



UNIwersytet Gdański
Wydział Chemii
Katedra Analizy Środowiska

WYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA

(HPLC)

Gdańsk, 2007

1. Wprowadzenie do chromatografii cieczowej

Chromatografia jest fizykochemiczną metodą rozdzielania składników jednorodnych mieszanin w wyniku ich różnego podziału między fazę ruchomą i nieruchomą układu chromatograficznego.

Fazą ruchomą może być gaz, ciecz lub płyn w stanie nadkrytycznym, a fazą nieruchomą (stacjonarną) ciało stałe lub ciecz.

Chromatografia, początkowo niedoceniana, należy obecnie do najbardziej rozpowszechnionych metod instrumentalnych w chemii analitycznej, a w analizie związków organicznych zajmuje pozycję lidera (minimum 100 000 związków organicznych). Znanych jest wiele jej wariantów, a bardzo istotne jest to, iż jako nieliczna metoda, umożliwia uzyskanie wyników jakościowych i ilościowych dla wielu oznaczanych substancji w jednym cyklu pomiarowym, nawet przy niskich stężeniach i w obecności innych związków.

Klasyfikacji metod chromatograficznych można dokonać według kilku kryteriów. Jednym z nich jest:

a) Stan skupienia fazy ruchomej

W ten sposób wyróżnić można chromatografię:

- gazową (ang. *gas chromatography*, GC),
- cieczową (ang. *liquid chromatography*, LC),
- w fazie nadkrytycznej (ang. *supercritical fluid chromatography*, SFC).

b) Stan skupienia fazy stacjonarnej

Fazą stacjonarną może być ciecz na nośniku lub ciało stałe. Stąd otrzymujemy następujące układy chromatograficzne:

Faza ruchoma	faza stacjonarna	
• gaz	ciecz	(ang. <i>gas-liquid chromatography</i> , GLC)
• ciecz	ciecz	(ang. <i>liquid-liquid chromatography</i> , LLC)
• gaz	ciało stałe	(ang. <i>gas-solid chromatography</i> , GSC)
• ciecz	ciało stałe	(ang. <i>liquid-solid chromatography</i> , LSC).

Ciało stałe może mieć różny charakter (być adsorbentem, nośnikiem modyfikatora chemicznego, wymiennicem jonowym lub sitem molekularnym). Wynikają z tego nowe podziały związane z naturą zjawisk stanowiących podstawę procesu chromatograficznego.

c) Natura zjawisk będących podstawą procesu chromatograficznego

Chromatografię dzielimy na :

- **adsorpcyjną**, w której rozdzielanie odbywa się w wyniku różnego powinowactwa adsorpcyjnego składników mieszaniny do odpowiednio dobranej powierzchni fazy stacjonarnej, zwanej adsorbentem,
- **podziałową**, w której rozdzielanie związane jest z różnymi wartościami współczynnika podziału składników mieszaniny między dwie nie mieszające się fazy, z których jedną jest faza stacjonarna (ciecz na nośniku), a drugą faza ruchoma (gaz, ciecz lub płyn w stanie nadkrytycznym),
- **jonowymienną**, w której podstawą rozdzielania są różnice w sile oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy jonami z roztworu a jonami związanymi z fazą stacjonarną (zwaną jonitem). Jonity są to nierozpuszczalne substancje wielkocząsteczkowe o budowie jonowej, zdolne do wymiany jonów zgodnie z równaniami reakcji:
$$(MR^-Y^+)_j + (X^+)_r \rightarrow (MR^-X^+)_j + (Y^+)_r$$
$$(MR^+Y^-)_j + (X^-)_r \rightarrow (MR^+X^-)_j + (Y^-)_r$$
Indeks "j" oznacza fazę jonitu, a indeks "r" fazę roztworu. Technikę tę stosuje się przede wszystkim do rozdziału związków jonowych, zjonizowanych lub ulegających jonizacji, a także dla związków niejonowych, po wcześniejszym przeprowadzeniu ich w kompleksy jonowe,
- **sitową**, zwaną inaczej chromatografią żelową, sączeniem molekularnym lub chromatografią wykluczania, w której o rozdzielaniu składników mieszaniny decydują rozmiary cząsteczek.

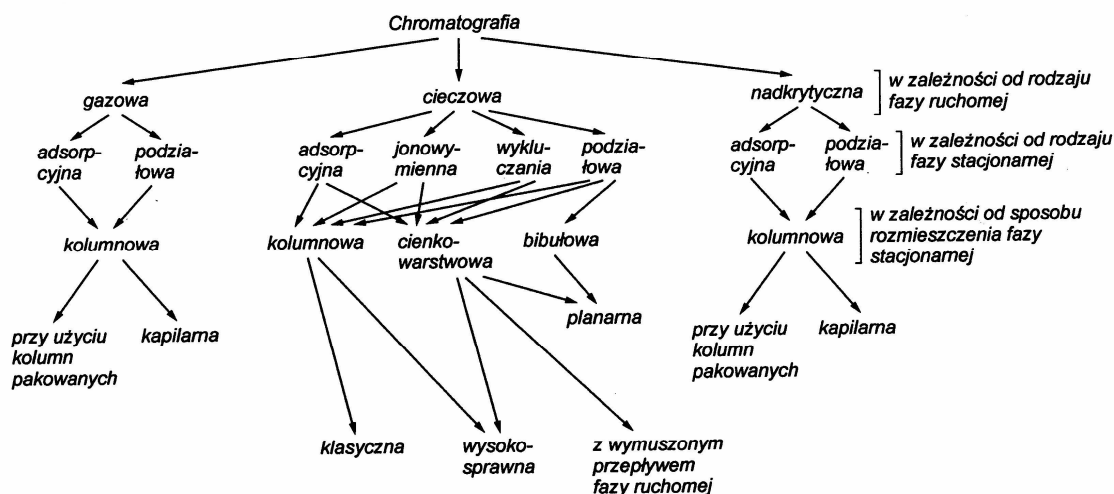
d) Techniki eksperymentalne

Proces chromatografowania prowadzić można techniką:

- **kolumnową**, stosowaną we wszystkich metodach chromatograficznych,
- **planarną**, możliwą jedynie w chromatografii cieczą, którą podzielić można dodatkowo na chromatografię bibułową i cienkowarstwową.

W zależności od celu przeprowadzanej analizy, wymienione techniki eksperymentalne można dodatkowo podzielić na: **analityczne** (identyfikacja analitów, „mała” ilość próbki) i **preparatywne** (wyodrębnianie poszczególnych składników).

Schemat klasyfikacji technik chromatograficznych przedstawiono na Rys. 1.



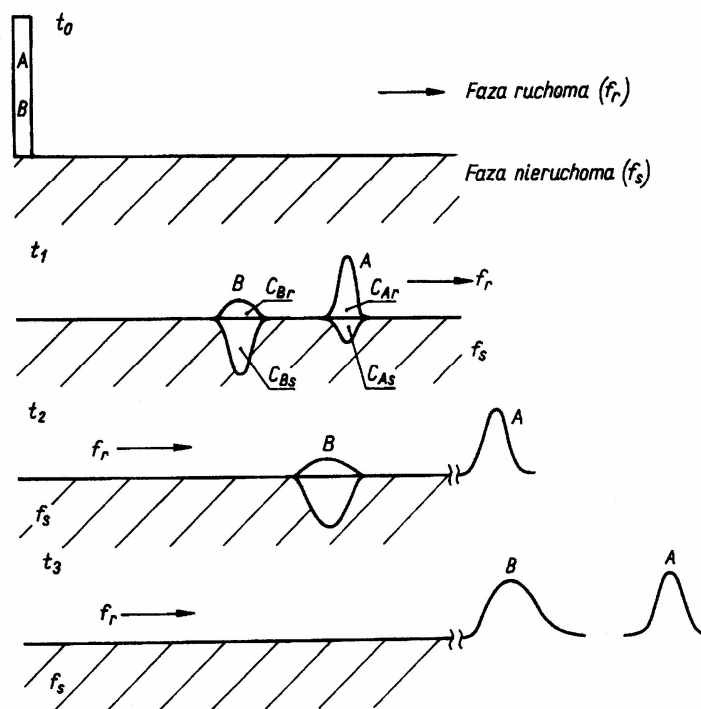
Rys. 1. Klasyfikacja technik chromatograficznych (Witkiewicz Z., Podstawy Chromatografii, WNT, Warszawa, 2005)

Na Rys. 2 przedstawiono ideę rozdzielania chromatograficznego mieszaniny składającej się z dwóch składników: A i B. Mieszaninę tę wprowadzono do fazy ruchomej w czasie, który przyjęto za zerowy i od którego rozpoczął się proces rozdzielania składników w wyniku różnego sposobu ich oddziaływania z fazą ruchomą i nieruchomą. Załóżmy, że składnik A oddziałuje z fazą nieruchomą znacznie słabiej niż składnik B. Częsteczki obu substancji dzielą się między obie fazy w różnych stosunkach, charakterystycznych dla tych składników i opisanych przez stałe podziału K_c .

$$\text{Dla składnika A} \quad K_{cA} = \frac{c_{As}}{c_{Am}} \quad (1)$$

$$\text{Dla składnika B} \quad K_{cB} = \frac{c_{Bs}}{c_{Bm}} \quad (2)$$

W obu przypadkach c oznacza stężenie składnika w fazie nieruchomej (s) i w fazie ruchomej (m). Między liczbą cząsteczek związków chromatografowanych, obecnych w fazie ruchomej i nieruchomej, ustala się równowaga dynamiczna z wielokrotnym przechodzeniem tych cząsteczek z jednej fazy do drugiej. Ich przenoszenie wzdłuż układu chromatograficznego jest możliwe tylko wtedy, gdy znajdują się w fazie ruchomej.



Rys. 2. Schemat rozdzielania chromatograficznego mieszaniny składającej się z dwóch składników A i B, $t=0$ - moment wprowadzenia mieszaniny do układu chromatograficznego, t_1 , t_2 - wybrane czasy z ogólnego czasu przebiegu rozdzielania chromatograficznego, t_3 - czas zakończenia rozdzielania składników mieszaniny, C - stężenie składnika (A lub B) w fazie ruchomej (r) lub nieruchomej (s) (Witkiewicz Z., Podstawy Chromatografii, WNT, Warszawa, 2005).

W czasie t_1 (Rys. 2) widoczny jest różny podział składników między obie fazy układu chromatograficznego i rozdzielenie tych składników. To rozdzielenie jest możliwe tylko wtedy, gdy stałe podziału tych składników różnią się ($K_A \neq K_B$).

Z Rys. 2 wynika, że w czasie t_2 jeden ze składników (A) został już wyniesiony z układu chromatograficznego i znajduje się w fazie ruchomej, a w czasie t_3 oba składniki (A i B) są już w fazie ruchomej poza zasięgiem oddziaływania fazy stacjonarnej. Pasma stężeniowe składników po przejściu układu chromatograficznego różnią się od pasma początkowego mieszaniny. Różnica polega na poszerzeniu tych pasm i na przyjęciu kształtu krzywej Gaussa. Pasma te noszą nazwę pików chromatograficznych. Na Rys. 2 widać, że pik składnika B jest szerszy niż pik składnika A. Jest on wynikiem większego rozmycia dyfuzyjnego składnika B, który dłużej przebywał w układzie chromatograficznym.

2. Wielkości chromatograficzne charakterystyczne dla procesu rozdzielania

Parametry retencji

Całkowitym czasem retencji t_R nazywamy czas jaki upływa między wprowadzeniem próbki a pojawieniem się maksimum pików rozpatrywanego składnika próbki (Rys. 3.). Całkowity czas retencji jest sumą czasu, w którym substancja oddziałuje z wypełnieniem kolumny i czasu potrzebnego do przejścia tej substancji od dozownika do detektora, gdyby takiego oddziaływania nie było.

Składnik niezatrzymywany przez fazę stacjonarną pojawia się w wycieku po czasie t_M , nazywanym **czasem retencji substancji niezatrzymywanej** lub **zerowym czasem retencji**. Czas retencji substancji niezatrzymywanej można łatwo wyznaczyć przez zadozowanie do kolumny substancji, która nie oddziałuje z fazą stacjonarną lub oddziałuje z nią bardzo słabo, np. gdy fazą ruchomą jest *n*-heksan do wyznaczenia zerowego czasu retencji t_M może posłużyć *n*-heptan lub *n*-pentan.

Czas retencji związany z przebywaniem substancji w kolumnie tylko w wyniku oddziaływania tej substancji z wypełnieniem kolumny nazywany jest **zredukowanym czasem retencji t'_R** :

$$t'_R = t_R - t_M \quad (3)$$

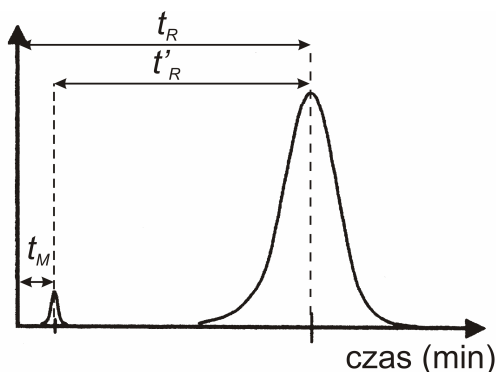
W niektórych przypadkach korzystne jest posługiwanie się objętościami retencji. Otrzymuje się je, mnożąc czas retencji [min] przez objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej (F_c) [ml/min]:

$$\text{całkowita objętość retencji} \quad V_R = t_R \cdot F_c \quad (4),$$

$$\text{objętość retencji substancji niezatrzymywanej} \quad V_M = t_M \cdot F_c \quad (5),$$

$$\text{zredukowana objętość retencji} \quad V'_R = t'_R \cdot F_c \quad (6).$$

Objętość retencji jest wielkością, która w odróżnieniu od czasu retencji nie zależy od liniowej prędkości przepływu fazy ruchomej u [cm/min].



Rys. 3. Chromatogram elucyjny.

Współczynnik retencji k , jest to stosunek ilości substancji w fazie stacjonarnej do ilości substancji w fazie ruchomej. Jeśli c_S i c_M oznaczają odpowiednio równowagowe stężenia substancji (wyrażone w molach) w fazie stacjonarnej i ruchomej a V_S i V_M są objętościami tych faz w kolumnie, to

$$k = \frac{c_S \cdot V_S}{c_M \cdot V_M} = K \frac{V_S}{V_M} \quad (7)$$

Wielkość $K = c_S / c_M$ nazywa się stałą podziału substancji między dwie fazy.

Współczynnik retencji k można łatwo obliczyć, wykorzystując zmierzone wartości retencji:

$$k = (t_R - t_M) / t_M = t'_R / t_M = (V_R - V_M) / V_M = V'_R / V_M \quad (8)$$

Im większa jest wartość współczynnika retencji, tym silniej substancja oddziałuje z wypełnieniem kolumny. Z powyższej zależności wynika, że:

$$t_R = t_M(1 + k) \quad (9), \quad \text{natomiast } V_R = V_M(1 + k) \quad (10)$$

Moc fazy ruchomej powinna być tak dobrana, aby wartości k znalazły się w przedziale 0,5-10. Gdy oznaczany składnik występuje w małym stężeniu, należy, jeśli to możliwe, ustalić dla niego wartość k nieco poniżej 1 (uzyskujemy wówczas maksymalną czułość). Jeśli $k > 10$ wydłuża się czas analizy, a nie polepsza się stopień rozdzielania.

Wielkość, którą można łatwo wyznaczyć, a która zależy od rodzaju rozdzielanych substancji i rodzaju fazy ruchomej jest **retencja względna (r)**. Określa się ją jako stosunek retencji dwóch substancji chromatografowanych, z których jedna jest wzorcem (st), a retencja drugiej (i) jest zbliżona do retencji wzorca:

$$r = t'_{Ri} / t'_{Rst} = k_i / k_{st} \quad (11)$$

Wartość r może być większa lub mniejsza od 1. Im bardziej r jest różne od 1, tym lepiej dwie substancje rozdzielają się.

Współczynnik rozdzielania

Współczynnik rozdzielania (zwany także współczynnikiem selektywności) jest miarą rozdzielania dwóch sąsiednich pików na chromatogramie, dla których $t'_{R2} > t'_{R1}$:

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} \quad (12)$$

Współczynnik rozdzielania ma zawsze wartość większą od 1.

Sprawność kolumn

Sprawność kolumn chromatograficznych (która decyduje o tym czy pik chromatograficzny jest ostry czy też rozmyty) charakteryzuje się wysokością półek H (dokładnie wysokością równoważną półce WRP), tzn. najmniejszą długością odcinka kolumny, w której osiąga się stan równowagi między stężeniami substancji chromatografowanej w fazie ruchomej i nieruchomej.

Wysokość pólki zdefiniowana jest za pomocą wzoru:

$$H = \frac{L}{N} \quad (13)$$

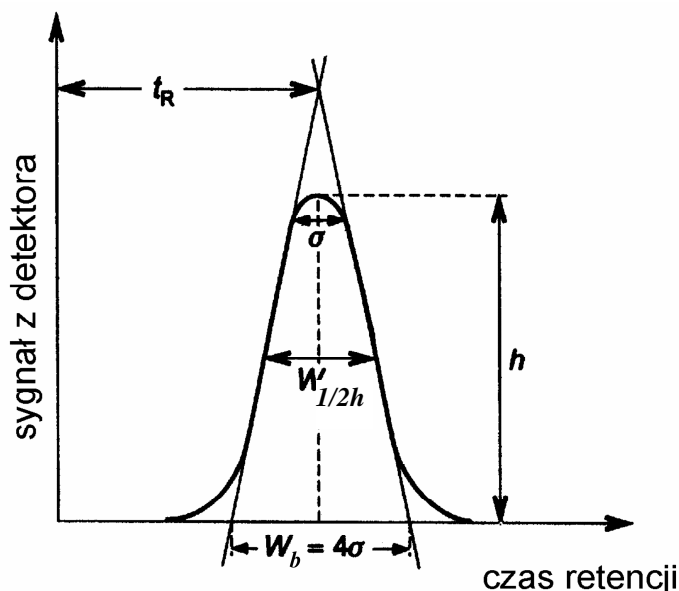
gdzie: N - liczba póltek, L – długość kolumny.

Im wartość H ($WRPT$) jest mniejsza, tym kolumna ma więcej póltek i jest sprawniejsza (przy optymalnej prędkości fazy ruchomej wartość H mieści się w przedziale 0,015–0,02 mm). Zależność między liczbą póltek i długością kolumny nie jest jednak proporcjonalna. Oznacza to, że dwukrotny wzrost długości kolumny nie powoduje w niej dwukrotnego wzrostu liczby póltek.

Liczbę póltek w kolumnie (N) można wyznaczyć przy użyciu substancji testowej, której współczynnik retencji k mieści się w przedziale 5–10. Substancja testowa powinna dawać pik symetryczny, a przesuwanie się taśmy rejestratora lub czas komputerowej rejestracji pików powinien być tak dobrany, żeby szerokość pików miała kilkanaście milimetrów. W wyniku analizy chromatograficznej substancji testowej otrzymuje się chromatogram (Rys. 4.), z którego odczytuje się niezbędne dane:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2h}} \right)^2 \quad (14)$$

W dwu najczęściej stosowanych metodach wykorzystuje się szerokość pików przy podstawie, w_b , oraz szerokość pików w połowie wysokości ($w_{1/2h}$). Wartości t_R i w powinny być mierzone na chromatogramie i wyrażane w tych samych jednostkach - czasu lub długości.



Rys. 4. Szerokości piku gaussofskiego na różnych wysokościach, wykorzystywane do obliczania liczby póltek.

Selektywność fazy stacjonarnej i sprawność kolumny charakteryzowane są przez rozdzielczość pików. Rozdzielczość pików, R_s określona jest zależnością:

$$R_s = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (15)$$

w której w_{b1} i w_{b2} oznaczają szerokości pików przy podstawie.

Piki są tym lepiej rozdzielone, im wartość R_s jest większa, a rozdzielone są do linii podstawowej, gdy $R_s = 1,5$. Jeżeli $R_s = 1$, to piki o podobnej postawie są rozdzielone w około 96%.

Wielkości zredukowane

Wielkości zredukowane są to wielkości bezwymiarowe, które umożliwiają porównywanie kolumn napełnionych różnymi, pod względem rodzaju i rozmiarów cząstek, fazami stacjonarnymi, pracujących w różnych warunkach.

- Zredukowana długość kolumny

$$l = \frac{L}{d_p} \quad (16)$$

gdzie L - długość kolumny [m], d_p - średnica cząstek fazy stacjonarnej [m].

- Zredukowana wysokość półki

$$h = \frac{H}{d_p} = \frac{l}{N} \quad (17)$$

określa liczbę cząstek wypełnienia kolumnowego tworzących jedną półkę. Kolumna ma dobrą sprawność, gdy h charakteryzuje się wartością od 2 do 5.

- Zredukowana prędkość fazy ruchomej

$$v = \frac{ud_p}{D_M} \quad (18)$$

gdzie: u - prędkość liniowa fazy ruchomej [cm/min], D_M - współczynnik dyfuzji molekularnej substancji w fazie ruchomej.

3. Kinetyka wymiany

Równanie Knoksa

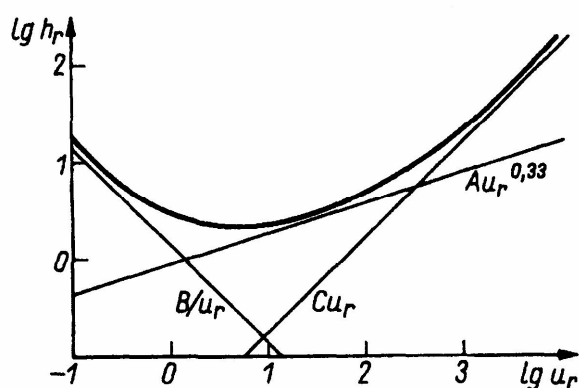
Jakość kolumn do chromatografii cieczowej zależy od różnych czynników, z których najważniejsze to jednorodność cząstek wypełnienia i struktura fazy chemicznej związanej z żelem krzemionkowym oraz liniowa prędkość fazy ruchomej [cm/min].

Zależność między zredukowaną wysokością półki i zredukowaną prędkością fazy ruchomej jest opisana równaniem Knoksa, analogicznym do równania van Deemtera w chromatografii gazowej:

$$h = A v^{1/3} + \frac{B}{v} + C v \quad (19)$$

gdzie $A \cdot v^{1/3}$ - udział dyfuzji wirowej, B/v - udział cząsteczkowej dyfuzji wzdłużnej, $C v$ - udział efektów przenoszenia masy w wartości zredukowanej wysokości półki, Rys. 5.

W przypadku kolumn dobrze napełnionych $A \approx 1$, B często wynosi około 2 a C jest zawarte między 0,01 i 0,2, ale może przyjmować większe wartości w przypadku faz stacjonarnych z polimerów szczepionych, polimerów cząsteczkowych lub wymiennicy jonowych.



Rys. 5. Wykres zależności zredukowanej wysokości półki h , od zredukowanej liniowej prędkości fazy ruchomej u oraz udział w niej poszczególnych członów równania Knoksa (Witkiewicz Z., Podstawy Chromatografii, WNT, Warszawa, 2005)

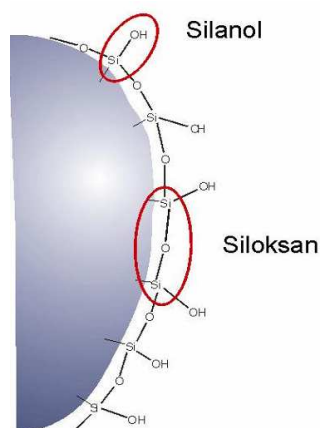
4. Wypełnienia kolumn

W wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *high performance liquid chromatography*, HPLC) stosuje się najczęściej wypełnienia o rozmiarze ziaren 5-10 μm . Drobnziarniste wypełnienia zapewniają krótką drogę dyfuzji cząsteczek substancji chromatografowanych do wnętrza ziaren i dzięki temu przy względnie dużych prędkościach fazy ruchomej uzyskuje się wysokie sprawności kolumn. Właściwości kinetyczne sorbentu są tym lepsze, im cieńsza jest grubość warstwy aktywnej. Można to uzyskać stosując **sorbenty o porowatej powierzchni na nieporowatym wnętrzu** (np. szklanym). Zaletą ich jest to, że można je łatwo otrzymywać w postaci cząstek o kształtach zbliżonych do kulistego. Rozmiary cząstek takich sorbentów są zwykle większe niż sorbentów objętościowo-porowatych, więc wypełnianie nimi kolumn jest stosunkowo łatwe, a ponadto stawiają one mały opór przepływowi fazy ruchomej. Kolumny napełnione sorbentami powierzchniowo-porowatymi mają jednak małą powierzchnię sorpcyjną i małą sprawność dlatego też obecnie stosowane są rzadko.

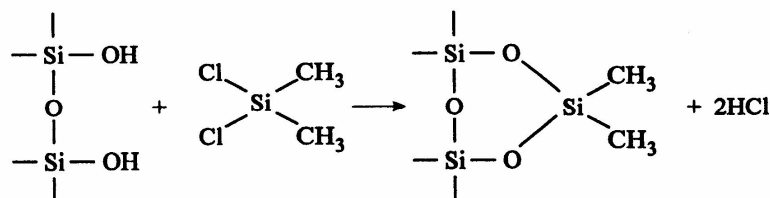
Powszechnie używane są **sorbenty objętościowo-porowate**. Wprawdzie stawiają one dość duży opór przepływowi fazy ruchomej, ale przy zastosowaniu odpowiedniej pompy, nie stanowi to problemu. Ciśnienie potrzebne do przetłaczania fazy ruchomej przez kolumnę wynosi 5-15 MPa (~50-150 atm). Wypełnienie sorbentami objętościowo-porowatymi zapewnia wysoką sprawność i dużą pojemność sorpcyjną kolumny. Stosowane są jako wypełnienia kolumn do rozdzielania preparatywnego.

W chromatografii adsorpcyjnej, prowadzonej w normalnym układzie faz, jako wypełnienie kolumn stosuje się przede wszystkim **żel krzemionkowy**. Bardzo rzadko używany jest tlenek glinu i inne polarne adsorbenty przydatne do pewnych, szczególnych przypadków rozdzielania. Żel krzemionkowy jest materiałem amorficznym, porowatym i jako wypełnienie kolumn ma dużo zalet: posiada uziarnienie o pożądanej wielkości i odpowiednich rozmiarach porów, określoną powierzchnię właściwą i dużą wytrzymałość mechaniczną. Żele krzemionkowe wytwarzane są przez wiele firm i noszą różne nazwy.

Chemiczna struktura powierzchni żelu krzemionkowego związana jest z obecnością grup silanolowych $\equiv \text{Si-O-H}$ lub siloksanowych $\equiv \text{Si-O-Si}\equiv$ i może być przedstawiona schematem:

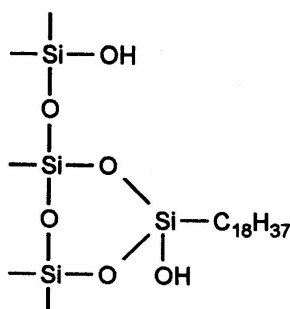


Obecnie dużo większe znaczenie niż żel krzemionkowy mają wypełnienia otrzymane w wyniku jego modyfikacji, polegającej na wiązaniu z aktywnymi grupami żelu krzemionkowego związków organicznych. Modyfikacja przebiega wg schematu:



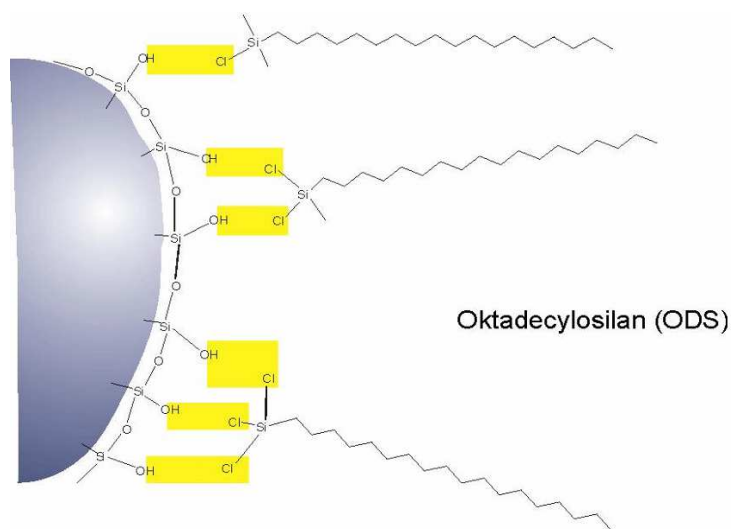
Zwykle z powierzchnią żelu krzemionkowego wiązane są łańcuchy alkilowe lub łańcuchy alkilowe zakończone grupami funkcyjnymi. Otrzymane w ten sposób wypełnienia nazywa się w skrócie **fazami związanymi**. Przyjmuje się, że mechanizm działania tych faz jest podziałowy. W rzeczywistości znaczny udział w procesie rozdzielania mają zjawiska adsorpcji.

Spośród faz związanych największe znaczenie mają fazy otrzymywane w wyniku modyfikacji żelu krzemionkowego alkilochlorosilanami. Związane z powierzchnią żelu krzemionkowego łańcuchy alkilowe nadają jego powierzchni charakter niepolarny (hydrofobowy). Polarność zmodyfikowanej powierzchni zależy od długości i ilości związanych z nią łańcuchów alkilowych. Największe znaczenie praktyczne posiadają te sorbenty, w których z powierzchnią żelu krzemionkowego związane są łańcuchy alkilowe zawierające 2, 8 lub 18 atomów węgla w cząsteczce. Im dłuższy jest łańcuch alkilowy i mniej wolnych grup hydroksylowych na powierzchni żelu, tym mniejsza jest jego polarność.



Rys. 6. Schemat struktury żelu krzemionkowego modyfikowanego oktadecylosilanem

Najpopularniejszą fazą niepolarną (hydrofobową) jest faza oktadecylosilanowa (ODS) o 18 atomach węgla w łańcuchu (C_{18}) (Rys. 6 i 7). Wykorzystywana jest ona do rozdzielania różnych związków – od niepolarnych do polarnych. Rzadziej stosowane są fazy zawierające w łańcuchu alkilowym 8 (C_8) lub 2 (C_2) atomy węgla. Czasami łańcuch alkilowy zakończony jest grupą fenyłową ($-C_6H_5$) lub difenyłową ($-(C_6H_5)_2$). Fazy związane hydrofobowe są podstawowymi wypełnieniami stosowanymi do chromatografii w **odwróconym układzie faz** (ang. *reversed phase*, RP).



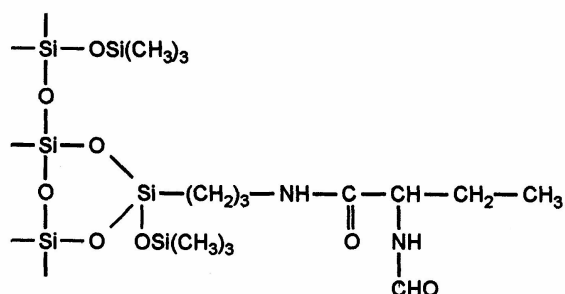
Rys. 7. Schemat sposobu modyfikacji żelu krzemionkowego grupami oktadecylosilanowymi

Stosowane są do rozdzielania substancji nierozpuszczalnych lub słabo rozpuszczalnych w wodzie. Należą do nich węglowodory aromatyczne, polimery, steroidy i alkaloidy.

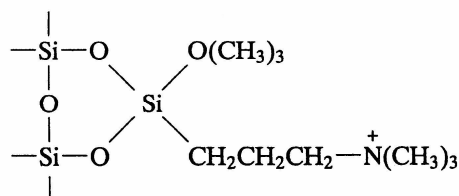
Inną grupę faz związanych stanowią hydrofilowe fazy stacjonarne o pośredniej polarności (żel krzemionkowy zmodyfikowany grupami propylocyjjanowymi $-(CH_2)_3CN$ lub propyloaminowymi $-(CH_2)_3NH_2$).

Fazy związane z silnie polarnymi grupami funkcyjnymi, podobnie jak żel krzemionkowy, stosowane są do chromatografii w **normalnym układzie faz (NP)**.

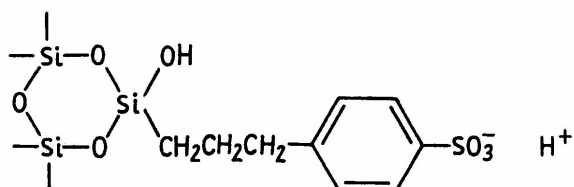
Do rozdzielania składników niektórych mieszanin potrzebne są specjalne wypełnienia kolumn. Grupę takich faz stacjonarnych, stosowanych do rozdzielania izomerów optycznie czynnych (mieszanin racemicznych) stanowią **żele krzemionkowe modyfikowane grupami chiralnymi** (optycznie czynnymi):



Do analizy związków jonowych stosuje się **wymieniacze jonowe**. Do rozdzielania w oparciu o wymianę anionów stosuje się wymieniacze anionowe, np. czwartorzędowe aminy,



a do rozdzielania na zasadzie wymiany kationów służą wymieniacze kationowe, np. aromatyczne kwasy sulfonowe.



W **chromatografii sitowej** (nazywaną często chromatografią żelową) jako fazy stacjonarne stosuje się żele polimerowe o określonych wielkościach porów. Umożliwia to rozdzielanie substancji w zależności od wielkości ich cząsteczek. Przykładem fazy stacjonarnej używanej w chromatografii sitowej są różne typy Sephadeksów i żele poliakryloamidowe (Bio-Gel-e) używane np. do rozdzielania związków wielkocząsteczkowych.

Do **chromatografii par jonowych** (jonowo-asocjacyjnej) stosuje się zwykle fazy ODS. Nie zaleca się jednak używać tej samej kolumny do chromatografii RP i do chromatografii par jonowych, ponieważ odczynniki używane w chromatografii par jonowych mogą powodować trwałe zmiany aktywności kolumny jeśli zastosujemy ją do chromatografii RP.

W ostatnich latach coraz większe znaczenie mają związane fazy stacjonarne nowej generacji, w których znajdują się fragmenty naturalnie występujące w układach biologicznych. Ich cechą charakterystyczną jest to, że umożliwiają rozdzielanie związków na podobnych zasadach jak na granicy faz w organizmach żywych, np. mózg – krew czy otoczenie oraz wewnątrz komórki. Fazy nowej generacji stosowane są głównie do analizy związków aktywnych biologicznie. Od zwykłych faz stacjonarnych różnią się tym, że różne związki chemiczne powiązane są z powierzchnią żelu krzemionkowego za pośrednictwem grupy aminopropylowej, specyficzne dla rozdzielanych agalitów.

5. Fazy ruchome

Fazy ruchome w chromatografii cieczowej stanowią pojedyncze rozpuszczalniki lub ich dwu- lub więcej składnikowe mieszaniny. Faza ruchoma, którą wprowadza się do kolumny, nosi nazwę **eluentu**. W kolumnie w skład fazy ruchomej oprócz eluentu mogą wchodzić także składniki rozdzielanej mieszaniny. Po rozdzieleniu składniki te są obecne w wycieku z kolumny, który nosi nazwę **eluatu**. Faza ruchoma w chromatografii cieczowej jest czynnikiem aktywnym a rodzaj i ilość rozpuszczalników ją stanowiących ma istotny wpływ na proces chromatografowania. Przy wyborze fazy ruchomej należy uwzględnić rodzaj i skład rozdzielanej mieszaniny, rodzaj zastosowanego wypełnienia kolumny oraz rodzaj detektora.

Przy doborze eluentu należy wziąć pod uwagę jego **siłę elucyjną**, którą można charakteryzować wielkością siły oddziaływania jego cząsteczek z powierzchnią adsorbentu. Przy chromatografii na adsorbentach polarnych siłę elucji wyznacza polarność i polaryzowalność cząsteczek eluentu. Siła ta jest tym większa, im większa jest polarność rozpuszczalnika. W przypadku adsorbentów niepolarnych polarność i polaryzowalność nie mają większego wpływu na siłę elucji rozpuszczalnika. Zależy ona natomiast od niespecyficznych sił van der Waalsa (oddziaływań dyspersyjnych). W tym przypadku siła elucji wzrasta ze wzrostem rozmiarów niepolarnych fragmentów cząsteczek rozpuszczalników.

W celu ułatwienia wyboru właściwego rozpuszczalnika jako eluentu rozpuszczalniki ułożono w szeregi eluotropowe. W przypadku polarnych faz stacjonarnych (np. żelu krzemionkowego lub tlenku glinu) rozpuszczalniki ułożone wg rosnącej mocy eluowania (miarą której są **indeksy polarności**) mają kolejność następującą: n-pentan < n-heksan < cykloheksan < tetrachlorek węgla < toluen < benzen < eter dietylowy < chloroform < dichlorometan <

tetrahydrofuran < dichloroetan < aceton < octan etylu < acetonitryl < pirydyna < etanol < metanol < woda < kwas octowy. Moc elucji przy chromatografowaniu na niepolarniej fazie stacjonarnej (np. węglowej **fazie odwróconej**) jest odwrotna.

Oprócz polarności ważną cechą eluentów jest ich lepkość. Wpływa ona na wysokość ciśnienia potrzebnego do wywołania odpowiedniego przepływu rozpuszczalnika przez kolumnę (należy stosować eluenty o małej lepkości).

Z innych właściwości fizykochemicznych eluentów mających wpływ na ich przydatność w chromatografii cieczowej wymienić należy współczynnik załamania światła (w przypadku zastosowania detektora refraktometrycznego) oraz granicę długości fali promieniowania elektromagnetycznego, przy której rozpuszczalnik staje się nieprzezroczysty dla nadfioletu (w przypadku stosowania absorpcyjnego detektora UV). W Tab. 1 zebrano podstawowe właściwości niektórych rozpuszczalników stosowanych jako eluenty w chromatografii adsorpcyjnej.

Tab. 1. Właściwości niektórych rozpuszczalników stosowanych w cieczowej chromatografii adsorpcyjnej

Rozpuszczalnik	Gęstość g/ml	Lepkość w temp. °C cP	Siła elucji ϵ	Współczynnik załamania światła	Graniczna długość pochłanianej fali UV, nm
n-Pentan	0,629	0,23	0,00	1,358	205
n-Heksan	0,659	0,33	0,01	1,375	195
Cykloheksan	0,779	1,00	0,04	1,427	205
Cyklopentan	0,740	0,47	0,05	1,406	210
1-Penten	0,640	0,24	0,08	1,371	215
Disiarczek węgla	1,260	0,37	0,15	1,626	380
Tetrachlorek węgla	1,590	0,97	0,18	1,466	265
m-Ksilen	0,864	0,62	0,26	1,500	290
Eter n-dipropylowy	0,747	0,37	0,28	1,368	220
2-Chloropropan	0,862	0,33	0,29	1,378	225
Toluen	0,867	0,59	0,29	1,496	285
1-Chlorobutan	0,873	0,35	0,30	1,397	225
Chlorobenzen	1,106	0,80	0,30	1,525	
Benzen	0,879	0,65	0,32	1,501	280
Bromoetan	1,460		0,37	1,424	
Eter diizopropylowy		0,33		1,368	
Eter dietylowy	0,713	0,23	0,38	1,353	220
Siarczek dietylowy	0,836	0,45	0,38	1,442	290
Chloroform	1,500	0,57	0,40	1,443	245
Dichlorometan		0,44	0,42	1,424	235
Tetrahydrofuran	0,880	0,85	0,45	1,408	215
1,2-Dichloroetan	1,250	0,79	0,49	1,445	225
Keton etylowo-metylowy	0,805	0,40	0,51	1,381	330
1-Nitropropan	1,001	0,84	0,53	1,400	380
Aceton	0,818	0,32	0,56	1,359	330
Dioksan	1,033	1,54	0,56	1,422	220
Octan etylu	0,901	0,45	0,58	1,370	260
Octan metylu	0,927	0,37	0,60	1,362	260
Pentanol	0,815	4,10	0,61	1,410	210
Anilina	1,022	4,40	0,62	1,586	
Dietyloamina	0,702	0,38	0,63	1,387	275
Nitrometan	1,138	0,67	0,64	1,394	380
Acetonitryl	0,782	0,37	0,65	1,344	190
Pirydyna	0,983	0,94	0,71	1,510	305

2-Metoksyetanol	0,965	1,72	0,74	1,401	220
2-Propanol	0,786	2,30	0,82	1,380	205
Etanol	0,789	1,20	0,88	1,361	205
Metanol	0,796	0,60	0,95	1,329	200
Kwas octowy	1,049	1,26	duża	1,372	
Woda	1,000	1,00	duża	1,330	

W **chromatografii sitowej** eluent powinien być obojętny zarówno w stosunku do substancji chromatografowanej, jak i do wypełnienia kolumny a jego jedynym zadaniem jest przenoszenie składników chromatografowanej mieszaniny wzdłuż kolumny. Gdy wypełnienie stanowią organiczne stacjonarne fazy hydrofobowe, wówczas fazami ruchomymi są rozpuszczalniki średnio polarne: dichlorometan, chloroform, toluen lub tetrahydrofuran. Natomiast, gdy wypełnienie kolumny stanowi polarny związek nieorganiczny, eluentem musi być woda, ewentualnie alkohole. Wodne fazy ruchome stosuje się także w przypadku faz stacjonarnych takich jak Sepharose i Sephadex.

Inne zadanie spełnia eluent w **chromatografii jonowej**. Fazy ruchome zawierają jony przeciwnego znaku (przeciwjony) względem ładunków elektrycznych na powierzchni wymienniczy jonowych. Substancje jonowe silnie dysocjujące, chromatografowane słabym eluentem, silnie oddziałują z wymienniczem i mają długie czasy retencji. Substancje chromatografowane słabo dysocjujące nie mogą wypierać jonów osadzonych na wymienniczu jonowym z elentu o silnym charakterze jonowym i mają bardzo krótkie czasy retencji. Siła jonowa jest najważniejszym czynnikiem charakteryzującym eluent w chromatografii jonowymiennej. Na właściwości elentu wpływa też pH i obecność modyfikatora organicznego.

Do rozdzielania składników niektórych mieszanin (zwłaszcza związków biologicznie czynnych) stosuje się **chromatografowanie z tworzeniem par jonowych**. W tym rodzaju chromatografii do elentu dodaje się substancję tworzącą jony hydrofobowe (np. $C_7H_{15}SO_3^-$) zwane przeciwjonami. Jony te oddziałując z jonami próbki tworzą neutralne pary jonowe, które podlegają zwykłemu rozdzielaniu chromatograficznemu w odwróconym układzie faz (RP). Wybór przeciwjonów zależy od rodzaju analizowanej próbki. Próbki zasadowe są zwykle analizowane przy zastosowaniu przeciwjonów soli sodowych alkilosulfonianów przy pH około 3. Próbki kwasowe są analizowane przy użyciu np. fosforanu tetrabutylamoniowego przy pH około 7-8. Dobre wyniki uzyskuje się stosując bromek cetylotrimetyloamoniowy do tworzenia par jonowych z pochodnymi kwasów karboksylowych.

W przypadku stosowania **normalnego układu faz**, tzn. polarnych faz stacjonarnych, jako fazy ruchome używane są rozpuszczalniki mające mniejszą od nich polarność. Eluentami w tym układzie są np.: heksan, izooktan, chloroform i dichlorometan. Jeżeli faza stacjonarna jest słabo polarna lub niepolarna, to faza ruchoma musi być bardziej polarna. Fazą ruchomą mogą być tetrahydrofuran, acetonitryl, metanol, woda. Dobierając skład eluentów, należy pamiętać, że wzrost

zawartości wody wydłuża czasy retencji chromatografowanych substancji niepolarnych, a wzrost ilości rozpuszczalnika organicznego - skraca ich czasy retencji.

Elucja izokratyczna i elucja gradientowa

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

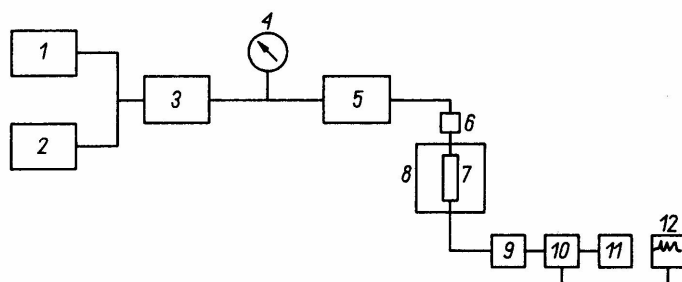
Wyróżnić można dwa przypadki:

- skład eluentu jest jednakowy przez cały czas chromatografowania próbki – jest to tzw. **elucja izokratyczna**,
- skład eluentu zmienia się podczas chromatografowania próbki – jest to tzw. **elucja gradientowa**.

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

6. Aparatura

Analizę mieszanin za pomocą chromatografii cieczowej kolumnowej wykonuje się prawie wyłącznie przy użyciu chromatografów cieczowych (Rys. 8).



Rys. 8. Schemat blokowy chromatografu cieczowego. 1,2 - zbiorniki eluentów, 3 - pompa, 4 - manometr, 5 - dozownik, 6 - przedkolumna, 7 - kolumna chromatograficzna, 8 - termostat kolumny, 9 - przepływomierz, 10 - detektor, 11 - kolektor frakcji, 12 - rejestrator lub komputer (Witkiewicz Z., Podstawy Chromatografii, WNT, Warszawa, 2002).

Pompa ze zbiornika (lub zbiorników) zasysa fazę ruchomą i przez dozownik tłoczy do kolumny chromatograficznej. Kolumna jest niekiedy umieszczana w termosacie. Analizowaną próbkę wstrzykuje się za pomocą dozownika na szczyt kolumny chromatograficznej, a następnie składniki mieszaniny rozdzielają się w kolumnie i na wyjściu z niej są wykrywane przez detektor.

Sygnal elektryczny z detektora po wzmocnieniu jest zapisywany na papierze rejestracyjnym lub rejestrowany za pomocą integratora albo komputera w postaci piku chromatograficznego. Przepływ cieczy przez układ może być kontrolowany manometrem i przepływomierzem. W niektórych przyrządach możliwe jest zbieranie rozdzielonych składników w kolektorze frakcji.

Pompy

Pompa jest ważnym elementem chromatografu cieczowego ponieważ w sposób ciągły, odtwarzalny i z optymalną prędkością wymusza przepływ fazy ruchomej przez kolumnę chromatograficzną. Dobre pompy powinny charakteryzować się stałym przepływem fazy ruchomej z możliwą regulacją w granicach 0,1 – 10 ml/min, odpornością chemiczną materiału pompy na fazę ruchomą, małą objętością wewnętrzną, bezpulsacyjnym przepływem oraz możliwością uzyskania ciśnień roboczych do 35 MPa. Pompy stosowane w chromatografii cieczowej można podzielić na **stałociśnieniowe** i **stałoprzepływowe**. Do pomp stałociśnieniowych należą pompy wyporowe i pompy z tłokami z napędem pneumatycznym. Obecnie stosowane są rzadko ze względu na możliwość niepożądanych zmian przepływu fazy ruchomej.

Lepsze własności odtwarzania wymuszonego przepływu mają pompy stałoprzepływowe i dlatego są szeroko stosowane. Najbardziej rozpowszechnionym typem pomp stałoprzepływowych są pompy tłokowe. Są to najczęściej pompy z jednym lub dwoma tłokami. Tłoki przesuwiają się w cylindrach o małej objętości (0,03 ml – 1 ml), a ruch tłoków jest zsynchronizowany z otwieraniem i zamykaniem zaworów kulkowych, które kontrolują przepływ fazy ruchomej. Objętościowa prędkość przepływu regulowana jest albo wielkością skoku tłoka albo częstością ruchu tłoka. Pompy tłokowe zapewniają możliwość pracy ciągłej w zakresie 0,1 - 30 ml/min, a ich wadą może być pulsacja cieczy powodująca niestałość linii zerowej i spadek czułości detektora.

Dozowniki

Przez dozownik chromatografu cieczowego (port iniekcyjny) wprowadza się próbki pod ciśnieniem atmosferycznym do kolumny, w której panuje ciśnienie kilkudziesięciu MPa. We współczesnych chromatografach cieczowych do dozowania próbek analizowanych substancji stosuje się najczęściej zawory dozujące zaopatrzone w pętlę dozowniczą. Kierunek przepływu fazy ruchomej zależy od położenia zaworu, w jednym położeniu dźwigni może omijać pętlę a w drugim - przechodzić przez nią. Do napełnienia pętli dozującej wykorzystuje się strzykawkę szklaną. Pojemność pętli dozowniczej może być różna i wynosić od kilku µl do kilku ml.

Detektory

Detektory działające na zasadzie absorpcji światła nadfioletowego (UV) lub nadfioletowego i widzialnego (UV-VIS) łącznie są najlepsze i najbardziej rozpowszechnione wśród detektorów stosowanych w kolumnowej chromatografii cieczowej. Stosuje się je do wykrywania związków zawierających w cząsteczce wiązania nienasycone i grupy chromoforowe, olefin, związków

aromatycznych i barwników (Tab. 2). Absorpcja promieniowania w zakresie UV-VIS związana jest z przejściami elektronów walencyjnych oraz elektronów wolnych par elektronowych z orbitalu o niższej energii na orbital o wyższej energii.

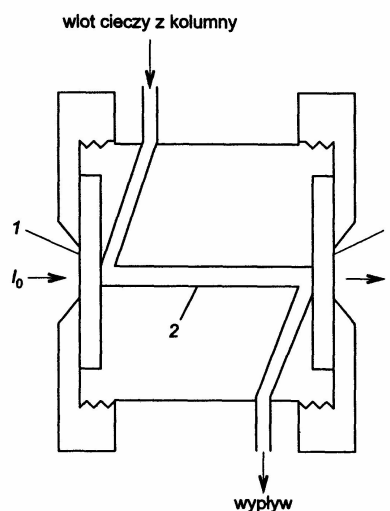
Tab. 2. Typowe chromofory i odpowiadające im przejścia elektronowe

Chromofor	Związek	Przejście elektronowe	λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max} [$\text{dm}^{-3} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}_1$]
>C=O<	etylen	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	13000
	aceton	$\pi \rightarrow \pi^*$	185	950
układ aromatyczny	benzen	$n \rightarrow \pi^*$	277	20
		$\pi \rightarrow \pi^*$	200	8000
—N=N—	azometan	$\pi \rightarrow \pi^*$	255	220
		$n \rightarrow \pi^*$	347	1

Oferowane są trzy typy detektorów UV:

- pracujące przy jednej długości fali, $\lambda = 254$ nm,
- pracujące w całym zakresie UV, a nawet VIS, z możliwą płynną regulacją długości fali promieniowania (w zakresie 190 – 600 nm),
- detektory typu *diode array*.

W detektorach tych stosowana jest przepływowa komora pomiarowa (Rys. 9.) o długości optycznej wynoszącej 10 mm i objętości 0,01 ml.



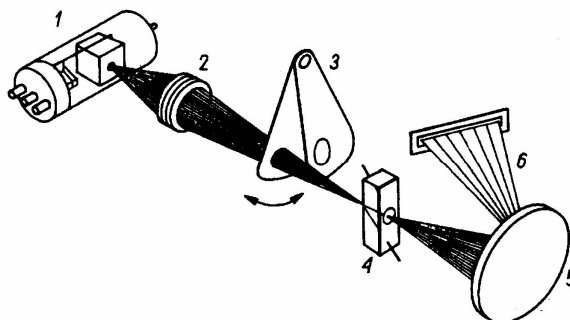
Rys. 9. Schemat przepływowej komory pomiarowej detektora UV-VIS; 1 – okienka kwarcowe, 2 – droga optyczna, I_0 – natężenie wiązki promieniowania padającego na próbkę, I – natężenie wiązki promieniowania przechodzącego przez próbkę (Szczepaniak W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997)

Najprostsze monochromatyczne detektory UV umożliwiają wykrywanie chromatografowanych substancji przy jednej długości fali - 254 nm. Jest to długość fali światła pochłanianego przez większość substancji organicznych (około 65 %).

Obecnie powszechnie stosowane są detektory spektrofotometryczne, w których możliwa jest płynna regulacja długości fali. Taki detektor, po zatrzymaniu przepływu fazy ruchomej umożliwia

rejestrację widma absorpcji substancji znajdującej się w detektorze i ustalenie długości fali, przy której występuje maksimum absorpcji. Można więc wykryć daną substancję z maksymalną czułością.

Niektóre firmy produkują detektory z matrycą fotodiodową (ang. *diode array detector*, DAD). Schemat układu optycznego takiego detektora przedstawia Rys.10.



Rys. 10. Schemat układu optycznego detektora z matrycą diodową 1 - lampa deuterowa, 2 - achromatyczny układ soczewek, 3 - Przesłona, 4 - komórka przepływowa, 5 - holograficzna siatka dyfrakcyjna, 6- matryca diodowa (Witkiewicz Z., Podstawy Chromatografii, WNT, Warszawa, 2005).

Światło z lampy deuterowej jest skupiane przez układ optyczny w komórce przepływowej, w której część światła jest absorbowana przez substancje zawarte w próbce. Następnie promień światła rozszczepiony na siatce dyfrakcyjnej pada na matrycę diodową. Diody tej matrycy mogą rejestrować natężenie światła w zakresie 190-600 nm w ciągu 10 ms.

W matrycy umieszcza się np. 211 fotodiod, z których każda jest przeznaczona do pomiaru wąskiego spektrum światła. Jednoczesna rejestracja prądów z poszczególnych fotodiod umożliwia rejestrację całego widma absorpcji analizowanego związku chemicznego. Widmo to może być przedstawione w układzie trójwymiarowym - czas retencji, długość fali i absorbancja. Możliwe też jest rejestrowanie zwykłego chromatogramu z maksimum absorpcji dla każdego składnika próbki rejestrowanego na chromatogramie w postaci piku.

Detektor spektrofotometryczny UV jest niewrażliwy na zmiany przepływu fazy ruchomej i na zmiany temperatury. Wykrywalność analizowanej substancji przy dobrze dobranej długości fali nadfioletu wynosi średnio 1 ng w próbce.

Detektor refraktometryczny jest najbardziej uniwersalnym detektorem spośród stosowanych w chromatografii ciekowej. Detekcja polega na pomiarze różnicy współczynnika załamania światła eluentu i eluatu.

Zasada działania **detektora aerosolowego promieniowania rozproszonego** polega na tym, że eluat z kolumny rozpylany jest dwutlenkiem węgla w nebulizatorze podgrzanym do temp. 42 °C. Wskutek tego eluent ulega odparowaniu a nielotne składniki próbki tworzą aerosol. Aerosol w strumieniu CO₂ i par eluentu jest przenoszony przez rurkę dyfuzyjną i komórkę pomiarową poza detektor. W komórce pomiarowej aerosol rozprasza promień światła emitowany z lasera.

Rozproszone promieniowanie jest doprowadzane przez światłowód do fotopowielacza, a prąd fotopowielacza po wzmocnieniu w elektrometrze rejestruje się w postaci chromatogramu.

7. Analiza jakościowa

Podstawą analizy jakościowej, czyli identyfikacji pików odpowiadających poszczególnym składnikom próbki, są wielkości retencyjne. Porównuje się czas retencji pików identyfikowanej substancji z czasem retencji pików wzorca, chromatografowanych w jednakowych warunkach.

Korzystając z wielkości retencyjnych, należy pamiętać, że retencja może się zmieniać przy małych zmianach składu fazy ruchomej. W niektórych przypadkach zmiana ta nie jest jednakowa dla wszystkich składników próbki i położenie jednych w stosunku do drugich może się zmienić.

Analizując nowe próbki, trzeba mieć pewność, że wszystkie składniki poprzednio chromatografowanej próbki zostały usunięte z kolumny.

Sygnaly chromatograficzne odpowiadające substancjom, które nie występują w badanej próbce, mogą pochodzić z zanieczyszczeń układu chromatograficznego lub rozpuszczalnika użytego do sporządzenia roztworu próbki. W tym ostatnim przypadku należy sprawdzić czystość rozpuszczalnika, chromatografując jego ilość odpowiadającą tej, którą wprowadza się do kolumny z próbka.

8. Analiza ilościowa

Ilościową zawartość składników w próbce oblicza się, wykorzystując to, że ilość tych składników jest proporcjonalna do powierzchni lub wysokości pików im odpowiadających. Do obliczeń zaleca się wykorzystywanie wysokości pików pod warunkiem, że są one symetryczne.

W analizie ilościowej pewne znaczenie ma rodzaj zastosowanego detektora. Najlepsze wyniki uzyskuje się stosując detektor absorpcji w nadfiolecie. Przy szerokim zakresie liniowości charakteryzuje się on wysoką czułością. Należy tak dobrać warunki detekcji, np. długość fali odpowiadającą maksimum absorpcji, aby nie trzeba było wykorzystywać maksymalnej czułości detektora.

Na wyniki analizy chromatograficznej wpływ ma jakość zastosowanego przyrządu oraz stałość warunków prowadzenia analizy. W czasie analizy temperatura kolumny, skład fazy ruchomej i wielkość próbek dozowanych do kolumny nie powinny ulegać zmianie.

W chromatografii cieczowej analizę można wykonać przez porównywanie powierzchni lub wysokości pików składnika analizowanej próbki i powierzchni lub wysokości pików wzorca. Postępuje się tak przy analizie sposobem wzorca wewnętrznego, normalizacji czy kalibracji bezwzględnej. Inną metodą jest metoda dodawania (dodatku) wzorca.

Metoda dodawania wzorca

Procedura oznaczeń w metodzie dodawania wzorca jest następująca:

a) przygotowujemy próbkę analizowaną i przeprowadzamy dla niej pomiar, mierząc wartość Y_0 (w naszym przypadku wielkość absorpcji promieniowania UV, która jest proporcjonalna do wysokości lub powierzchni sygnału chromatograficznego),

b) do tej samej próbki dodajemy znaną ilość substancji oznaczanej (wzorca), roztwór mieszamy i mierzymy wartość Y_i . Wartość parametru mierzonego wzrasta, a wzrost jest proporcjonalny do ilości dodanego wzorca.

Stężenie analitu można wyliczyć na podstawie równań;

$$Y_0 = ac \quad (20)$$

$$Y_i = a(c + c_s) \quad (21)$$

w których Y_0 oznacza pole powierzchni lub wysokość sygnału chromatograficznego analitu zmierzony dla próbki bez dodatku wzorca, Y_i – pole powierzchni lub wysokość sygnału chromatograficznego analitu zmierzony dla próbki po dodaniu wzorca, c – stężenie analitu w próbce, c_s – stężenie wzorca w próbce. Z równania (20) obliczymy a :

$$a = Y_0 / c \quad (22)$$

Po podstawieniu do równania (21) otrzymamy :

$$Y_i = Y_0 / c \cdot (c + c_s) \quad (23)$$

Po rozwiązaniu równania (23) względem c otrzymamy:

$$c = Y_0 \cdot c_s / (Y_i - Y_0) \quad (24)$$

Wynikiem dodania wzorca jest zmiana objętości roztworu próbki badanej, stąd należy skorygować stężenia. W przypadku stosowania mikrostrzykawkę i dozowania mikrolitrowych ilości wzorca do analizowanej próbki, które nie wpływają w zasadniczy sposób na zmianę objętości próbki, taka korekta objętości nie jest konieczna.

Literatura

1. Szczepaniak W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, W-wa, 1996.
2. Minczewski J., Marczewski Z., *Chemia analityczna, tom III*, PWN, W-wa, 1986.
3. Ewing G.W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, W-wa, 1980.
4. Witkiewicz Z., *Podstawy chromatografii*, WNT, W-wa, 1995, 2005.
5. Piotrowski J.K., *Podstawy toksykologii*, WNT, W-wa, 2006.
6. Biziuk M., *Pestycydy, występowanie, oznaczanie i unieszkodliwianie*, WNT, W-wa, 2001.
7. Baird C., Cann M., *Environmental Chemistry*. W.H. Freeman and Co., 2005.