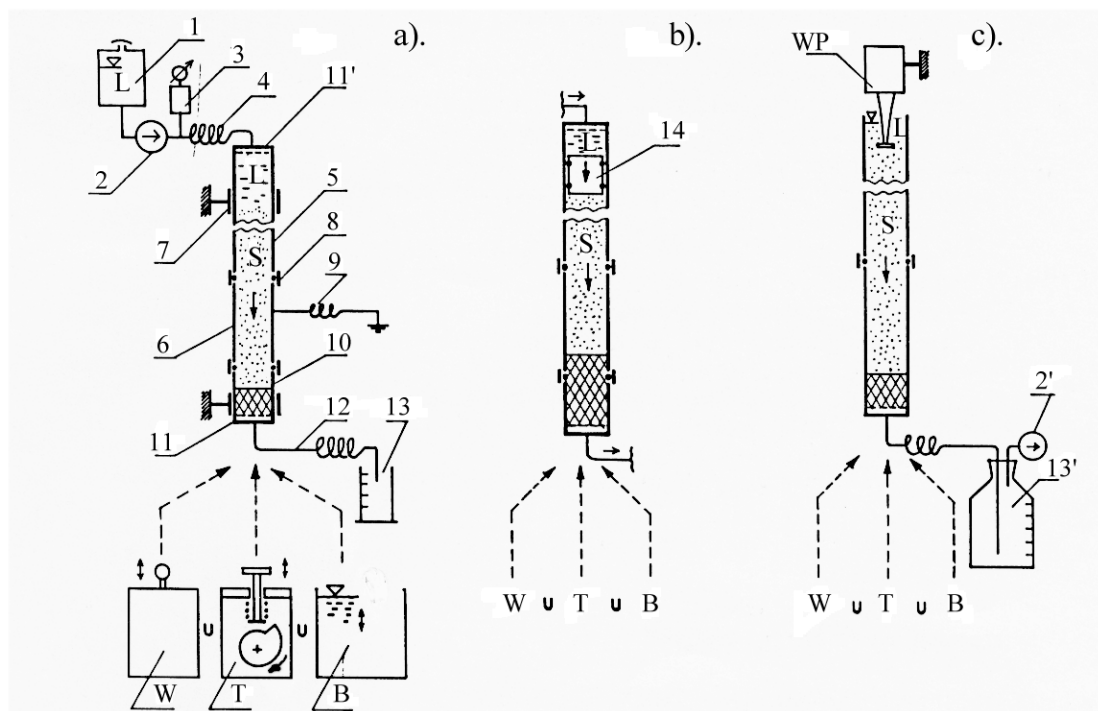
Rys. 13.18. Przykłady reprezentatywnych wyników uzyskanych podczas doboru optymalnych warunków wypełnienia kolumn preparacyjnych o średnicy 32 - 52 mm, wykonanych z zastosowaniem mieszaniny dwóch różnobarwnych frakcji żelu krzemionkowego o zakresie wielkości ziaren 22 do 45 μm (frakcja bezbarwna: 22 do 35 μm i frakcja zabarwiona: 30 do 45 μm) z uwzględnieniem kształtów stref barwnika Sudan I "zatrzymanego" w przekroju poprzecznym wypełnienia kolumny oraz odpowiadające tym kolumnom kształty pików chromatograficznych na chromatogramach testowych. Warunki wypełniania kolumn:

A, B, C - wypełnianie na sucho metodą udarową z równomiernym doprowadzeniem sorbentu do kolumny podczas wypełniania w warunkach, odpowiednio: A - optymalnych (prędkość narostu złoża podczas wypełniania (u_r - ok. 1 cm/min) - cyfrą "1" oznaczono wygląd przekroju wypełnienia obserwowany również niekiedy w optymalnie wypełnionej kolumnie),

B - przy zbyt szybkim doprowadzaniu sorbentu do kolumny (u_r - ok. 3 cm/min),

C - przy zbyt powolnym doprowadzaniu sorbentu do kolumny (u_r - ok. 0,22 cm/min),

D, D', E - wypełnianie kolumny na mokro, odpowiednio: metodą filtracyjną lub tłokową w warunkach optymalnych (przykłady D, D') i sedimentacyjno-wibracyjną (przykład E), (w przypadku D' zastosowano głowicę dystrybucyjną zapewniającą realizację warunków nieskończonej średnicy w kolumnie ($S=50\%$) wypełnionej w tych samych warunkach jak w przykładzie D). Długości warstwy wypełnienia w badanych kolumnach: 12 - 17 cm.



Rys. 13.19. Zestawienie schematów urządzeń do wypełnienia kolumn preparatywnych HPLC i MPLC na mokro, metodami "kombinowanymi"

- a) Kombinacja metody zawiesinowej z wibracjami lub udarowaniem zespołu kolumna - zbiornik z zawiesiną
- b) Kombinacja metody dynamicznej kompresji aksjalnej z zastosowaniem "pływającego" tłoka z wibracjami lub udarowaniem
- c) Udarowanie albo wibrowanie zespołu kolumna - zbiornik z zawiesiną, albo wykorzystanie wibratora pogrążalnego - z jednoczesnym zasysaniem cieczy tworzącej zawiesinę

Elementy 1-13 powtarzają się na rysunku b w całości, natomiast na rysunku c nie stosowano elementów 1-4 oraz 10 i głowicy górnej 11.

Oznaczenia:

1 - zbiornik z cieczą konsolidującą "L", 2 - pompa tłokowa, ($w = const = 0-1 \text{ l/min}$ lub $P = const: 0-300 \text{ bar}$), 3 - zawiesina "S", 6 - kolumna, 7- uchwyt suwliwy, 8 - łącznik i uszczelnienie, 9 - kabel uziemiający, 10 - postkolumna wstępnie częściowo wypełniona na sucho ($dp=60 \mu\text{m}$), 11, 11' - głowice wylotowa i wlotowa, 12 - przewód wlotowy (rurka), 13, 13' - cylinder miarowy lub zbiornik próżniowy, 14 - "pływający tłok"

W - wzbudnik wibracji, T - urządzenie udarowania kolumny, B - łaźnia ultradźwiękowa, WP - pogrążalny wzbudnik ultradźwiękowy

POSTĘPOWANIE W PRZYPADKU WYMIANY ELUENTU / KOLUMNY NIEKTÓRE PRZYCZYNY NIEPRAWIDŁOWEJ PRACY CHROMATOGRAFU I SPOSOBY ICH USUWANIA

Marian Kamiński

1. ZASADY OGOLNE

Ten sam aparat chromatograficzny jest bardzo często używany do wykonywania bardzo różnych oznaczeń z wykorzystaniem różnych metod analitycznych. Inna metoda oznaczania wymaga, często, innego składu eluentu, albo innego programu elucji, a nierzadko innej kolumny i eluentu, albo tylko innego eluentu, a tej samej kolumny. W konsekwencji, wymiana eluentu i kolumny, albo eluentu lub kolumny jest częstą koniecznością w HPLC. Zmiana rodzaju układu chromatograficznego jest szczególnie trudna, bo wiąże się najczęściej z koniecznością zastosowania nowego eluentu, który nie rozpuszcza się w poprzednio używanym (np. metanol - woda / *n*-heptan, a jednocześnie, nawet niewielkie ilości eluentu poprzedniego mogą szkodliwie oddziaływać z powierzchnią sorpcyjną nowej kolumny.

W celu uniknięcia uszkodzenia lub zniszczenia kolumny, a niekiedy nawet być może i aparatu należy przestrzegać następujących reguł ogólnych:

- Przez cały czas trwania wymiany eluentu kolumna powinna być odłączona i zastąpiona **łącznikiem** (dwójnikiem). Kolejna kolumna potrzebna do wykonania oznaczeń, powinna zostać przyłączona w miejsce dwójnika dopiero po upewnieniu się, że cały aparat został poprawnie przepłukany i zawiera eluent, który aktualnie będzie wykorzystywany do analizy. Zawór dozujący w pozycji powinien być w pozycji "inject".
- Jeżeli, eluent poprzedni i następny **wzajemnie się nie mieszają**, a szczególnie **gdy stosowane są roztwory buforowe, lub eluenty zawierające substancje będące w stanie czystym fazą stałą**, należy upewnić się, że kolejna ciecz pompowana przez aparat nie spowoduje wytrącenia się stałego osadu wewnątrz chromatografu, ani powstania emulsji. W takich przypadkach należy zastosować ciecz pośrednią, o której wiadomo, że jest dobrym rozpuszczalnikiem składników poprzedniego i następnego eluentu, np. wodę destylowaną, gdy ma być stosowany bufor zawierający sole nieorganiczne, albo tetrahydrofuran, aceton lub dioksan, gdy poprzedni i następny eluent są cieczami bez dodatku substancji stałych, ale wzajemnie się nie mieszają. Pomocne może być wprowadzenie strzykawką poprzedniego eluentu do następnego zawartego w próbówce w celu sprawdzenia czy nie powstaje osad lub emulsja;
- Zawsze należy każdą ze stosowanych cieczy pośrednich przepłukać także **kanal odniesienia** detektora, gdy detektor taki kanał posiada (np. w przypadku detektora refraktometrycznego);
- Gdy eluent zawiera substancje stałe, to dla ochrony uszczelek tłoczków pompy przed porysowaniem przez kryształki powstające w niewielkiej ilości na powierzchni tłoczków, należy co najmniej dwa razy dziennie dokonać płukania strefy wewnętrznej obu części głowic pompy poprzez specjalnie do tego celu przeznaczone otworki z zastosowaniem dobrego rozpuszczalnika substancji stałych zawartych w eluencie (najczęściej wody). Użyć strzykawki 10 ml do wprowadzenia cieczy i ligniny dla zebrania cieczy spod głowic pompy.
- W celu szybkiego przejścia od jednej cieczy do następnej bez strefy pośredniego stężenia obu cieczy, należy na chwilę wyjąć filtr ssawny z cieczy, która była poprzednio pompowana i zas-

sać pewną ilość powietrza do filtra ssawnego, po czym przewód z filtrem umieścić w następnym aktualnie pompowanej cieczy. Ciecz zawartą w przewodzie ssawnym i utworzoną strefę powietrza należy usunąć przy szybkim przepływie eluentu przez otwarty zawór bocznikujący, gdy pompa pracuje w trybie “purge”.

2. KOLEJNE ETAPY POSTĘPOWANIA W PRZYPADKU WYMIANY ELUENTU Z HEPTANU / HEKSANU NA WODNY ROZTWÓR BUFOROWY, ALBO ODWROTNIE

- Wyłączyć przepływ eluentu z zastosowaniem komputera, albo klawiatury pompy. W pierwszym przypadku kliknąć na ikonie pompy i potwierdzić “off”, w drugim przypadku nacisnąć na płycie czołowej pompy klawisz “pump”, tak, aby zgasła zielona dioda umieszczona powyżej.
- Odłączyć kolumnę i w jej miejsce przyłączyć szczelnie dwójnik, a zawór dozujący ustawić w pozycji “inject”.
- Otworzyć zawór bocznikujący pompy, zassać nieco powietrza do filtra ssawnego kanału, w którym ma nastąpić wymiana cieczy na inną (albo do filtrów ssawnych w kilku kanałach, w których wymieniamy ciecz). Umieścić filtr (filtry) w cieczy pośredniej (np. w acetonie) i włączyć przepływ eluentu za pomocą komputera (potwierdzając “on” po kliknięciu na ikonie pompy, albo naciskając przycisk “pump” na płycie czołowej pompy);
- Nacisnąć przycisk “purge” na płycie czołowej pompy i przepompować do pojemnika ścieków tyle cieczy, aż powietrze opuści odpowiedni przewód ssawny (przewody ssawne) oraz pompę i wyłączyć tryb “purge”.

Uwaga! *Pompa i przewody ssawne muszą być zawsze odpowietrzone, aby aparat mógł poprawnie pracować. Odpowietrzanie przewodów ssawnych w przypadku wykorzystywania przepływu eluentu przez zawory proporcjonujące wymaga kolejnego naciskania “A”, “B”, “C”, “D” na płycie czołowej pompy, gdy pracuje ona w opcji “manual” oraz “purge”. Na końcu trzeba wyłączyć tryb “purge” oraz nacisnąć przycisk “init” na płycie czołowej pompy.*

- Zamknąć zawór bocznikujący i przepompować przez cały aparat z detektorem (detektorami włącznie), co najmniej 5 ml cieczy pośredniej przy ok. 50 do 100% większym natężeniu przepływu, niż stosowany do rozdzielania. W końcowym etapie przemywania przemyć cieczą kanał odniesienia detektora, jeżeli detektor taki kanał posiada. W tym celu, w przypadku detektora refraktometrycznego, trzeba nacisnąć przycisk “purge” na płycie czołowej detektora (zaświeci się zielona dioda nad tym przyciskiem) i gdy przestaną świecić się czerwone diody oraz gdy pali się tylko jedna, najwyżej dwie diody “balansu”, a wartość poziomu sygnału ustaliła się - ponownie nacisnąć przycisk “purge” na płycie czołowej detektora RI, w celu przejścia do trybu pomiarowego.
- Następnie, tak samo postąpić w celu wypełnienia przewodu ssawnego, pompy i obu kanałów detektora (detektorów) docelowym eluentem.

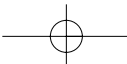
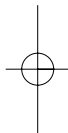
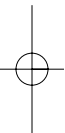
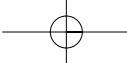
Uwaga! *Podczas pracy pomiarowej detektora refraktometrycznego zielona dioda “purge” nie może się świecić i nie może świecić się żadna czerwona dioda na płycie czołowej detektora. Powinna świecić się tylko jedna (środkowa) dioda “balansu” i sygnał detektora powinien być stały (może wahać się +/- 0.2 jednostki, albo zmieniać się systematycznie o +/- 0.2 jednostki na ok. 20 sekund. Dopóki ten stan nie zostanie osiągnięty, nie można dozować próbki i wykonywać oznaczenia. Do tego czasu musi trwać okres stabilizowania warunków pracy detektora refraktometrycznego. Należy zwrócić też uwagę, aby “polarity” było w położeniu właściwym dla stosowanej metody oznaczania (odpowiednia dioda świecąca powinna najczęściej świecić się w pozycji “+”).*

- Po przepłukaniu całego aparatu za pomocą świeżej porcji eluentu i po ustabilizowaniu się linii bazowej detektora (ów) zatrzymać pracę pompy, przyłączyć kolumnę w miejsce dwójni-

ka, uruchomić przepływ eluentu o takim składzie i z takim natężeniem przepływu, jaki jest potrzebny podczas dozowania najbliższej analizowanej próbki. Poczekać do ponownego ustabilizowania się linii bazowej detektora (ów) i przystąpić do wykonywania oznaczeń badanych próbek zgodnie z instrukcją konkretnej metody oznaczania.

3. OPIS GŁÓWNYCH PROBLEMÓW ZE STABILNĄ I POPRAWNĄ PRACĄ CHROMATOGRAFU CIECZOWEGO I SPOSOBY ICH USUNIĘCIA

Objawy	Przyczyny i sposoby usuwania problemu
Ciśnienie wskazywane przez wyświetlacz na płycie czołowej pompy waha się więcej niż +/- 2 bary, a zawór bocznikujący jest szczelnie zamknięty i nie widać zasysania powietrza do pompy.	<p>Przyczyna: chwilowe przyklejanie się kulek zaworu ssącego pompy do powierzchni gniazd.</p> <p>Należy wymontować zawór ssący z głowicy pompy i przeprowadzić oczyszczenie jego wnętrza z zastosowaniem płuczki ultradźwiękowej oraz odpowiednich cieczy rozpuszczających - dyspergujących mikro-zanieczyszczenia zawarte w zaworze (kolejno: aceton, woda, woda z detergentem, aceton) i ponownie zamontować zawór ssawny w głowicy pompy. Jeżeli to nie pomogło, należy dodatkowo zastosować płukanie ultradźwiękowe w tzw. "chromiance", albo w tzw. "wodzie królewskiej" (w tym ostatnim przypadku płukanie tylko rubinowych i szafirowych elementów zawieradła zaworu, a nie korpusu o uszczelkach, tzn. zawór trzeba uprzednio zdemontować nad naczyniem z wysokimi brzegami (aby nie stracić kulki), a po płukaniu ponownie zmontować, zwracając uwagę na wzajemne usytuowanie zespołu kulka - gniazdo (kulka po stronie błyszczącej płytki gniazda).</p>
Detektor UV, UV-VIS-DAD, fluorescencyjny nie daje się wyzerować w całym, albo w części zakresu pomiarowego, balans detektora RI nie daje się sprowadzić do jednej diody świecącej.	<p>Przyczyna: eluent o niedostatecznej czystości, albo - co gorzej - na powierzchni wewnętrznej naczynka przepływowego w detektorze wydzieliła się emulsja, albo depozyt substancji stałej.</p> <p>Należy wymieść eluent na inny - o wyższej czystości, a jeżeli to nie pomaga, przepłukać naczynko przepływowe odpowiedniego detektora kolejno: dichlorometanem, acetonem, wodą, acetonem, toluenem i powrócić do stosowanego eluentu. W razie potrzeby zastosować ciecz pośrednią. Jeżeli to nie pomaga zastosować dodatkowo płukanie 5% - owym kwasem azotowym.</p>
Ciśnienie wskazywane przez wyświetlacz na płycie czołowej pompy waha się więcej niż +/- 2 bary, a jednocześnie widać okresowe zasysanie małych banieczek z przewodu ssawnego do pompy.	<p>Przyczyna: zapowietrzony eluent, albo eluent o zbyt wysokiej prężności par, albo/i zatkany zanieczyszczeniami filtr ssawny pompy.</p> <p><i>(Uwaga! Eluent przed użyciem musi być przefiltrowany przez filtr 0,45 um, jeżeli nie ma pewności, że wykonał to producent, a także nie wolno dopuścić do powstania życia biologicznego w eluencie nietoksycznym dla bakterii i grzybów - stosować 0.5 mM azydek sodu)</i></p> <p>Przedmuchać filtr ssawny pompy sprężonym powietrzem w kierunku odwrotnym do kierunku przepływu cieczy, dodatkowo odpowietrzyć eluent i postawić go powyżej poziomu głowicy pompy.</p>



LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

- w języku angielskim

1. L.R Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, "Practical HPLC Method Development", Wiley, New York, NY, 1998.,
2. J. Cazes (ed), Encyclopedia of Chromatography", Marcel Dekker, New, York, 2001.,
3. P. Jandera, J. Churacek, "Gradient Elution in Column Liquid Chromatography", Elsevier, Amsterdam, 1985.,
4. O. Mikes, "HPLC, of Biopolimers and Biooligomers", Elsevier, Amsterdam, 1988.,
5. J.W. Dolan, L.R. Snyder, "Troubleshooting LC Systems", Humana Press, Clifton, New York, 1989.,
6. K. Hostettman, A. Morston, "Preparative Chromatography - Techniques, Applications", Springer Verlag, 1998.,
7. H. Jork, W. Funk, W. Fischer, H. Wimmer, "Thin-Layer Chromatography - Reagents and Detection Methods", vol. 1a - *Physical and Chemical Detection Methods: Fundamentals, Reagents*, VCH Publishers, Weinheim, 1990.,
8. D. M. Ruthven, "Encyclopedia of Separation Technology", vol. 1-2, J. Willey. 1997.,
9. A.S. Grandisson (ed), M.J. Lewis (ed), "Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries - *Principles and Applications*", Woodhoed Publ. Ltd., Cambridge, England.
10. V. R. Mayer, Practical High-Performace Liquid Chromatography, John Wiley and Sons, Chichester, 1994

- w języku polskim

1. Z. Witkiewicz, "Podstawy chromatografii", wyd. II, a szczególnie III, WNT, Warszawa, odpowiednio: 1992, 2000.,
2. D.Berek, M.Dressler, M.Kubin, K.Marcinka "Chromatografia żelowa", PWN, Warszawa, 1989.
3. R Rosset, H. Kołodziejczyk, "Współczesna chromatografia cieczowa - ćwiczenia i zadania", PWN, Warszawa 2001.,
4. B. Walczak, J, Śliwiok, "Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), Skrypty Uniwersytetu Śląskiego, *skrypt nr 429*, Uniwersytet Śląski, Katowice 1989.,
5. Z. Witkiewicz, "Nowe kierunki w chromatografii", WNT, Warszawa 1988.,
6. M. Kamiński, "Problemy stosowania kolumnowej chromatografii cieczowej, jako metody otrzymania substancji", rozprawa habilitacyjna, Politechnika Gdańska, Gdańsk, 1991.,

O znaczeniu historycznym, ale opisane zasady teoretyczne są nadal aktualne i przydatne dla zrozumienia zjawisk:

7. R.J. Hamilton, P.A. Sewell, "Wysokosprawna chromatografia cieczowa", PWN, 1982.,
8. J.S. Kowalczyk (ed.), "Podstawy podziałowej i adsorpcyjnej chromatografii cieczowej", Wrocław, Warszawa, Kraków, Gdańsk, Zakład Narodowy im. Ossolińskich, Wydawnictwo Polskiej Akademii Nauk, Ossolineum, 1973.
9. A. Zlatkis (ed), V. Pretorius, (ed), "Preparatywna chromatografia gazowa", WNT, Warszawa 1975.
10. L. R. Snyder, Prioncipless of Adsorption Chromatography, Mercel Dekker, Nowy York, 1968
11. E. Stahl, Thin-Layer Chromatography - A Laboratory Handbook, Springer, Berlin, wydanie drugie 1969.
12. J. J. Kirkland (praca zbiorowa), Współczesna chromatografia cieczowa, PWN, Warszawa, 1976



**Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
ul. G. Narutowicza 11/12
80-952 Gdańsk**



**Centrum Doskonałości
Analityki i Monitoringu Środowiska
<http://www.pg.gda.pl/chem/CEEAM/>**

ISBN: 83-919081-5-1