



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

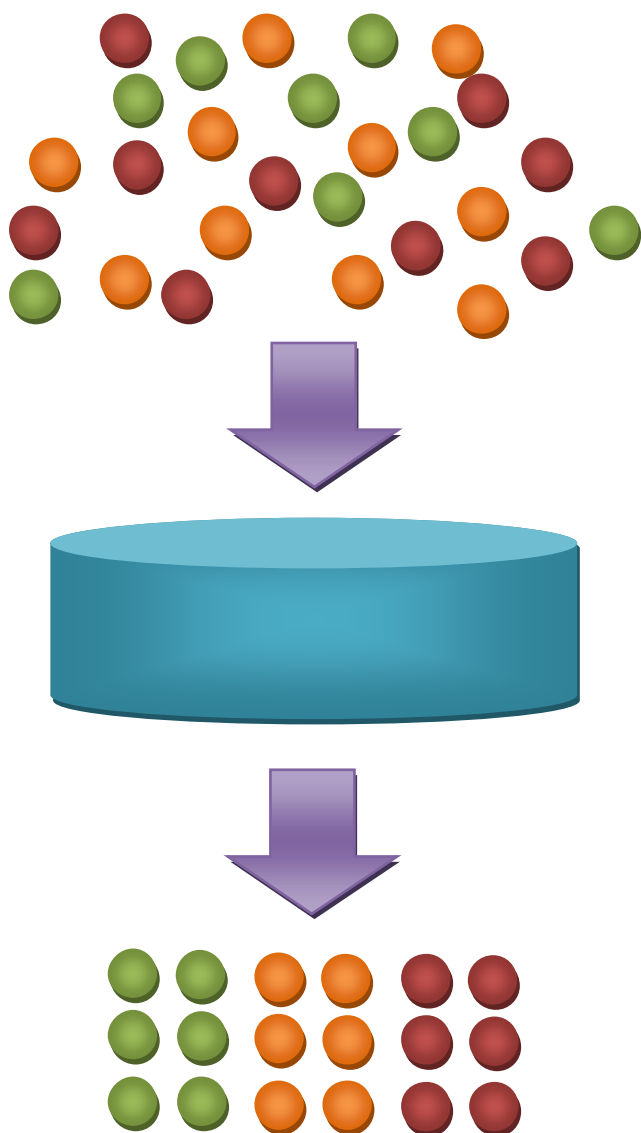


UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Publikacja współfinansowana przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

TECHNIKI SEPARACYJNE



Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego

Piotr Stepnowski

Elżbieta Synak

Beata Szafranek

Zbigniew Kaczyński



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Publikacja współfinansowana przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

© Copyright by:

Piotr Stepnowski, Elżbieta Synak, Beata Szafranek, Zbigniew Kaczyński

Skład komputerowy: Zbigniew Kaczyński & Piotr Stepnowski

Okładkę i stronę tytułową zaprojektowali: Anna Białk-Bielińska, Jolanta Kumirska, Piotr Stepnowski

Recenzent: Prof. dr hab. inż. Waldemar Wardencki

ISBN 978-83-7326-712-1

All rights reserved

Uniwersytet Gdański
Wydział Chemii
80-952 Gdańsk, ul. Sobieskiego 18/19

Techniki separacyjne

Piotr Stepnowski

Elżbieta Synak

Beata Szafranek

Zbigniew Kaczyński

Uniwersytet Gdański, Gdańsk 2010

Spis treści

Od autorów	9
I. Wstęp do technik separacyjnych	9
1. Wstęp	9
2. Teoria separacji	12
2.1. Termodynamiczny opis separacji	13
2.2. Adsorpcja i podział	17
2.3. Oddziaływania międzycząsteczkowe	21
2.3.1. Oddziaływania dyspersyjne	21
2.3.2. Oddziaływania polarne	22
2.3.3. Oddziaływanie jonowe	23
2.4. Lipofilowość w opisie potencjału oddziaływań molekularnych	24
3. Literatura	29
II. Ekstrakcja	30
1. Wstęp	30
2. Podział technik ekstrakcyjnych	31
3. Ekstrakcja próbek gazowych	35
3.1. Ekstrakcja w układzie gaz – ciecz	35
3.1.1. Ekstrakcja membranowa przez błony półprzepuszczalne	35
3.2. Ekstrakcja w układzie gaz – ciało stałe	37
3.2.1. Ekstrakcja gazów przez membrany porowate	39
3.2.2. Mikroekstrakcja do fazy stałej	42
4. Ekstrakcja próbek ciekłych	50
4.1. Ekstrakcja w układzie ciecz – gaz	50
4.1.1. Ekstrakcja do gazowej fazy nadpowierzchniowej	50
4.1.2. Ekstrakcja strumieniem gazu przepływającym przez próbkę	53
4.2. Ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz	56
4.2.1. Ekstrakcja związków organicznych	59
4.2.2. Ekstrakcja związków nieorganicznych	61
4.2.2.1. Ekstrakcja kompleksów chelatowych	61
4.2.2.2. Ekstrakcja jonów metali w postaci kompleksów jonowo-asocjacyjnych	62
4.2.2.3. Ekstrakcja specjacyjna	65
4.2.3. Klasyczna technika ekstrakcji ciecz – ciecz	67
4.2.4. Ekstrakcja ciągła	67

4.2.5. Mikroekstrakcja.....	69
4.2.5.1 Mikroekstrakcja do rozpuszczalnika.....	69
4.2.5.2. Mikroekstrakcja do kropli	69
4.2.5.3. Mikroekstrakcja poprzez membranę do fazy ciekłej.....	72
4.2.6. Ekstrakcja cieczami jonowymi.....	73
4.3. Ekstrakcja w układzie ciecz – ciało stałe	79
4.3.1. Ekstrakcja do fazy stałej	79
4.3.2. Mikroekstrakcja do fazy stałej	84
4.3.3. Ekstrakcja za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego.....	84
4.3.4. Ekstrakcja z ograniczonym dostępem do fazy stacjonarnej	90
4.3.5. Ekstrakcja przez wykluczanie na sorbentach immunologicznych	91
4.3.6. Ekstrakcji za pomocą polimerów z nadrukiem molekularnym	92
4.3.7. Mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu w strzykawce	95
5. Ekstrakcja próbek stałych.....	97
5.1. Ekstrakcja próbek stałych fazą gazową.....	98
5.1.1 Ekstrakcja do gazowej fazy nadpowierzchniowej	98
5.1.2. Ekstrakcja dynamiczna techniką wmywania i wychwytywania.....	99
5.1.3. Ekstrakcja strumieniem gazu z desorpcją termiczną	99
5.2. Ekstrakcja w układzie ciało stałe – ciecz	100
5.2.1. Ekstrakcja rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie.....	100
5.2.2. Ekstrakcja przez homogenizację próbki z rozpuszczalnikiem	100
5.2.3. Ekstrakcja przez zmydlanie (saponifikacja).....	100
5.2.4. Ekstrakcja za pomocą strumienia rozpuszczalnika	101
5.2.5. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem.....	102
5.2.6. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika w aparacie Soxhleta	103
5.2.7. Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami	107
5.2.8. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana promieniowaniem mikrofalowym	108
5.2.9 Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika pod zwiększonym ciśnieniem.....	111
5.2.10. Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika	112
5.2.11. Ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym	115
5.2.12. Ekstrakcja poprzez mineralizację.....	119
6. Literatura.....	121
III. Techniki chromatograficzne	123

1. Wprowadzenie do chromatografii	123
1.1. Wstęp.....	123
1.2. Podstawowe definicje chromatograficzne.....	125
1.3. Chromatogram.....	127
1.4. Podstawowe parametry retencyjne.....	129
1.5. Podstawy teoretyczne procesu chromatograficznego.....	130
1.5.1. Teoria półtek	132
1.5.2. Teoria kinetyczna.....	135
1.6. Sprawność kolumn chromatograficznych.....	139
1.7. Analiza jakościowa	141
1.8. Analiza ilościowa.....	144
1.8.1. Metoda krzywej kalibracyjnej.....	145
1.8.2. Metoda wzorca wewnętrznego.....	146
1.8.3. Metoda dodatku wzorca	149
1.8.4. Metoda normalizacji wewnętrznej.....	150
2. Chromatografia cieczowa.....	152
2.1. Wstęp.....	152
2.2. Chromatografia cienkowarstwowa.....	153
2.2.1. Wstęp.....	153
2.2.2. Proces chromatograficzny	154
2.2.3. Zasady dobrej praktyki laboratoryjnej w TLC.....	157
2.3. Chromatografia kolumnowa niskociśnieniowa	159
2.3.1. Wstęp.....	159
2.3.2. Proces chromatograficzny	160
2.3.3. Żel krzemionkowy jako faza stacjonarna.....	161
2.3.4. Klasyfikacja rozpuszczalników w normalnym układzie faz	162
2.3.5. Dobór warunków rozdzielenia w chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym za pomocą analizy TLC.....	165
2.4. Wysokosprawna chromatografia cieczowa	169
2.4.1. Wstęp.....	169
2.4.2. Aparatura.....	170
2.4.3. Chromatografia adsorpcyjna	175
2.4.4. Chromatografia podziałowa	175
2.4.5. Chromatografia jonowa	177

2.4.6. Chromatografia wykluczania	182
2.4.7. Chromatografia powinowactwa.....	183
3. Chromatografia gazowa	184
3.1. Wstęp.....	184
3.2. Aparatura	184
3.3. Wybór parametrów analizy GC.....	190
4. Połączenie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas.....	192
5. Chromatografia z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym	198
5.1. Wstęp.....	198
5.2. Fazy ruchome	199
5.3. Proces rozdzielania chromatograficznego	199
5.4. Aparatura	200
5.5. Zastosowanie chromatografii z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym.....	203
6. Literatura.....	204
IV. Techniki elektromigracyjne	206
1. Wstęp.....	206
2. Podział technik elektroforetycznych.....	210
2.1. Elektroforeza kapilarna.....	211
Zalety elektroforezy kapilarnej.....	217
2.1.1. Strefowa elektroforeza kapilarna	218
2.1.2. Micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna	218
2.1.3. Kapilarna elektroforeza żelowa.....	219
2.1.4. Ogniskowanie izoelektryczne.....	219
2.1.5. Izotachoforeza kapilarna	220
2.1.6. Elektrochromatografia kapilarna.....	221
2.2. Elektroforeza żelowa na płaszczyźnie	222
2.2.1. Żele stosowane w elektroforezie	223
2.2.2. Przygotowanie próbek	225
2.2.3. Rozdzielenie	225
2.2.4. Wizualizacja	225
2.2.5. Dokumentacja rozdzielenia.....	226
3. Wykorzystanie technik elektromigracyjnych.....	226
4. Literatura.....	227

Od autorów

Techniki separacyjne, a szczególnie techniki chromatograficzne są dzisiaj najczęściej stosowanymi technikami laboratoryjnymi – żadne współczesne laboratorium chemiczne czy biochemiczne nie może się bez nich obejść. Nabywanie umiejętności posługiwania się nowoczesnymi technikami separacyjnymi staje się więc zasadniczym obszarem kształcenia praktycznego na kierunkach chemicznych i pokrewnych w szkolnictwie wyższym.

Od wielu lat Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego wprowadza do programów studiów na kierunkach CHEMIA oraz OCHRONA ŚRODOWISKA zagadnienia związane z zastosowaniem technik separacyjnych w zaawansowanej analityce chemicznej i biochemicznej, fizykochemii organicznej czy monitoringu środowiska. Dodatkowo, na jednej ze specjalności kierunku chemia (analityka i diagnostyka chemiczna) realizowany jest przedmiot pod nazwą *Techniki separacyjne*.

Niniejszy skrypt przygotowany został z myślą o studentach wszystkich kierunków i specjalności Wydziału Chemii UG, którzy z elementami technik separacyjnych stykają się już na pierwszym roku studiów, by w kolejnych latach poznawać coraz to bardziej zaawansowane metody rozdzielcze zarówno w obrębie kursów podstawowych jak i specjalnościowych.

Skrypt podzielony jest na trzy samoistne części: techniki izolacji analitów, techniki chromatograficzne oraz techniki elektromigracyjne. Takie podejście umożliwiło zawarcie większości zagadnień teoretycznych i praktycznych towarzyszących technikom separacyjnym ukazując je, jako integralny obszar wiedzy.

Mamy nadzieję, że skrypt *Techniki separacyjne* stanie się ważną pozycją wspomagającą kształcenie studentów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego oraz innych uczelni w Polsce.

Autorzy

I. Wprowadzenie do technik separacyjnych

1. Wstęp

Techniki separacyjne we współczesnej analityce chemicznej są podstawą większości procesów izolacji i identyfikacji związków chemicznych. Ich zadaniem jest selektywne rozdzielanie pierwiastków czy substancji chemicznych ze skomplikowanych mieszanin, przy jednoczesnym określeniu ich rodzaju i ilości. Stosując techniki separacyjne, w trakcie jednej operacji analitycznej można uzyskać bardzo wiele informacji. Jest to najprawdopodobniej największa ich zaleta w porównaniu z klasycznymi metodami analitycznymi.

Oprócz zastosowania analitycznego, techniki separacyjne wykorzystywane są obecnie również w procesach preparatywnych, tzn. do wydzielania większych ilości pojedynczych substancji lub frakcji wybranych związków o określonym dalszym zastosowaniu. W dużej mierze procesy te są bardzo podobne do zastosowań analitycznych ze względu na mechanizm rozdzielania jak i stosowanej aparatury, różnią się natomiast skalą.

Zastosowanie technik separacyjnych w analityce chemicznej związków organicznych rozpoczęło się ponad sto lat temu, wraz z odkryciem zjawiska chromatografii przez Michaiła Cwieta, który po raz pierwszy zastosował tę metodę do rozdzieleń wyekstrahowanych barwników roślin. Rozwój tej dziedziny nauki nie byłby jednak możliwy bez wkładu takich uczonych jak Irving Langmuir (Nagroda Nobla w 1932) czy Archer Martin i Richard Synge (Nagroda Nobla w 1952), których badania nad fizykochemią powierzchni czy zjawiskami międzyfazowego podziału dały faktyczne pod: nowoczesnym technikom separacyjnym.

Współcześnie, techniki separacyjne stosowane w chemii analitycznej obejmują trzy zasadnicze grupy:

- **techniki izolacji analitów z matryc,**
- **techniki chromatograficzne,**
- **techniki elektromigracyjne.**

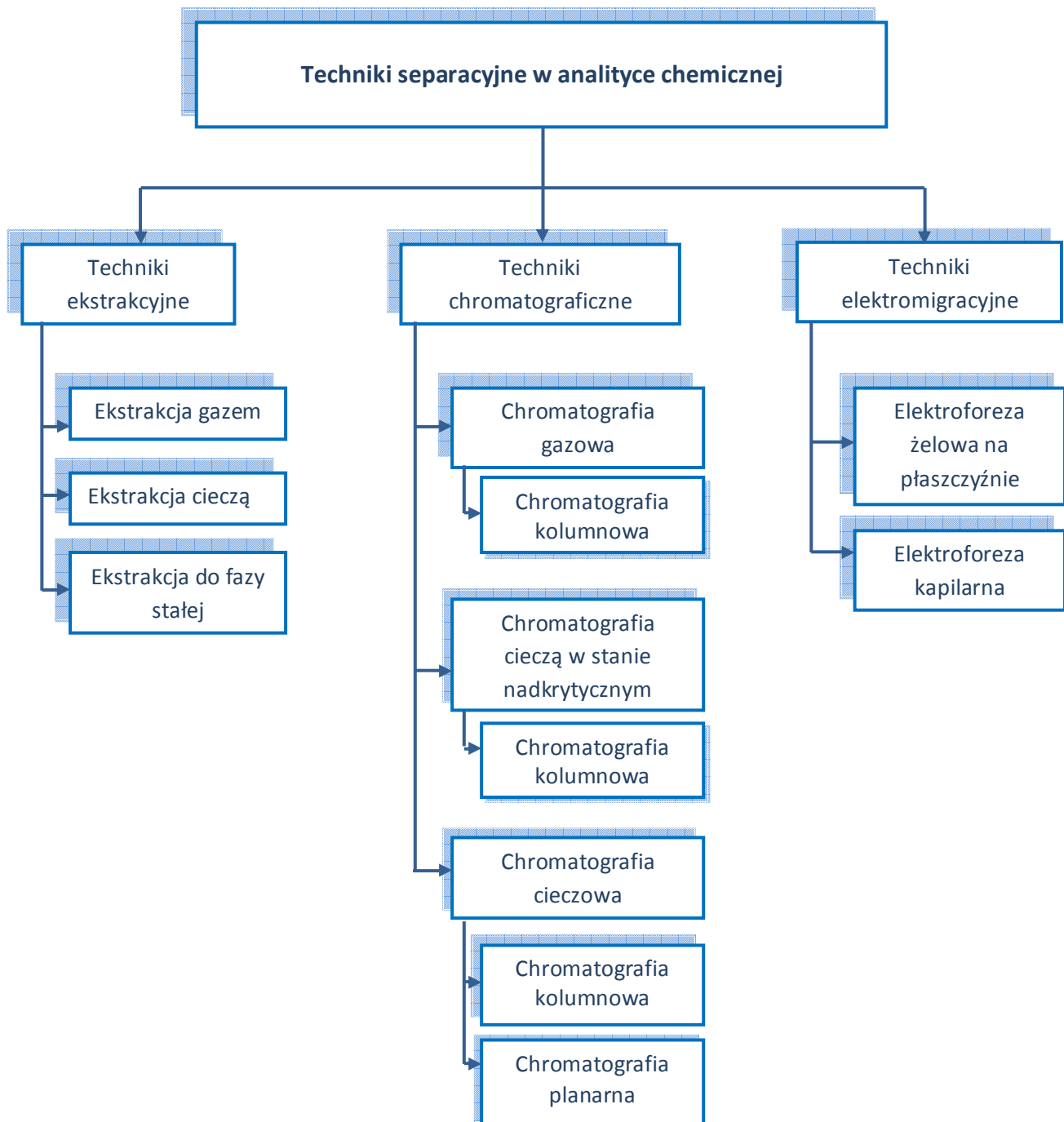
Techniki izolacji analitów reprezentowane są przede wszystkim przez różnorodne **metody ekstrakcyjne**, takie jak ekstrakcja rozpuszczalnikiem czy cieczą w stanie nadkrytycznym, ekstrakcja i mikroekstrakcja do fazy stałej czy ekstrakcja do kropli. Dodatkowo, procesy te mogą być wspomagane energią ultradźwięków, mikrofal lub podwyższaniem ciśnienia.

Najobszerniejszą grupą technik separacyjnych, stosowanych w analityce chemicznej, jest **chromatografia**. Obejmuje ona chromatografię planarną, gazową i cieczową wraz z ich odmianami, jak chromatografia adsorpcyjna, podziałowa, powinowactwa, wykluczenia, jonowymienna i in. oraz techniki łączone, wykorzystujące np. połączenie procesu ekstrakcji z dozowaniem próbki do układu pomiarowego czy separacji analitów wraz z określeniem ich ilości i identyfikacji struktury.

Trzecia grupa obejmuje **techniki elektromigracyjne**, takie jak: elektroforeza planarna i kapilarna, micelarna chromatografia elektrokinetyczna, kapilarne ogniskowanie izoelektryczne oraz izotachoforeza kapilarna.

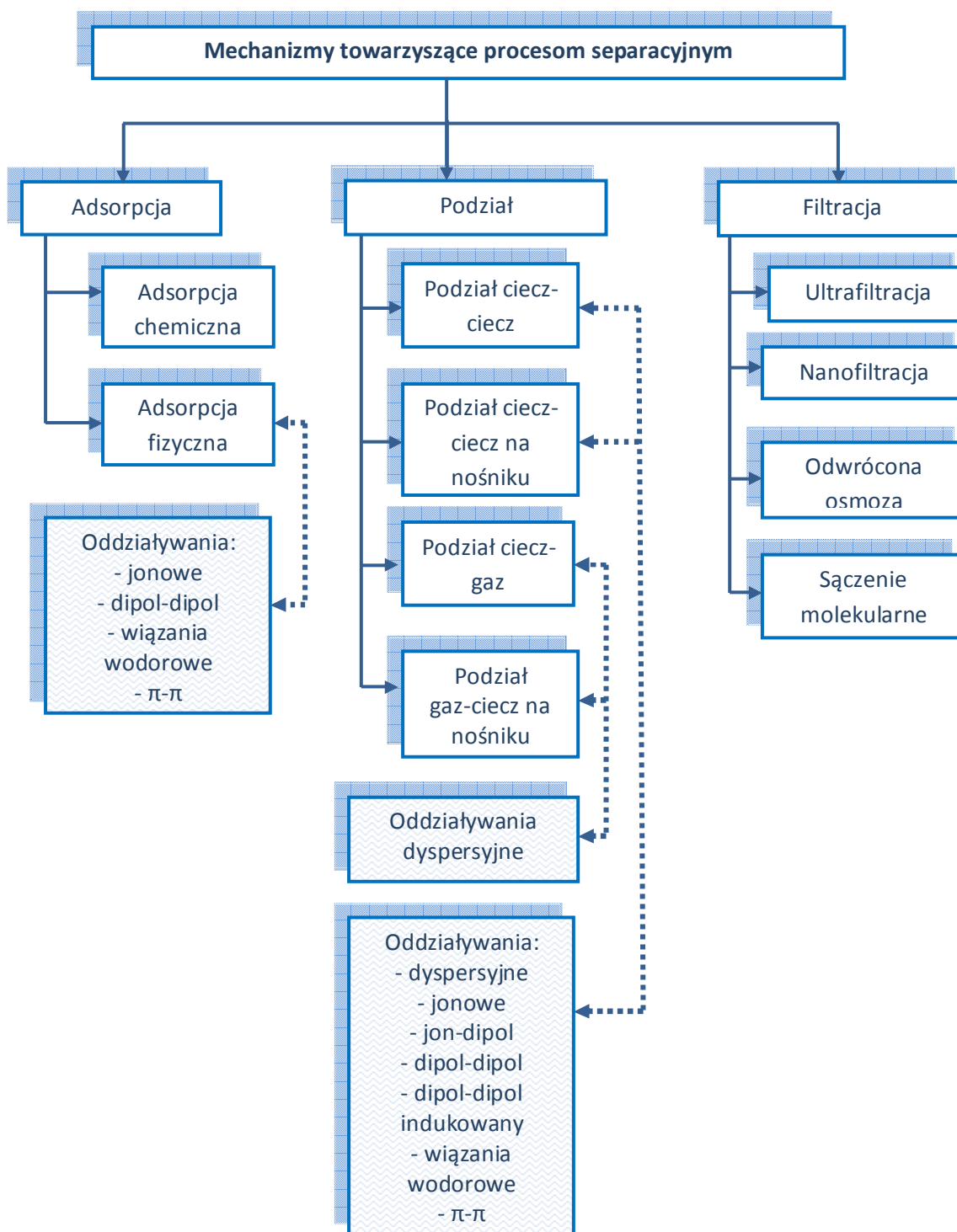
Podstawowy podział technik separacyjnych wykorzystywanych w analityce chemicznej przedstawiono na rysunku 1. Dodatkowo, podziału metod można dokonać na podstawie cech charakterystycznych dla konkretnego procesu. Są to: typ fazy ruchomej (gaz lub ciecz), profil układu

(strefowy lub czołowy), rodzaj izotermi (liniowy lub nieliniowy), rozmieszczenie wypełnienia (planarne lub kolumnowe), skład fazy ruchomej (izokratyczny lub w gradiencie), wymiarowość układu (jednowymiarowy, dwu- lub wielowymiarowy), skala (analityczna lub preparatywna) oraz rodzaj mechanizmu.



Rysunek 1. Techniki separacyjne w analityce chemicznej

Procesom separacyjnym towarzyszą określone mechanizmy fizyczne i chemiczne, w konsekwencji umożliwiające rozdzielanie substancji z mieszaniny (rysunek 2). Istnieją trzy podstawowe grupy mechanizmów wykorzystywanych w separacji analitycznej, są to: **podział, adsorpcja oraz filtracja**. Ostatni z nich ma charakter wyłącznie fizyczny i ma zastosowanie głównie w procesach zateżenia i wydzielania analitów z matrycy. Z kolei zarówno sorpcja jak i podział oparte są na oddziaływaniach fizykochemicznych pomiędzy analitem a medium separacyjnym.



Rysunek 2. Mechanizmy towarzyszące procesom separacyjnym

Intensywność oraz selektywność tych oddziaływań odgrywa zasadniczą rolę w procesie rozdzielania substancji. Kluczową rolę w doborze procesu separacyjnego ma budowa chemiczna analitu, od której zależy potencjał oddziaływań molekularnych jego cząsteczki. Zdolność oddziaływań molekularnych cząsteczki analitu nie jest mierzona jednym parametrem, lecz jest wypadkową przynajmniej kilku deskryptorów molekularnych, określających zachowanie się cząsteczki w układzie separacyjnym.

2. Teoria separacji

Tak w analityce jak i preparatyce, separacja (rozdzielenie) substancji może mieć charakter pełny bądź cząstkowy.

W pierwszym przypadku dochodzi do pełnego rozdzielania mieszaniny na jej poszczególne składniki, zgodnie z poniższym schematem:

$$(a + b + c + d + \dots) \rightarrow (a) + (b) + (c) + (d) + \dots \quad (1)$$

gdzie:

nawiasy to określony obszar w przestrzeni,

poszczególne litery $a, b, c, d \dots$ to komponenty (analitu), zajmujące te obszary.

Zgodnie z tym schematem, po zastosowaniu techniki separacyjnej, komponenty stanowiące mieszaninę (zmieszane), zostają rozdzielone, czyli formalnie zajmują różne obszary w przestrzeni. Jest to wynik najbardziej korzystny, umożliwiającą dalszą, dokładną analizę poszczególnych składników, zarówno pod kątem ilościowym jak i jakościowym.

W drugim przypadku, w którym dochodzi do separacji cząstkowej, schemat ten może przyjąć następującą postać:

$$(a + b + c + d + \dots) \rightarrow (a) + (b + c + d + \dots) \quad (2)$$

lub

$$(a + b + c + d + \dots) \rightarrow (a + b) + (b + a) + \dots \quad (3)$$

Schemat (2) opisuje przypadek wydzielenia z wieloskładnikowej mieszaniny jednej, czystej substancji (analitu). Jest to sytuacja często towarzysząca zastosowaniu technik separacyjnych do wydzielenia i oznaczania jednego składnika, z pominięciem pozostałych komponentów mieszaniny, będących np. składnikami matrycy analizowanej próbki. Niestety, stosowane techniki separacyjne nie zawsze są w stanie doprowadzić do jednoznacznego wyodrębnienia czystego analitu. Taką sytuację opisuje schemat (3), z którego wynika, iż w wyniku procesu separacyjnego rozdzielane są wieloskładnikowe frakcje, bogate w składnik a (1 frakcja) lub składnik b (2 frakcja). Otrzymane frakcje, o ile zachodzi taka potrzeba, można poddawać dalszym procesom rozdzielczym, używając tej samej lub innej techniki separacyjnej.

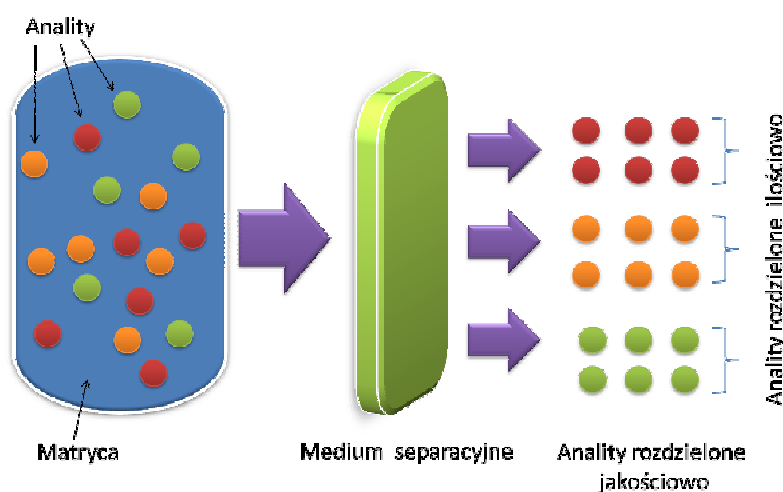
Przedstawione schematy separacji, niezależnie od tego, na jakim etapie rozdzielania czy wzbogacania próbki zachodzą, opisują zasadniczą cechę wszystkich technik separacyjnych.

Główną cechą wszystkich technik separacyjnych jest fakt, iż w trakcie procesu dochodzi do przeniesienia (transportu) i redystrybucji analitów w przestrzeni w taki sposób, aby było możliwe ich pojedyncze i/lub grupowe oznaczenie jakościowe i ilościowe.

Transport analitów zachodzi w medium separacyjnym, w którym kluczową rolę odgrywają następujące czynniki:

- **budowa molekularna medium separacyjnego**, określająca rodzaj oddziaływań międzycząsteczkowych, decydujących o selektywności wobec konkretnych analitów,
- **równowaga (dynamiczna) zachodząca pomiędzy analitem a medium**, będąca siłą napędową procesu separacji,
- **budowa mikro- i makroskopowa medium**, określająca mechaniczne parametry separacji, tj. przepływ, opory, wymianę masy i in.

Ogólny schemat procesu separacji przedstawiono na rysunku 3. Najważniejszą częścią układu jest medium separacyjne, od którego rodzaju zależy nie tylko typ (budowa chemiczna) analitów poddawanych rozdzielaniu, ale również ich liczba i stężenie.



Rysunek 3. Ogólny schemat rozdzielenia analitów w technikach separacyjnych

Medium separacyjne stanowi najczęściej układ dwufazowy. Wprowadzone do takiego układu anality, w trakcie procesu separacyjnego, ulegają przeniesieniu z jednej fazy do drugiej. Wielokrotność tego procesu wraz z odpowiednią selektywnością faz doprowadza do stopniowego rozdzielania (bądź wydzielania) składników mieszaniny. Układ ten najczęściej ma charakter dynamiczny, tzn. fazy przemieszczają się względem siebie w trakcie procesu separacyjnego, wielokrotnie zwiększając możliwość oddziaływań na granicy faz. Wydłużony w ten sposób kontakt między fazami umożliwia wielokrotne zajście stanu równowagi, w którym zachodzi selektywne przeniesienie analitu, co prowadzi do jego rozdzielania od innych składników mieszaniny.

2.1. Termodynamiczny opis separacji

Przeniesieniu masy analitu z jednej fazy do drugiej w układzie otwartym towarzyszy stan stałej lub chwilowej równowagi. Na gruncie termodynamiki można przewidywać właściwości układu znajdującego się w stanie równowagi. Do tego celu służy funkcja termodynamiczna nazywana **entalpią swobodną**, G (energiją Gibbsa). Funkcja ta nie tylko opisuje stany równowagowe, ale również dostarcza informacji o tym, czy określone procesy osiągną stan równowagi w danych warunkach. Z procesami przebiegającymi samorzutnie w kierunku równowagi związana jest ujemna zmiana entalpii swobodnej ΔG (w warunkach stałego ciśnienia i temperatury), więc, obliczając ΔG dla

przemiany fizycznej czy też chemicznej, można przewidzieć czy w danych warunkach temperatury i ciśnienia będzie ona samorzutna.

Zgodnie z I i II zasadą termodynamiki zmiana entalpii swobodnej takiego układu opisana jest funkcją temperatury i objętości, co pokazuje następujące równanie:

$$dG = -SdT + Vdp \quad (4)$$

gdzie:

dG – zmiana entalpii swobodnej,
 S – wartość entropii,
 dT – zmiana temperatury,
 V – objętość układu,
 dp – zmiana ciśnienia.

Jeżeli w czasie procesu separacji, w warunkach stałej temperatury i stałego ciśnienia, zostanie wprowadzona do mieszaniny składników pewna, bardzo mała ilość moli analitu i (dn_i) przy niezmięnionej ilości pozostałych składników (analitów), to spowoduje to zmianę entalpii swobodnej G całej mieszaniny:

$$dG = \left(\frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T,p,n_j} dn_i \quad (5)$$

W tym przypadku entalpia swobodna układu G zmienia się nieznacznie, proporcjonalnie do dn_i . Ten wkład własnej entalpii swobodnej danego składnika i do całkowitej entalpii swobodnej układu definiuje się jako **potencjał chemiczny** substancji μ_i :

$$\mu_i = \left(\frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T,p,n_j} \quad (6)$$

Innymi słowy, potencjał chemiczny to część entalpii G wniesiona do układu przez n moli substancji i przy stałej temperaturze i ciśnieniu. Wymiarem potencjału chemicznego jest jednostka energii na mol. Po podstawieniu pochodnej cząstkowej $\partial G / \partial n$ do równania (5), zmiana entalpii układu przyjmuje następującą postać:

$$dG = \mu_i dn_i \quad (7)$$

Podobnie, zmiana ilości każdego z pozostałych składników rozdzielanej mieszaniny (np. analitu j) ma wpływ na całkowitą entalpię swobodną mieszaniny:

$$dG = \mu_j dn_j \quad (8)$$

Stąd, przeniesienie dowolnej liczby składników w układzie jest sumą wkładów cząstkowych,

$$dG = \sum \mu_i dn_i \quad (9)$$

przy czym suma dotyczy wszystkich składników wchodzących i opuszczających system (potencjały chemiczne opuszczających składników stanowią ujemny wkład do dG). Jeżeli w trakcie procesu separacyjnego zmienia się także temperatura i ciśnienie, należy dodatkowo uwzględnić ich udział:

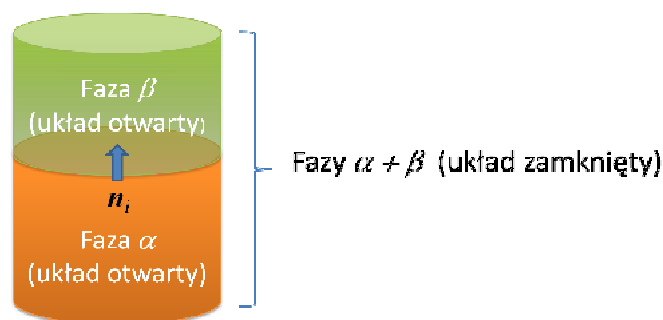
$$dG = -SdT + Vdp + \sum \mu_i dn_i \quad (10)$$

Jak powiedziano wcześniej, rozdzielanie analitów w większości technik separacyjnych odbywa się najczęściej w układzie dwufazowym (przedstawionym w uproszczeniu na rys. 4), zawierającym dwie niemieszające się (lub mieszające się w bardzo ograniczonym stopniu) fazy α i β , pomiędzy którymi może dojść do wymiany składników. Fazy α i β rozpatrywane razem, stanowią układ zamknięty, który po upływie dostatecznie długiego czasu osiąga stan równowagi termodynamicznej. Do równowagi tej dochodzi za sprawą przemieszczania się składników pomiędzy fazami. W równowadze składniki przemieszczają się równomiernie pomiędzy fazami zachowując określone, równowagowe, stężenia w tych fazach. Wówczas zmiany entalpii swobodnych faz mają taką samą wartość. Stąd wypadkowa zmiana entalpii swobodnej wynosi zero, $dG = 0$, zgodnie z równaniem:

$$dG = dG^\beta + dG^\alpha = (\mu_i^\beta + \mu_i^\alpha) dn_i = 0 \quad (11)$$

Potencjał chemiczny wyraża status energetyczny składnika i w każdej z tych faz. Przy stałej temperaturze i ciśnieniu równowaga na granicy faz oznacza zrównanie potencjałów chemicznych substancji i w fazie α i fazie β :

$$\mu_i^\beta = \mu_i^\alpha \quad (12)$$



Rysunek 4. Schemat układu dwufazowego składającego się z fazy α , zawierającej n moli analitu (n_i) i z fazy β , do której migrują cząsteczki analitu

Równość ta zachodzi we wszystkich procesach separacyjnych. Wielkość potencjału chemicznego zależy od dwóch zasadniczych czynników:

- termodynamicznego powinowactwa związku do danej fazy,
- stopnia rozcieńczenia (stężenia związku).

Powinowactwo (intensywność oddziaływań analitu z fazą) opisuje tzw. **standardowy potencjał chemiczny** μ_i^0 , natomiast stopień rozcieńczenia - stężenie substancji w układzie. Obie te wielkości są związane z potencjałem chemicznym w następujący sposób:

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln c_i \quad (13)$$

gdzie:

R – stała gazowa,

c_i – stężenie analitu i (mol/L lub mol/kg).

Standardowy potencjał chemiczny μ_i^0 zależy przede wszystkim od energii (w mniejszym stopniu entropii) oddziaływań pomiędzy analitem a jego otoczeniem (fazą), stąd zmienia się w czasie przemieszczania analitu z fazy do fazy. Wielkość μ_i^0 przyjmuje najmniejsze wartości w układach, gdzie oddziaływania analit – faza są najsilniejsze. Człon $RT \ln c_i$ opisuje stopień rozcieńczenia analitu w fazie. Na stopień rozcieńczenia wpływa przede wszystkim wartość entropii (entropii rozcieńczenia). Wpływ ten jest niebagatelny, zważywszy na fakt, iż w układach separacyjnych (dwóch faz) występuje zwykle duży stopień rozcieńczenia analitu. Biorąc powyższe pod uwagę możemy powiedzieć, iż w układzie dwufazowym bodźcem do przejścia analitu z fazy α do fazy β jest obniżanie potencjału chemicznego. W układzie takim osiągnięcie stanu równowagi oznacza, że potencjał chemiczny analitu jest taki sam w obu fazach, czyli $\mu_i^\beta = \mu_i^\alpha$, co prowadzi do następującego równania:

$$\left(\frac{c_i^\beta}{c_i^\alpha} \right)_{eq} = \exp \left(\frac{-\Delta\mu_i^0}{RT} \right) \quad (14)$$

gdzie:

$$\Delta\mu_i^0 = \mu_i^{0\beta} - \mu_i^{0\alpha},$$

$(c_i^\beta / c_i^\alpha)_{eq}$ - iloraz stężeń analitu w fazach.

Iloraz stężeń analitu w fazach jest równowagowym współczynnikiem podziału K , stąd:

$$K = \exp \left(\frac{-\Delta\mu_i^0}{RT} \right) \quad (15)$$

W równowadze zachodzi równość $\mu_i^\beta = \mu_i^\alpha$, więc w fazie z mniejszą wartością μ_i^0 równość kompensuje wyższa wartość składowej $RT \ln c_i$, a więc wyższe stężenie analitu. Dodatkowo, jeżeli $\Delta\mu_i^0$ przyjmuje wartość dodatnią, oznacza to, że μ_i^0 w fazie α jest mniejsze niż w fazie β . Różnica ta spowodowana jest zarówno różną siłą (energiją) oddziaływań chemicznych analitów z fazami jak i różnym stopniem rozcieńczenia (entropiją) w fazach. W konsekwencji to właśnie ta różnica umożliwia separację różnych analitów w układzie dwufazowym. Przyjmując, że całkowitą zmianę entalpii układu reprezentuje różnica standardowych potencjałów chemicznych w układzie, to:

$$K = \exp \left(\frac{-\Delta G^0}{RT} \right) \quad (16)$$

gdzie:

$$\Delta G^0 - \text{całkowita zmiana entalpii układu}$$

stąd:

$$RT \ln K = -\Delta G^0 \quad (17)$$

Z II zasady termodynamiki wiadomo, iż na entalpię swobodną układu ΔG składa się zarówno zmiana entalpii, ΔH^0 , stanowiąca wkład energetyczny do entalpii swobodnej, jak i zmiana entropii (ΔS^0), czyli:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (18)$$

gdzie:

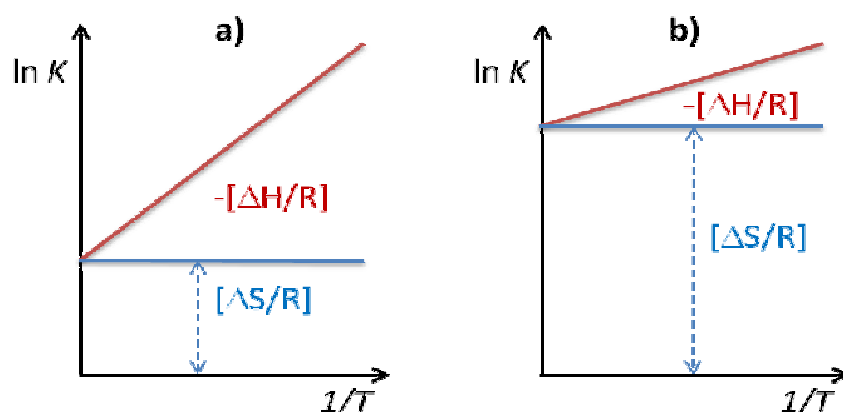
$$\Delta H^0 - \text{zmiana entalpii układu,}$$

$$\Delta S^0 - \text{zmiana entropii układu.}$$

Po podstawieniu do równania (17) otrzymuje się ogólne równanie wiążące równowagowy współczynnik podziału, z entalpią i entropią danego procesu:

$$\ln K = - \left(\frac{\Delta H^0}{RT} - \frac{\Delta S^0}{R} \right) \quad (19)$$

Równowagowy współczynnik podziału K , będący miarą wszystkich procesów separacyjnych, jest wypadkową dwu udziałów: entalpowego i entropowego, przy czym w zależności od zastosowanej techniki, dominujący może być udział jednej albo drugiej składowej. Ilustrują to przykładowe wykresy Van't Hoffa, przedstawione na rysunku 5, opisujące temperaturową zmienność stałej równowagi w dwu różnych procesach separacyjnych.

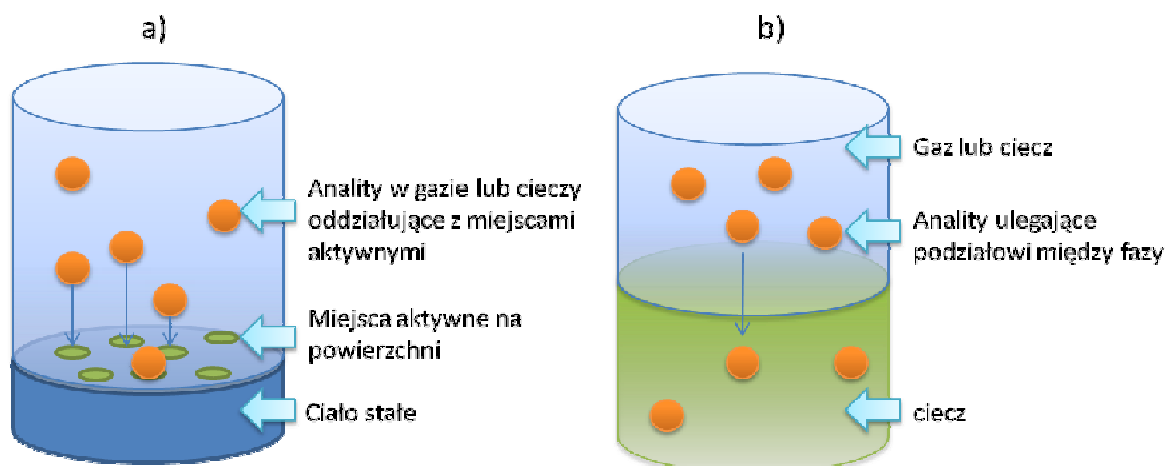


Rysunek 5. Wykresy Van't Hoffa, opisujące temperaturową zmienność stałej równowagi w dwu (a i b) różnych procesach separacyjnych

W pierwszym procesie (wykres A), przy małym udziale czynnika entropowego ($\Delta S/R$), następuje wyraźna zmiana entalpii układu wraz ze zmianą temperatury (duży kąt nachylenia krzywej). Taki przypadek ma miejsce w przypadku technik opartych o podział do fazy (chromatografia podziałowa, ekstrakcja), gdzie energia oddziaływań fizykochemicznych analitu z fazą odgrywa decydującą rolę w separacji. W drugim procesie (wykres B), udział czynnika entropowego ($\Delta S/R$) jest zdecydowanie większy, natomiast wpływ zmian temperatury na czynnik entalpowy jest mniej wyraźny (mniejsze nachylenie krzywej). Jest to przypadek opisujący techniki oparte o zjawisko adsorpcji (chromatografia adsorpcyjna lub jonowymienna), gdzie dochodzi do gwałtownych zmian w strukturze uporządkowania układu w trakcie separacji.

2.2. Adsorpcja i podział

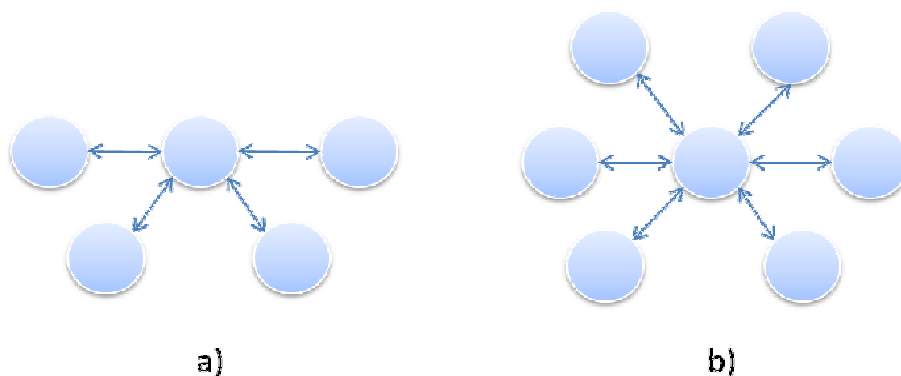
Z punktu widzenia procesu separacyjnego różnica pomiędzy adsorpcją a podziałem tkwi w miejscu, w którym dochodzi do zmiany stężenia rozdzielanego analitu; podczas adsorpcji zmiana ta zachodzi na powierzchni graniczących ze sobą faz, natomiast w trakcie podziału dotyczy ona całej objętości faz układu. Na rysunku 6 przedstawiono schematyczne ujęcie obu procesów.



Rysunek 6. Schematyczne ujęcie adsorpcji (a) i podziału (b)

Na granicy faz dochodzi do nierównomiernego rozłożenia (asymetrii) oddziaływań molekularnych na powierzchni (rysunek 7a). W efekcie cząsteczki powierzchniowe są silniej wciągane do wnętrza fazy objętościowej, co jest przyczyną powstania napięcia powierzchniowego na granicy faz, na której dochodzi do adsorpcji. Natomiast w przypadku podziału, oddziaływania w obrębie fazy objętościowej są jednakowe, niezależne od miejsca w przestrzeni (rysunek 7b).

Zarówno mechanizm adsorpcji (i desorpcji) jak i podziału, zachodzący w technikach separacji analitów, jest zwykle sumą kilku typów oddziaływań. Ich poszczególny udział decyduje o intensywności i trwałości interakcji analitu z medium separacyjnym. Po zajściu adsorpcji anality tracą swobodę ruchu, co oznacza obniżenie entropii układu. Anality po związaniu z sorbentem tracą również energię, czyli maleje ich entalpia swobodna. Skoro zachodzi równość opisana zależnością (18), oznacza to, że wszystkie procesy adsorpcji są egzotermiczne.



Rys. 7. Schematyczna reprezentacja oddziaływań międzycząsteczkowych w fazie powierzchniowej (a) i objętościowej (b)

Aby określić, w jakim stopniu związek chemiczny gromadzi się na granicy faz w stanie równowagi w danym układzie, należy znać stosunek całkowitej ilości związku na sorbencie do ilości pozostałej w drugiej fazie. Stosunek ten odpowiada stałej podziału zdefiniowanej wyrażeniem (15), przy czym w opisie zjawiska adsorpcji stała ta nazywana jest równowagowym współczynnikiem sorpcji, K_d :

$$K_d = \frac{C_s}{C_w} \quad (20)$$

gdzie:

C_s - całkowita ilość zaadsorbowanego analitu na jednostkę sorbentu (np.: $mol\ kg^{-1}$),
 C_w - ilość związku pozostająca w drugiej fazie (gazie lub roztworze) w stanie równowagi (np.: $mol\ l^{-1}$).

W równowagowym podziale substancji chemicznej między gaz lub ciecz a ciało stałe na stężenie analitu w gazie lub roztworze wpływa całkowita pojemność sorbentu i związany z tym stopień nasycenia powierzchni sorbentu. W najprostszym przypadku, dla niskich ciśnień lub bardzo małych stężeń (powierzchnia sorbentu jest prawie pusta) zależność (20) jest spełniona w postaci:

$$C_s = K_d C_w \quad (21)$$

i jest zwana równaniem izotermy Henry'ego (zależność liniowa, potwierdzona eksperymentalnie).

Powiązanie między stężeniami analitu w fazie wolnej i związanej dużo lepiej oddaje izoterma sorpcji wg modelu Freundlicha:

$$C_s = K_F \cdot C_w^{1/n} \quad (22)$$

gdzie:

K_F - stała Freundlicha lub współczynnik pojemnościowy,
 $1/n$ - wykładnik potęgowy Freundlicha.

Zależność ta zakłada, że równocześnie oddziałują różne typy miejsc aktywnych, zróżnicowanych zarówno pod względem ilości, jak i entalpii swobodnych. Dodatkowo, model ten zakłada, że może występować wielowarstwowa sorpcja. Wykładnik potęgowy jest wskaźnikiem zróżnicowania entalpii swobodnych, powiązanych z sorpcją z roztworu przez różne składniki heterogenicznego sorbentu:

- gdy $1/n = 1$, można wnioskować, że entalpia swobodna procesu jest stała w całym zakresie stężeń;
- kiedy $1/n < 1$, izoterma wskazuje, iż dodawany sorbat jest wiązany z centrami o coraz mniejszej entalpii swobodnej;
- gdy $1/n > 1$, izoterma ma przebieg rosnący, z czego można wnioskować, że większa ilość cząsteczek na powierzchni zwiększa entalpię swobodną, a tym samym potęguje dalszą sorpcję.

Parametry K_F oraz $1/n$ mogą zostać wyznaczone z danych eksperymentalnych, poprzez przekształcenie równania (22) do postaci logarytmicznej (23):

$$\log C_s = \frac{1}{n} \log C_w + \log K_F \quad (23)$$

Jeśli na sorbencie istnieje ograniczona liczba miejsc aktywnych, które zostaną wysyczone, C_s nie może rosnąć w nieskończoność wraz ze wzrostem C_w i izoterma nie może być opisana przez równanie (23). W takim przypadku lepiej sprawdza się model *izotermy Langmuira*. Zakłada on, że na powierzchni sorbentu istnieje określona liczba jednakowych centrów sorpcji (adsorpcji), z których każde jest zdolne do zaadsorbowania tylko jednej cząsteczki adsorbentu (proces ten nazywany też jest adsorpcją zlokalizowaną). Stan maksymalnej adsorpcji odpowiada obsadzeniu wszystkich centrów, tj. wytworzeniu na powierzchni monomolekularnej warstwy. Izotermę Langmuira opisuje następujące równanie:

$$C_s = \frac{C_{\max} K_L C_w}{1 + K_L C_w} \quad (24)$$

gdzie:

C_{max} - maksymalna liczba centrów aktywnych na jednostkę masy sorbentu,
 K_L - stała Langmuira.

W idealnym przypadku, C_{max} będzie takie samo dla wszystkich sorbentów, w rzeczywistości C_{max} może mieć różne wartości, w zależności od rodzaju analitu (np: różnica w wielkości cząsteczki oddziaływującej). Dlatego też, C_{max} zwykle wyraża maksymalną powierzchnię dostępną dla danego związku. Stała K_L jest określana, jako stała równowagi reakcji sorpcji:

centrum powierzchniowe + analit w roztworze lub w gazie ↔ analit na powierzchni

Przy założeniu, że K_L jest stała, następuje ciągłe powinowactwo analitu do wszystkich centrów powierzchniowych. Aby wyznaczyć K_L i C_{max} z danych eksperymentalnych, należy graficznie przedstawić zależność $1/C_s$ od $1/C_w$:

$$\frac{1}{C_s} = \frac{1}{K_L C_{max} C_s} + \frac{1}{C_{max}} \quad (25)$$

i z parametrów prostej wyznaczyć stałe izotermy.

Model Freundlicha jest zwykle stosowany do opisu zachowań cząsteczek chemicznych na zróżnicowanych powierzchniach porowatych, natomiast model Langmuira bardzo dobrze ilustruje koncepcję tworzenia monowarstwy adsorpcyjnej na powierzchni porowatej, a także procesy chemisorpcji.

W przypadku zjawiska podziału także dochodzi do równowagi, w której, zgodnie z równaniem (14) stosunek stężeń analitu w dwóch niemieszających się fazach jest stały, opisany stałą podziału K :

$$\left(\frac{c_i^\beta}{c_i^\alpha} \right)_{eq} = K = const \quad (26)$$

Stan ten opisuje prawo Nernsta, które jest spełnione w stałej temperaturze i przy stałym ciśnieniu. Prawo Nernsta jest spełnione dla układu dwu cieczy niemieszających lub mieszających się w sposób ograniczony. Warunkiem koniecznym jest także (jak w przypadku izotermy Henry'ego) niskie stężenie substancji rozpuszczonej w obu fazach oraz brak jakichkolwiek reakcji analitów, w kontakcie z jedną lub obu fazami układu (dysocjacja, asocjacja, polimeryzacja i in.).

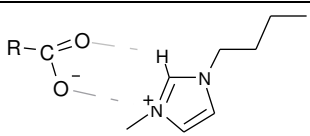
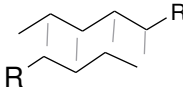
Wszystkie wymienione stałe opisujące równowagę układu, zarówno podczas procesu adsorpcji (K_d , K_F i K_L) czy podziału (K) są jedną z miar efektywności procesu separacyjnego. Im wyższa wartość dowolnej z nich, opisującej dany proces, tym intensywniejsze oddziaływanie analitu z medium separacyjnym, powodujące dłuższy czas przebywania analitu w układzie. Ponieważ wynik procesu separacyjnego najczęściej określa się czasem przebywania (retencji, retardacji, mobilności) analitu w układzie, czas ten jest wprost proporcjonalny do stałej równowagi opisującej dany proces.

2.3. Oddziaływania międzycząsteczkowe

Wielkością charakteryzującą termodynamiczne powinowactwo analitu do danej fazy jest standardowy potencjał chemiczny μ_i^0 (13). Na to powinowactwo składa się szereg oddziaływań fizykochemicznych o charakterze odwracalnym, powodujących przemieszczanie się analitu w układzie. W procesach rozdzielczych najczęściej wykorzystywane są następujące oddziaływania: **dyspersyjne, jonowe, dipol – dipol, dipol – dipol indukowany oraz wiązanie wodorowe**. Trwalsze oddziaływania (wiązania chemiczne), ze względu na ich nieodwracalność, praktycznie nie są wykorzystywane w procesach separacji. W tabeli 1 zgrupowano typowe oddziaływania towarzyszące procesom rozdzielania wraz z zakresami ich energii oraz ilustrującymi je przykładami.

Wszystkie oddziaływania międzycząsteczkowe mają naturę elektrostatyczną. Generalnie można wyodrębnić trzy grupy oddziaływań, których natura uzależniona jest od budowy chemicznej biorących w nich udział cząsteczek. Są to: oddziaływania dyspersyjne, oddziaływania polarne oraz oddziaływania jonowe.

Tabela 1. Typowe oddziaływania zachodzące w układach separacyjnych

Rodzaj oddziaływania	Energia (kJ/mol)	Zależność energii od odległości	Przykład
Silne oddziaływanie jonowe	200	$1/r$	
Oddziaływanie jonowe	40	$1/r$	$\text{Cl}^- \cdots +\text{N}_4\text{R}$
Oddziaływanie jon- dipol	25	$1/r^2$	$\text{R}_3\text{N}: \cdots +\text{N}_4\text{R}$
Wiązanie wodorowe	20	$1/r^3$	$-\text{OH} \cdots \text{O}=\text{O}$
Oddziaływanie dipol- dipol	4	$1/r^3$	$=\text{C}^{\delta+} \cdots :\text{NR}_3$
Oddziaływania dyspersyjne	2	$1/r^6$	

2.3.1. Oddziaływania dyspersyjne

Oddziaływania dyspersyjne (zwane inaczej siłami Londona) wywoływane są przede wszystkim pomiędzy substancjami obojętymi, nieposiadającymi trwałych ładunków elektrycznych czy momentów dipolowych. Mimo to, wzajemne sąsiedztwo dwóch obojętnych cząsteczek z czasem prowadzi do nieznacznych fluktuacji elektronów w ich strukturze, co z kolei wywołuje powstanie chwilowych dipoli. Dipole te, choć trwają dosłownie ułamki sekund, zaczynają na siebie oddziaływać przyciągając się i odpychając elektrostatycznie. Siła tego typu oddziaływań zależy od polaryzowalności cząsteczek, zarówno tych, w których rozpoczynają się fluktuacje elektronów, jak i

tych, które ulegać będą temu wpływowi. Fluktuacje te będą tym intensywniejsze im słabszy będzie wpływ jądra na wzbudzone (walencyjne) elektrony. Duża polaryzowalność świadczy o uprzywilejowanej skłonności cząsteczek do ulegania takim oddziaływaniom. W uproszczeniu energię oddziaływań dyspersyjnych można przybliżyć wzorem Londona:

$$V = -\frac{C}{r^6} \quad C \propto \alpha_1 \alpha_2 \left(\frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2} \right) \quad (27)$$

gdzie:

V – energia potencjalna oddziaływania,

r – odległość między cząsteczkami,

α_1 i α_2 – polaryzowalność cząsteczek biorących udział w oddziaływaniu,

I_1 i I_2 – energie jonizacji obu cząsteczek.

Oddziaływania dyspersyjne mają kluczowe znaczenie w jednym z najważniejszych obecnie rodzajów chromatografii cieczowej - w układzie faz odwróconych. Ten typ chromatografii cieczowej pozwala na precyzyjne projektowanie selektywności układu, dzięki niewielkim energiom oddziaływań (odległym o aż r^6), towarzyszącym procesowi separacji. Jest to obecnie jedna z najpopularniejszych metod rozdzielania analitów.

2.3.2. Oddziaływania polarne

Oddziaływania polarne zachodzą pomiędzy cząsteczkami polarnymi, które posiadają trwałe lub indukowane momenty dipolowe. Trwały moment dipolowy wynika z obecności konkretnych grup funkcyjnych w cząsteczce, których budowa zapewnia powstanie cząstkowych ładunków w obrębie struktury. Z kolei indukowanie dipolu może zajść w cząsteczce obojętnej (jak to ma miejsce w oddziaływaniach dyspersyjnych), przy czym zjawisko to dotyczy dużo silniejszych pól elektrycznych, pochodzących od cząsteczek polarnych. Energia oddziaływań polarnych zależy przede wszystkim od momentu dipolowego cząsteczki polarnej oddziałującej z inną cząsteczką polarną bądź indukującą dipol w innej cząsteczce obojętnej. Moment dipolowy wyrażany jest w debajach (D), przy czym $1D = 3,3 \cdot 10^{-30} \text{ C m}$.

Sama wartość momentu dipolowego nie zawsze odzwierciedla faktyczną polarność cząsteczki. Np. zmierzony moment dipolowy wody, substancji z natury wysoce polarnej, wynosi zaledwie 1,8 D lub polarnego metanolu, tylko 2,8 D. W obu przypadkach jest to wynik dodatkowych oddziaływań, jakie zachodzą w tych rozpuszczalnikach, prowadzących do wzajemnych asocjacji cząsteczek poprzez wiązania wodorowe, w konsekwencji kompensujących potencjalnie znaczne momenty dipolowe. W oddziaływaniach polarnych ważną rolę odgrywa także wzajemne ułożenie dipoli w przestrzeni. Ogólnie, energia potencjalna takiego oddziaływania zależy od momentów dipolowych μ obu dipoli, odległych od siebie o r^3 w przypadku ułożenia równoległego lub o r^6 w przypadku innej orientacji:

$$V \propto \frac{\mu_1 \mu_2}{r^3} f \quad (28)$$

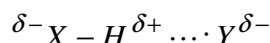
gdzie:

czynnik f uwzględnia zmianę energii wywołaną zbliżaniem się do siebie jednakich lub przeciwnych ładunków dipoli (zmianą kąta pomiędzy wektorami reprezentującymi oddziałujące na siebie dipole).

Gdy oddziaływanie dotyczy dipola indukowanego, energia potencjalna oddziaływania, opisana równaniem (27), jest zdecydowanie niższa, a stała C zależy od momentu dipolowego substancji indukującej μ_1 i polaryzowalność substancji indukowanej α_1 :

$$C \propto \mu_1^2 \alpha_1 \quad (29)$$

Szczególnym przypadkiem oddziaływań polarnych jest wiązanie wodorowe. W oddziaływaniu tym atom wodoru jest usytuowany pomiędzy dwoma silnie elektroujemnymi atomami (np. atomem azotu, tlenu lub fluoru) wiążąc je nawzajem. W najprostszym ujęciu, pomijając teorię orbitali molekularnych, oddziaływanie to powstaje w wyniku pojawienia się na atomie wodoru cząstkowego ładunku dodatniego (w związku ze spolaryzowaniem układu), który elektrostatycznie oddziałuje z wolną parą elektronową na drugim atomie elektroujemnym, wg następującego schematu:



gdzie:

X i Y to atomy wysoce elektroujemne biorące udział w oddziaływaniu.

Oddziaływanie takie jest stosunkowo trwałe (20kJ/mol) i pełni istotną rolę w strukturze kryształów molekularnych czy drugorzędowej strukturze białek. Z punktu widzenia technik separacyjnych, jest to zasadnicze oddziaływanie zachodzące podczas procesu sorpcji związków polarnych na powierzchniach takich jak krzemionka czy tlenki glinu. Ponadto, podobnie jak pozostałe oddziaływania polarne, współwystępuje ono z oddziaływaniami dyspersyjnymi i jonowymi w trakcie procesów rozdzielania.

Do oddziaływań polarnych należy także zaliczyć oddziaływania donorowo-akceptorowe par elektronowych (nazywanych także oddziaływaniem przeniesienia ładunku). Zachodzi ono pomiędzy donorem pary elektronowej - cząsteczką posiadającą wysokoenergetyczny orbital molekularny a akceptorem pary elektronowej - cząsteczką posiadającą niskoenergetyczny orbital molekularny. Najwyższymi energiami charakteryzują się orbitale zajęte przez wolne pary elektronów n (np. w aminach, eterach, fosfinach i in.) lub elektronów π (nienasycone związki organiczne). Orbitale akceptorowe to nieobsadzone orbitale walencyjne metali, orbitale antywiążące σ (np. chlorowce) lub związki zawierające układ π -elektronowy. W technikach separacyjnych, w celu podniesienia selektywności rozdzieleń często wykorzystuje się te oddziaływania pomiędzy układami nienasyconymi (oddziaływanie π -* π).

2.3.3. Oddziaływanie jonowe

Oddziaływania jonowe zachodzą między dwiema różnoimiennie naładowanymi cząsteczkami. W odróżnieniu od wiązania jonowego, w oddziaływaniu jonowym ładunek jest zdelokalizowany pomiędzy atomami tworzących je cząsteczek. Energię tego oddziaływania opisuje kulombowska energia potencjalna pomiędzy dwoma ładunkami odległymi o r , wg wzoru:

$$V = \frac{z_i e^2}{4\pi\epsilon_0 r} \quad (30)$$

gdzie:

z_i – wartościowość jonu,

e - ładunek elementarny,

ϵ_0 – przenikalność elektryczna w próżni ($8,85 \cdot 10^{-12} \text{ J}^{-1}\text{C}^2\text{m}^{-1}$).

W przypadku ośrodka zawierającego inne ładunki, np. roztworu elektrolitu, efekt oddziaływania jest dużo słabszy. Oddziaływanie jonowe jest wykorzystywane w technikach separacyjnych przede wszystkim w chromatografii jonowej, gdzie naładowane anality rozdzielane są na fazach stacjonarnych (jonitach) obdarzonych przeciwnym ładunkiem.

2.4. Lipofilowość w opisie potencjału oddziaływań molekularnych

Różnorodny zakres energetyczny oddziaływań umożliwia taki dobór układu separacyjnego, który jest w stanie selektywnie rozdzielić anality o różnej budowie chemicznej, czyli różniące się potencjałem oddziaływań molekularnych. Stąd, przed przystąpieniem do procesu separacyjnego, warto jest scharakteryzować badane anality pod tym kątem, aby móc dobrać jak najkorzystniejszy układ. Nie jest to zadanie łatwe, gdyż opisu substancji chemicznej pod kątem jej oddziaływania z otoczeniem dokonuje się przy pomocy kilkunastu parametrów (deskryptorów molekularnych), których wyznaczenie wymaga zastosowania złożonego aparatu chemometrycznego oraz niejednokrotnie dodatkowych eksperymentów. W praktyce jednak, wprowadza się parametry grupowe (zbiorcze), znacznie ułatwiające prognozę efektywnej separacji. Parametry grupowe opierają się o zasadę liniowości energii swobodnych, która zakłada, że podobne połączenia chemiczne reagują podobnie, i że podobne zmiany w strukturze podobnie wpływają na reaktywność. W myśl tej zasady można z dużym przybliżeniem obliczyć, na podstawie udziału poszczególnych fragmentów molekularnych w cząsteczce, jaka np. będzie rozpuszczalność badanej substancji w wodzie, jaka będzie jej prężność pary lub, co jest wykorzystywane w technikach separacyjnych, w jakim stopniu badana substancja ulegnie podziałowi pomiędzy fazę organiczną a fazę wodną. Wielkością charakteryzującą tę skłonność nazywa się zwyczajowo lipofilowością (powinowactwo związku chemicznego do fazy lipidowej, tzn. niemieszającej się z wodą), którą oczywiście charakteryzowała będzie stała podziału. Przyjęto, że rozpuszczalnikami najlepiej odwzorowującymi układ faz polarnych i niepolarnych są *n*-oktanol i woda. Rozpuszczalniki te po zmieszaniu tworzą dwie odseparowane fazy, przy czym ze względu na wzajemną częściową rozpuszczalność jest to układ zawierający oktanol nasycony wodą (2,3 mol/L) oraz wodę nasyconą oktanołem ($4,5 \times 10^{-3}$ mol/L). Stała podziału pomiędzy tymi fazami, opisywana jako K_{OW} lub współczynnik podziału P , jest wyrażana ilorazem dwóch stężeń substancji rozpuszczonej:

$$P = K_{OW} = \frac{C_{okt}}{C_w} \quad (31)$$

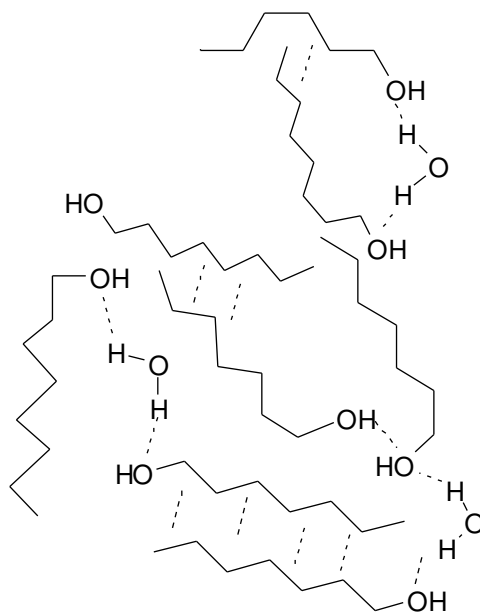
gdzie:

C_{okt} (mol/L) - stężenie molowe substancji w oktanolu,

C_w (mol/L) - stężenie molowe substancji w wodzie.

Eksperymentalnie, współczynnik taki wyznacza się w 25°C, przy stężeniu substancji badanej nie wyższym niż 0.01 mol/L. W takim układzie, jeżeli większa ilość cząsteczek badanego związku chemicznego znajdzie się w fazie oktanolowej, to mamy do czynienia ze związkiem lipofilowym (hydrofobowym). Jeżeli zaś większość pozostanie w fazie wodnej, będzie to związek lipofobowy (hydrofilowy). W fazie oktanolowej, dominującymi są oddziaływania dyspersyjne pomiędzy hydrofobowymi fragmentami cząsteczki rozpuszczonego związku a łańcuchem alkilowym *n*-oktanolu. Ponieważ *n*-oktanol posiada zarówno właściwości lipo- jak i hydrofilowe, występują tam również oddziaływania dipol-dipol czy wiązania wodorowe z grupą hydroksylową alkoholu, są one jednak o nieco mniejszym znaczeniu. Cecha związku, polegająca na wykazywaniu zarówno właściwości lipofilowych jak i hydrofilowych nazywa się amfilowością. Tę cechę *n*-oktanolu przedstawiono

schematycznie na rysunku 8, na którym uwidoczniono wszystkie oddziaływania zachodzące pomiędzy oboma rozpuszczalnikami.



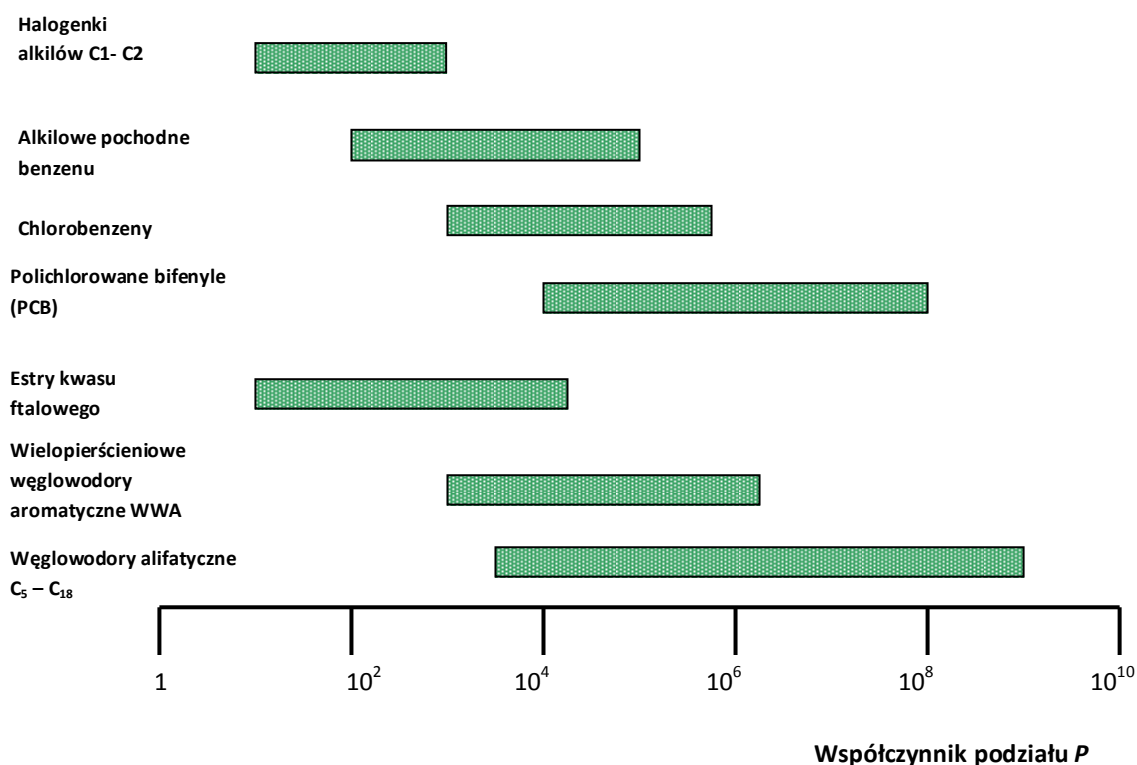
Rysunek 8. Oddziaływania międzycząsteczkowe układzie *n*-oktanol : woda

W fazie *n*-oktanolu analit może oddziaływać z rozpuszczalnikiem poprzez oddziaływania dyspersyjne, ale również na zasadzie oddziaływań dipol-dipol oraz wiązań wodorowych. W fazie wodnej z kolei, występować będą niemal wyłącznie wiązania wodorowe oraz oddziaływania dipol-dipol pomiędzy polarnymi fragmentami cząsteczki związku rozpuszczonego a wodą. Wartość współczynnika podziału oktanol – woda zależy zarówno od budowy chemicznej cząsteczki rozpuszczonego związku (liczba i rodzaj różnych grup funkcyjnych, udział miejsc nienasyconych, fragmentów alkilowych, wartość momentu dipolowego i in.) jak i, w dużej mierze, od jej wielkości. W trakcie mieszania obu rozpuszczalników (proces spontaniczny) całkowita entropia takiego układu gwałtownie wzrasta, jednak jej uprzywilejowany wzrost jest ograniczany spadkiem entropii w fazie wodnej, związanym ze stopniowym uporządkowywaniem cząsteczek wody w otocze hydratacyjnej solwatowanego związku. Ponieważ większe rozmiary cząsteczki wymagać będą coraz większej wnęki w rozpuszczalniku (większej otoczki hydratacyjnej), powodować to będzie nieuprzywilejowany spadek entropii całego układu. W takiej sytuacji korzystniejszej termodynamicznie staje się obniżenie rozpuszczalności cząsteczek o dużych rozmiarach w fazie wodnej, co wpływa na zwiększenie współczynnika podziału. Stąd też cząsteczki, nawet stosunkowo duże, ale zawierające w swojej strukturze układy nienasycone, rozgałęzione i in., ułatwiają zmniejszenie rozmiaru molekularnego, charakteryzują się dużo niższymi stałymi podziału od swoich analogów pozbawionych tych cech.

Stała podziału *n*-oktanol – woda mieści się w bardzo szerokim zakresie, od 0,01 dla związków o wysokiej polarności do 10^{10} dla substancji wysoce hydrofobowych. Na rysunku 9 przedstawiono zakres wartości współczynnika podziału *P* dla wybranych grup związków chemicznych. Tak rozpięty zakres wartości współczynnika spowodował, że przyjęto wyrażać go w formie logarytmicznej:

$$\log P = \log C_{okt} - \log c_w \quad (32)$$

Przyjmuje się, iż związki, których $\log P$ jest mniejszy od jedności, mogą być charakteryzowane jako hydrofilowe (liefobowe), związki dla których $1 < \log P < 3$, charakteryzują się średnią lipofilowością (liefilowością), natomiast związki, których $\log P > 3$, charakteryzują się wysoką lipofilowością (liefilowością). Wartości wybranych współczynników podziału P ($\log P$) przedstawiono w tabeli 2.



Rysunek 9. Wartości współczynnika podziału P wybranych grup związków chemicznych

W pionierskich badaniach Hansha i Leo nad wyznaczeniem stałej podziału oktanol-woda dla szerokiej gamy związków zauważono, że określone fragmenty strukturalne badanych substancji, wnoszą każdorazowo do całkowitej wielkości $\log P$ stały wkład, niezależny od tego, w jakiej cząsteczce występują. I tak np. różnica w zlogarytmizowanych wartościach stałych podziału pomiędzy benzenem a toluenem (strukturalnie różniące się obecnością grupy metylowej) wyniosła 0,55. Podobną różnicę zaobserwowano pomiędzy lipofilowością aniliny i metyloaniliny, w których przypadku różnicę strukturalną również stanowi ugrupowanie metylowe.

Tabela 2. Wartości logarytmu współczynnika podziału P dla wybranych substancji chemicznych

Związek	$\log P$
Acetamid	-1,16
Metanol	-0,82
Kwas mrówkowy	-0,41
Eter di etylowy	0,83
Chlorek metylenu	3,37
Heksametylobenzen	4,61
2,2',4,4',5-Pentachlorobifenyl	6,41

W myśl zasady liniowości energii swobodnych przyjęto więc, że niezależnie od miejsca przyłączenia grupa metylowa wnosi do całkowitej wartości $\log K_{OW}$ substancji stały udział w wysokości ok. 0,55. Z czasem baza danych cząstkowych udziałów lipofilowości została rozszerzona o dziesiątki ugrupowań funkcyjnych, grup czy pojedynczych atomów, oraz uzupełniona szeregiem poprawek, uwzględniających miejsca przyłączenia danej grupy czy atomu, czynniki steryczne, zjawiska elektronowe, geometryczne i in. W tabeli 3 przedstawiono przykładowe współczynniki cząstkowe wnoszone przez konkretne fragmenty do całkowitej lipofilowości analitu. Korzystanie z bazy danych pozwala bardzo szybko policzyć całkowitą lipofilowość substancji chemicznej wyłącznie na podstawie jej struktury. Obliczona w ten sposób lipofilowość, wyrażona logarytmem ze stałej podziału, umożliwia prognozę zachowania się analitu w układzie separacyjnym. Współcześnie korzysta się z kilku metod obliczenia $\log P$ zgodnie z powyższą zasadą. Obliczenia dokonuje się wykorzystując następującą zależność:

$$\log P = \sum a_i \cdot f_i + \sum b_j \cdot F_j \quad (33)$$

gdzie:

- f_i - cząstkowy udział fragmentu i ,
- a_i - ilość fragmentów i ,
- F_j - cząstkowy udział czynnika strukturalnego j ,
- b_j - ilość czynników strukturalnych j .

Tabela 3. Wybrane współczynniki cząstkowe fragmentów i części struktury molekuly

Fragment	f_i
Alifatyczny – CH ₃	0,5473
Alifatyczny – CH ₂	0,4911
Alifatyczny C	0,2000
Aromatyczny C lub –CH	0,2940
Wodór	0,2300
Cl – połączony z alifatycznym fragmentem	0,0600
Cl – połączony z aromatycznym fragmentem	0,6445
OH – połączony z aromatycznym fragmentem	-0,4802
Br – połączony z aromatycznym fragmentem	0,8900
Aromatyczny – NH ₂	-0,8540
Czynnik strukturalny	F_j
Wiązanie podwójne	-0,09
Wiązanie potrójne	-0,50
Elastyczny łańcuch alkilowy	
o n atomach węgla	$(n-1)(-0,12)$
2 chlorowce na tym samym atomie węgla	0,60
3 chlorowce na tym samym atomie węgla	1,59

Ograniczeniem tych metod jest dziś wielkość analizowanej cząsteczki. Metoda obliczeniowa sprawdza się bardzo dobrze dla małych cząsteczek, natomiast w przypadku związków wielkocząsteczkowych dochodzi do dodatkowych efektów związanych z objętością molekuly, co wprowadza dodatkowe oddziaływania w układzie, niemożliwe do przewidzenia tym prostym modelem.

Metody obliczeniowe lipofilowości korelują bardzo dobrze z wielkościami retencji (czasem przebywania w rozdzielającym układzie chromatograficznym) związków o średniej i wysokiej hydrofobowości.

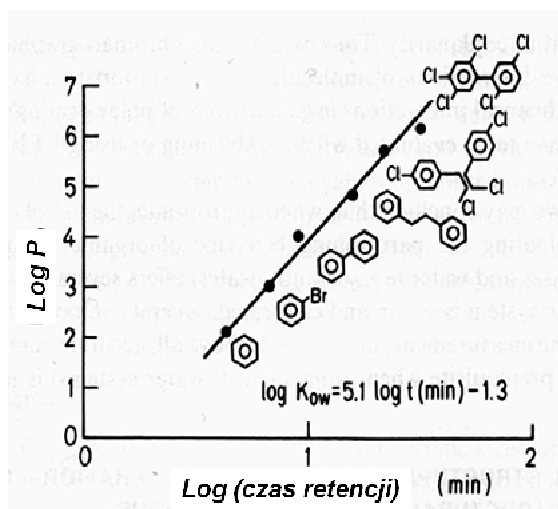
Poniżej podano przykład obliczenia teoretycznej wartości logarytmu ze stałej podziału K_{ow} trichloroetanu (CCl_3-CH_3). Do równania (33) należy wprowadzić:

- sumę udziałów fragmentów: 2 x (węgiel alifatyczny) + 3 x (wodór) + 3 x (chlor),
- oraz sumę udziałów czynników strukturalnych: 1 x (elastyczny łańcuch alkilowy o 2 atomach węgla) + 1 x (3 chlorowce na jednym atomie węgla).

$$\log P = 2 \cdot (0,20) + 3 \cdot (0,23) + 3 \cdot (0,06) + 1 \cdot (-0,12) + 1 \cdot (1,59) = 2,50$$

Wartość stałej podziału wyznaczona eksperymentalnie dla trichloroetanu (CCl_3-CH_3) wynosi dla 2,49.

Na rysunku 10 przedstawiono korelację lipofilowości wybranych węglowodorów alifatycznych i aromatycznych z ich wartościami retencji, otrzymanymi przy użyciu chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz. Dla przedstawionej na rysunku wybranej grupy związków zależność ta jest niemal idealnie liniowa, co wskazuje, iż dominującym parametrem decydującym o zatrzymywaniu tych analitów w danym układzie chromatograficznym jest lipofilowość. Istotnie, w chromatografii w odwróconym układzie faz parametr ten jest najlepszym deskryptorem retencji (zatrzymywania w układzie).



Rysunek 10. Zależność lipofilowości wybranych substancji od chromatograficznego czasu retencji

3. Literatura

1. Boethling, R. S.; Mackay, D. *Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals*; Environmental and Health Sciences; Lewis Publishers: Boca Rota, 2000.
2. Dutkiewicz, E. *Fizykochemia powierzchni*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne: Warszawa, 1998.
3. Giddings, J. C. *Unified separation science*; John Wiley & Sons Inc.: New York, 1991.
4. Hammett, L. P. *Fizyczna chemia organiczna*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 1970.
5. Kaliszan, R. *Structure and retention in chromatography. A chemometric approach*; Harwood Academic Publisher: Amsterdam, 1997.
6. Schwarzenbach, R. P.; Gschwend, P. M.; Imboden, D.M. *Environmental organic chemistry*; John Wiley & Sons Inc.: New York, 1993.
7. Witkiewicz, Z. *Podstawy chromatografii*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne: Warszawa, 2000.

II. Ekstrakcja

1. Wstęp

Klasyczna ekstrakcja jest sposobem wyodrębniania poszczególnych substancji lub grup związków chemicznych poprzez rozpuszczanie ich w rozpuszczalniku i oddzielenie ich w postaci roztworu od pozostałych składników próbki.

W przypadku próbek ciekłych ekstrakcja jest przenoszeniem wybranych składników z roztworu próbki (matrycy pierwotnej) do roztworu w innej cieczy (matrycy wtórnej zwanej też matrycą odbierającą). Gdy próbka jest ciałem stałym, ekstrakcja polega na rozpuszczeniu wybranych składników w cieczy i oddzieleniu roztworu od pozostałych, nierozpuszczalnych składników matrycy.

Przenoszenie składników z fazy stałej do ciekłej nazywa się ługowaniem lub roztwarzaniem, ale te terminy używa się zwykle do wydzielania (powiązanego często z rozkładem próbki) związków nieorganicznych z próbek stałych (np. gleby czy stopu metali) za pomocą roztworów kwasów, zasad, soli oraz związków chelatujących i innych.

We współczesnych technikach ekstrakcji, jako matrycę odbierającą stosuje się również gaz, płyn w stanie nadkrytycznym lub ciało stałe.

Ekstrakcję stosuje się z dwóch zasadniczych powodów:

- dla wyodrębnienia grupy lub poszczególnych związków chemicznych z ich pierwotnej matrycy,
- dla uzyskania odpowiedniego stężenia wyodrębnianych związków (zateżenia), umożliwiającego zastosowanie odpowiedniej techniki instrumentalnej w analizie ilościowej, szczególnie w analizie związków występujących w ilościach śladowych.

Wyodrębnianie może dotyczyć substancji podstawowej, np. produktu reakcji, biologicznie czynnych związków zawartych w surowcach roślinnych albo substancji zanieczyszczających dany roztwór czy inną próbkę.

Ekstrakty to anality i związki ekstrahujące się razem z nimi, w nowej matrycy, którą jest zwykle rozpuszczalnik lub mieszanina rozpuszczalników o znanym składzie. Skład chemiczny ekstraktu jest zdecydowanie prostszy od składu matrycy pierwotnej.

Rozpuszczalniki organiczne, będące matrycą odbierającą, można łatwo odparować, bez straty ekstraktu oraz są zwykle odpowiednie do zastosowania w technikach analizy końcowej, np. w chromatografii. Substancje obecne w ekstrakcie obok analitu mogą powodować zakłócenia (interferencje) w oznaczaniu, jednak jest ich, w stosunku do analitu, zdecydowanie mniej niż w próbce pierwotnej.

Proces lub operacja zwiększająca stosunek stężeń lub ilości analitów (mikroskładników) względem matrycy (makroskładników) w badanej próbce nazywa się wzbogacaniem (definicja przyjęta przez IUPAC). Ekstrakcja jest jedną z metod wzbogacania analitów.

Do oceny ilościowej procesu ekstrakcji służy wielkość nazwana procentem ekstrakcji (%E). Jest to stosunek masy substancji ekstrahowanej, znajdującej się w matrycy odbierającej po ekstrakcji $(A)_\beta$ do masy substancji ekstrahowanej, znajdującej się w matrycy pierwotnej przed ekstrakcją $(A)_\alpha$:

$$\%E = \frac{(A)_\beta}{(A)_\alpha} 100\% \quad (1)$$

Jeśli substancja ekstrahowana nie znajduje się w takiej samej postaci w obu matrycach (bo ulega np. dysocjacji, hydratacji lub hydrolizie) należy uwzględnić masy wszystkich form substancji ekstrahowanej, występujące w matrycy odbierającej $[\Sigma(A)_\beta]$ oraz masy wszystkich form substancji ekstrahowanej, występujące w matrycy pierwotnej $[\Sigma(A)_\alpha]$:

$$\%E = \frac{\sum (A)_\beta}{\sum (A)_\alpha} 100\% \quad (2)$$

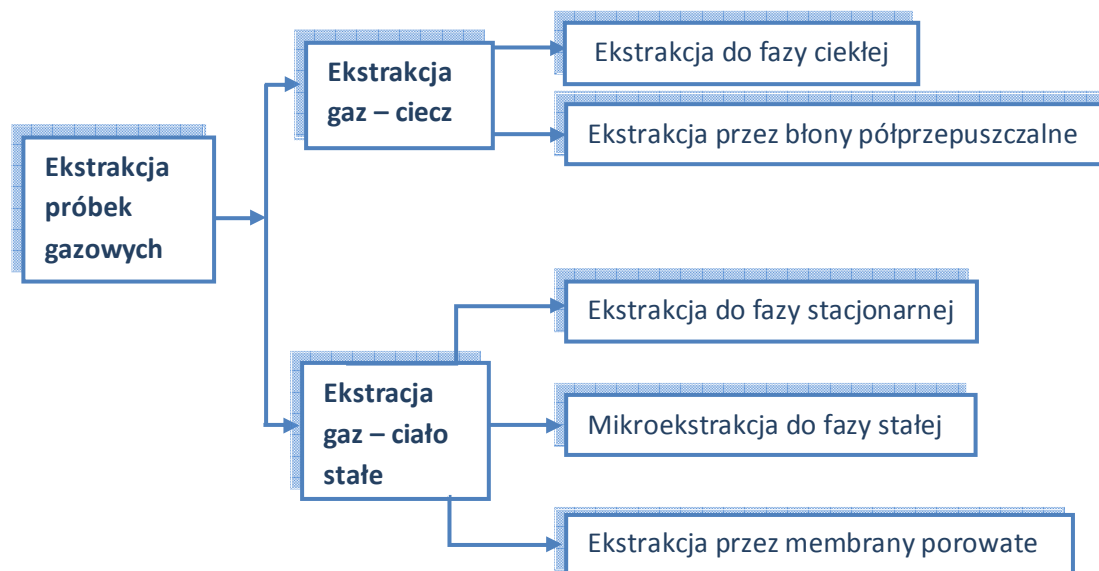
2. Podział technik ekstrakcyjnych

Kryterium podziału technik ekstrakcyjnych są stany skupienia próbki oraz medium ekstrahującego (ekstrahenta). Technika ekstrakcji ciała stałego różni się od techniki ekstrakcji cieczy czy gazu. W tradycyjnej ekstrakcji matrycą odbierającą jest ciecz natomiast nowoczesne techniki ekstrakcyjne są często bezrozpuszczalnikowe, gdzie matrycą odbierającą jest gaz lub ciało stałe. Nazywając technikę ekstrakcji należy przyjąć stałą kolejność wymieniania faz, tak by mówiąc o ekstrakcji typu ciało stałe - ciecz i ciecz - ciało stałe było oczywiste, która faza jest ekstrahentem. Logicznym wydaje się wymieniać w pierwszej kolejności stan skupienia fazy zawierającej substancję przed ekstrakcją, czyli próbki, natomiast stan skupienia fazy zawierającej substancję po ekstrakcji (ekstrahenta), jako drugą i taki sposób przyjęto w niniejszym opracowaniu. Na rysunkach 1, 2 i 3 przedstawiono podział technik ekstrakcyjnych stosowanych do próbek o różnym stanie skupienia.

Wybór techniki ekstrakcji zależy od właściwości fizyko-chemicznych substancji ekstrahowanych i matrycy, a także końcowego celu stosowanego procesu.

Właściwością analitu o podstawowym znaczeniu jest jego rozpuszczalność w ekstrahencie. Poza tym należy brać pod uwagę postać fizyczną analitu, jego lotność, zdolność do sublimacji, odporność termiczną, odporność na działanie promieniowania UV czy zdolność do sorpcji na powierzchni. Właściwości analitu i matrycy warunkują też dobór parametrów wybranej techniki ekstrakcji, takich jak: temperatura, rodzaj i moc oddziaływań fizycznych (ciśnienia, ultradźwięków czy promieniowania mikrofalowego), intensywności mieszania, itp. Wybór techniki ekstrakcji zależy od tego czy celem ma

być wyodrębnienie pojedynczej substancji czy określonej grupy związków chemicznych, czy wyodrębnianie przeprowadza się na skalę preparatywną czy analityczną. Sposób ekstrakcji zależy od poziomu stężeń analitu w matrycy, jak również od tego, czy końcowa analiza jest identyfikacją składników ekstraktu i/lub oznaczeniem ilościowym jego składu. Sposób ekstrakcji musi być dostosowany do wymogów techniki analizy końcowej.



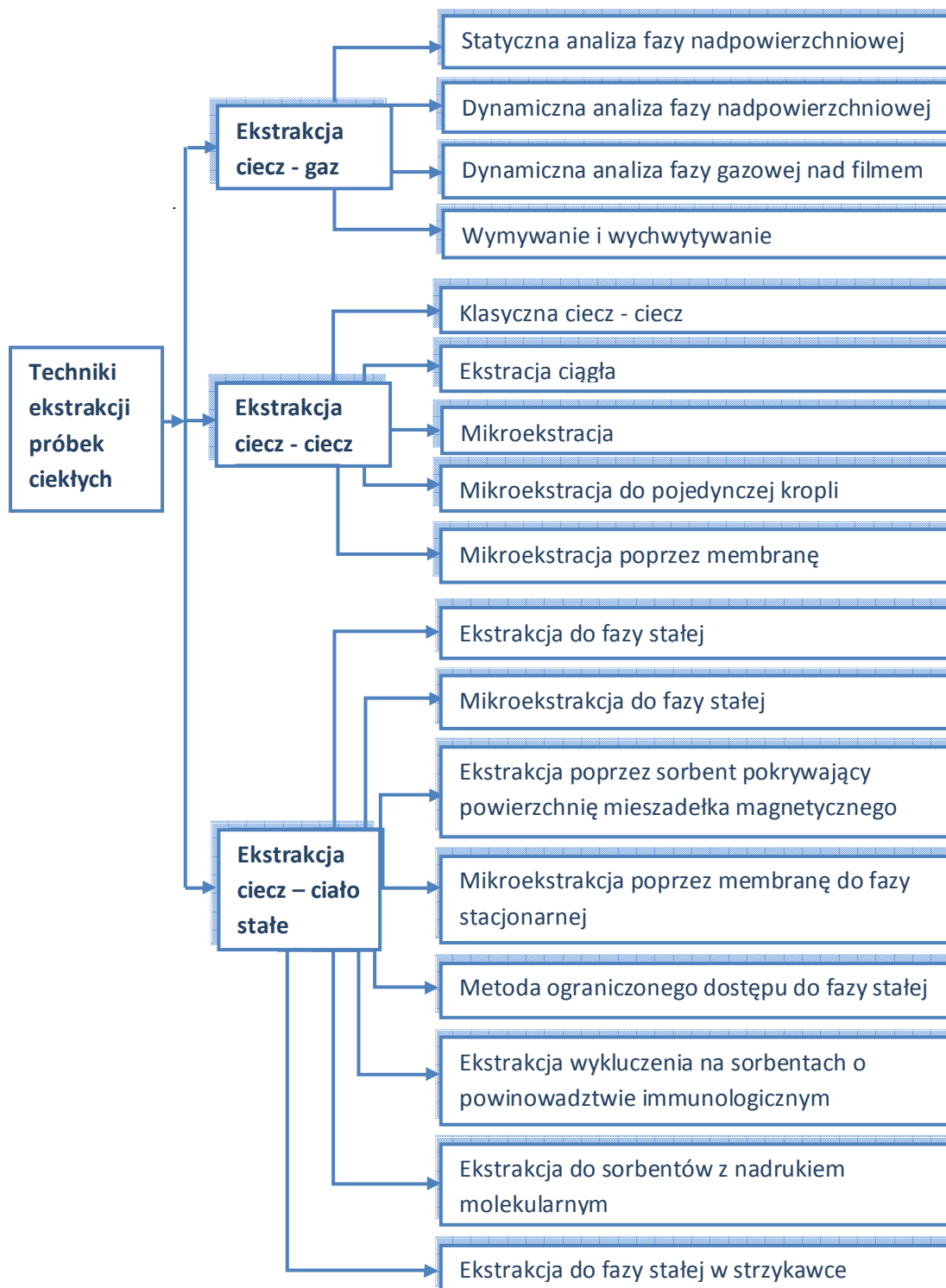
Rysunek 1. Sposoby ekstrakcji próbek gazowych

Kierunkiem rozwoju współczesnych technik ekstrakcyjnych są zasady „zielonej chemii”, w tym chemii analitycznej. Podstawowymi cechami „zielonej chemii analitycznej” są:

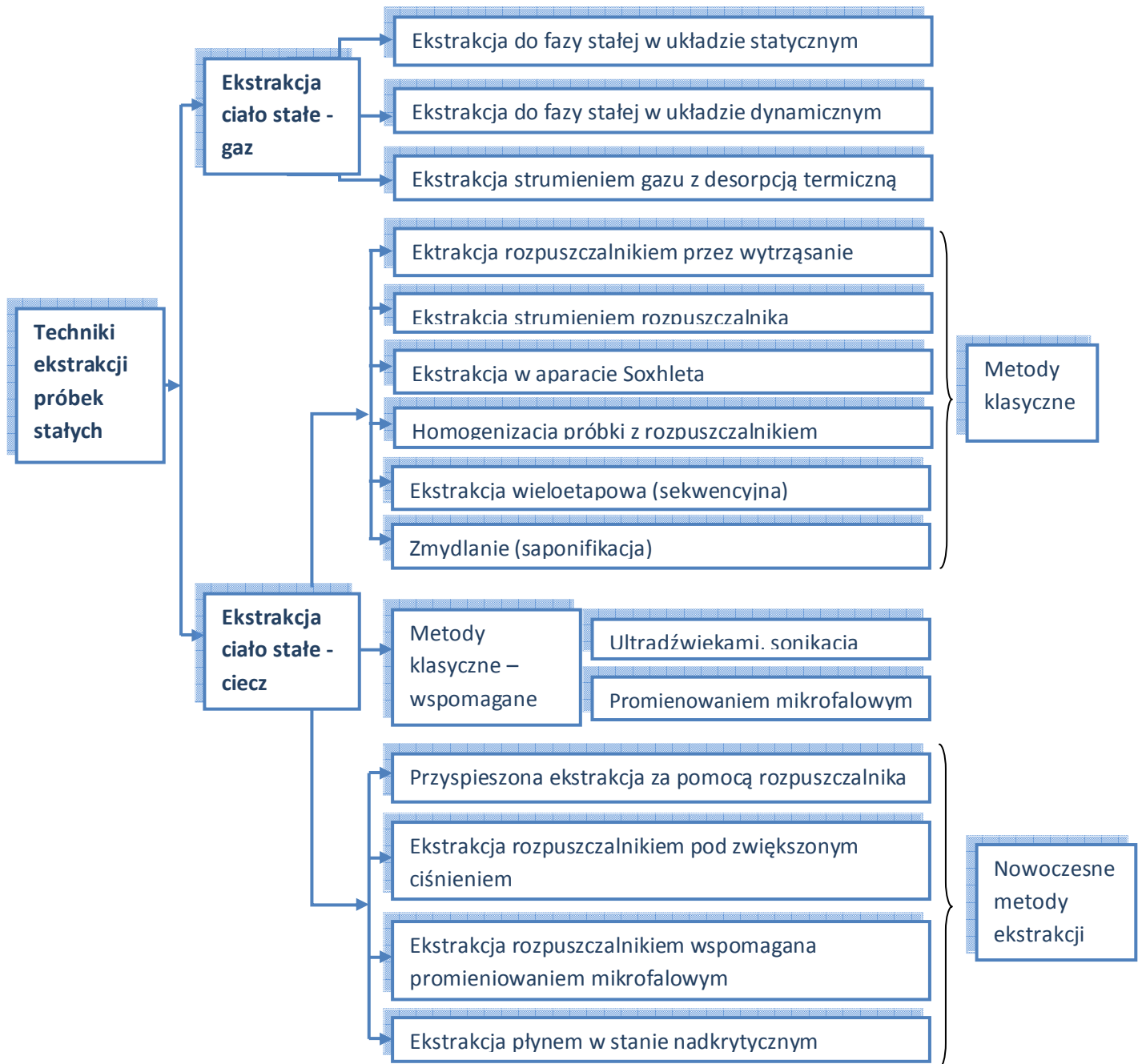
- ograniczenie zużycia odczynników chemicznych, zwłaszcza rozpuszczalników organicznych, lub ich eliminacja,
- niestosowanie odczynników toksycznych dla człowieka i środowiska naturalnego,
- ograniczenie emisji par i gazów, ścieków i odpadów stałych, powstających w wyniku procesu analitycznego,
- zmniejszenie nakładu pracy i zużycia energii w procesie analitycznym.

Powyższe wymogi spełnia wiele współczesnych technik ekstrakcji, jak ekstrakcja do fazy stałej lub gazowej. W ekstrakcji cieczą znalazły zastosowanie nowe ekstrahenty, takie jak: płyn w stanie nadkrytycznym, woda w stanie podkrytycznym czy ciecze jonowe.

Techniki ekstrakcyjne umożliwiające automatyzację procesu lub oznaczanie kilku substancji w jednej próbce zmniejszają zużycie energii i pracy w przeliczeniu na analit.



Rysunek 2. Sposoby ekstrakcji próbek ciekłych



Rysunek 3. Sposoby ekstrakcji próbek stałych

3. Ekstrakcja próbek gazowych

3.1. Ekstrakcja w układzie gaz – ciecz

Ekstrakcja próbek gazowych cieczą (ang. *gas liquid extraction*, GLE) polega na **podziale** izolowanych z próbki analitów gazowych do cieczy, pod warunkiem, że są one w niej całkowicie rozpuszczalne lub rozpuszczalne częściowo, ale w większym stopniu niż pozostałe składniki próbki. Mieszaninę gazową (próbkę) przepuszcza się przez określony rozpuszczalnik. W trakcie tego procesu rozpuszczalne składniki próbki są absorbowane i skład mieszaniny gazowej opuszczającej ciecz jest inny niż skład mieszaniny wejściowej. Proces podziału zachodzi w całej objętości cieczy. Przenoszenie mas polega na **dyfuzji** cząsteczek substancji w obu fazach (gazowej i ciekłej) poprzez warstwę graniczną, wywołanej różnicą stężenia substancji w obu fazach.

Różnica stężeń składnika absorbowanego jest siłą napędową dyfuzji, im większa różnica stężeń tym większa szybkość dyfuzji.

W płynie nieruchomym jest to dyfuzja cząsteczkowa, przy przepływie cieczy - dyfuzja burzliwa.

Przenikanie (podział) cząsteczek substancji przez warstwę graniczną, czyli strefę przyległą do powierzchni międzyfazowej i poprzez powierzchnię międzyfazową (granicę faz) zależy od szybkości przenikania i jest tym większe im większa jest powierzchnia międzyfazowa.

Zwiększenie powierzchni międzyfazowej uzyskuje się przez mieszanie, zastosowanie bełkotki lub rozpylanie, a także przez rozpraszenie na wypełnieniach o różnych kształtach. Etap dyfuzji można wydłużyć, stosując odpowiedni czas ekstrakcji.

Tą metodę ekstrakcji gazu stosuje się do próbek o stężeniu analitu rzędu kilku procent lub niższych, pod warunkiem, że ekstrahowany gaz bardzo dobrze rozpuszcza się w cieczy ekstrahującej. Ciecz (medium ekstrahujące) nazywa się **absorbentem**, składnik gazowy ekstrahowany z próbki gazowej – **absorbatem**, urządzenie, w którym zachodzi absorpcja nazywa się zaś **absorberem**.

Proces podziału składa się tu z trzech etapów: przenoszenia masy z fazy gazowej do powierzchni cieczy, rozpuszczenia w warstwie granicznej i przenoszenia masy z warstwy granicznej w głąb cieczy. Szybkość przenoszenia masy do granicy faz po obu stronach zależy od szybkości dyfuzji cząsteczkowej i burzliwej. Rozpuszczanie w warstwie granicznej wiąże się z oporami wnikania mas po obu stronach granicy. Przyczyną oporów jest bariera fizyczna i hydrodynamiczna. Bariere fizyczną stwarzają cząsteczki, które blokują dostępność powierzchni międzyfazowej do wnikania gazu. Z kolei barierę hydrodynamiczną stwarza napięcie powierzchniowe cieczy, które utrudnia ruch w strefie przyległej do powierzchni międzyfazowej. W nieruchomej warstwie cieczy o przenoszeniu masy decyduje dyfuzja cząsteczkowa.

Gazy słabo rozpuszczają się w cieczach w warunkach normalnych w porównaniu z innymi substancjami, a ich rozpuszczalność maleje wraz ze wzrostem temperatury. Oddziaływania międzycząsteczkowe gaz – ciecz (solwatacja) są słabe z powodu niewielkiej polarności gazów, a niewielki wzrost temperatury powoduje ich ulatnianie się (zwiększenie entropii lotnych związków nie wymaga dużych nakładów energii).

W układach rozcieńczonych gaz - ciecz w stanie równowagi, matematyczną zależność stężenia gazu pochłanianego w cieczy i jego ciśnienia podaje prawo Henry'ego (prawo Henry'ego nie obowiązuje, gdy gazy wchodzą w reakcje chemiczne lub ulegają dysocjacji):

$$p_A = H \cdot c_A \quad (3)$$

gdzie:

p_A - równowagowe ciśnienie gazu pochłanianego (ciśnienie cząstkowe tego gazu nad roztworem nasyconym),

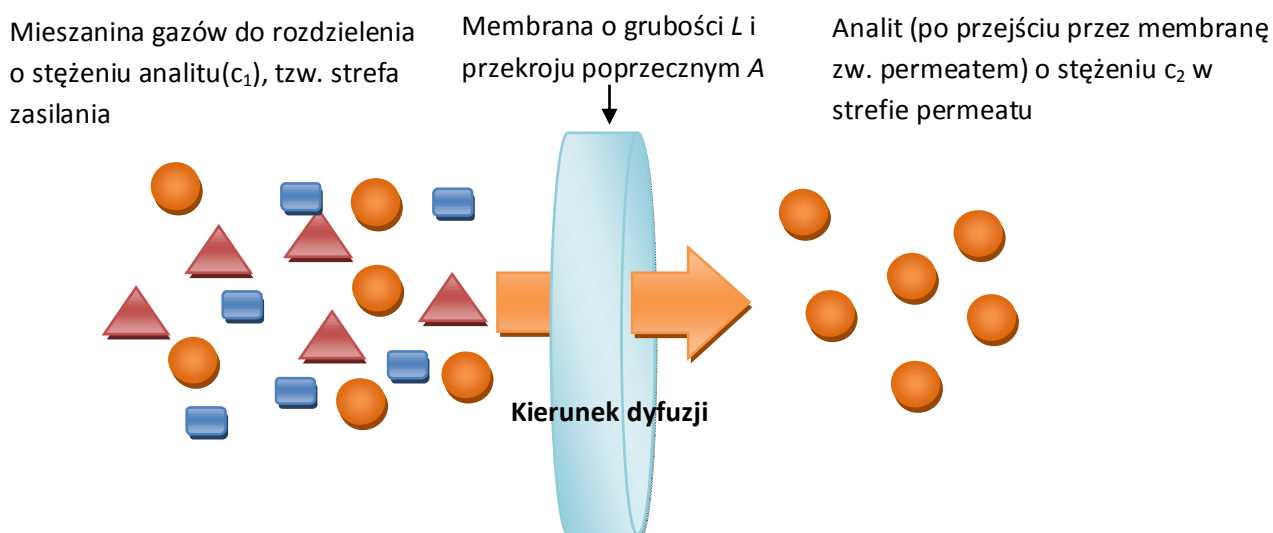
c_A - równowagowe stężenie gazu w cieczy (roztwór nasycony),

H - stała Henry'ego.

Z równania Henry'ego wynika, że rozpuszczalność gazu w cieczy będzie tym wyższa im wyższe ciśnienie w układzie. Wartość stałej Henry'ego zależy od temperatury, i wzrasta wraz z jej wzrostem, zatem wzrost temperatury zmniejsza rozpuszczalność gazu. W stanie równowagi szybkość absorpcji składnika gazowego w cieczy równa jest szybkości jego desorpcji z cieczy. Czas osiągnięcia równowagi jest długi i w praktyce, podczas ekstrakcji, nieosiągnany.

3.1.1. Ekstrakcja membranowa przez błony półprzepuszczalne

Do oczyszczania lub rozdzielania gazów stosuje się również membrany półprzepuszczalne zwane zwartymi. Materiał, z którego wykonana jest błona półprzepuszczalna zachowuje się jak ciecz, w której rozpuszczają się i dyfundują składniki gazu. Motorem separacji składników gazu jest różnica ich ciśnień cząstkowych po obu stronach membrany. Efekt rozdzielania zależy od selektywności materiału membrany oraz rozpuszczalności składników gazu w membranie i od wartości ich współczynników dyfuzji, które można modyfikować warunkami przeprowadzania ekstrakcji, jak temperaturą i ciśnieniem. Schemat procesu separacji przez membranę półprzepuszczalną przedstawiono na rysunku 8.



Rysunek 8. Schemat separacji przez membranę półprzepuszczalną

Przenoszenie masy przez membranę półprzepuszczalną opisywane jest równaniem dyfuzji Ficka i równaniem Henry'ego. Pierwsze dotyczy transportu masy podczas dyfuzji składnika, wywołanej różnicą jego stężeń po obu stronach membrany:

$$J = AD \frac{\Delta c}{L} \quad (4)$$

gdzie:

J – szybkość dyfuzji wyrażana strumieniem molowym (objętościowym) składnika, [$\text{cm}^3/\text{cm}^2 \text{ s}$],

Δc - różnica stężeń składnika między stroną zasilania a stroną permeatu ($c_1 - c_2$),

L - grubość membrany [cm],

A – poprzeczny przekrój strefy dyfuzji,

D – współczynnik dyfuzji analitu w materiale membrany.

W połączeniu z równaniem Henry'ego, zależność przyjmuje postać:

$$J = \frac{QA(p_1 - p_2)}{L} \quad (5)$$

z której wynika, że dla określonego analitu i materiału membrany, o wymiarach membrany decyduje różnica ciśnień ($p_1 - p_2$) po obu jej stronach, a szczególnie ciśnienie permeatu. Membrany zwarte są wykonywane z polimerów, ze szkła kwarcowego, materiałów ceramicznych i metali. Polimery nie mają dużej selektywności i nie są wytrzymałe na wysokie temperatury, są za to zdecydowanie tańsze od pozostałych. Wśród polimerów największym zastosowaniem cieszą się membrany wykonane z gumy silikonowej. Membrany zwarte ceramiczne lub metalowe mogą być jednofazowe lub dwufazowe, jak spieki ceramiczno-metalowe, tzw. cermety.

Ekstrakcję membranową przez błony półprzepuszczalne stosuje się w przemyśle i w laboratoriach analitycznych. W przemyśle membrany stosowane są do rozdzielania takich mieszanin, jak: tlen – azot, wodór – węglowodory, wodór – tlenek węgla, wodór – azot, ditlenek węgla – węglowodory, para wodna węglowodory, siarkowodór – węglowodory, hel – węglowodory, hel – azot, węglowodory – powietrze w procesach wzbogacania, osuszania, oczyszczania, wydzielania i odzyskiwania. W analityce gazów stosowane są urządzenia wykorzystujące ekstrakcję membranową. Są to permeacyjne osuszalniki strumienia gazów, dozometry permeacyjne, denudery permeacyjne, dozowniki w spektrometrach mas, umożliwiające wprowadzenie próbki gazowej do komory jonizacyjnej, separatory membranowe do przenośnych spektrometrów mas.

3.2. Ekstrakcja w układzie gaz – ciało stałe

Rozdzielanie na sorbentach stałych może odbywać się wg różnych mechanizmów: poprzez adsorpcję fizyczną, adsorpcję chemiczną, kondensację kapilarną i in. (por. rozdz. II.3.1.2).

Adsorpcja fizyczna polega na zatrzymywaniu składników gazu na powierzchni zewnętrznej i wewnętrznej (w porach) adsorbentu, w wyniku oddziaływań międzycząsteczkowych bliskiego zasięgu, jak siły Van der Waalsa czy wiązania wodorowe. W wyniku tych oddziaływań najłatwiej adsorbują się cząsteczki gazów o dużej masie cząsteczkowej i niskiej temperaturze wrzenia. Podczas gdy małe cząsteczki gazu mają mniejszą energię wiązania z adsorbentem. W trakcie procesu adsorpcji cząsteczki silniej wiążące się z adsorbentem wypierają te, słabiej związane. Ponieważ adsorpcja następuje na skutek oddziaływań bliskiego zasięgu między cząsteczkami

składników gazu a cząsteczkami powierzchni adsorbentu, ilość zaadsorbowanych cząsteczek jest ograniczona i adsorpcja fizyczna zachodzi do momentu całkowitego wykorzystania przez analit powierzchni zewnętrznej i wewnętrznej sorbentu.

Dlatego ważną cechą adsorbentu jest jego powierzchnia właściwa. Rozróżnia się dwa rodzaje powierzchni właściwej: powierzchnia właściwa ziaren adsorbentu i powierzchnia właściwa złoża adsorbentu.

Powierzchnia właściwa ziaren adsorbentu, zwana też **powierzchnią adsorpcyjną**, jest to stosunek całkowitej powierzchni zewnętrznej ziaren (granulek) i powierzchni porów do masy ziarna. Powierzchnia właściwa wyrażana jest zwykle w m^2/g . Na wielkość i kinetykę adsorpcji ma również wpływ struktura porów adsorbentu, określana całkowitą objętością porów i strukturą porów.

Całkowita objętość porów składa się z objętości właściwej wszystkich rozmiarów porów (makroporów, mezoporów i mikroporów, patrz rozdział: Ekstrakcja membranowa przez membrany porowate) i wyrażana jest w cm^3/g adsorbentu.

Strukturę porów określa: kształt powierzchni bocznej porów, kształt przekroju poprzecznego porów (jest zmienny wzdłuż jego długości), profil porów w przekroju podłużnym, krętość porów, rodzaje połączeń porów (obustronnie i jednostronnie otwarte), uporządkowanie lub nieuporządkowanie porów (położenie), połączenie elementów złoża adsorbentu (sztywne szkielet lub oddzielne, przylegające do siebie elementy). Od struktury porów zależy droga migracji cząstek analitu, tym samym szybkość adsorpcji.

Powierzchnia właściwa złoża adsorbentu jest potrzebna do obliczania transportu masy substancji z gazu do powierzchni adsorbentu. Powierzchnię właściwą złoża adsorbentu oblicza się na podstawie masy pojedynczego ziarna i gęstości nasypowej złoża, po uwzględnieniu kształtu ziarna. Charakterystykę najczęściej stosowanych adsorbentów przedstawiono w tabeli 1.

W przypadku **adsorpcji chemicznej**, oddziaływanie cząsteczek adsorbentu z cząsteczkami powierzchni adsorbentu związane jest z przejściem elektronów, w wyniku tego energia wiązania cząsteczek na powierzchni jest tak duża, że zaadsorbowana substancja może być desorbowana tylko w postaci związku chemicznego lub usunięta jak substancja stała.

Przy doborze adsorbentu do rozdzielania mieszanin gazowych należy **uwzględnić**:

- charakter chemiczny izolowanych substancji,
- charakter chemiczny adsorbentu odpowiadający właściwościom rozdzielanych gazów,
- pojemność sorpcyjną adsorbentu (odpowiednia powierzchnia właściwa, wielkość porów),
- metodę desorpcji analitu z sorbentu,
- czystość adsorbentu,
- trwałość analitu na wybranym sorbencie (możliwość zmian chemicznych analitu).

Proces adsorpcji składa się z trzech głównych etapów (por. rozdz. II.3.2.1.)

- wędrówka adsorbentu do zewnętrznej powierzchni adsorbentu, polegająca na dyfuzji cząstek gazu w fazie gazowej – dyfuzja zewnętrzna,

- dyfuzja adsorbentu w porach w kierunku powierzchni wewnętrznej porów – dyfuzja wewnętrzna,
- kondensacja cząsteczek adsorbentu na powierzchni porów – właściwy proces adsorpcji.

Proces adsorpcji może przebiegać w różnych warunkach: gaz poddawany adsorpcji może być jedno- lub wieloskładnikowy, adsorpcji może ulegać jeden lub kilka składników gazu, adsorpcja może być prowadzona statycznie lub dynamicznie, złożenie adsorbentu może być nieruchome lub ruchome itd. Warunki adsorpcji mają zdecydowany wpływ na jej całkowitą szybkość oraz szybkość poszczególnych jej etapach. Całkowitą szybkość adsorpcji wyraża się przyrostem ilości adsorbującej się substancji [jednostka masy] w jednostce czasu.

Adsorpcja może być prowadzona w sposób statyczny lub dynamiczny. W sposobie statycznym, ruch cząsteczek gazu w kierunku fazy stacjonarnej jest swobodny (dyfuzja molekularna). Statyczna adsorpcja stosowana jest w analityce, do pobierania próbek gazowych (dozymetry pasywne). Stosowanie metody statycznej nie wymaga urządzeń do zasysania gazu ani pomiaru jego objętości.

Adsorpcja dynamiczna polega na przepuszczaniu strumienia gazu przez adsorbent. Jest często stosowana w analityce do oznaczania organicznych składników gazowych. Wymaga zasysania gazu przez sorbent (np. przez rurkę sorpcyjną wypełnioną złożem sorbentu stałego lub kilku warstw różnych sorbentów) oraz pomiaru objętości zasysanego gazu. W przemyśle procesy adsorpcyjne przeprowadza się metodami dynamicznymi, najczęściej na złożu nieruchomym, rzadziej ruchomym czy fluidalnym. Zatrzymane na adsorbencie składniki muszą być uwalniane – desorbowane. Przy rozdzielaniu mieszanin gazowych, proces desorpcji jest związany z procesem adsorpcji. Rozdzielanie adsorpcyjne mieszanin gazowych można przeprowadzać dwoma sposobami:

- metodą adsorpcji zmiennie-temperaturowej, polegającej na adsorpcji w niskiej temperaturze (adsorpcja jest procesem egzotermicznym, odprowadzanie ciepła zwiększa wydajność), desorpcji i regeneracji adsorbentu w podwyższonej temperaturze,
- metodą adsorpcji zmiennie-ciśnieniowej („metoda bezgrzewcza”), polegającej na adsorpcji w podwyższonym ciśnieniu, a desorpcji i regeneracji przy obniżonym ciśnieniu.

W skali laboratoryjnej stosowana jest również desorpcja przez płukanie złoża gazem obojętnym, wypieranie zaadsorbowanego gazu innym, nieadsorbującym się na sorbencie oraz desorpcja rozpuszczalnikiem (ekstrakcja).

3.2.1. Ekstrakcja gazów przez membrany porowate

Do selektywnego rozdzielania składników mieszanin gazowych (gazów i par) stosuje się również klasyczne membrany porowate. Ze względu na średnicę porów membrany dzieli się na:

- mikroporowate, o średnicy porów mniejszej niż 2 nm,
- mezoporowate (membrany o porach przejściowych), o średnicy od 2 nm do 50 nm,
- makroporowate, o średnicy porów większej niż 50 nm.

Podstawą separacji na membranach porowatych jest proces **selektywnej adsorpcji** składników mieszanin gazowych na powierzchni i wewnątrz porów oraz na mechanizmie **wykluczenia**.

Tabela. 1. Charakterystyka najczęściej stosowanych adsorbentów

Adsorbent	Właściwości fizyczne	Skład chemiczny i właściwości chemiczne	Zastosowanie	wg klasyfikacji Kisieleva*
Żele krzemionkowe	Wąskoporowe (śred. 1,5 nm), pow. wł. 550÷700 m ² /g szerokoporowe (śred. 6 nm), pow. wł. 400÷530 m ² /g	SiO ₂ (99,71%) + Fe ₂ O ₃ , Al ₂ O ₃ , TiO ₂ , Na ₂ O, CaO, ZrO ₂ polarny, kwaśny, o dużej pojemności sorpcyjnej	Osuszanie gazów, usuwanie polarnych zanieczyszczeń organicznych, np. alkoholi, fenolu, chlorofenoli, chlorobenzenów, amin aromatycznych i alifatycznych	specyficzny dodatni
Tlenek glinu (aluminożel)	Powierzchnia właściwa – 200÷250 m ² /g	Al ₂ O ₃ (92%) + H ₂ O, Na ₂ O, SiO ₂ , Fe ₂ O ₃ , TiO ₂ , polarny, kwaśny	Usuwanie związków polarnych: alkoholi, glikoli, aldehydów, ketonów itp., osuszania powietrza, oczyszczanie z lotnych związków fluoru	specyficzny dodatni
Węgłe aktywne	Duża porowatość, posiadają makro-, mezo-, mikropory, pow. wł. – 700÷1200 m ² /g	Nazwy handlowe: Węgiel N, Węgiel A, Carbosorbit, Carbopol Z-O-4,	Usuwanie z powietrza par związków organicznych, usuwanie SO ₂ z gazów spalinowych	niespecyficzny niepolarny
Sorbent cząsteczkowy (zeolit)	Duża porowatość, pory jednorodne o średn. 0,3÷1,1 nm, pow. wł. – 700÷1100 m ² /g	Glinokrzemiany metali jedno- i dwuwartościowych, sita molekularne, typ A, X, Y, polarne,	Osuszanie wodoru, powietrza, gazów szlachetnych, usuwanie NH ₃ , H ₂ S, SO ₂ , CO ₂ , n-alkany, dieny, etyloamina, benzen, naftalen, proste związki heterocykliczne, chlorowcowęglowodory	specyficzny dodatni
Polimery porowate	Duża porowatość, wąskoporowate, pow. wł. kilkaset m ² /g	Niepolarne, niespecyficzne: XAD-2, XAD-4, Porapak(P,Q), Chromosorb (101, 102) Polarne, Chromosorb 104, Vinylosorb N, XAD-11, Amberlite IRC-50	Usuwanie zanieczyszczeń organicznych, kwasów i zasad organicznych, fenoli, związków organicznych z wieloma grupami funkcyjnymi	specyficzny ujemny
Polimery porowate	Duża porowatość, wąskoporowate, pow. wł. kilkaset m ² /g	XAD-2, XAD-4, Porapak(P,Q), Chromosorb (101, 102) Chromosorb 104, Vinylosorb N, XAD-11, Amberlite IRC-50	Usuwanie zanieczyszczeń organicznych, kwasów i zasad organicznych, fenoli, związków organicznych z wieloma grupami funkcyjnymi	Niepolarny niespecyficzny lub specyficzny ujemny

*klasyfikacja chemicznego charakteru powierzchni wg Kisieleva: niespecyficzne (niepolarne, neutralne i hydrofobowe, na powierzchni nie znajdują się jony ani grupy funkcyjne), specyficzne dodatnie (polarne, na powierzchni znajdują się skupione ładunki dodatnie), specyficzne ujemne (polarne, na powierzchni znajdują się rozłożone ładunki ujemne).

Adsorpcją nazywa się zjawisko zmian stężenia substancji na powierzchni styku fazy stałej z fazą gazową lub ciekłą (por. roz. 1.2.2.). Zmiany stężenia (sorpcja) następują w wyniku reakcji zachodzącej na powierzchni ciała stałego (**adsorpcja chemiczna**) lub w wyniku oddziaływań międzycząsteczkowych (sił Van der Waalsa), występujących w głębi fazy stałej oraz sił adhezji, skierowanych prostopadle do powierzchni styku faz (**adsorpcja fizyczna**). Wydajność adsorpcji wzrasta ze wzrostem powierzchni właściwej sorbentu. Adsorpcja jest procesem egzotermicznym, więc wydajność ekstrakcji na membranie porowatej wzrasta wraz z obniżeniem temperatury. Natomiast proces odwrotny, czyli desorpcja wymaga doprowadzenia energii.

Mechanizm wykluczania polega na dyfuzji przez membranę tych molekuł, których rozmiary odpowiadają średnicy porów.

Udział poszczególnych procesów zależy od wielkości porów. W makroporach membran adsorpcja zachodzi w niewielkim stopniu, służą one głównie do transportu adsorbowanych substancji na powierzchni membrany do porów o mniejszych średnicach. Na powierzchni porów przejściowych zachodzi adsorpcja, a zaadsorbowane molekuly mają dużą mobilność, gdyż siły adsorpcyjne występują w niewielkiej odległości od ścian porów. Adsorpcja na powierzchni mezoporów może być mono- lub polimolekularna. Wewnątrz porów przejściowych możliwa jest również kondensacja kapilarna. Wykroplenie się składnika w kapilarze jest etapem separacji od trwałych składników gazowych.

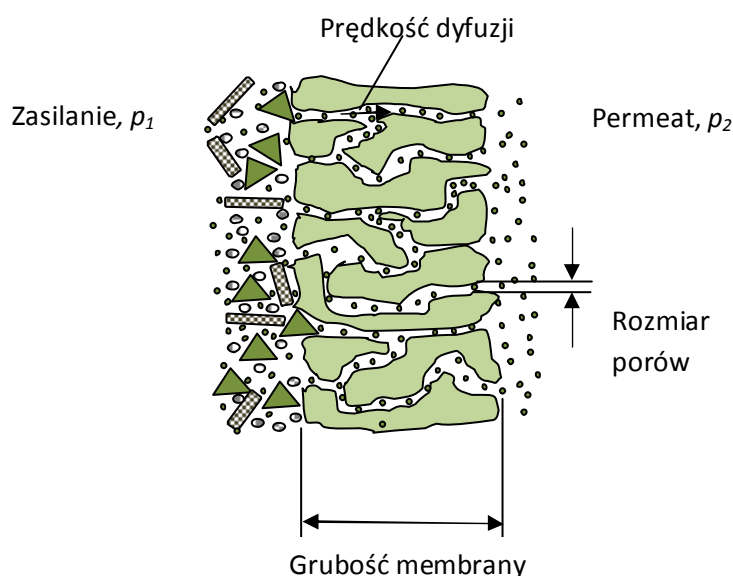
Membrany o mikroporach, porównywalnych z rozmiarami cząsteczek mają największą selektywność, wynikającą z możliwości doboru rozmiarów porów i doboru ich charakteru chemicznego. Poza tym, w mikroporach zachodzi wiele zjawisk, jak: dyfuzja molekularna, dyfuzja Knudsenowa, dyfuzja powierzchniowa, kondensacja kapilarna, oddziaływania między dyfundującymi molekułami oraz wykluczanie molekuł, dzięki którym membrany mikroporowate osiągają wysoką selektywność. Ogólny schemat działania membrany porowatej przedstawiono na rysunek 9. Rozdzielanie na membranie porowatej składa się z trzech etapów:

- wędrówka adsorbentu do zewnętrznej powierzchni adsorbentu, polegający na dyfuzji cząstek gazu w fazie gazowej – dyfuzja zewnętrzna,
- dyfuzja adsorbentu w porach w kierunku powierzchni wewnętrznej porów – dyfuzja wewnętrzna (prędkość dyfuzji w porach zależy w dużej mierze od stosunku średniej średnicy porów (r) do średniej drogi swobodnej cząsteczek adsorbentu (λ) i również decyduje o szybkości całego procesu; gdy $r \gg \lambda$, to transport wewnątrz porów w fazie gazowej odbywa się w wyniku dyfuzji molekularnej, czyli swobodnych ruchów cząsteczek, gdy $\lambda \gg r$, szybkość dyfuzji zależy o ciężaru cząsteczkowego gazu i średnicy porów i nosi nazwę dyfuzji knudsenowskiej),
- kondensacja cząsteczek adsorbentu na powierzchni porów – właściwy proces adsorpcji.

Cząsteczki o odpowiednich rozmiarach, nieulegające adsorpcji dyfundują przez pory membrany w kierunku mniejszego stężenia.

Membrany porowate wykonuje się z polimerów organicznych, materiałów ceramicznych, metali, szkła kwarcowego i rzadziej z węgla. Nowe technologie produkcji membran pozwalają otrzymywać membrany w postaci cienkiej warstwy zeolitów, krzemionki, tlenku tytanu, węglika

krzemu i węgla, naniesionej na nieorganiczne membrany makro- i mezoporowate. Membrany mogą mieć kształt płaskiej folii, kapilary lub wydrążonego, porowatego włókna kapilarnego.



Rysunek 9. Zasada działania membrany porowatej

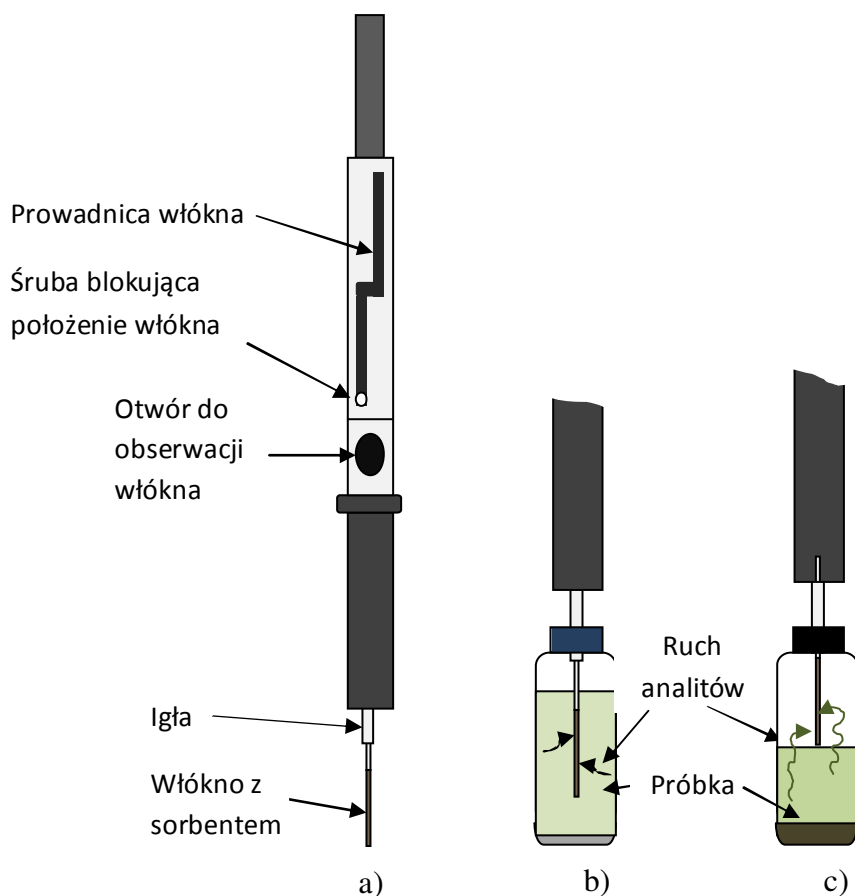
Ekstrakcja za pomocą adsorpcji na membranach porowatych umożliwia usuwanie z gazu wielu substancji jednocześnie, szczególnie organicznych oraz oczyszczanie dużych strumieni gazów o małym stężeniu zanieczyszczeń.

3.2.2. Mikroekstrakcja do fazy stałej

Mikroekstrakcja do fazy stałej (ang. *solid phase microextraction, SPME*) polega na sorpcji mikroilości związków organicznych w cienkiej, cylindrycznej warstwie fazy stacjonarnej, pokrywającej włókno szklane lub kwarcowe. SPME została zastosowana po raz pierwszy w Kanadzie w 1989 roku przez naszego rodaka Janusza Pawliszyna z Uniwersytetu w Waterloo. Mikroekstrakcja do fazy stałej znalazła szybko szerokie zastosowanie w analityce związków organicznych z próbek gazowych, ciekłych lub ekstraktów z próbek stałych. Cztery lata później firma Supelco wprowadziła na rynek strzykawkę do mikroekstrakcji do fazy stałej. Włókno z sorbentem znajduje się w rurce ze stali nierdzewnej, a całość mieści się w igle umocowanej w uchwycie, przypominającym strzykawkę do chromatografii gazowej (rysunek 10a). Uchwyt umożliwia dwa położenia włókna: wewnątrz i na zewnątrz rurki. W trakcie ekstrakcji włókno może być umieszczone (zanurzone) bezpośrednio w ciekłej próbce (ang. *direct immersion, DI-SPME*), lub w gazowej fazie nadpowierzchniowej nad ciekłą lub stałą próbką (ang. *head space, HS-SPME*), rysunek 10b i c.

Po określonym czasie ekstrakcji, włókno chowane jest do igły. Ekstrakt, po zamknięciu końca igły np. uszczelką chromatograficzną, może być przechowywany na włóknie do czasu analizy. Analiza chromatograficzna ekstraktu polega na wprowadzeniu igły przyrządu do dozownika chromatografu gazowego i wysunięciu włókna z sorbentem do przestrzeni dozownika, gdzie następuje desorpcja analitów do fazy gazowej. Gaz nośny przenosi je następnie do kolumny chromatograficznej, gdzie

następuje proces rozdzielania. Technika SPME nie wymaga specjalnych desorberów termicznych i można ją stosować w połączeniu z każdym chromatografem gazowym.



Rysunek 10. Schemat przyrządu do mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej, SPME (a) oraz sposoby ekstrakcji: bezpośrednio w próbce, DI-SPME (b) i w fazie nadpowierzchniowej, HS-SPME (c)

Dla celów chromatografii cieczowej stosuje się ekstrakcję poprzez przepuszczanie próbki przez kapilarę, pokrytą od wewnątrz sorbentem. Zatrzymane na sorbencie w kapilarze anality wymywa się bezpośrednio przez fazę ruchomą do kolumny HPLC lub rozpuszczalnikiem do naczynka chromatograficznego.

Fazy stacjonarne stosowane w technice SPME mają różne właściwości chemiczne. Sorpcja związków organicznych zależy od ich powinowactwa do zastosowanego rodzaju fazy stacjonarnej. Najpowszechniej stosowaną grupą faz są fazy silikonowe. Są to polisiloksany, które dzięki swym właściwościom fizykochemicznym, bardzo dobrze spełniają wymogi faz stacjonarnych. Polisiloksany są stabilnymi termicznie i chemicznie cieczami, posiadającymi odpowiednią lepkość, nieznacznie zmieniającą się ze zmianą temperatury. Fazy te można modyfikować chemicznie, poprzez dodatek różnych grup funkcyjnych, uzyskując w ten sposób różną selektywność. Struktura polisiloksanów umożliwia szybką sorpcję analitów. Przykładem faz silikonowych jest np. polidimetylosiloksan (ang. *polydimethylsiloxane*, PDMS) lub mieszanina polidimetylosiloksanu i diwinylobenzenu PDMS/DVB (ang. *divinylbenzene*, DVB). Jako fazę stałą w SPME stosuje się również poliakrylany (PA) oraz kopolimery np. carbowax/DVB, DVB/carboxenTM-PDMS i inne.

Podstawy metody

Zależność stężenia analitu w fazie stacjonarnej od czasu ekstrakcji jest funkcją wykładniczą, którą przedstawia równanie:

$$c_s(t) = c_{w,0} \frac{k_1}{k_2} (1 - e^{-k_2 t}) \quad (6)$$

gdzie:

k_1 i k_2 - stałe sorpcji i desorpcji analitu w fazie stacjonarnej,

$c_{w,0}$ - początkowe stężenie analitu w wodzie,

$c_s(t)$ - stężenie analitu w fazie stacjonarnej w czasie t .

Mechanizm ekstrakcji polega na **podziale** analitu między dwie fazy: matrycę (woda) i sorbent (polimer, ciecz). W związku z tym ilość analitu w sorbencie (m_s) zależy w głównej mierze od wartości stałej podziału analitu między dwie fazy: sorbent i wodę - $K_{s/w}$. Stała podziału jest ilorazem stężeń analitu w stanie równowagi w fazie sorpcyjnej (c_s) i fazie wodnej (c_w):

$$K_{s/w} = \frac{c_s}{c_w} = \frac{m_s}{m_w} \frac{V_w}{V_s} \quad (7)$$

gdzie:

V_w - objętość fazy wodnej,

V_s - objętość fazy ekstrahującej,

m_s - masa analitu w fazie ekstrahującej,

m_w - masa analitu w fazie wodnej.

Po osiągnięciu stanu równowagi, bilans mas można zapisać:

$$m_{w,0} = m_s + m_w \quad (8)$$

gdzie:

$m_{w,0}$ - początkowa masa analitu w fazie wodnej.

Przekształcając wzory (7) i (8), otrzymuje się wzór na masę analitu w fazie ekstrahującej,

$$m_s = \frac{m_{w,0} K_{s/w} V_s}{K_{s/w} + V_w} \quad (9)$$

który po uwzględnieniu początkowej masy analitu w fazie wodnej przyjmuje ostateczną postać zależności masy analitu w fazie ekstrahującej:

$$m_s = \frac{c_{w,0} V_w K_{s/w} V_s}{K_{s/w} + V_w} \quad (10)$$

Mikroekstrakcja do fazy stałej jest techniką równowagową, co oznacza, że zawsze masa analitu znajdująca się w sorbencie ekstrahującym jest zależna od jego stężenia początkowego w próbce. To, jaka początkowa część analitu znajdzie się w sorbencie, zależy od stałej podziału oraz od objętości

fazy stacjonarnej i próbki. Przy **bardzo dużej objętości próbek**, stosunek $\frac{V_w}{K_{s/w} + V_w}$ jest bliski jedności, więc równanie można zapisać:

$$m_s = K_{s/w} c_{w,0} V_s \quad (11)$$

co oznacza, że w takim przypadku **ilość analitu** ekstrahowana do fazy stacjonarnej jest **niezależna od objętości próbki**. Umożliwia to pomiar stężenia analitów w wysoce objętościowych próbkach, np. rzecze czy w jeziorze, poprzez bezpośrednie zanurzenie włókna do wody.

Dla **próbek gazowych**, zależność ilości analitu zaabsorbowana przez fazę stacjonarną od stężenia jego w próbce jest identyczna jak w przypadku próbek ciekłych, przy czym stężenie, objętość oraz stała podziału analitu dotyczy gazu:

$$m_s = K_{s/g} c_{g,0} V_s \quad (12)$$

gdzie:

$c_{g,0}$ - początkowe stężenie analitu w próbce gazowej,

V_g - objętość fazy gazowej (próbki),

$K_{s/g}$ - stała podziału analitu między dwie fazy: sorbent i próbkę gazową.

Jeśli włókno znajduje się w fazie nadpowierzchniowej nad próbką, w stanie równowagi między fazami, ilość analitu w fazie stacjonarnej zależy od stałej podziału między fazę stacjonarną a gazową fazę nadpowierzchniową, $K_{s/g}$ oraz między gazową fazę nadpowierzchniową a próbkę, $K_{g/w}$. Zależność tę można wyprowadzić jak poprzednio z bilansu mas w stanie równowagi, uwzględniając przejście analitu z fazy gazowej do fazy stałej:

$$K_{s/g} = \frac{c_s}{c_g} = \frac{m_s}{m_g} \frac{V_g}{V_s} \quad (13)$$

oraz przejście analitu z fazy wodnej do fazy gazowej:

$$K_{g/w} = \frac{c_g}{c_w} = \frac{m_g}{m_w} \frac{V_w}{V_g} \quad (14)$$

gdzie:

V_g - objętość fazy nadpowierzchniowej,

m_g - masa analitu w gazowej fazie nadpowierzchniowej.

Bilans mas obejmuje wszystkie trzy fazy:

$$m_{w,0} = m_s + m_w + m_g \quad (15)$$

stąd masa analitu w fazie stacjonarnej wynosi:

$$m_s = \frac{K_{s/g} K_{g/w} V_s V_w c_0}{K_{s/g} K_{g/w} V_s + K_{g/w} V_g + V_s} \quad (16)$$

Ponadto, w przypadku próbek ciekłych, stosunek stałej podziału ciało stałe/gaz i stałej podziału gaz/woda jest równy stałej podziału ciało stałe/woda:

$$K_{s/g} K_{g/w} = \frac{m_s}{m_g} \frac{V_g}{V_s} \frac{m_g}{m_w} \frac{V_w}{V_g} = \frac{m_s}{m_w} \frac{V_w}{V_s} = K_{s/w} \quad (17)$$

Jeśli ekstrahuje się anality, których stała podziału faza nadpowierzchniowa/próbka, $K_{g/w}$ jest niska, to zmniejszając objętość fazy gazowej, zmniejsza się wartość czynnika $K_{g/w} V_g$, co oznacza, że ilość analitu w fazie stacjonarnej będzie prawie taka sama, jakby zanurzyć sorbent w próbce. Jest to bardzo cenna cecha tej techniki, gdyż transport analitów przez fazę nadpowierzchniową jest znacznie szybszy niż w ciekłej fazie (w próbce zawsze tworzy się cienka warstwa wody wokół włókna, co spowalnia przenoszenie masy analitu). Ponadto, w fazie nadpowierzchniowej, jest znacznie mniejszy wpływ matrycy, co z kolei jest istotne w przypadku bardzo złożonych próbek.

Czas ekstrakcji zależy od czasu ustalania się równowagi między próbką a fazą stacjonarną. Dyfuzję analitów z próbki do fazy stacjonarnej przyspiesza **mieszanie**. Idealne mieszanie umożliwia zastosowanie ultradźwięków, w innych przypadkach zawsze wokół włókna znajduje się cienka warstwa wody ograniczająca dyfuzję do warstwy sorbentu i wydłużająca czas ustalania równowagi. Ponieważ warstwa sorbentu na włóknie ma małą grubość (7 – 100 μm), stan równowagi ustala się szybko i w praktyce czas ekstrakcji wynosi zwykle od 2 do 30 min. Poza tym pojemność włókna jest ograniczona i przedłużanie czasu kontaktu z próbką (zwłaszcza w gazową) może prowadzić do desorpcji i zmniejszenia wydajności ekstrakcji.

Dobór włókna z sorbentem opiera się najczęściej na zasadzie stosowanej w chromatografii - „podobne rozpuszcza podobne”, charakter sorbentu (polarność) dobierany jest do polarności analitu. Czułość metody zateżania techniką SPME zależy od wartości stałej podziału analitu między substancją sorpcyjną (fazę stacjonarną) a próbkę.

Jeśli dobór włókna jest utrudniony ze względu na właściwości analitu (obecność w matrycy znacznych ilości substancji o podobnej strukturze chemicznej), można zastosować jego **derywatyzację**. Dobrym sposobem, jeśli to jest możliwe, jest przeprowadzenie analitów w pochodne o innej strukturze chemicznej od pozostałych składników matrycy. Pochodne analitów powinny mieć inne właściwości fizykochemiczne, np. niższą temperaturę wrzenia lub inną polarność. Niższa temperatura wrzenia zwiększa ich lotność, a mniejsza polarność zwiększy stałą podziału na niepolarną fazę stacjonarną, co w rezultacie zwiększa wydajność ekstrakcji lub wręcz ją umożliwia. Derywatyzację próbki można wykonać przed ekstrakcją lub w trakcie. Jednym ze sposobów jednoczesnej ekstrakcji i derywatywacji jest zanurzenie włókna do odczynnika -reagenta a następnie zanurzenie do próbki lub umieszczenie w fazie gazowej nad próbką. Reakcja zachodzi na włóknie, co znacznie skraca czas analizy. Niestety, nie każdą reakcję można w ten sposób wykonać.

Masa analitu w fazie stacjonarnej zależy również od jej ilości. Dostępne są włókna o następującej grubości warstwy sorbentu: 7, 10, 30, 50, 65, 70, 85 i 100 μm . Grube warstwy fazy odpowiednie są do

większych ilości analitów, cieńsze stosowane są do mniejszych stężeń. Czas dyfuzji w fazie stacjonarnej zależy od jej grubości i wielkości molekuly analitu. Włókna o większej grubości warstwy, np. 100 μm , stosuje się do ekstrakcji niskomolekularnych i lotnych związków. Z kolei włókna o grubości warstwy mniejszej, np. 30, 10 lub 7 μm stosuje się do ekstrakcji związków o wyższych masach molekularnych i mniej lotnych. Grubość warstwy sorbentu należy również wybierać biorąc pod uwagę proces desorpcji analitu. Substancje o wyższych temperaturach wrzenia szybciej desorbują się z włókna o cieńszej warstwie fazy stacjonarnej.

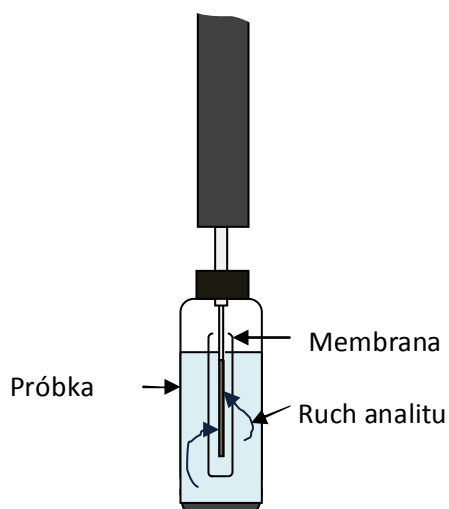
Na wydajność ekstrakcji mają wpływ objętości fazy gazowej i próbki.

Wydajność wzrasta przy minimalizacji objętości fazy gazowej nadpowierzchniowej. Zwykle próbka ciekła zajmuje połowę objętości naczynka do ekstrakcji. Poza tym stan równowagi między fazą gazową a ciekłą osiąga się szybciej w naczynku o mniejszej pojemności. Np. 3 razy szybciej osiąga się stan równowagi w naczynku o pojemności 5 mL, z zawartością próbki równą 1 mL niż w naczynku o pojemności 50 mL, z zawartością próbki równą 10 mL.

Stała podziału substancji między fazą gazową a próbką, $K_{g/w}$ rośnie ze wzrostem temperatury, wzrasta więc ilość analitu w fazie gazowej. Im wyższe stężenie analitu w fazie gazowej, tym szybsza jego sorpcja na włóknie. Ale zbyt wysoka temperatura jest przyczyną desorpcji ich z włókna, która nie powinna zachodzić w trakcie ekstrakcji. Optymalną temperaturę należy więc dobrać w zależności od składu próbki i użytej fazy stacjonarnej. Temperatura i czas ekstrakcji są ściśle ze sobą związane, wzrost temperatury pociąga za sobą skrócenie czasu ekstrakcji.

Dla zwiększenia wydajności ekstrakcji często stosuje się proces wysalania. Wysalanie zwiększa siłę jonową roztworu i zmniejsza rozpuszczalność organicznych analitów w próbce, tym samym zwiększając ich ilość w fazie gazowej, co ułatwia sorpcję na włóknie. Wysalanie często stosuje się przy oznaczaniu pestycydów i związków aromatycznych. Efekt wysalania zależy od rodzaju analitu i stężenia soli w próbce.

Zastosowanie selektywnych membran wokół włókna (rysunek 11) zwiększa selektywność ekstrakcji i może przedłużyć żywotność włókna. Szczególne zainteresowanie wzbudzają membrany węglowe.



Rysunek 11. Schemat mikroekstrakcji do fazy stałej przez membranę

Warunki **desorpcji** są równie ważne jak warunki ekstrakcji. Zwykle stosowana jest desorpcja termiczna i odbywa się w dozowniku chromatografu gazowego. SPME nie daje piku rozpuszczalnika w GC ale desorpcja analitu z włókna zachodzi wolniej niż odparowanie rozpuszczalnika, czego rezultatem jest ogonowanie pików, dlatego czas desorpcji powinien być możliwie najkrótszy. Temperatura dozownika powinna być wyższa niż temperatura wrzenia najwyższego wrzącego składnika, ale z drugiej strony musi być dopasowana do termicznej wytrzymałości włókna. W oznaczaniu nielotnych lub nietrwałych związków, technikę SPME lepiej połączyć z techniką HPLC lub LC/MS.

Technika SPME jest bezrozpuszczalnikową ekstrakcją. Różnorodność włókien dostępnych komercyjnie umożliwia wiele zastosowań (tabela 2). SPME jest metodą przygotowania próbek analizowanych techniką chromatografii gazowej, wysokosprawnej chromatografii cieczowej lub elektroforezy. Można ją stosować do lotnych i nielotnych substancji. Ekstrakcja do fazy stałej może się odbywać na bardzo selektywnych sorbentach, jakimi są przeciwciężła lub polimery z molekularnym nadrukiem.

Tabela 2. Przykłady zastosowań mikroekstrakcji do fazy stałej w analityce środowiska (na podstawie Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis, W. Wardencki, J. Curyło, J. Namieśnik, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007))

Próbka	Analit	Typ sorbentu, grubość warstwy fazy stacjonarnej [μm]	Typ ekstrakcji	Analiza właściwa
Woda	Pochodne benzenu	PDMS, 100	DI	GC/IT/MS
Woda	Pestycydy	PDMS, 7 PDMS/DVB, 65	DI	GC/NPD, GC/ECD
Woda	Lotne i średniolotne związki organiczne	PDMS	HS	GC/FID, GC/MS
Gleba	Chlorowcoorganiczne pestycydy	PDMS, 100	DI	GC/ECD, GC/MS
Gleba	Fungicydy	PA, 85	DI	GC/MS
Gleba	Fosforoorganiczne pestycydy	PA, 85	HS	GC/MS
Ryby, woda rzeczna	Metylortęć	PDMS, 100	HS	GC/MS
Woda	Fosforoorganiczne pestycydy	PA, 85	DI	SFE/HPLC
Woda	Substancje wybuchowe	CW/TPR, 50 PDMS/DVB, 60 PA, 85	DI	HPLC/UV
Grunt i woda powierzchni.	BTEX, naftalen, chlorowane alkany, chlorowane benzeny	PDMS, 100 PA, 85	HS	MCC/UV/IMS

Tabela 2. c.d.

Próbka	Analit	Typ sorbentu, grubość warstwy fazy stacjonarnej [μm]	Typ ekstrakcji	Analiza właściwa
Woda	BTEX	PDMS/DVB, 65	HS	GC/FID
Woda	N-nitrozoaminy	CAR/PDMS	HS	GC/NCD GC/NPD GC/MS
Ścieki przemysłowe	Związki siarkowe	PDMS/DVB PDMS/Carboxen	HS	GC/MS
Woda	Chlorek benzylu, dichlorek benzylu, trichlorek benzylu	Włókno z węglem aktywowanym (ACF)	HS	GC/MS
Powietrze	Chlorobenzeny	Carbowax/PDMS PDMS/DVD Carbowax /DVB	HS	GC/MS GC/ECD

4. Ekstrakcja próbek ciekłych

4.1. Ekstrakcja w układzie ciecz – gaz

Metoda ekstrakcji do fazy gazowej wykorzystywana jest głównie do oznaczania lotnych składników organicznych w próbkach wodnych oraz stałych. Metodę tę stosuje się w przypadku próbek szczególnie trudnych do analizy, wymagających uciążliwego i skomplikowanego oczyszczania oraz zagęszczania. Ekstrakcja do fazy gazowej polega na przenoszeniu analitów do fazy gazowej nad powierzchnią próbki (nadpowierzchniowej, ang. *head space*, HS) w układzie zamkniętym lub do strumienia gazu przepływającego przez próbkę. W obu technikach istotną rolę odgrywa podwyższona temperatura, dzięki której wspomagane są procesy desorpcji analitu z fazy ciekłej lub stałej do gazowej.

4.1.1. Ekstrakcja do gazowej fazy nadpowierzchniowej

Podstawą statycznej metody ekstrakcji do gazowej fazy nadpowierzchniowej jest zmienność ciśnienia cząstkowego substancji w fazie gazowej wraz ze zmianą jej stężenia w fazie ciekłej. W układzie zamkniętym, w stanie równowagi termodynamicznej zależność ciśnienia cząstkowego p_i składnika i w fazie gazowej nad próbką od jego stężenia w ciekłej mieszaninie, którą jest próbka, wyraża prawo Raoult'a:

$$p_i = x_i p_i^0 \quad (18)$$

gdzie:

x_i - ułamek molowy składnika i w próbce ciekłej,

p_i^0 - prężność pary nad czystym składnikiem i .

Z prawa Raoult'a wynika, że na podstawie stężenia analitu w fazie gazowej można określić pierwotne jego stężenie w próbce ciekłej. W stanie równowagi termodynamicznej między fazą gazową i ciekłą, przy danym ciśnieniu i temperaturze, stosunek stężeń składnika i w obu fazach jest wielkością stałą, której wartość wyraża stała podziału substancji i – K_i :

$$K_i = \frac{c_{iL}}{c_{iG}} \quad (19)$$

gdzie:

c_{iL} - stężenie substancji i w fazie ciekłej,

c_{iG} - stężenie substancji i w fazie gazowej.

Stężenie początkowe składnika i w próbce (c_{iL}^0) można obliczyć z bilansu mas. W stanie równowagi termodynamicznej ilość składnika i w fazie ciekłej wynosi $c_{iL}V_L$ a w fazie gazowej - $c_{iG}V_G$. Suma ilości składnika w obu fazach jest jego ilością w fazie ciekłej (próbce) przed ekstrakcją - $c_{iL}^0 V_L$:

$$c_{iL}^0 V_L = c_{iG}V_G + c_{iL}V_L \quad (20)$$

Po uwzględnieniu stałej podziału otrzymuje się równanie wyrażające związek między stężeniem badanej substancji w próbce ciekłej a jej stężeniem w fazie gazowej:

$$c_{iL}^0 = c_{iG} \left[\frac{V_G}{V_L} + K_i \right]$$

Równanie (21) jest podstawową zależnością stosowaną w oznaczeniach ilościowych techniką HS w połączeniu z chromatografią gazową. Stężenie badanej substancji w próbce ciekłej jest proporcjonalne do jej stężenia w fazie gazowej, będącej w stanie równowagi termodynamicznej z fazą ciekłą. Wyrażenie $\left[\frac{V_G}{V_L} + K_i\right]$ jest współczynnikiem proporcjonalności, który należy wyznaczyć doświadczalnie metodą krzywej kalibracyjnej.

Przy wykonywaniu pomiarów do krzywej kalibracyjnej należy nastrzykiwać na kolumnę chromatograficzną, identyczną objętość fazy gazowej jak w przypadku próbki badanej. Próbkę do wyznaczenia **krzywej kalibracyjnej** muszą mieć te same objętości fazy ciekłej V_L i fazy gazowej V_G , oraz niezmienną wartość stałej podziału K_i . Szczególnie trudny do zachowania jest warunek ostatni, tj. zachowanie tej samej wartości stałej podziału w próbkach wzorcowych i badanych, co się wiąże z zachowaniem takiego składu jakościowego próbek wzorcowych jak próbek badanych.

Innym sposobem wyznaczenia wartości stężenia składnika w próbce jest eliminacja z obliczeń stałej podziału: rzeczywista i rachunkowa. Rzeczywistą eliminację można osiągnąć przez ekstrakcję w temperaturze podwyższonej (takiej, by cały analit znajdował się w stanie gazowym), wówczas $c_{iL} = 0$, więc i $K_i = 0$, a zawartość w próbce oblicza się stosując metodę chromatograficzną. Nie jest to jednak metoda uniwersalna, można ją wykorzystywać do substancji lotnych i dobrze rozpuszczalnych w wodzie o małych stałych podziału.

Rachunkowo stałą podziału eliminuje się z obliczeń w metodzie dodatku wzorca

Najdogodniejszym sposobem tej metody jest wykonanie dwóch analiz równoległych, jednej bez dodatku, drugiej z dodatkiem znanej ilości analitu. Zaletą jest również to, że można go stosować w automatycznych dozownikach chromatografów gazowych.

Bilans mas substancji oznaczanej w pierwszym naczynku HS (bez dodatku wzorca, indeks dolny 1) można zapisać następująco:

$$V_L c_0 = V_G c_{1G} + V_L c_{1L} \quad (22)$$

Bilans mas substancji oznaczanej w drugim naczynku HS (z dodatkiem wzorca, indeks dolny 2) można zapisać następująco:

$$V_L c_0 + m_w = V_G c_{2G} + V_L c_{2L} \quad (23)$$

Do obu równań można wprowadzić stałą podziału K_i , która jest identyczna w obu przypadkach, ponieważ skład jakościowy obu próbek jest taki sam:

$$K_i = \frac{c_{1L}}{c_{1G}} = \frac{c_{2L}}{c_{2G}} \quad (24)$$

Po odpowiednim podstawieniu otrzymuje się wzór na obliczenie **nieznanego stężenia początkowego w fazie ciekłej (próbce)** na podstawie stężeń analitu w fazie gazowej:

$$c_0 = \frac{m_w}{V_L} \frac{c_{1G}}{c_{2G} - c_{1G}} \quad (25)$$

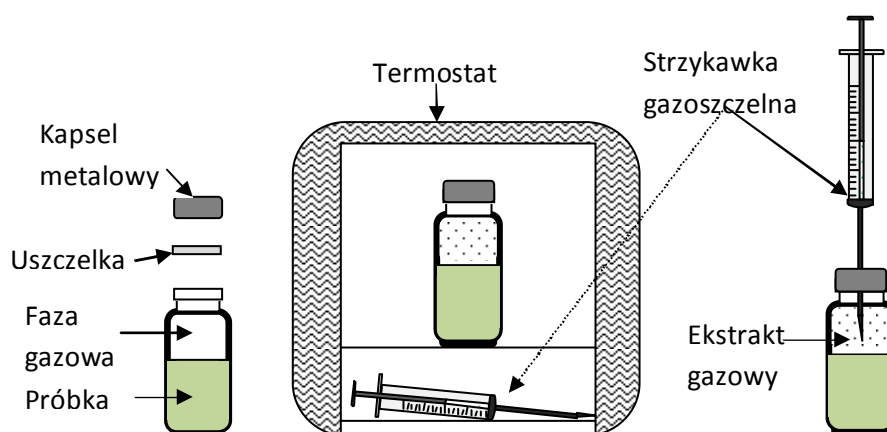
Ponieważ wielkość sygnałów chromatograficznych (A) jest wprost proporcjonalna do stężenia analitu w gazie gazowej (c_G), równanie można zapisać w postaci praktycznej, a mianowicie:

$$c_0 = \frac{m_w}{V_L} \frac{A_1}{A_2 - A_1} \quad (26)$$

Mnożąc obie strony równania przez wartość V_L otrzymuje się wzór na masę analitu w badanej próbce:

$$m_0 = m_w \frac{A_1}{A_2 - A_1} \quad (27)$$

Technikę „headspace” można wykonywać w dwóch układach ekstrakcyjnych: statycznym i dynamicznym. Statyczna metoda ekstrakcji do fazy nadpowierzchniowej (ang. *static headspace*, SHS) należy do metod równowagowych. W zamkniętym naczyniu, zawierającym próbkę ciekłą i gaz obojętny, w określonej temperaturze ustala się między fazami stan równowagi termodynamicznej, w którym stosunek stężeń analitów w obu fazach jest zgodny z ich stałą podziału. Po pobraniu określonej objętości fazy gazowej i oznaczeniu jej składu, uzyskuje się informację o składzie próbki. Ekstrakcję można przeprowadzać przy użyciu powietrza, pod warunkiem, że nie ma w nim analitów, a składniki powietrza nie oddziałują z substancjami oznaczanymi. Schemat postępowania w przypadku metody statycznej przedstawiony jest na rysunku 12. Po napełnieniu naczynka HS próbką (1) i fazą gazową (2) należy je zamknąć szczelnie za pomocą uszczelki (3) i kapsla metalowego (4) używając kapsłownicy. Zamknięte naczynko wstawia się do termostatu (5), gdzie w czasie t i temperaturze T ustala się stan równowagi. Optymalny czas i temperaturę termostatowania należy ustalić eksperymentalnie dla każdego analitu. Po ustaleniu się stanu równowagi ekstrakt gazowy (6) pobiera się gazoszczelną strzykawką (7), która była termostatowana w tej samej temperaturze, co próbka. Ogrzanie strzykawki do tej samej temperatury, co próbka zapobiega wykrapaniu się analitów podczas pobierania ekstraktu gazowego oraz oczyszcza ją przez odparowanie ewentualnych pozostałości po poprzednim użyciu. W automatycznych urządzeniach (przystawkach do chromatografu gazowego) ogólny schemat postępowania jest podobny do schematu przedstawionego na rysunku 12.



Rysunek 12. Schemat postępowania w statycznej ekstrakcji do fazy gazowej

Dynamiczna metoda ekstrakcji do gazowej fazy nadpowierzchniowej (ang. *dynamic headspace*, DHS) należy do technik nierównowagowych i polega na przepływie strumienia gazu ekstrahującego nad powierzchnią ogrzanej próbki. Ekstrakcja dynamiczna jest bardziej wydajna niż statyczna, gdyż kolejne porcje gazu porywają wydzielające się do fazy nadpowierzchniowej anality. Stosuje się ją w przypadku niskiego stężenia oznaczanych związków w matrycy lub z powodu małych wartości stałej podziału. Poza tym jest to dogodna metoda izolacji substancji z silnie pieniających się cieczy. Wadą jest natomiast duże zużycie gazu i konieczność izolowania analitów z fazy gazowej, gdyż dużej objętości gazu nie da się wprowadzić do dozownika chromatografu gazowego.

Sposobem na zwiększenie powierzchni kontaktu przepływającego gazu z próbką jest ekstrakcja do fazy gazowej przepływającej nad cienką warstwą (filmem) ciekłej próbki. Metoda ta nosi nazwę angielską *thin layer headspace*, TLHS. Duże rozwinięcie powierzchni kontaktu występuje w przypadku rozprysku próbki ciekłej w fazie gazowej.

4.1.2. Ekstrakcja strumieniem gazu przepływającym przez próbkę

Odrębną nierównowagową metodą izolacji analitów jest technika wymywania i wychwytywania (*purge and trap*, PT), która może być wykonywana w układzie zamkniętym i otwartym. Polega ona na wymywaniu analitu przez gaz ekstrahujący, przepuszczany przez warstwę próbki ciekłej a następnie usuwaniu analitu z gazu. W czasie przechodzenia kolejnych objętości gazu przez próbkę następuje zmniejszanie się w niej zawartości analitu. Stężenie analitu w próbce zmienia się wraz ze zmiennością objętości gazu (w danej temperaturze) wg funkcji wykładniczej:

$$c_{iL} = c_{iL}^0 e^{\left[-\frac{H V_G}{RT V_L} \right]} \quad (28)$$

gdzie:

H - stała Henry'ego,

R – stała gazowa,

c_{iL} - stężenie analitu i w próbce ciekłej o objętości V_L po przepuszczeniu przez nią objętości gazu V_G ,

c_{iL}^0 - początkowe stężenie analitu w próbce.

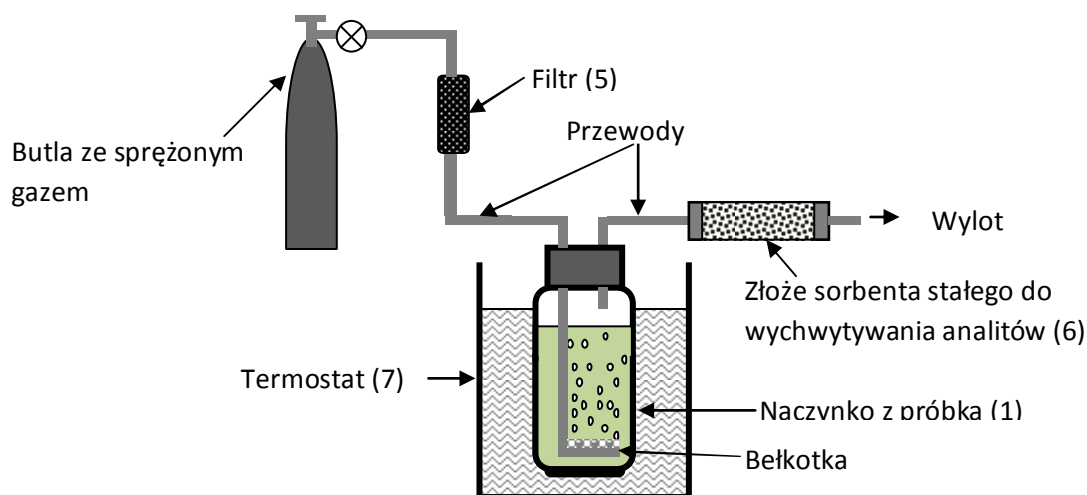
W technice PT wymywanie i wychwytywanie analitów jest prowadzone w tym samym czasie, przy otwartym obiegu gazu ekstrahującego, którym najczęściej jest hel. Schemat i zasadę działania takiego zestawu przedstawiono na rysunku 13. Próbkę umieszcza się w specjalnym, szczelnym naczynku (1), do którego doprowadzany jest gaz obojętny (2) przewodem (3), zakończonym bełkotką (4). Przepływ gazu ekstrahującego przez próbkę i pułapkę wymuszany jest ciśnieniem gazu w butli (2). Ekstrahent nie może wprowadzać zanieczyszczeń do próbki, dlatego gaz przepuszczany jest przez filtr (5), dla usunięcia ewentualnych niepożądanych substancji. Gaz, przepływając przez próbkę w postaci rozproszonych pęcherzyków, zabiera ze sobą lotne substancje, które następnie są zatrzymywane przez sorbent znajdujący się w pułapce (6). Objętość badanej próbki zależy od stężenia oznaczanych w niej związków chemicznych, zwykle wynosi kilka lub kilkanaście mL. Czas i objętość przepuszczanego gazu należy dostosować do wartości stałej podziału analitu. Najczęściej gaz przepuszczany jest przez próbkę przez kilka do kilkudziesięciu minut z prędkością od 10 do 40

mL/min. Dla związków lotnych, o dużej wartości stałej podziału, wystarczające stężenie analitu w fazie gazowej można osiągnąć już w temperaturze pokojowej. Dla związków średniolotnych lub trudnolotnych należy stosować podwyższoną temperaturę ekstrakcji, by zwiększyć ich lotność.

Związki polarne ulegają solwatacji w roztworach próbek, co zmniejsza ich lotność (następuje przesunięcie równowagi w kierunku fazy ciekłej). Na wydajność ekstrakcji ma również wpływ siła jonowa roztworu próbki. Im większa siła jonowa próbki, tym mniejsza rozpuszczalność w niej składników organicznych, stąd wysalanie próbki zwiększa wydajność ekstrakcji. Wydajność ekstrakcji do fazy gazowej jest to stosunek ilości analitu, jaka przeszła do fazy gazowej do ilości początkowej w próbce, wyrażony w % (patrz (1) i (2), rozdz. II.1):

$$E = \frac{c_{iL}^0 - c_{iL}}{c_{iL}^0} 100\% \quad (32)$$

W zestawie do ekstrakcji w układzie zamkniętym gaz doprowadzany jest do próbki i pułapki za pomocą pompy. Oczyszczony z analitu gaz po wyjściu z pułapki zawracany jest do ekstrakcji.



Rysunek 13. Schemat zestawu do ekstrakcji przez wymywanie i wychwytywanie (PT) w układzie otwartym

W dynamicznych metodach ekstrahowane związki trzeba izolować z fazy gazowej, ponieważ znajdują się w dużej jej objętości. Pułapki powinny zapewniać ilościowe wychwycenie składników oraz ilościowe i łatwe uwolnienie analitów. W zależności od właściwości fizyko-chemicznych analitów, wychwytywanie można stosować poprzez adsorpcję na sorbentach stałych, absorpcję w roztworach lub fazach ciekłych osadzonych na nośniku lub przez wymrażanie.

Sorbenty stałe powinny się charakteryzować określoną wytrzymałością termiczną i powierzchnią właściwą. Najczęściej stosowanymi sorbentami stałymi są sorbenty węglowe, takie jak: grafityzowana sadza węglowa (Carbotrap B lub C), węglowe sita molekularne (Carboxen, Carbosieve S-II i S-III) oraz polimery syntetyczne, jak politlenek 2,6-difenylo-*p*-fenylenowy znany pod nazwą Tenax GC, Tenax TA czy łączony z grafitem Tenax GR. Stosowane są również żele krzemionkowe i węgiel aktywny. Największą wytrzymałość termiczną posiada węgiel aktywny - pow. 700°C, najniższą żel krzemionkowy - 300°C. Syntetyczne sorbenty wytrzymują temperaturę 400 °C. Największą

powierzchnię właściwą posiadają: węgiel aktywny, Carbosieve S-III i S-II, Carboxen i żel krzemionkowy (od 300 do 1000 m²/g), mniejszą Tenax (18 m²/g) i Carbotrap C i B - odpowiednio 10 i 90 m²/g. Wymienione sorbenty stałe, poza żel krzemionkowym, mają charakter hydrofobowy. Zakres zastosowania sorbentów stałych używanych w technice wmywania i wychwytywania przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Sorbenty stałe stosowane w technice wmywania i wychwytywania(PT) (na podstawie Namieśnik J., Jamrógiwicz Z., red., *Fizykochemiczne metody kontroli zanieczyszczeń środowiska*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1998)

L.p.	Typ sorbentu	Zastosowanie
1.	Carbotrap B	Węglowodory C ₄ – C ₈
2.	Carbotrap C	Węglowodory od C ₄ do bifenyli
3.	Carbosieve S-II	Bardzo lotne związki organiczne
4.	Carbosieve S-III	Bardzo lotne związki typu chlorometan, chlorek winylu
5.	Carboxen	Lotne związki organiczne
6.	Tenax GC, Tenax TA	Węglowodory alifatyczne od C ₆ , węglowodory aromatyczne, policykliczne, aldehydy, fenole, aminy aromatyczne, nitrozwiązki i in.
7.	Tenax GR	Właściwości lepsze niż Tenax TA
8.	Węgiel aktywny	Bardzo lotne związki organiczne
9.	Żel krzemionkowy	Związki wysokowrzące

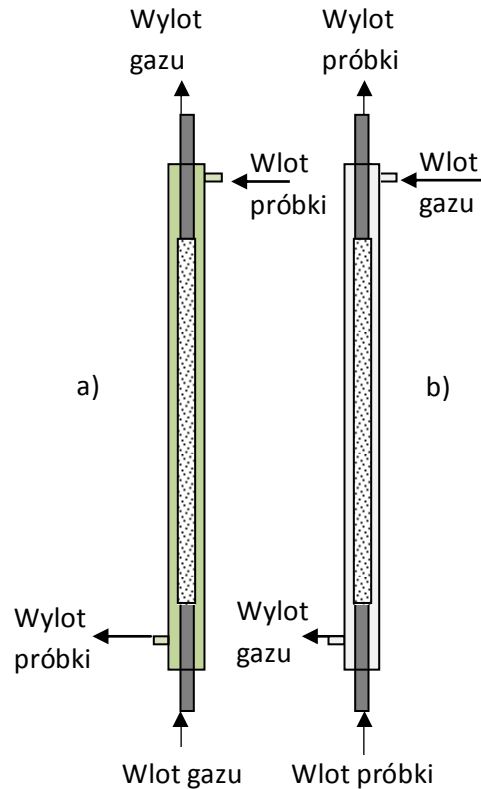
Pułapka kriogeniczna (wymrażająca) jest to niewielki odcinek kapilary ze spiekanej krzemionki, pusty lub pokryty fazą ciekłą, umieszczony w termostacie. Termostat można schłodzić do temperatury -196°C a następnie gwałtownie ogrzać do temperatury 300°C z szybkością 1200°C/min.

Ekstrakty gazowe, które mają być przepuszczane przez pułapki kriogeniczne nie mogą zawierać wody.

Dynamiczną formą ekstrakcji do fazy gazowej jest mikroekstrakcja przez porowate włókno polimerowe, która może być realizowana w dwóch wersjach, przedstawionych na rysunku 14a i b. Pierwszy sposób polega na omywaniu próbką porowatego włókna, przez które płynie w przeciwnym kierunku gaz ekstrahujący, w drugim sposobie gaz ekstrahujący omywa porowate włókno, przez które przepływa próbka. Jak w każdej metodzie dynamicznej, analit musi być z fazy gazowej izolowany.

Ekstrakcję do fazy gazowej stosuje się powszechnie do izolacji i oznaczania lotnych składników organicznych w próbkach o złożonej matrycy, mogącej interferować z oznaczanymi związkami. Takimi

próbki są: produkty spożywcze (owoce, miód, wino, moszcz) materiał biologiczny (np. krew, płyny ustrojowe, mleko ludzkie), materiał roślinny (olejki eteryczne, zioła, rośliny lecznicze), wody naturalne, ścieki, osady i gleba. „Headspace” stosuje się do izolacji pozostałości rozpuszczalników w różnych produktach, np. olejach, środkach farmaceutycznych oraz monomerów rozpuszczonych w polimerach.



Rysunek 14. Mikroekstrakcja do fazy gazowej przez porowate włókno

4.2. Ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz

Proces przenoszenia substancji rozpuszczonej w jednej fazie ciekłej do drugiej fazy ciekłej, niemieszającej się z pierwszą, nazywa się ekstrakcją w układzie ciecz – ciecz (*ang. liquid – liquid extraction, LLE*). Ruch materii przez granicę faz opisuje **reguła faz Gibbsa**:

$$f + s = \alpha + 2 \quad (33)$$

gdzie:

- f – liczba faz,
- s – zmienność lub liczba stopni swobody,
- α - ilość składników.

W układzie dwóch niemieszających się cieczy oraz jednego składnika, rozpuszczonego i ulegającego podziałowi między nie, liczba stopni swobody wynosi:

$$s = \alpha + 2 - f = 3 + 2 - 2 = 3 \quad (34)$$

W ekstrakcji, pod stałym ciśnieniem i w stałej temperaturze, pozostaje jeden stopień swobody – stężenie składnika, co oznacza, że stężenie składnika w jednej fazie ciekłej odpowiada ściśle określone mu jego stężeniu w drugiej fazie ciekłej, niezależnie od całkowitej jego zawartości.

Zależność stężenia substancji w jednej fazie od jej stężenia w drugiej fazie, w stanie równowagi i w stałej temperaturze i ciśnieniu jest stały co ilościowo opisuje **prawo podziału Nernsta** definiujące stałą podziału K (por. rozdz. 1.2.2, (26))

Jeśli substancja ekstrahowana ulega różnym procesom chemicznym w jednej z faz, podział substancji ekstrahowanej między dwie fazy określa **współczynnik ekstrakcji** - D , uwzględniający stężenia wszystkich form substancji występujących w matrycy odbierającej $[\Sigma(c_A)_\beta]$ i w matrycy pierwotnej $[\Sigma(c_A)_\alpha]$:

$$D = \frac{\sum (c_A)_\beta}{\sum (c_A)_\alpha} \quad (35)$$

Znajomość wartości stałej podziału K czy współczynnika ekstrakcji D substancji izolowanej lub jej homologu, umożliwia ustalenie warunków ekstrakcji, jak objętość fazy ekstrahującej oraz krotność ekstrakcji, aby zapewnić wystarczającą wydajność procesu.

Dla wartości $K \gg 1$ wystarczającą jest jednostopniowa ekstrakcja, wielostopniową ekstrakcję należy stosować, jeśli wartość K jest znacznie mniejsza, gdy K jest równe jedności – rozdzielanie jest niemożliwe.

Zależność między wydajnością ekstrakcji a współczynnikiem ekstrakcji przedstawia równanie:

$$\%E = D \frac{v_\beta}{v_\alpha} 100 \quad (36)$$

gdzie:

v_β, v_α – objętości odpowiednio matrycy odbierającej i matrycy pierwotnej.

Z równania wynika, że wydajność ekstrakcji jest tym większa, im większa jest wartość współczynnika ekstrakcji D i większa wartość stosunku v_β/v_α , czyli im większa objętość matrycy odbierającej. Zwiększenie objętości matrycy odbierającej powoduje rozcieńczenie analitu, co „kłóci się” z podstawowym celem ekstrakcji, jakim jest zateżnienie, dlatego aby osiągnąć pożądaną wydajność, należy stosować kilkakrotną ekstrakcję mniejszymi porcjami rozpuszczalnika. Zmiany stężenia substancji ekstrahowanej w dwóch fazach, podczas osiągnięcia stanu równowagi w kolejnych ekstrakcjach taką samą porcją rozpuszczalnika v_β , można zapisać, korzystając ze współczynnika ekstrakcji. Po pierwszej ekstrakcji współczynnik ten wynosi:

$$D = \frac{[\sum (A)_{\alpha 0} - \sum (A)_{\alpha 1}] / v_\beta}{\sum (A)_{\alpha 1} / v_\alpha} \quad (37)$$

Po przekształceniu, masa substancji pozostała w matrycy pierwotnej ($\Sigma(A)_{\alpha 1}$) wynosi:

$$\sum (A)_{\alpha 1} = \sum (A)_{\alpha 0} \left(\frac{v_{\alpha}}{Dv_{\beta} + v_{\alpha}} \right) \quad (38)$$

gdzie:

$[\Sigma(A)_{\alpha 0} - \Sigma(A)_{\alpha 1}] / v_{\beta}$ – stężenie substancji w matrycy odbierającej po pierwszej ekstrakcji,

$\Sigma(A)_{\alpha 0}$ - masa początkowa substancji w matrycy pierwotnej,

$\Sigma(A)_{\alpha 1} / v_{\alpha}$ - stężenie substancji pozostałej w matrycy pierwotnej po pierwszej ekstrakcji.

Jeśli matryca pierwotna będzie ekstrahowana kolejną porcją v_{β} matrycy odbierającej, pozostanie w niej masa $\Sigma(A)_{\alpha 2}$ substancji ekstrahowanej:

$$\sum (A)_{\alpha 2} = \sum (A)_{\alpha 1} \left(\frac{v_{\alpha}}{Dv_{\beta} + v_{\alpha}} \right) = \sum (A)_{\alpha 0} \left(\frac{v_{\alpha}}{Dv_{\beta} + v_{\alpha}} \right)^2 \quad (39)$$

Po wielu (n) ekstrakcjach taką samą porcją matrycy odbierającej v_{β} , w matrycy pierwotnej pozostanie masa substancji ekstrahowanej $\Sigma(A)_{\alpha n}$ równa:

$$\sum (A)_{\alpha n} = \sum (A)_{\alpha 0} \left(\frac{v_{\alpha}}{Dv_{\beta} + v_{\alpha}} \right)^n \quad (40)$$

Aby wyekstrahować substancję ilościowo należy zastosować n-krotną ekstrakcję, możliwie małymi porcjami matrycy odbierającej.

Powyższe równanie jest spełnione dla dwu niemieszających się cieczy, natomiast jeśli ekstrahent miesza się w niewielkim stopniu z roztworem próbki, zależność ta jest przybliżona. Wartość współczynnika ekstrakcji substancji między dwie niemieszające się ciecze można oszacować na podstawie jej rozpuszczalności w tych cieczach. Należy również podkreślić, że powyższe zależności spełniane są dla niskich stężeń.

Ekstrakcja ciecz – ciecz jest procesem dwufazowym, w którym w celu przyspieszenia osiągnięcia stanu równowagi wymagane jest rozwinięcie powierzchni zetknięcia faz. Po osiągnięciu stanu równowagi, fazy (warstwy cieczy) należy rozdzielić w możliwie krótkim czasie. Szybkie rozdzielanie się warstw ułatwia zastosowanie właściwego rozpuszczalnika do ekstrakcji, który poza zdolnością rozpuszczania analitu, ma odpowiednią gęstość, lepkość i napięcie powierzchniowe. Inne właściwości odpowiednio dobranego rozpuszczalnika to: bardzo słaba rozpuszczalność w matrycy pierwotnej, odpowiednia lotność, umożliwiającą łatwe odparowanie z ekstraktu bez strat analitów oraz duża czystość. Rozpuszczając się w matrycy pierwotnej, ekstrahent zwiększa w niej rozpuszczalność substancji wyodrębnianej, przez co zmniejsza się wartość stałej podziału i wydajność ekstrakcji.

Zatężony rozpuszczalnik może być źródłem zanieczyszczeń próbki końcowej - minimalna obecność substancji zanieczyszczającej w rozpuszczalniku (a istnieje niewiele substancji nierozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych na poziomie ppb) powoduje po jego zatężeniu (np. stukrotnym) pojawienie się sygnału mogącego zdecydowanie zmienić interpretację wyników oznaczeń.

Ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz może być stosowana w temperaturze pokojowej lub niższej, dlatego nadaje się do izolacji substancji nietrwałych. Ze względu na konieczność i sposób usuwania rozpuszczalnika (odparowanie), ekstrakcję w układzie ciecz – ciecz można stosować do izolacji średnio- i trudnołotnych substancji.

4.2.1. Ekstrakcja związków organicznych

Ekstrakcja w układzie ciecz – ciecz jest najstarszym typem ekstrakcji i nadal jest stosowana, zwłaszcza do wyodrębniania związków organicznych z próbek wodnych. Związki organiczne hydrofobowe, których cząsteczki zbudowane są głównie z łańcuchów czy pierścieni węglowodorowych, (nasyconych, nienasyconych, aromatycznych), rozpuszczają się lepiej w rozpuszczalnikach o małej stałej dielektrycznej (niepolarnych). Związki organiczne hydrofilowe, zawierające w swej budowie ugrupowania polarne takie jak grupy hydroksylowe, aminowe, karboksylowe lepiej rozpuszczają się w rozpuszczalnikach o dużej stałej dielektrycznej (polarnych). W skrócie, podstawę doboru rozpuszczalnika do ekstrakcji określa zasada „podobne rozpuszcza podobne”. Jeśli nie ma przesłanek, jakiego rozpuszczalnika należy użyć do ekstrakcji (np. brak danych o rozpuszczalności analitu w rozpuszczalnikach matrycy pierwotnej i odbierającej), wyboru dokonuje się na podstawie wyników kilku ekstrakcji wykonywanych na małą skalę różnymi rozpuszczalnikami. Do naczynia (np. próbki) wlewa się jednakowe, kilkumililitrowe, objętości próbki i testowanego rozpuszczalnika, po wytrząśnięciu i odstaniu warstwę rozpuszczalnika przenosi na szkiełko zegarkowe i pozostawia do odparowania, by stwierdzić obecność substancji. W tabeli 4 podano właściwości fizyczne niektórych, często stosowanych do ekstrakcji, rozpuszczalników.

Do ekstrakcji stosuje się również mieszaniny rozpuszczalników, których właściwości ekstrakcyjne mogą być lepsze niż dla każdego rozpuszczalnika osobno.

W przypadku bardzo złożonych próbek stosuje się ekstrakcję sekwencyjną, polegającą na traktowaniu kolejno, tej samej próbki rozpuszczalnikami o coraz większej polarności. Można uzyskać wtedy różne frakcje ekstraktu, z których każda będzie wzbogacona o inny analit lub grupę analitów.

Gęstość rozpuszczalnika ma duże znaczenie na etapie rozwarstwiania cieczy, im większa różnica w gęstości między rozpuszczalnikiem a próbka, tym szybsze i dokładniejsze rozdzielanie warstw. Niestety w praktyce niejednokrotnie otrzymuje się ekstrakty mętne, co jest spowodowane tworzeniem się emulsji na granicy faz. Emulsje tworzą się łatwo, gdy próbka ma odczyn zasadowy. Niektóre rozpuszczalniki, np. chloroform, łatwo tworzą emulsje z roztworami wodnymi.

Stosując wielostopniową ekstrakcję w rozdzielaczu, korzystnie jest używać rozpuszczalnika o większej gęstości niż próbka. W taki przypadku ekstrakt będzie tworzył dolną warstwę, którą można bezpośrednio przelać do zbiornika ekstraktu. Gdy do ekstrakcji używany jest rozpuszczalnik o mniejszej gęstości niż próbka, można dodać do niego takiego rozpuszczalnika, by ich mieszanina była cięższa od próbki, co bardzo ułatwia wykonywanie czynności przy wielostopniowej ekstrakcji. Mieszaninę rozpuszczalników stosuje się też by zwiększyć właściwości ekstrakcyjne, które mogą być dla mieszaniny lepsze niż dla każdego rozpuszczalnika oddzielnie.

Jeśli próbka jest roztworem wodnym, dla ułatwienia ekstrakcji można zastosować dodatek soli, np. chlorku sodu, chlorku wapnia. Zwiększenie siły jonowej roztworu zmniejsza rozpuszczalność w nim związku organicznego i ułatwi jego ekstrakcję. Proces taki nazywa się wysalaniem. Wysalanie jest również korzystne w przypadku stosowania rozpuszczalnika częściowo mieszającego się z wodą, gdyż zmniejsza

jego rozpuszczalność w wodzie. Dla związków organicznych o wysokiej lotności, wzrost ilości soli w próbce zwykle zwiększa wydajność ekstrakcji do rozpuszczalnika organicznego. Z kolei mniej lotne substancje mogą wykazywać optimum wydajności ekstrakcji przy określonej zawartości soli w próbce. Ilość dodawanej soli do próbki należy wyznaczyć eksperymentalnie.

Tabela 4. Właściwości fizyczne wybranych rozpuszczalników organicznych

Rozpuszczalnik	Gęstość [g ml ⁻¹]	Temperatura wrzenia[°C]	Względna przenikalność dielektryczna	Rozpuszczalność w wodzie [%]
Aceton	0,891	56,5	20,7	nieograniczona
Alkohol n-pentylowy	0,814	138,1	13,8	2,2
Alkohol n-butyłowy	0,813	117,7	17,1	7,9
Alkohol etylowy	0,789	78,3	24,3	nieograniczona
Alkohol metylowy	0,796	64,7	32,6	nieograniczona
Chloroform	1,498	61,3	4,8	1
Cykloheksan	0,783	80,7	2,0	0,01
Dichlorometan	1,326	40,2	8,93	1,6
Dioksan	1,034	101,3	2,2	nieograniczona
Disiarczek węgla	1,263	46,3	2,6	0,22
Eter dietylowy	0,719	34,5	4,3	7,4
Eter diizopropylowy	0,728	67,2	3,9	0,7
Heksan	0,660	69,0	1,9	0,02
Nitrobenzen	1,198	211	34,8	
Octan etylu	0,901	77,2	6,0	8,6
Pirydyna	0,988	115,3	12,3	nieograniczona
Toluen	0,866	110,8	2,4	0,05
Trichloroetylen	1,456	87	3,4	0,1

Rozpuszczalniki, które mają niską temperaturę wrzenia są korzystne na etapie usuwania ich z ekstraktu, ale nie w trakcie ekstrakcji. Lotne rozpuszczalniki łatwo przechodzą w stan pary, wdychane lub w kontakcie ze skórą stanowią zagrożenie dla zdrowia człowieka. Z kolei palne rozpuszczalniki stwarzają niebezpieczeństwo zapłonu. Rozpuszczalnikami organicznymi można też ekstrahować niektóre elektrolity organiczne. Ekstrakcję umożliwia właściwy dobór pH próbki, co wykorzystuje się np. do izolacji lub oczyszczania alkaloidów za pomocą chloroformu.

Jest kilka sposobów, które można zastosować dla przyspieszenia rozwarstwienia cieczy:

- delikatny ruch wirowy zawartości rozdzielnicy,
- przesączenie przez ściśłą warstwę waty szklanej,
- jeśli ekstrakt jest mętny z powodu emulsji rozpuszczalnika z wodą, można go przesączyć przez suchy sączek; woda z emulsji zatrzyma się na sączku,
- można dodać niewielką ilość innego rozpuszczalnika (w przypadku próbek wodnych, np. alkoholu etylowego),
- dodatek soli, np. chlorku czy siarczanu sodu, węglanu potasu,
- w przypadku ekstrakcji roztworów alkalicznych można zmniejszyć pH przez dodanie rozcieńczonego kwasu, pod warunkiem, że roztwór pozostanie nadal alkaliczny a składniki próbki nie zmienią swoich właściwości,
- wstawienie na chwilę naczynia z ekstraktem do ciepłej wody,
- pozostawienie do odstania.

4.2.2. Ekstrakcja związków nieorganicznych

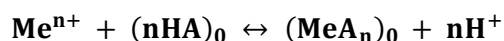
Ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi jest często stosowana w analizie nieorganicznej. Wykorzystuje się ją do oczyszczania odczynników do analiz śladowych, wydzielania substancji, usuwania składników przeszkadzających oraz zatężania. Bardzo często jest stosowana w analizie jakościowej i ilościowej do wydzielania lub rozdzielania małych i śladowych ilości kationów metali. Kationy metali w roztworach wodnych występują w postaci kompleksów z wodą i takiej postaci nie będą się rozpuszczały w rozpuszczalnikach organicznych. Aby umożliwić przejście kationu do warstwy organicznej i uzyskać selektywność rozdzielania, należy zastosować odpowiedni odczynnik, który zastąpi cząsteczki wody w kompleksie kationu innym ligandem i wyeliminuje ładunek elektryczny.

Wybór sposobu ekstrakcji pierwiastka lub związku zależy od tego, w jakiej postaci ma lub może być ekstrahowany.

Dla związków niejonowych, stosuje się ekstrakcję niepolarnymi rozpuszczalnikami organicznymi. W ten sposób można ekstrahować np. AsCl_3 czy HgCl_2 benzenem, toluenem czy chloroformem i jest to ekstrakcja niejonowych cząsteczek kowalencyjnych.

4.2.2.1. Ekstrakcja kompleksów chelatowych

Innym sposobem wyodrębniania kationów jest **ekstrakcja kompleksów chelatowych**. Niektóre ligandy tworzą z kationem metalu strukturę pierścieniową, a uzyskane połączenie nazywa się kompleksem chelatowym (chelatem) i jest często wykorzystywane w analizie chemicznej, ponieważ jest znacznie trwalsze od połączeń kompleksów prostych. Najczęściej stosowanymi związkami chelatującymi są: diketony, dioksymy, ditiokarbaminiany, 8-hydroksychinolina, kwasy alkilo- i arylofosforowe, kwasy alkilo- i arylotiofosforowe. Kompleksy chelatowe trudno rozpuszczają się w wodzie, natomiast rozpuszczają się w organicznych rozpuszczalnikach niepolarnych. Ekstrakcję przeprowadza się roztworem wybranego związku chelatującego w rozpuszczalniku organicznym. W czasie ekstrakcji zachodzi reakcja:



gdzie:

Me^{n+} - jon metalu,

$(\text{HA})_0$ - odczynnik kompleksujący w fazie organicznej,

$(\text{MeA}_n)_0$ - kompleks w fazie organicznej.

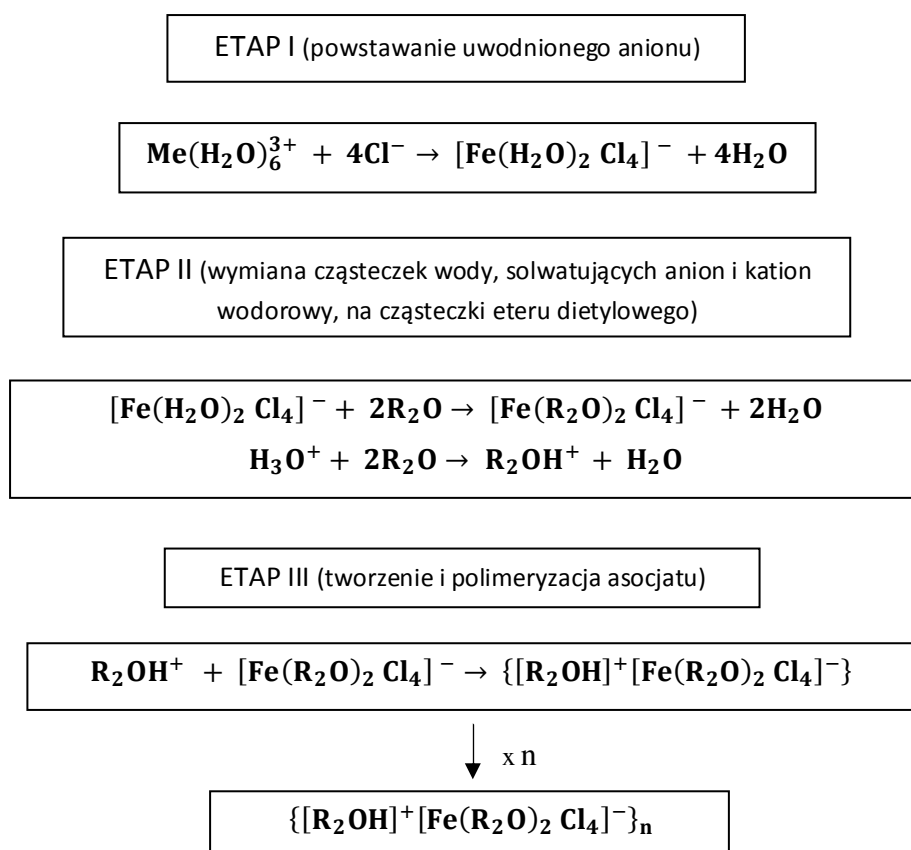
Wydajność ekstrakcji zależy od stężenia odczynnika kompleksującego w fazie organicznej i stężenia jonów wodorowych w fazie wodnej. Im wyższe pH fazy wodnej, tym wydajność jest wyższa, a zależność ta jest różna dla różnych wartościowości kationu. Wydajność ekstrakcji zależy od właściwości użytego odczynnika chelatującego, czyli od właściwości kompleksu (trwałość czy rozpuszczalność w rozpuszczalniku organicznym) i wzrasta wraz ze wzrostem jego stężenia w fazie organicznej. Wybór rozpuszczalnika organicznego zależy od właściwości chelatu. Jeśli kompleks ma wolne miejsca koordynacyjne, zostają one obsadzone cząsteczkami wody, w takim przypadku większą wydajność ekstrakcji uzyska się stosując bardziej polarny rozpuszczalnik. Ekstrakcję kationów w postaci chelatów prowadzi się w temperaturze pokojowej, a trwałość kompleksu zmniejsza się ze wzrostem temperatury.

4.2.2.2. Ekstrakcja jonów metali w postaci kompleksów jonowo-asocjacyjnych

W stężonych roztworach elektrolitów jony mają mniejszy dostęp do cząsteczek wody gdyż warstwa hydratacyjna poszczególnego kationu zostaje zmniejszona. Mogą pojawić się więc oddziaływania bezpośrednie między jonami. W wyniku elektrostatycznego oddziaływania przeciwnie naładowanych jonów tworzą się asocjaty – pary lub tryplety jonów, zachowujące się jak pojedynczy jon. Kompleksy jonowo-asocjacyjne powstają zwłaszcza wtedy, gdy przynajmniej jeden z jonów ma dużą masę. Na tworzenie się asocjatów ma także wpływ użyty rozpuszczalnik organiczny, który częściowo rozpuszczając się w wodzie, ogranicza dostęp jonów do jej cząsteczek.

Ekstrakcję jonów metali w postaci kompleksów jonowo-asocjacyjnych dzieli się na kilka grup, ze względu na rodzaj stosowanego odczynnika kompleksującego. Jedną z grup związków tworzących asocjaty z jonami metali wielowartościowych są **halogenkowe kwasy: chlorowodorowy, bromowodorowy, jodowodorowy i tiocyjanowodorowy**. Kompleks powstaje poprzez solwatację protonu cząsteczkami rozpuszczalnika. Schemat ekstrakcji jonów metalu trójwartościowego eterem dietylowym w obecności dużych ilości kwasu chlorowodorowego przedstawiono na rysunku 15.

Inną grupą pozwalającą ekstrahować jony metali oraz kwasy organiczne i nieorganiczne są **aminy o dużych masach cząsteczkowych**, np. tributylamina (TBA), tri-n-oktyloamina (TOA) czy metylo-di-n-oktyloamina (MDOA). Ich roztwory w benzenie, ksylenie, chloroformie czy alkoholu amyłowym umożliwiają ekstrakcję z kwasowych roztworów jonów metali, kwasów (np. HNO_3 , HClO_4) oraz heteropolikwasów (np. kwasu molibdenokrzemowego



Rysunek 15. Schemat ekstrakcji jonów metalu trójwartościowego eterem dietylowym w obecności dużych ilości kwasu chlorowodorowego

Azotany wielowartościowych metali można ekstrahować ze środowiska kwaśnego jako asocjaty z eterem dietylowym, ketonem metyloowo-izobutyloowym, fosforanem tri-n-butyloowym (TBP), fosforanem tri-n-oktyloaminy (TOPO) i in. w obecności jonów azotanowych w dużym stężeniu, pochodzących od takich soli, jak: $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ czy NH_4NO_3 . Asocjaty te, jak np. $\text{Ce}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{TBP}$ czy $\text{Zr}(\text{NO}_3)_4 \cdot 2\text{TOPO}$, można ekstrahować rozpuszczalnikami organicznymi. Duże kationy organiczne, jak jon tetrafenylarsoniowy $[\text{As}(\text{C}_6\text{H}_5)_4]^+$ czy jon tetrafenylfosfoniowy $[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_4]^+$ nie wymagają solwatacji aby utworzyć asocjaty z anionami (np. z SCN^- , $\text{Fe}(\text{SCN})_4^-$, SbCl_6^-). Asocjaty te ekstrahuje się niepolarnymi rozpuszczalnikami. W tabeli 5 podano przykłady ekstrakcji jonów metali za pomocą odczynników kompleksujących.

Podstawowym celem analizy specjacyjnej jest określenie toksycznego i ekotoksycznego działania poszczególnych pierwiastków. Sposób oddziaływania pierwiastków na wodę, glebę, osady oraz na ludzi, zwierzęta i rośliny jest bardzo zależny od ich formy chemicznej. Działanie toksyczne np. metali jest silniej związane z ich formą chemiczną niż z całkowitym stężeniem. Na bioprzyswajalność różnych form pierwiastków wpływa również ich rozmieszczenie w poszczególnych elementach środowiska naturalnego. Analizę specjacyjną wykonuje się w kontroli produktów żywnościowych, badaniu leków i innych produktów farmaceutycznych, w kontroli procesów technologicznych, kontroli stanowisk pracy i in. Badania specjacji są wykonywane również dla poznania pełnych cykli biogeochemicznych poszczególnych pierwiastków.

Tabela 5. Zastosowanie odczynników kompleksujących do ekstrakcji jonów niektórych pierwiastków

Pierwiastek	Odczynnik kompleksujący	Rozpuszczalnik	Warunki ekstrakcji	Uwagi
Nikiel	Dimetyloglioksym	Chloroform	Zasadowe lub obojętne	Oddziela się jony nikielu od jonów miedzi, żelaza, kobaltu, chromu, manganu i in.
Żelazo(III)	Kwas solny	Eter dietylowy, wyższe ketony, etery i estry	Kwas solny 6 mol L ⁻¹	Usuwanie żelaza przeszkadzającego w oznaczaniu innych pierwiastków
Kobalt	Izotiocyjanian	Keton metylo-izobutyloowy	Słabo kwaśne	Oddziela się jony kobaltu od jonów żelaza(III), miedzi(II) i innych
Kobalt	Tri-n-oktyloamina	Tetrachlorek węgla (tylko do rozcieńczenia)	Kwas solny 1:1	Do oznaczania domieszek kobaltu w niklu
Krzem	Molibdenian(VI) amonu	Alkohol izopentylowy	Kwaśne	Przeszkadzają fosfor(V), arsen(V) i german(IV)
Uran(VI)	Kompleks azotanowy sol wotowany tri-n-butylofosoranem	Toluen (tylko do rozcieńczenia)	Kwas azotowy 0,1-1 mol L ⁻¹ oraz duże stężenie azotanu(V)	Przy wyższej kwasowości ekstrahują się jony ceru(IV), toru i cyrkonu
Różne metale	8-Hydroksychinolina, dietyloditiokarbaminian i ditizon	Chloroform	Zmienne pH	Stosowane do analizy śladowej wody

W oznaczaniu całkowitej zawartości metali składniki próbki są przeważnie niszczone, a mierzone są tylko oznaczane pierwiastki, natomiast analiza specjacyjna następczo znacznie więcej trudności. Pierwszym problemem jest stężenie metali. Już całkowite bywa często bliskie progu detekcji, a analiza specjacyjna powoduje dodatkowe jego zmniejszanie poprzez podział na frakcje. Poza tym niektóre formy pierwiastków pozostają w równowadze z innymi, obecnymi w próbce, dlatego warunki ekstrakcji muszą być takie, aby nie naruszyć ogólnej równowagi lub naruszyć ją przynajmniej w nieznacznym stopniu. W zależności od celu przeprowadzania, metody analizy specjacyjnej są dzielone w różny sposób. Wg najbardziej podstawowego podziału, specjację dzieli się na funkcjonalną, użytkową lub chemiczną.

Analiza specjacyjna **funkcjonalna** służy do oznaczania analitów wg roli, jaką pełnią w elemencie środowiska, z którego zostały pobrane. Przykładem może być oznaczanie rtęci, która może być pobierana przez rośliny lub żelaza, które może być przyswajane z farmaceutyków.

Analiza specjacyjna **użytkowa (operacyjna)** określa rodzaj analitów ekstrahowanych daną metodą, np. metale ekstrahowane z gleby buforem octanowym lub ołów obecny w pyłe o średnicy niższej niż 10 µm, frakcje rozpuszczalne lub nierozpuszczalne i in.

Analiza specjacyjna **chemiczna** służy do oznaczania poszczególnych analitów lub grup analitów, np. stopień utlenienia chromu występującego w danej próbce lub zawartość monometylo- lub dimetylopo pochodnych. W analizie specjacyjnej chemicznej wyróżnia się następujące typy:

- analiza specjacyjna przesiewowa, w celu wykrycia i oznaczenia tylko jednej formy analitu,
- analiza specjacyjna grupowa, w celu oznaczenia określonej grupy związków w próbce,
- analiza specjacyjna dystrybucyjna (dotyczy głównie próbek biologicznych), w celu oznaczenia zawartości analitu w poszczególnych częściach badanego obiektu (rośliny, tkankach zwierzęcych),
- analiza specjacyjna indywidualna (najtrudniejsza), w celu rozróżnienia i oznaczenia wszystkich indywidualnych chemicznych, zawierających w swoim składzie dany pierwiastek.

W analizie specjacyjnej wykorzystuje się wszystkie dostępne techniki rozdzielania, w tym techniki ekstrakcyjne. Do izolacji różnych form pierwiastków stosuje się ekstrakcję chemiczną, polegającą na traktowaniu próbki odczynnikami lub odczynnikami symulującymi warunki środowiskowe naturalne lub zmienione antropogenicznie. Ekstrakcja może być **jednoetapowa lub wieloetapowa**.

Ekstrakcję jednoetapową przeprowadza się odczynnikami, który podobnie jak w naturze, umożliwia przechodzenie metali do gleby, wód czy roślin. Są to najczęściej roztwory o odczynie obojętnym, o dużej sile jonowej lub kompleksujące, powodujące uwalnianie zaadsorbowanych składników:

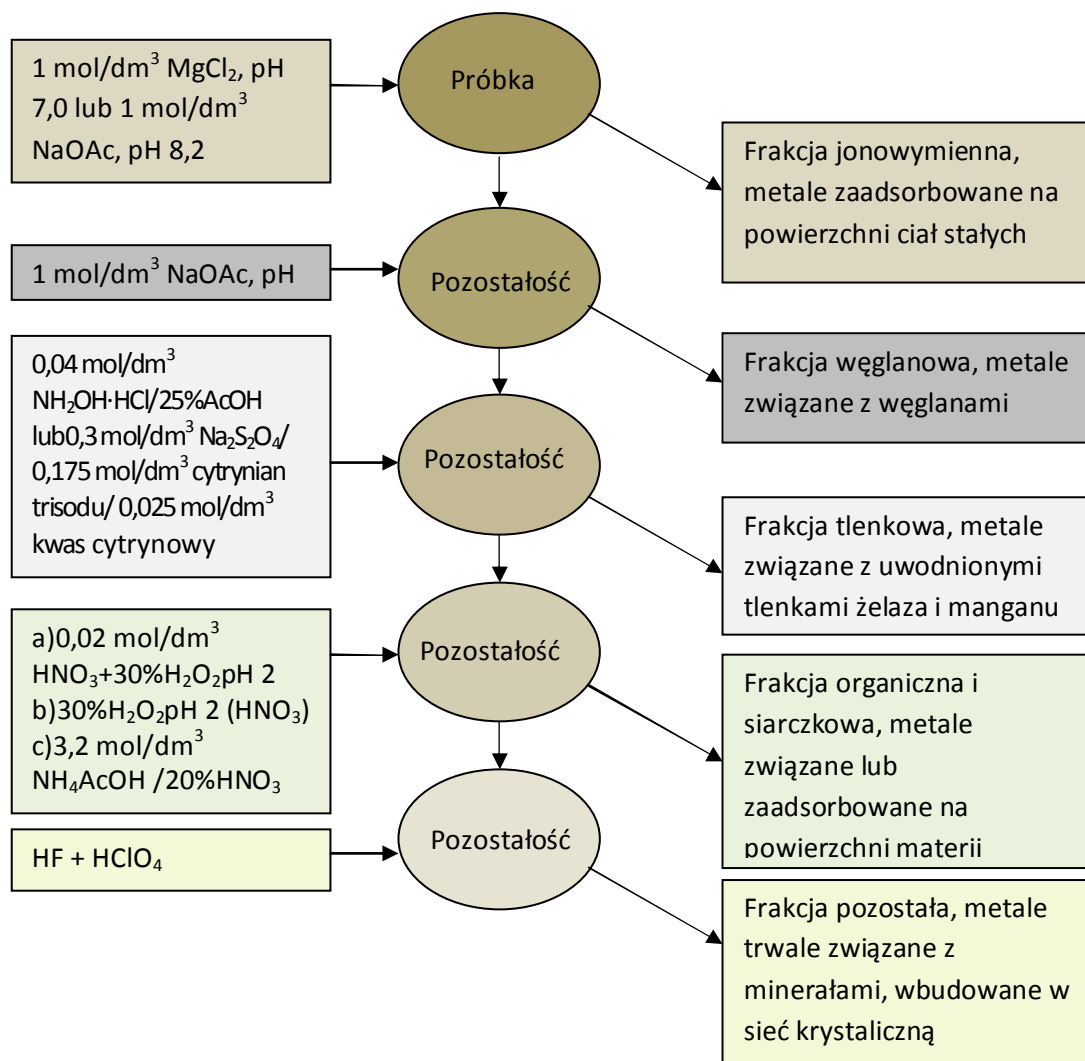
- niezbuforowane roztwory soli (CaCl_2 , NaNO_3 , NH_4NO_3 , BaCl_2),
- roztwory buforowe ($\text{NH}_4\text{OAc}/\text{AcOH}$),
- roztwory związków kompleksujących (kwas etylenodiaminotetraoctowy EDTA, kwas dietylenotriaminopentaoctowy DTPA, $\text{EDTA-AcOH}/\text{NH}_4\text{OAc}$, DTPA + trietanolamina TEA).

Ekstrakcja wieloetapowa polega na kolejnych ekstrakcjach roztworami o wzrastającej sile ługowania i może być prowadzona **równolegle** oraz **sekwencyjnie**. Ekstrakcje równoległe prowadzi się, aby wyeliminować wpływ innych odczynników.

Ekstrakcja sekwencyjna polega na roztwarzaniu i ługowaniu tej samej próbki kolejno różnymi odczynnikami, którymi najczęściej są, stosowane w kolejności:

- niezbuforowane roztwory soli,
- roztwory buforowe lub roztwory słabych kwasów,
- roztwory związków redukujących,
- roztwory związków utleniających,
- mocne kwasy.

Ekstrakcje wieloetapowe przeprowadzane są wg różnorodnych procedur i z zastosowaniem różnych odczynników. Najczęściej, za podstawową metodę przyjmuje się procedurę opracowaną w 1979 r. przez A. Tessiera, P. Campbella i M. Bisona, która umożliwia oznaczanie pięciu frakcji. Schemat tej ekstrakcji przedstawiono na rysunku 16.



Rysunek 16. Schemat ekstrakcji sekwencyjnej wg A. Tessiera i wsp.

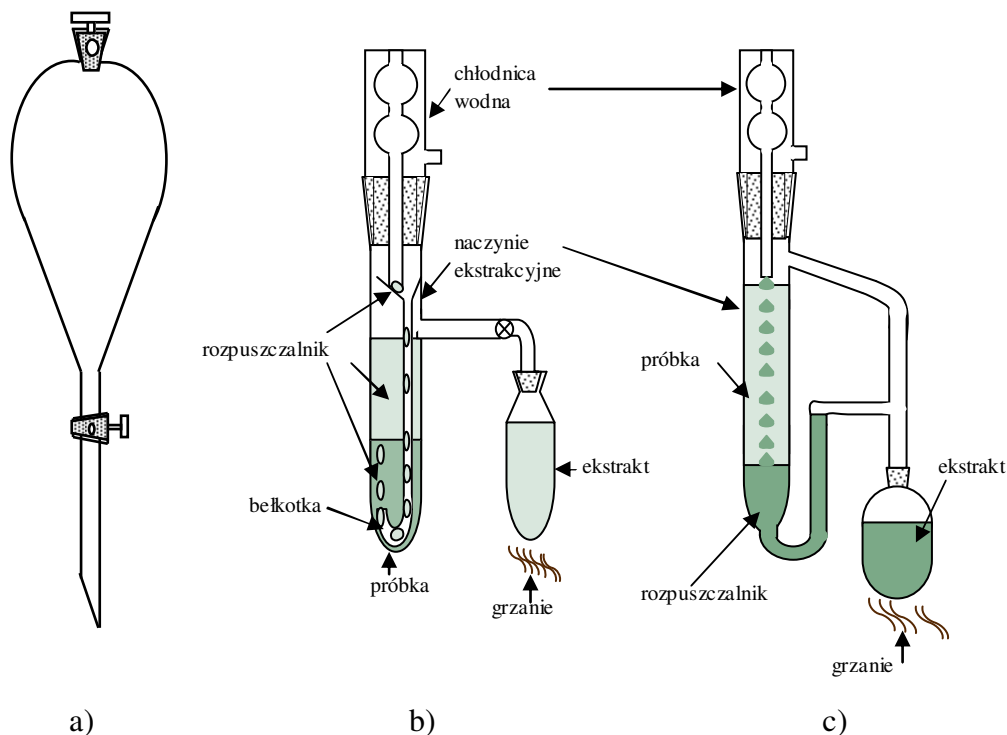
Dla umożliwienia porównywania wyników w Krajach Unii Europejskiej w ramach Programu Pomiarów i Testowania (Standard Measurement and Testing Programme, SM&T) przyjęto wspólne procedury ekstrakcji metali ciężkich z gleb mineralnych, zarówno dla metody jednoetapowej jak i sekwencyjnej. Do izolacji Cd, Pb, Cr, Ni, Cu, i Zn zatwierdzono 0,43 M kwas octowy i 0,005 M EDTA. Zatwierdzone przez SM&T warunki ekstrakcji sekwencyjnej przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Schemat procedury analizy sekwencyjnej wg europejskiego programu standaryzacji SM&T

Etap	Fracja metali (śladów)	Skład wodnego roztworu ekstrahującego c[mol L ⁻¹]
1	Jonowymienna i węglanowa	CH ₃ COOH (0,11)
2	Tlenkowa	NH ₂ OH·HCl (0,1) przy pH 2 (HNO ₃)
3	Organiczna i siarczkowa	H ₂ O ₂ (8,8) przy pH 2(HNO ₃); CH ₃ COONH ₄ (1.0), pH 2

4.2.3. Klasyczna technika ekstrakcji ciecz – ciecz

Najprostszym sposobem ekstrakcji ciecz – ciecz jest ekstrakcja w rozdzielaczu zwana periodyczną. Próbkę ciekłą umieszcza się w rozdzielaczu (rysunek 17a), dodaje rozpuszczalnika ekstrahującego i wytrząsa ręcznie lub mechanicznie. Następnie pozostawia do rozdzielenia warstw. Ekstrakcję powtarza się wielokrotnie a połączone ekstrakty przemywa czystą cieczą, w której była rozpuszczona próbka. W przypadku próbek wodnych, ekstrakty przemywa się wodą lub roztworem wodnym zawierającym odczynniki, jeśli były one dodane do próbki przed ekstrakcją. Odmyty z domieszek ekstrakt należy wysuszyć środkiem suszącym, np. bezwodnym siarczanem(VI) sodu i odparować.



Rysunek 17. Rozdzielacz gruszkowy (a) i zestawy do ekstrakcji ciągłej (b i c)

4.2.4. Ekstrakcja ciągła

Nie zawsze można dobrać rozpuszczalnik, dla którego stała podziału ekstrahowanej substancji będzie miała dużą wartość. W takich przypadkach, by ograniczyć ilości zużywanego do ekstrakcji rozpuszczalnika, stosuje się ekstrakcję ciągłą (ang. *liquid-liquid extraction*, CLLE). Budowa aparatów

do ekstrakcji ciągłej ciecz – ciecz próbek wodnych zależy od tego, czy rozpuszczalnik jest lżejszy czy cięższy od wody. Budowę ich przedstawiono na rysunkach 17b i 17c. Ekstrakcja prowadzona jest ciągle świeżą porcją rozpuszczalnika. Na rys. 17b przedstawiono schemat ekstrakcji rozpuszczalnikiem lżejszym od wody. Rozpuszczalnik spływa z chłodnicy rurką na dno i przez bełkotkę zatopioną na końcu rurki przenosi się w postaci drobnych kropelek przez próbkę, ekstrahując ją. Bełkotka umożliwia rozwinięcie powierzchni styku faz i zwiększenie wydajności ekstrakcji. Ekstrakt zbiera się nad wodą, następnie przelewa rurką boczną do odbieralnika ogrzewanego, skąd rozpuszczalnik odparowuje i skrapla się w chłodnicy a w odbieralniku zagęszcza się ekstrakt. Na rysunku 17c przedstawiono schemat ekstrakcji rozpuszczalnikiem cięższym od wody. Ekstrakcja przebiega podobnie, a substancja ekstrahowana gromadzi się w odbieralniku.

Poniżej podano kilka warunków ekstrakcji, ułatwiających jej wykonanie:

- **rozdzielacz powinien mieć szczelne zamknięcia, szlifów nie można smarować smarami, ponieważ rozpuszczają się w większości rozpuszczalników,**
- **rozdzielacze w kształcie gruszki (rysunek 17a) ułatwiają rozdzielanie warstw,**
- **pojemność rozdzielacza powinna być dwukrotnie większa od objętości ekstrahowanej próbki,**
- **ilość rozpuszczalnika ekstrahującego nie powinna być zbyt mała, zwykle stosuje się ilość stanowiącą ok. 1/3 objętości roztworu próbki,**
- **na początku ekstrakcji wytrząsanie należy przeprowadzać bardzo delikatnie, by nie doprowadzić do gwałtownego wzrostu ciśnienia i często otwierać kran dla wyrównania ciśnienia,**
- **po ustaleniu się ciśnienia w rozdzielaczu, wytrząsanie można wykonywać energicznie przez kilka minut,**
- **gdy rozpuszczalnik jest lżejszy od roztworu próbki, ekstrakt stanowi górną warstwę; w takim układzie, by uniknąć zanieczyszczenia ekstraktu roztworem próbki, dolną warstwę spuszcza się przez kran a ekstrakt (górną warstwę) wylewa się z rozdzielacza górnym otworem,**
- **najczęściej wykonuje się trzykrotną ekstrakcję, dla sprawdzenia czy substancja została wyekstrahowana, pobiera się małą objętość ostatniej porcji ekstraktu, odparowuje rozpuszczalnik i sprawdza ilość suchej pozostałości,**
- **ekstrahowanej próbki nie wylewa się dopóki nie zostanie wyizolowany czysty produkt (można wtedy naprawić ewentualne błędy).**

Do rozdzielania mieszaniny substancji o zbliżonych wartościach stałych podziału stosuje się ekstrakcję przeciwpądową, którą przeprowadza się w specjalnych aparatach, np. aparacie Craiga. Aparat taki składa się z wielu elementów (np. 120). Do jednego lub kilku elementów wprowadza się próbkę, pozostałe napełnia fazą ekstrahującą. Na ekstrakcję składa się kilka etapów:

- wytrząsanie (wszystkie elementy poruszają się i w elementach z próbką następuje wymieszanie faz),
- stan spoczynku, w którym następuje rozdzielanie się warstw,
- etap przenoszenia fazy; aparat jest tak zbudowany, że umożliwia przelewanie się fazy górnej do kolejnego elementu (daje to efekt „poruszania się faz w przeciwnym kierunku”),
- etapy jednostkowe przeprowadzane są wielokrotnie.

Czas mieszania i odstawiania oraz ilość pojedynczych procesów ustala się doświadczalnie w zależności od składu próbki i właściwości ekstrahenta. Ekstrakcja przeciwnokierowa umożliwia rozdzielanie skomplikowanych mieszanin nawet, gdy różnice w zawartości poszczególnych składników są duże. Pozwala także na wydzielanie składników w bardzo czystym stanie i określanie ich stosunku ilościowego w mieszaninie. Ekstrakcja przeciwnokierowa stosowana jest do celów analitycznych i preparatywnych.

4.2.5. Mikroekstrakcja

Techniki mikroekstrakcji w układzie ciecz – ciecz (ang. *liquid-liquid microextraction*, LLME) charakteryzują się małym zużyciem rozpuszczalników, co jest korzystne dla środowiska naturalnego i zdrowia. Stosowanie niewielkich ilości rozpuszczalników ogranicza też zdecydowanie liczbę operacji wykonywanych podczas ekstrakcji.

4.2.5.1 Mikroekstrakcja do rozpuszczalnika

Mikroekstrakcja do rozpuszczalnika (ang. *microscale solvent extraction*, MSE) została zastosowana we wstrzykowej analizie przepływowej. Metoda ta polega na wstrzykiwaniu płynnej próbki do strumienia cieczy nośnej, przepływającej przez rurkę o małej, stałej średnicy, w której znajduje się odczynnik reagujący z analitem. Rozmiary rurki i prędkość przepływu cieczy nośnej jest dostosowana do szybkości zachodzenia reakcji chemicznej (ta część rurki, w której zachodzi reakcja jest w postaci spirali). Wstrzyknięta próbka tworzy w strumieniu nośnym odpowiednią strefę przemieszczającą się do detektora. Jeśli do strumienia cieczy nośnej, w miejscu, w którym próbka jest już spochodniona, doprowadzi się rozpuszczalnik, całość wymiesza się i nastąpi ekstrakcja analitu do fazy organicznej (w spirali ekstrakcyjnej). Mieszanina wpływa następnie do separatora grawitacyjnego lub membranowego, gdzie faza organiczna jest oddzielona i kierowana do detektora. W metodzie tej zużycie rozpuszczalników jest zdecydowanie mniejsze w porównaniu do ilości zużywanych w metodach tradycyjnych (np. 1 mL na 1L próbki), poza tym ekstrakcja zachodzi w układzie zamkniętym i rozpuszczalnik nie odparowuje do atmosfery.

4.2.5.2. Mikroekstrakcja do kropli

Mikroekstrakcja do kropli (ang. *single-drop microextraction*, SDME) jest kolejną techniką zmniejszającą w sposób radykalny zużycie rozpuszczalników. Ekstrakcja następuje przez rozpuszczanie się składników próbki w kropli cieczy zawieszonyj na końcu igły strzykawki i zanurzonej w próbce. Warunkiem przeprowadzenia ekstrakcji jest większa rozpuszczalność analitu w rozpuszczalniku ekstrahującym niż w próbce.

W mikroekstrakcji do kropli występuje układ trójfazowy, gdzie analit ulega podziałowi między próbkę a fazę gazową nad próbkę oraz między próbkę a ciekłą fazę organiczną, którą jest kropla. Po osiągnięciu stanu równowagi, ilość wyekstrahowanego do kropli analitu (m) opisuje równanie:

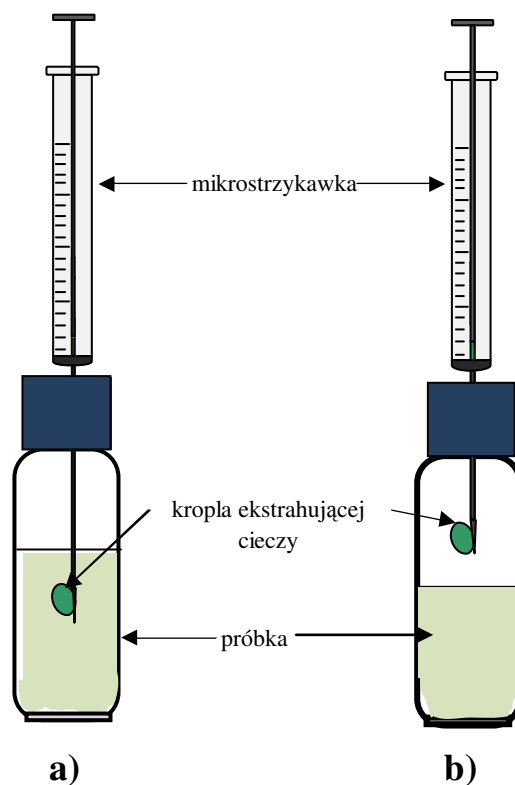
$$m = \frac{K_{odw}V_d C_0 V_s}{K_{odw}V_d + K_{hs}V_h + V_s} \quad (42)$$

gdzie:

- K_{odw} - stała podziału analitu między fazę organiczną (kroplą) a fazę ciekłą próbki,
- K_{hs} - stała podziału analitu między fazę gazową nad powierzchnią próbki a fazę ciekłą próbki,
- C_0 - stężeniem początkowym analitu w próbce,
- V_s, V_h i V_d - objętości odpowiednio próbki, fazy gazowej nad próbką i kropli.

Ilość wyekstrahowanego analitu nie zależy od lokalizacji kropli w układzie ekstrakcyjnym (bezpośrednio w roztworze próbki czy w fazie gazowej nadpowierzchniowej nad próbką) pod warunkiem, że objętości próbki, kropli i fazy gazowej nie zmieniają się.

Metodę SDME można stosować do próbek ciekłych i gazowych. W przypadku próbek ciekłych rozpuszczalnik ekstrahujący nie może mieszać się z próbką lub mieszać się w bardzo ograniczonym stosunku. Zestawy do mikroekstrakcji do kropli z próbek ciekłych pokazano na rysunku 18. Jeśli kropla rozpuszczalnika jest bezpośrednio zanurzona w próbce (ang. *direct immersion single drop microextraction*, DI-SDME), (rysunek 18a), ekstrakcja następuje przez podział analitu między dwie ciekłe fazy. W drugim przypadku (rysunek 18b), lotne anality z próbki ciekłej znajdujące się w fazie gazowej rozpuszczają się w kropli rozpuszczalnika umieszczonej nad powierzchnią próbki (ang. *headspace single drop microextraction*, HS-SDME). Po odpowiednim czasie ekstrakcji, kropla rozpuszczalnika ekstrahującego „wciągana” jest do strzykawki i przenoszona np. do dozownika chromatografu. Do ekstrakcji można stosować pojedynczy rozpuszczalnik lub mieszaninę rozpuszczalników w celu uzyskania większej selektywności. Do ekstrakcji jonów metali stosuje się odczynniki chelatujące, rozpuszczone w organicznym rozpuszczalniku.



Rysunek 18. Mikroekstrakcji do kropli, a – kropla zanurzona bezpośrednio w próbce (DI-SDME), b – kropla w fazie gazowej nad powierzchnią próbki (HS-SDME)

W ekstrakcji do kropli znalazły również zastosowanie cieczy jonowe (por roz II. 4.2.6). Przy wyborze rozpuszczalnika do ekstrakcji należy również uwzględnić rodzaj techniki stosowanej do oznaczania analitu. W przypadku stosowania chromatografii gazowej w końcowym oznaczeniu, rozpuszczalnik do ekstrakcji musi być tak dobrany, by jego sygnał chromatograficzny nie nakładał się na sygnał analitu.

Wydajność ekstrakcji zależy głównie od wartości stałej podziału K analitu między próbką a ekstrahentem oraz od warunków ekstrakcji, takich jak: czas ekstrakcji, intensywność mieszania próbki, wielkość kropli oraz pH próbki, zwłaszcza, gdy ekstrahentem jest odczynnik chelatujący.

Wydłużanie czasu ekstrakcji zwiększa jej wydajność, ale tylko do pewnego momentu. Szybki wzrost stężenia analitu w kropli obserwuje się w początkowej fazie ekstrakcji, dalsze wydłużanie czasu daje minimalne przyrosty stężenia. Poza tym długi czas ekstrakcji może powodować niestabilność kropli (rozpuszczanie lub „zerwanie”). Zwykle ekstrakcja trwa kilka do kilkanaście minut. Ponieważ powierzchnia styku dwóch faz jest bardzo mała, próbkę należy mieszać mieszadłem magnetycznym, umożliwiając kontakt kropli z kolejną warstwą próbki. Mieszanie próbki skraca czas i zwiększa wydajność ekstrakcji. Zwiększanie szybkości mieszania daje początkowo duży wzrost wydajności, po czym dalszy wzrost szybkości mieszania nie daje już wyraźnej poprawy, za to staje się niekorzystne dla stabilności kropli i powtarzalności oznaczania. Objętość kropli zależy od gęstości i napięcia powierzchniowego rozpuszczalnika ekstrahującego oraz rozmiarów igły i może wynosić 1–10 μL , najczęściej jednak nie przekracza objętości 5 μL . Wielkość kropli również wpływa na wydajność ekstrakcji. Optymalne warunki ekstrakcji należy dobrać eksperymentalnie dla każdego oznaczenia.

Opisana powyżej metoda ekstrakcji do kropli jest wersją statyczną. W wersji dynamicznej kroplę stanowi niewielki słup cieczy ekstrahującej, znajdujący się w czasie ekstrakcji przez cały czas w mikrostrzykawce. Próbkę wprowadza się do mikrostrzykawki i pozostawia na kilka sekund, w tym czasie anality z próbki rozpuszczają się w słupie rozpuszczalnika i jego warstwie przylegającej do wewnętrznej ściany korpusu strzykawki. Taką operację powtarza się wielokrotnie, uzyskując kontakt ekstrahenta z kolejnymi, świeżymi porcjami próbki. Wzbogacony w analit rozpuszczalnik ze strzykawki wykorzystuje się bezpośrednio do oznaczenia stosowaną techniką analityczną.

W technice SDME zastosowanie powszechnie stosowanych sposobów wspomaganie ekstrakcji jest ograniczone trwałością kropli. Wspomaganie energią ultradźwięków czy intensywne mieszanie niszczy kroplę. Przy ekstrakcji związków organicznych z roztworów wodnych skuteczne jest wysalanie.

Metodę mikroekstrakcji do kropli po raz pierwszy zastosowano w 1996 roku do ekstrakcji z próbek wodnych rozpuszczalnikami niemieszającymi się z wodą. Przykłady zastosowania SDME podano w tabeli 7.

Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami do ekstrakcji próbek wodnych są proste węglowodory, oktanol oraz alkohol benzylowy. Zastosowanie do ekstrakcji znalazły również cieczy jonowe, np. do ekstrakcji podstawionych fenoli wykorzystano krople heksafluorofosforanu 1-oktylo-3-metyloimidazoliowego. Jony metali można ekstrahować rozpuszczalnikami organicznymi z roztworów wodnych, stosując odczynniki kompleksujące. Do wydzielania jonów ołowiu z próbek biologicznych (włosów ludzkich, liści herbaty, mąki ryżowej) zastosowano odczynnik chelatujący - 1-fenilo-3-

metylo-4-benzoilo-5-pirazolon (PMBP), rozpuszczony w benzenie, następnie kroplę z chelatem ołowiu umieszczano w kuwecie grafitowej i oznaczano metodą elektrotermicznej atomowej spektroskopii absorpcyjnej (ET-ASA). Kompleksowanie z *O,O*-dietyloditiofosforanem oraz technikę SDME, z zastosowaniem chloroformu, wykorzystano do oznaczania jonów ołowiu metodą ET-ASA.

Tabela 7. Niektóre przykłady zastosowania mikroekstrakcji do kropli

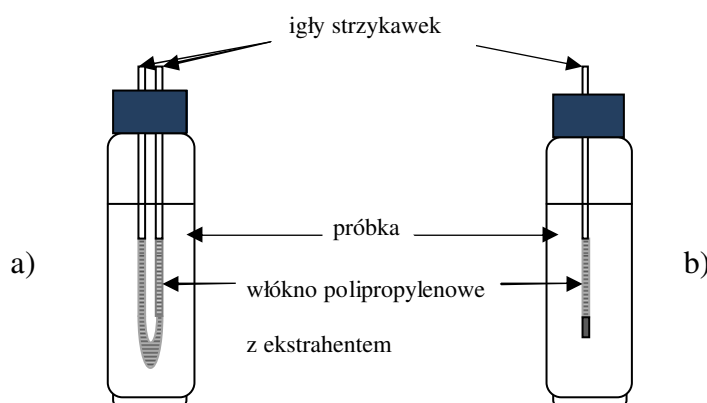
Analit	Próbka	Rozpuszczalnik ekstrahujący	Sposób ekstrakcji
Lotne związki organiczne	Woda	Heksan	DI SDME
Chloroorganiczne pestycydy			
Chlorobenzeny	Woda	Izooktan	DI SDME
Fosforoorganiczne pestycydy	Woda, soki owocowe	Toluen	DI SDME
Fosforoorganiczne insektycydy	Woda	Toluen	DI SDME
Herbicydy sulfonamidowe	Ekstrakty wodne z gleby	Octan etylu, chlorek metylenu	DI SDME
BTEX	Woda	1-Oktanol, n-heksadekan	HS SDME
Związki aktywne biologicznie	Ekstrakty wodne z roślin	1-Oktanol	HS-SDME
BTEX	Zużyty olej silnikowy	n-Heksadekan	HS SDME
Związki terpenowe aktywne biologicznie	Olejki eteryczne	p-Ksylen	HS-SDME
Pozostałości rozpuszczalników	Olej roślinny	Alkohol benzylowy	HS-SDME

Przeprowadzanie analitu w odpowiednią do analizy końcowej pochodną może się odbywać podczas jednej operacji, równocześnie z ekstrakcją i zatężaniem, jeśli kropla rozpuszczalnika ekstrahującego będzie zawierać odpowiedni reagent. Ten sposób można wykorzystać w technice HS-SDME, w której kropla ekstrahenta umieszczona jest w fazie gazowej nad powierzchnią próbki.

4.2.5.3. Mikroekstrakcja poprzez membranę do fazy ciekłej

Mikroekstrakcja do kropli obarczona jest ryzykiem jej zniszczenia. Ciecz ekstrahującą można unieruchomić w porowatym włóknie (drenie), co zostało wykorzystane w mikroekstrakcji poprzez membranę do fazy ciekłej (ang. *hollow fibre liquid phase microextraction*, HF-LPME). Jest to ekstrakcja w układzie ciecz – ciecz, gdzie ciecz ekstrahująca znajduje się w przestrzeniach porowatego włókna zamocowanego na końcach igieł dwóch mikrostrzykawek (rys.19a) lub na końcu igły jednej mikrostrzykawki (rysunek 19b) i zanurzonego w roztworze próbki. Po skończonej ekstrakcji ekstrakt z

drenu zasysany jest do strzykawki. Technika ta umożliwia dużą selektywność procesu poprzez duże możliwości doboru odpowiedniej cieczy ekstrahującej oraz rodzaju porowatego włókna. Duże zastosowanie w tej technice znalazł porowaty polipropylen. Poza zabezpieczeniem cieczy ekstrahującej, małe pory włókna uniemożliwiają przedostanie się do niej dużych molekuł, co jest pożądane zwłaszcza w analityce płynów biologicznych. Na wydajność ekstrakcji, podobnie jak w technice SDME, wpływ mają takie warunki ekstrakcji, jak: objętość próbki i ekstrahenta, intensywność mieszania, czas ekstrakcji, wysalanie oraz pH próbki. Technikę tę zastosowano do ekstrakcji z roztworów wodnych takich analitów jak np.: aminy aromatyczne, leki o charakterze kwaśnym lub zasadowym oraz estrogeny.



Rysunek 19. Zestawy do mikroekstrakcji przez membranę do fazy ciekłej, *HF-LPME*

4.2.6. Ekstrakcja cieczami jonowymi

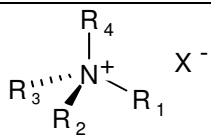
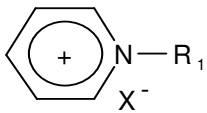
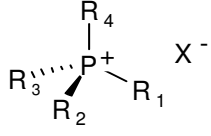
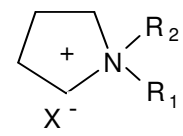
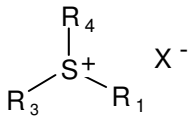
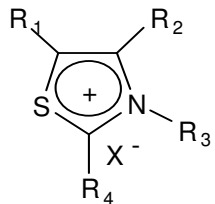
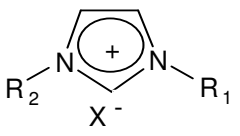
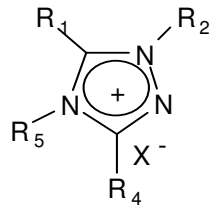
Zastosowanie do mikroekstrakcji, zwłaszcza do mikroekstrakcji do kropli (SDME) znalazły **ciecze jonowe**. W odróżnieniu od konwencjonalnych rozpuszczalników, ciecze jonowe umożliwiają tworzenie większych i stabilniejszych kropli, które nie odparowują i nie rozpuszczają się w próbce wodnej. Te korzystne cechy wynikają ze struktury chemicznej cieczy jonowych, które są solami o niskiej temperaturze topnienia.

Wg ogólnie przyjętej definicji ciecze jonowe są to sole organiczne o temperaturach topnienia poniżej 100°C i stabilne w powietrzu w szerokim zakresie temperatur. Spośród nich wyróżniają się te, które mają temperaturę topnienia równą lub niższą od temperatury pokojowej (ang. *room temperature ionic liquids, RTIL*).

Są to nowe rozpuszczalniki o dobrych właściwościach rozpuszczających dla szerokiego zakresu substancji i korzystnych fizycznych właściwościach. RTIL znajdują coraz szersze zastosowanie w technikach separacyjnych. **Ciecze jonowe ciekłe w temperaturze pokojowej** są bardzo interesującymi rozpuszczalnikami ekstrahującymi. Znanych jest ponad dwieście RTIL a liczba dostępnych komercyjnie związków wciąż wzrasta. Głównymi typami ciekłych w temperaturze pokojowej cieczy są sole zawierające w swej strukturze kationy takie jak: alkilimidazoliowe, alkiloamoniowe, alkilofosfoniowych, alkilopirydiniowe oraz alkilopirolidyniowe. Z kolei najczęściej stosowane aniony to słabe nukleofile takie jak: bis(trifluorometanosulfonyl)imidek, heksafluorofosforan, tetrafluoroboran, perfluoroalkilosulfonian i

in. Strukturę chemiczną często stosowanych, ciekłych w temperaturze pokojowej cieczy jonowych przedstawiono w Tabeli 8. Niska temperatura topnienia cieczy jonowych tłumaczona jest małą symetrią cząsteczki i delokalizacją ładunku, przesłanianiem jednego lub obu jonów oraz słabym wiązaniem wodorowym między jonami. Mała symetria cząsteczki i delokalizacja ładunku dają dużą swobodę drgań, które zwiększają odległości międzyładunkowe i obniżają w ten sposób stabilność sieci krystalicznej i temperaturę topnienia. Temperatury parowania cieczy jonowych są wysokie, gdyż przed przejściem do fazy gazowej chronią, działające na znaczne odległości, oddziaływania kulombowskie.

Tabela 8. Typowe ciecze jonowe

Kation	Struktura	Kation	Struktura
Alkiloamoniowy		Alkilopirydyniowy	
Alkilfosfoniowy		Alkilopirolidyniowy	
Alkilosulfoniowy		Alkilotioazoliowy	
Alkiloimidazoliowy		Alkilotriazoliowy	

Anion X⁻: BF₄⁻, PF₆⁻, AlCl₄⁻, SbF₆⁻, CF₃SO₃⁻, (CF₃SO₂)₂N⁻ i in. R_x: od -CH₃ do -C₉H₁₉

Niska prężność par cieczy jonowych występuje w szerokim zakresie temperatur. Termiczną trwałość cieczy jonowej najczęściej określa się przez temperaturę początku rozpadu. Ciecze jonowe ze słabozasadowymi anionami wykazują wyjątkową termiczną stabilność w obojętnej atmosferze, pozwalającą na stosowanie w temperaturze powyżej 250°C (np. w chromatografii gazowej). Gęstość cieczy jonowych RTIL jest przeważnie większa od gęstości wody (dla najczęściej stosowanych wynosi od 0,964 do 1,470 g/mL, w 25°C) i zwykle zmniejsza się wraz ze wzrostem rozmiaru jonów. Ciekłe w temperaturze pokojowej ciecze jonowe mają

relatywnie niską lepkość, **relatywnie** należy podkreślić, bo większość z nich ma lepkość powyżej 30 cP (lepkość wody w temp. 25°C wynosi 0,8937 cP). Lepkość cieczy jonowych związana jest z rozmiarem anionu, małe aniony z rozmytym ładunkiem ujemnym i ograniczoną zdolnością do wiązania wodoru obniżają lepkość. Ciecze jonowe są ogólnie trudnopalne, a temperatury zapłonu są przynajmniej o 100°C wyższe niż temperatury zapłonu konwencjonalnych rozpuszczalników organicznych.

Zdolność do solwatacji oraz właściwości fizyczne ciekłych w temperaturze pokojowej cieczy jonowych, takie jak: niska prężność par i wysoka gęstość, są korzystne w procesie ekstrakcji.

Zdolność do solwatacji jest ogólnie charakteryzowana przez polarność rozpuszczalnika, czyli zdolność rozpuszczalnika do oddziaływań międzycząsteczkowych ze składnikami rozpuszczonymi, ale nieskutkująca reakcjami chemicznymi. Jest to wypadkowa wszystkich oddziaływań (o polarności rozpuszczalnika nie można mówić w kontekście pojedynczych cząsteczek). Np. azotany i tiocyjaniany alkiloamoniowe mają polarność podobną do wody, z kolei sole alkiloimidazoliowe mają polarność mniejszą niż woda, porównywalną z rozpuszczalnikami polarnymi, jak: dimetylosulfotlenek, krótkołańcuchowe alkohole alifatyczne i in. Wszystkie ciecze jonowe są dipolarne/polaryzowalne i posiadają właściwości tworzenia wiązań wodorowych, co powoduje ich dobre właściwości solwatacyjne i dobrą rozpuszczalność szerokiego zakresu związków organicznych i nieorganicznych a także różnych biomolekuł w tym enzymów i biopolimerów, takich jak np. celuloza.

Poprzez odpowiedni dobór kationu i anionu cieczy jonowej można z powodzeniem manipulować takimi cechami fizykochemicznymi jak lepkość, gęstość, rozpuszczalność z odpowiednimi rozpuszczalnikami i in. Większość z dostępnych współcześnie cieczy jonowych może całkowicie lub częściowo mieszać się z polarnymi rozpuszczalnikami organicznymi (np. metanolem, acetonitrilem, tetrahydrofuranem, dichlorometanem, acetonem, i in.). Ciecze mogą też tworzyć wydajne dwufazowe układy z organicznymi rozpuszczalnikami o niskiej polarności (np. heksanem, toluenem, eterami alkilowymi) lub z wodą.

Rozpuszczalność w wodzie zależy bardziej od rodzaju anionu niż kationu. Sole alkiloimidazoliowe z anionami halogenkowymi, etanolanowym, azotanowym i trifluoroocetowym całkowicie mieszają się z wodą. Sole z anionami heksafluorofosforanowymi oraz bis(trifluorometanosulfonylo)imidkowymi ogólnie nie mieszają się z wodą, natomiast sole anionów tetrafluoroboranowych i trifluorosulfonianowych mieszają się całkowicie lub wcale, w zależności od długości łańcucha alkilowego w strukturze kationu. Wszystkie tetrafluoroborany alkiloimidazoliowe są ogólnie rozpuszczalne w acetonie i dichlorometanie. Z kolei dicyjanoimidki 1-etylo-3-metyloimidazoliowe, N,N-dialkiloimidazoliowe i tetralkiloamoniowe mieszają się bez ograniczeń z wodą i większością rozpuszczalników organicznych, z wyjątkiem heksanu i toluenu; metanosulfonian i etanosulfonian 1,3-dialkiloimidazoliowy mieszają się z wodą i z większością zwykłych, polarnych rozpuszczalników organicznych.

W większości zastosowań ciekłych w temperaturze pokojowej cieczy jonowych w technikach separacyjnych, dwie właściwości odróżniają je na korzyść od konwencjonalnych rozpuszczalników: wysoka termiczna trwałość i pomijalna prężność par w szerokim zakresie temperatur.

Gęstość ciekłych w temperaturze pokojowej cieczy jonowych, które tworzą układy dwufazowe z wodą lub rozpuszczalnikami organicznymi, umożliwia szybkie rozdzielanie faz, co jest korzystne w przypadku ich stosowania w metodach ekstrakcyjnych. Niepożądaną cechą w porównaniu z konwencjonalnymi rozpuszczalnikami jest wysoka lepkość. Procedury przygotowania próbek, polegające na pompowaniu cieczy jonowej wymagają dla normalnej pracy aparatu lepkości poniżej 5 cP. Lepkość RTIL może być obniżana do pożądanego zakresu przez podwyższenie temperatury lub przez rozcieńczenie z mieszającym się rozpuszczalnikiem organicznym.

Pomijalna prężność par minimalizuje zanieczyszczenie środowiska naturalnego poprzez odparowanie, co jest głównym problemem w przypadku stosowania konwencjonalnych rozpuszczalników organicznych oraz pozwala na stosowanie układów próżniowych bez istotnych strat.

W technikach separacyjnych największe zastosowanie ciekłe w temperaturze pokojowej cieczy jonowe znalazły w ekstrakcji próbek wodnych, do izolacji zarówno związków organicznych jak i nieorganicznych. Jeśli analiza właściwa analitu jest przeprowadzana techniką uniemożliwiającą bezpośrednio zastosowanie cieczy jonowej (np. za pomocą chromatografii gazowej) konieczna jest zamiana tego medium na inną matrycę. Odzyskanie ekstrahowanych substancji można przeprowadzić przez destylację, sublimację lub ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym (ewentualnie po derywatywacji). RTIL nie można wprowadzać bezpośrednio do chromatografu gazowego z powodu ich niskiej lotności, co może powodować ich kumulację w dozowniku i na kolumnie chromatograficznej, obniżając sprawność separacji. Przykłady zastosowania ciekłych w temperaturze pokojowej cieczy jonowych w ekstrakcji związków organicznych i nieorganicznych przedstawiono w Tabeli 9.

Cieczami jonowymi można ekstrahować związki występujące w formie obojętnej lub jonowej. Jeśli związek jest w formie jonowej, np. fenol - jako anion fenolanowy, ekstrakcja zachodzi wg mechanizmu wymiany jonowej, czyli taka sama ilość anionów cieczy jonowej musi przejść do fazy wodnej, ile anionów fenolanowych przechodzi do cieczy jonowej.

Fenole mogą być ekstrahowane w formie obojętnej i formie anionowej, a wydajność ekstrakcji zależy od rodzaju cieczy jonowej. Dla niektórych fenoli ekstrakcja była wydajniejsza w warunkach, gdy fenol był w formie zjonizowanej. Wydajność ekstrakcji fenoli z wody za pomocą RTIL może być 10 razy większa niż dla dichlorometanu.

Zastosowanie cieczy ciekłych w temperaturze pokojowej w technikach mikroekstrakcji, jak ekstrakcja do pojedynczej kropli w fazie nadpowierzchniowej (HS-SDME) i ciekłej (DI-SDME), mikroekstrakcja poprzez membranę do fazy ciekłej (HF-LPME) oraz mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME), wynikają głównie z ich właściwości fizycznych. Stosowane w SDME cieczy jonowe dają większe i stabilniejsze krople, co umożliwia szybsze mieszanie próbki i dłuższy czas ekstrakcji. RTIL z kationem 1,3-dialkiloimidazoliowym dają współczynnik wzbogacenia od 5 do 200 dla typowych niskomolekularnych substancji. Technika SDME czy HF-LPME przy użyciu cieczy jonowych ciekłych w temperaturze pokojowej może być bezpośrednio łączona z chromatografią cieczą w układzie odwróconych faz z wodnymi fazami ruchomymi. W przypadku analizy techniką chromatografii gazowej, wymagany jest dozownik z wyjmowaną wkładką, z której lotne składniki są odparowywane w temperaturze pokojowej, a usuwanie wkładki zapobiega kumulowaniu się cieczy jonowej w dozowniku i na kolumnie. Przykłady zastosowań cieczy jonowych w mikroekstrakcji przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 9. Przykłady zastosowania ciekłych w temperaturze pokojowej cieczy jonowych (RTIL), jako cieczy ekstrahujących

Analit	Próbka	Ciekła w temperaturze pokojowej ciecz jonowa (RTIL)	Współczynnik podziału
Benzenowe lub naftalenowe pochodne z pojedynczą grupą fenolową	Woda	heksafluorofosforan 1-butylo-3-metyloimidazoliowy	1 ÷ 97
Fenol, tyrozol, kwas p-hydroksybezoesowy, bisfenol A, pentachlorofenol, 4-oktylofenol, 4-nonylofenol	Woda	tetrafluoroboran 1-alkilo-3-metyloimidazoliowy	Porównywalny z n-oktanol/woda
Benzen	Woda	heksafluorofosforan 1-butylo-3-metyloimidazoliowy	Porównywalny z n-oktanol/woda
Białka	Komórki drożdży	mrówczan 3-(dimetyloamino) -1-propyloamoniowy	-
Hemoglobina	Krew ludzka	heksafluorofosforan 1-butylo-3-trimetylosililoimidazoliowy	-
Ksylene	Heksan	etylosulfonian 1-etylo-3-metylopirydyniowy	-
Jony metali ciężkich w postaci kompleksu z ditizonem	Woda	heksafluorofosforan 1-butylo-3-metyloimidazoliowy	-
Jony rtęci (bez kompleksowania)	Woda	heksafluorofosforan 1-alkilo-3-metyloimidazoliowy	-
Toluen, cykloheksanon, nonanol-1, kwas octowy, kwas heksanowy	Woda	Różne RTIL	Wyższy niż n-oktanol/woda
Kwasy naftalenosulfonowe (barwniki azowe)	Woda	bis(trifluorometano-sulfonyl)imidek N-butylo-N-etylopirolidyniowy	ok. 2 (2 lub 3 ekstrakcje dawały 95 % wydajności)
Amoxicilina, ampicylina (antybiotyki)	Woda	heksafluorofosforan 1-butylo-3-metyloimidazoliowy, heksafluorofosforan i tetrafluoroboran 1-heksylo-3-metyloimidazoliowy, tetrafluoroboran 1-oktylo-3-metyloimidazoliowy	3 ÷ 20

Tabela 10. Zastosowanie cieczy jonowych RTIL w technice mikroekstrakcji

Analit	Próbka	Ciecz jonowa	Technika ekstrakcji
BTEX, halometany, chlorobenzeny, chloroaniliny	Woda	heksafluorofosforan 1-oktylo-3-metyloimidazoliowy	HS-SDME
Benzofenony	Mocz	heksafluorofosforan 1-butylo-3-metyloimidazoliowy	DI-SDME
WWA, alkilofenole	Woda	heksafluorofosforan 1-butylo-3-metyloimidazoliowy	DI-SDME
Chlorofenole alifatyczne, węglowodory aromatyczne	Woda	heksafluorofosforan 1-butylo-3-metyloimidazoliowy heksafluorofosforan 1-oktylo-3-metyloimidazoliowy	HF-LPME
Amfetamina, metamfetamina	Mocz	1-winylo-3-alkiloimidazoliowa ciecz jonowa chemicznie związana z włóknem z krzemionki	SPE

Wodne układy dwufazowe tworzone są zwykle przez dwie substancje o różnych własnościach (szczególnie o różnym powinowactwie do wody) w mieszaninie z wodą. Trójskładnikowa mieszanina o określonym stężeniu w odpowiedniej temperaturze tworzy dwie wodne fazy o różnym składzie.

Wodny układ dwufazowy można stosować do ekstrakcji ciecz - ciecz, a rozpuszczone substancje ulegają podziałowi między dwie wodne fazy.

Ta technika jest szeroko stosowana do oczyszczania biopolimerów, ponieważ jest selektywna, tania, rozdzielanie faz następuje szybko i można ją zaadaptować do procesów ciągłych, a ekstrahowane substancje zachowują aktywność biologiczną.

W technice dwufazowych roztworów wodnych podejmowano próby zastosowania niskotemperaturowych cieczy jonowych. Mieszaninę trójskładnikową tworzą ciecz jonowa, sól nieorganiczna i woda, w której ciecz jonowa współzawodniczy z solą nieorganiczną o cząsteczki wody. Sól nieorganiczna ma większe powinowactwo do wody, więc hydratacja cieczy jonowej będzie się zmniejszała, bo cząsteczki wody będą przemieszczały się od jonów cieczy jonowej do jonów soli nieorganicznej. Zmniejszenie hydratacji cieczy jonowej powoduje zmniejszenie jej rozpuszczalności w wodzie, co sprawia, że faza bogatsza w ciecz jonową oddziela się od reszty roztworu, dzięki czemu powstaje układ dwufazowy.

Najkorzystniejsze cechy do zastosowania w technice dwufazowych układów wodnych mają sole kationów 1,3-dialkiloimidazoliowych, których zdolność do tworzenia dwóch faz jest w przybliżeniu

odwrotnie proporcjonalna do rozpuszczalności w wodzie. Stosowane w tych układach sole nieorganiczne to: fosforany(V), siarczany(VI), węglany lub cytryniany amoniowe, potasowe lub sodowe. Fazę wodną wzbogaconą w ciecz jonową można bezpośrednio analizować metodą chromatografii cieczowej.

Wodne układy dwufazowe z RTIL stosowane są do ekstrakcji niskocząsteczkowych składników, np.: alkaloidów z roślin, tryptofanu, testosteronu i epitestosteronu w moczu, a najczęściej stosowanym dwufazowym układem ekstrakcyjnym jest mieszanina chlorku 1-butylo-3-metyloimidazoliowego lub bromku z fosforanem(V) lub kwaśnym fosforanem(V) sodu.

4.3. Ekstrakcja w układzie ciecz – ciało stałe

4.3.1. Ekstrakcja do fazy stałej

Klasyczna ekstrakcja ciecz-ciecz jest łatwa, niewymagająca specjalistycznego sprzętu, ale czasochłonna i wymagająca dużej ilości czystych rozpuszczalników. Dużą redukcję czasu analizy i objętości używanych rozpuszczalników i związane z tym zmniejszenia szkodliwych odpadów i zwiększenia bezpieczeństwa pracy, daje **ekstrakcja do fazy stałej** (ang. *solid phase extraction*, SPE). Termin ten oznacza sposób izolowania analitu w układzie ciecz – ciało stałe, wykorzystujący zjawisko podziału analitu między ciekłą próbkę a stały sorbent.

Rozwój technik ekstrakcji do fazy stałej nastąpił w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku, po pojawieniu się łatwo dostępnych i trwałych sorbentów o różnorodnych właściwościach chemicznych. Do techniki SPE wykorzystano zmodyfikowane powierzchniowo materiały krzemionkowe czy polimerowe, podobne do tych, które są szeroko stosowane w HPLC. Są to adsorbenty, takie jak: żel krzemionkowy, florisil, tlenek glinu, krzemionka modyfikowana grupami alkilowymi (np. C-18), fenyłowymi, cyjanowymi, propyloaminowymi i in. W technice SPE stosuje się również różnego rodzaju modyfikacje polimeru diwinylobenzenu (DVB), sorbenty wykluczania immunologicznego, polimery z nadrukiem molekularnym lub fazy stacjonarne stosowane w chromatografii jonowymiennej (SCX, SAX).

Sorbentem o największym znaczeniu w technice SPE jest krzemionka, gdyż jest wygodnym nośnikiem różnych grup funkcyjnych. „Czysta” krzemionka, zawierająca na swej powierzchni wolne grupy silanolowe (SiOH), która silnie adsorbuje polarne związki, przy czym jest to oddziaływanie na tyle silne, że odzysk zaadsorbowanych substancji jest znacznie utrudniony. Zmodyfikowanie powierzchni żelu krzemionkowego poprzez zastąpienie wolnych grup silanolowych grupą cyjanową (CN), aminową (NH₂) czy diolową (COHCOH) powoduje zmniejszenie siły oddziaływań silnie polarnych związków z krzemionką i umożliwia ich ekstrakcję. Ten typ sorbentów nosi nazwę związanych faz normalnych (NP). Z kolei zastąpienie grup silanolowych grupami oktylowymi (C-8), oktadecylowymi (C-18) czy alkilofenyłowymi (R-C₆H₅) sprawia, że krzemionka staje się sorbentem niepolarnym i nosi nazwę faz odwróconych (RP). W tym przypadku powstają silne, ale odwracalne oddziaływania niepolarnych lub słabo polarnych substancji ze zmodyfikowaną powierzchnią krzemionki, co umożliwia ich ekstrakcję z polarnego rozpuszczalnika.

Zasada rozdzielania metodą SPE zależy głównie od natury sorbentu. Siłami warunkującymi oddziaływanie między analitem a stałym adsorbentem polarnym (np. żel krzemionkowy, tlenek glinu) są wiązania wodorowe, oddziaływania dipol-dipol, dipol indukowany-dipol oraz siły dyspersyjne (van der Waalsa) (por. roz. I.2.3). Ten typ ekstrakcji oparty jest na takich samych zasadach jak chromatografia adsorpcyjna. Gdy zastosowanym sorbentem jest krzemionka z chemicznie związaną grupą polarną, np. aminową (układ faz normalnych) lub niepolarną, np. oktadecylową (układ faz odwróconych) zasada rozdzielania jest taka, jak w chromatografii podziałowej (por. roz. III.2.4). Należy pamiętać, że istnieje możliwość różnych

oddziaływań między grupami funkcyjnymi analitu a powierzchnią sorbentu i mimo, że mechanizm rozdzielania na fazach związanych jest podziałowy, w rzeczywistości przebiega w dużym stopniu przy udziale procesów adsorpcyjnych.

Celem rozdzielania metodą SPE jest przygotowanie próbki do analizy właściwej, czyli wyizolowanie analitu z matrycy w maksymalnie czystej i skoncentrowanej postaci. Może być to osiągnięte na dwa sposoby: można wyeluować analit, podczas gdy zanieczyszczenia są zatrzymywane lub odwrotnie, żądany analit jest zatrzymywany na kolumnie, podczas gdy zanieczyszczenia są usuwane z kolumny. Ekstrakcja do fazy stałej zachodzi tylko wówczas, gdy wiązanie pomiędzy sorbentem a analitem jest silniejsze niż oddziaływanie wywierane przez rozpuszczalnik lub matrycę próbki. Anality zatrzymane na złożu można odzyskiwać przez mineralizację złoża, ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi czy desorpcję termiczną. Do najczęstszych metod należy jednak ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi. W procesie wymywania eluent musi posiadać silniejsze powinowactwo do analitu niż sorbent. Zwykle stosuje się: metanol, acetonitryl, aceton, izopropanol, dichlorometan, pentan oraz mieszaniny tych rozpuszczalników.

Należy pamiętać, że stosowane w kolumnkach SPE fazy stacjonarne wykonane na bazie materiałów krzemionkowych są stabilne w zakresie pH od 2 do 7,5; w odczynie alkalicznym żel krzemionkowy może się rozpuścić a w odczynie silnie kwaśnym mogą ulec hydrolizie wiązania między grupami silanolowymi a podstawnikami modyfikującymi żel krzemionkowy.

Chemicznie związane fazy stacjonarne posiadają znaczną (od 1 do 5% masy sorbentu) zdolność umiarkowanie selektywnego wychwytu różnorodnych substancji, co umożliwia zminiaturyzowanie procesu ekstrakcji. W praktyce używa się najczęściej komercyjnie przygotowane kolumnki szklane lub polipropylenowe, zawierające od 100 mg do 2 g sorbentu stałego, zawartego między dwoma porowatymi filtrami oraz system próżniowy ze statywem na odbieralniki, manometrem kontrolnym i zaworem regulującym. Ponadto w skład systemu wchodzi złącza i zawory umożliwiające łączenie kilku kolumnek tej samej lub różnej wielkości. Ziarna wypełnienia w kolumnkach SPE mają średnicę 40 μm (większą niż stosowane w HPLC) a także nieregularny kształt, co umożliwia szybki przepływ fazy ruchomej. Budowa pojedynczej kolumnki SPE oraz zestawu szeregu kolumnek podłączonych do próżni przedstawiona jest na rysunku 20.

Elucja analitów wymaga rozpoznania pochodzenia próbki, potencjalnych substancji przeszkadzających (interferentów) i właściwości fizyko-chemicznych oznaczanych substancji. Dobór rozpuszczalnika do elucji zależy od miejsca rozpuszczalnika w szeregu eluotropowym w stosunku do analitu, rodzaju fazy stałej oraz od wymagań kolejnych etapów procedury oznaczania (np. lotność, możliwość zastosowania detektora spektrofotometrycznego UV/Vis). Ekstrakcję z wody związków niepolarnych wykonuje się, stosując niepolarną fazę, najczęściej krzemionkę zmodyfikowaną grupami oktadecylowych (C-18) lub sorbenty polimerowe o właściwościach odwróconych faz. Do elucji stosuje się takie rozpuszczalniki, jak: dichlorometan, pentan, heksan, aceton, octan etylu, acetonitryl lub ich mieszanina. Można też wymyć substancje kolejno różnymi rozpuszczalnikami, różniącymi się siłą elucyjną - ekstrakcja sekwencyjna.

Efektywność zagęszczania metodą SPE wyraża się współczynnikiem wzbogacenia analitu k , opisanego wzorem:

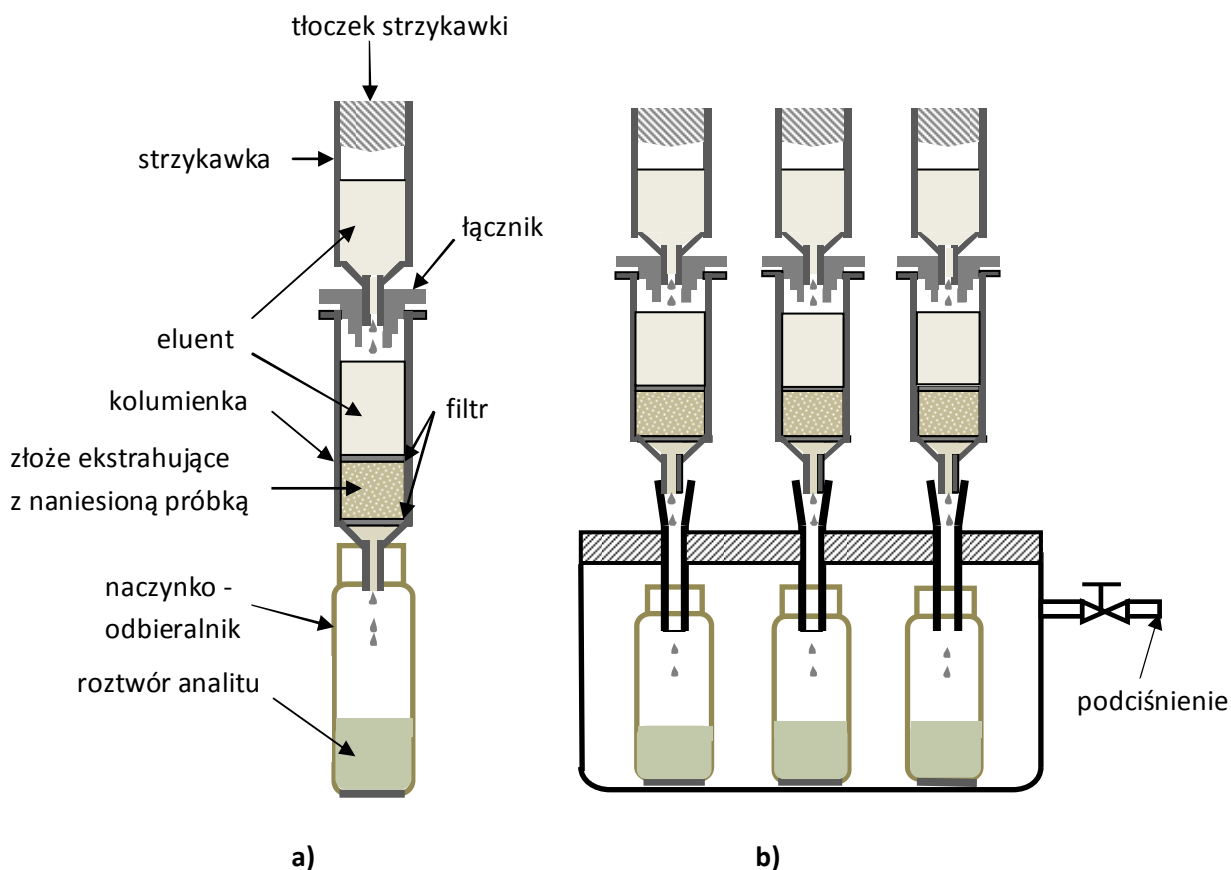
$$k = \frac{V_W}{V_E} \quad (43)$$

gdzie:

V_W - objętość wody przepuszczona przez sorbent,

V_E - objętość eluentu użyta do wymycia analitów.

Wzrost wartości współczynnika można osiągnąć przez zwiększenie objętości wody przepuszczanej przez sorbent lub przez zmniejszenie objętości eluentu. Zmniejszenie objętości eluentu wiąże się z użyciem mniejszej ilości sorbentu. Użycie eluentu o większej sile wymywania też prowadzi do zmniejszenia jego objętości, ale może się wiązać z wymyciem interferentów. W warunkach optymalnych wartość odzysku może wynosić ok. 90%, przy współczynniku wzbogacenia 1000 dla próbek o objętości 0,5 do 1,0 dm³ wody.



Rysunek 20. Budowa pojedynczej kolumnienki SPE (a) i zestawu kilku kolumnienek (b)

Metoda ekstrakcji do fazy stałej znalazła szerokie zastosowanie, zwłaszcza do izolowania substancji organicznych z roztworów wodnych, np. do ekstrakcji WWA z wody stosowane są z powodzeniem niepolarne fazy oktadecylowe (C-18), same lub w połączeniu z grupami polarnymi, np. aminopropylową.

Ekstrakcja do fazy stałej obejmuje kilka niezbędnych etapów. Poniżej podano sposób przygotowania kolumnienki wypełnionej niepolarną fazą oktadecylową (C-18). **Pierwszy etap to przemycie kolumnienki wraz z wypełnieniem** rozpuszczalnikami mającymi wartość eluotropową większą niż stosowane eluenty. Usuwa się w ten sposób substancje (alkeny C₁₆-C₂₄, alkilofalany, alkanole, silanole, siloksany), które mogą się wyekstrahować z gotowych kolumnienek, a ilość ich zależy od producenta. Wymywanie związków silanolowych wynika z hydrolizy wiązania między grupami silanolowymi a podstawnikami modyfikującymi krzemionkę, dlatego należy bezwzględnie unikać stosowania eluentów mogących ją powodować w dalszych etapach ekstrakcji. Objętość rozpuszczalników służących do przemywania kolumnienek należy ustalić doświadczalnie, najczęściej zaleca się wstępne przemywanie rozpuszczalnikami stosowanymi do elucji w objętości 5-10 razy większej od masy wypełnienia.

Następnym etapem jest kondycjonowanie (solwatacja) wypełnienia kolumnienki (złoża sorbentu), polegające na przygotowaniu powierzchni sorbentu do efektywnej izolacji i wzbogacania analitów z wody. Żel krzemionkowy modyfikowany fazą oktadecylową ma własności lipofilowe (fazy RP nie są zwilżane wodą), dlatego złożo najpierw przemywa się metanolem lub 2-propanolem a następnie mieszaniną wody i 2-propanolu. Do kondycjonowania stosuje się zwykle 5–10 objętości pustych używanej kolumnienki (1 objętość pusta = 1,0–1,2 $\mu\text{l}/\text{mg}$ sorbentu). W trakcie kondycjonowania łańcuchy węglowodorowe ulegają wyprostowaniu oddalając się od powierzchni sorbentu, tworząc tzw. “szczotkę” o znacznie powiększonej powierzchni aktywnej. Ważne jest użycie do kondycjonowania rozpuszczalnika o właściwościach najbardziej zbliżonych do właściwości matrycy badanej próbki (wody dejonizowanej dla próbek wodnych) oraz utrzymywanie sorbentu w pełni pokrytego rozpuszczalnikiem do momentu naniesienia próbki (zawsze pierwszą porcją rozpuszczalnika wprowadza się bez użycia podciśnienia, pozwalając jej “wsiąknąć” w złożo).

Kolejnym etapem jest naniesienie na kolumnienkę próbki wody. Jeśli próbka zawiera zawiesinę, przed naniesieniem należy ją odwirować lub przesączyć, aby uniknąć zatkania filtra wlotowego kolumnienki. Badaną wodę nanosi się z dodatkiem 1-5% metanolu lub 5–15% 2-propanolu. Dodatek alkoholu do wody badanej powoduje, że powierzchnia sorbentu jest aktywna (łańcuchy węglowodorowe wyprostowane) podczas wszystkich etapów zagęszczania (dynamiczna solwatacja), co umożliwi przepuszczenie przez kolumnę większej objętości próbki bez przekroczenia pojemności sorpcyjnej złoża (tzw. przebicia) oraz zmniejsza adsorpcję analitów na ściankach kolumnienki. Roztwory wodne zawierające analit przepuszcza się przez kolumnienkę z szybkością 1–25 cm^3/min przy stosowaniu odpowiedniego podciśnienia (pompka wodna) lub nadciśnienia (sprężony gaz obojętny).

Następny etap obejmuje usunięcie z przestrzeni między cząstkami sorbentu oraz z wnętrza jego porów substancji niezwiązanych przez przemycie czystym rozpuszczalnikiem, w którym znajdował się analit. Można zastosować inne rozpuszczalniki, o sile eluotropowej większej, jeśli nie spowodują wymycia analitu. W ten sposób usuwa się ewentualne interferenty pochodzące z matrycy, co zwiększa czystość frakcji analizowanej. **Resztki rozpuszczalnika przemywającego usuwa się przez suszenie strumieniem powietrza** (zasysanym przez pompkę wodną). Czas suszenia zależy od lotności rozpuszczalnika i masy sorbentu i wynosi od 1–20 minut. W przypadku rozpuszczalników wysokowrzących (w tym wody), suszenie przy użyciu podciśnienia może być niewystarczające i powinno go poprzedzić wirowanie. Odwirowanie rozpuszczalnika należy stosować, gdy mamy do czynienia z analitami lotnymi lub łatwo ulegającymi utlenieniu. Przy nielotnych analitach można zastosować również liofilizację.

Ostatnim etapem jest wycięcie zatrzymanych na kolumnie analitów małą porcją (zależna od wielkości złoża, zwykle 300 -500 μL) odpowiedniego rozpuszczalnika. Na rysunku 21 przedstawiono zestaw do ekstrakcji do fazy stałej z zastosowaniem podciśnienia z pompki wodnej.



Rysunek 21. Zestaw do ekstrakcji do fazy stałej

Kolumnienki SPE charakteryzują się małą sprawnością mierzonej ilości pól teoretycznych, mają za to następujące zalety:

- szybkość ekstrakcji - kilkukrotnie większa niż w układzie ciecz -ciecz,
- przy śladowych zanieczyszczeniach, jedna kolumnienka może ekstrahować nawet 100 L próbki wody,
- można je stosować do analitów lotnych i nielotnych,
- można je stosować do analitów organicznych i nieorganicznych,
- można przechowywać analit w warstwie sorbentu do czasu analizy, co pozwala na wykonywanie ekstrakcji w warunkach polowych,
- powodują omięcie problemu pienienia się lub emulgowania próbek,
- mają dużą odtwarzalność, dzięki zmniejszeniu ilości manipulacji z próbką,
- możliwość automatyzacji procesu,
- duża selektywność ekstrakcji dzięki dużemu wyborowi stałych sorbentów,
- są bardziej ekonomiczne, przez zmniejszenie zużycia szkła, odczynników i nakładu pracy (możliwość wielokrotnego użycia sorbentu, prostota wyposażenia),
- są zdecydowanie bezpieczniejsze od tradycyjnej ekstrakcji, na skutek mniejszego zużycia łatwopalnych rozpuszczalników,
- dają możliwość izolacji od matrycy i zagęszczania różnorodnych grup związków chemicznych w czasie jednej ekstrakcji,
- dzięki wysokiemu współczynnikowi podziału i małej objętości eluatu można przeprowadzić bezpośrednią jego analizę bez strat z powodu zagęszczania, co jest bardzo ważną zaletą tej metody, zwłaszcza w analizach śladów,
- możliwość zagęszczania w warunkach polowych: możliwość ekstrakcji prób o dużej objętości do małych, kilkumililitrowych kolumnienek z materiałem sorpcyjnym umożliwia transport dużej ich ilości i zabezpiecza nietrwałe anality przed rozkładem w czasie transportu i oczekiwania na analizę.

Niestety metoda ta posiada też wady, a do najistotniejszych można zaliczyć:

- tło pozostawione przez użyty rozpuszczalnik,
- konieczność regeneracji złoża przed kolejnym użyciem,
- czasem małe wartości odzysku analitu, spowodowane oddziaływaniami między sorbentem a substancją analizowaną,
- zatykanie złoża poprzez zawiesiny obecne w próbce,
- czasami słaba odtwarzalność spowodowana różnicami między kolejnymi partiami sorbentu.

Przewaga zalet nad wadami jest zdecydowana i ekstrakcja do fazy stałej znalazła szerokie zastosowanie do wydzielania analitów bezpośrednio z próbek gazowych, wodnych jak i z ekstraktów próbek stałych. Ekstrakcja do fazy stałej jest rutynową techniką w każdym laboratorium.

4.3.2. Mikroekstrakcja do fazy stałej

Rozwój techniki SPE doprowadził do miniaturyzacji procesu ekstrakcji oraz jego automatyzacji, czego przykładem jest mikroekstrakcja do fazy stałej (*por. roz. II.3.2.2*).

4.3.3. Ekstrakcja za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego

Jedną z wersji ekstrakcji do fazy stałej jest **mikroekstrakcja do warstwy sorbentu, pokrywającego stały element szklany lub kwarcowy**. Do takiej należą **mikroekstrakcja do fazy stałej** oraz **ekstrakcja za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego** (ang. *stir bar sorptive extraction*, SBSE). Obie techniki ekstrakcji są zgodne z ideą "zielonej chemii analitycznej", gdyż powodują minimalizację preparatyki próbek: ograniczają lub eliminują zużycie rozpuszczalników, zmniejszają objętość próbki wymaganej do analizy oraz minimalizują straty analitów, ponieważ nie wymagają obróbki ekstraktów, które w całości mogą być wprowadzane do systemu dozowania w chromatografii gazowym czy cieczowym.

Metodę SBSE wprowadził Baltussen i współpracownicy w 1999 roku i nazwał ją „twisters”. Od tamtej pory metoda ta znajduje coraz szersze zastosowanie w oznaczaniu zanieczyszczeń w próbkach środowiskowych, w żywności oraz w próbkach biomedycznych. Tak duże zainteresowanie tą metodą wiąże się z wykorzystaniem polidimetylosiloksanu jako fazy sorpcyjnej. Polidimetylosiloksan (PDMS), znany w podziałkowej chromatografii gazowej, jako ciekła faza stacjonarna, jest termicznie stabilną cieczą o dużej lepkości, niemieszającą się z matrycą próbki (wodą), która może być stosowana w szerokim zakresie temperatur (do 320°C). Poza tym, PDMS wykazuje interesujące właściwości dyfuzyjne, w ekstrakcji analitu bierze udział cała objętość sorbentu a nie tylko jego powierzchnia.

Nieorganiczne sorbenty nie mają dużego zastosowania w tej metodzie, ponieważ oddziałują zbyt silnie z wyłapywanymi substancjami, co wiąże się z desorpcją w warunkach mogących powodować degradację analitu (np. wysoka temperatura). Organiczne adsorbenty, jak np. Tenax, często powodują termiczną dekompozycję składu próbki.

Podstawy metody

W miarę upływu czasu ekstrakcji, następują zmiany stężenia analitu w fazie sorpcyjnej PDMS. Jest to zależność wykładnicza, którą przedstawia równanie:

$$c_{PDMS}(t) = c_{W,0} \frac{k_1}{k_2} (1 - e^{-k_2 t}) \quad (44)$$

gdzie:

k_1 i k_2 - stałe sorpcji i desorpcji analitu w fazie PDMS,

$c_{W,0}$ - początkowe stężenie analitu w wodzie,

$c_{PDMS}(t)$ - stężenie analitu w fazie PDMS w czasie t .

Próbka i sorbent są cieczami, więc mechanizm ekstrakcji polega na **podziale** analitu między dwie fazy. W związku z tym wydajność ekstrakcji zależy w głównej mierze od wartości stałej podziału analitu między dwie fazy: PDMS i wodę (próbkę) - $K_{PDMS/w}$. Stała podziału podziału jest ilorazem stężeń analitu w stanie równowagi w fazie sorpcyjnej (c_{PDMS}) i fazie wodnej (c_w):

$$K_{PDMS} = \frac{c_{PDMS}}{c_w} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \frac{V_w}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \beta \quad (45)$$

gdzie:

β - stosunek objętości fazy wodnej V_w do fazy ekstrahującej V_{PDMS} ,

m_{PDMS} - masa analitu w fazie ekstrahującej,

m_w - masa analitu w fazie wodnej.

Po osiągnięciu stanu równowagi, bilans mas można zapisać:

$$m_{W,0} = m_{PDMS} + m_w \quad (8)$$

gdzie:

$m_{W,0}$ - początkowa masa analitu w fazie wodnej.

Łącząc obydwa równania można wyliczyć teoretyczny odzysk izolowanego analitu R:

$$R = \frac{m_{PDMS}}{m_w} = \frac{m_{PDMS} K_{PDMS} / w}{m_{PDMS} (K_{PDMS} + \beta)} = \frac{K_{PDMS} / w}{K_{PDMS} + \beta} \quad (47)$$

Ze wzoru wynika, że odzysk analitu (tym samym wydajność ekstrakcji) jest tym wyższy im mniejszy jest stosunek objętości faz wodnej do ekstrahującej (β).

Aby ocenić, czy dla danego analitu techniką SBSE z wykorzystaniem fazy PDMS osiągnie się wystarczającą wydajność, można posłużyć się stałą podziału oktanol –woda K_{OW} , zwaną też współczynnikiem podziału P (por. roz. 1.2.4).

Jeśli do wzoru na odzysk analitu w czasie ekstrakcji wprowadzi się wartość stałej podziału oktanol–woda, K_{OW} dla badanej substancji, uzyska się przybliżoną wartość jej odzysku w czasie ekstrakcji do fazy polidimetylosiloksanowej.

Stała podziału oktanol – woda jest niezawodnym sposobem przewidywania zachowania się analitu w układzie faz polarnej i niepolarnej. W literaturze chemicznej można znaleźć wartości stałej K_{OW} dla wielu substancji.

Stała podziału oktanol–woda jest niezawodnym sposobem przewidywania zachowania się analitu w układzie faz polarnej i niepolarnej. W literaturze chemicznej można znaleźć wartości współczynnika dla wielu substancji.

Przyjmuje się, że związki, których $\log K_{OW}$ jest mniejszy od jedności, charakteryzowane są jako hydrofilowe, więc nie będą się rozpuszczały w niepolarnej fazie PDMS. Związki, dla których $\log K_{OW}$ mieści się między wartością 1 a 3, charakteryzują się średnim charakterem hydrofilowym (lub średnim charakterem hydrofobowym) i mogą w ograniczonym stopniu rozpuszczać się w fazie PDMS. Natomiast związki, których $\log K_{OW}$ osiąga wartość powyżej 3, charakteryzowane są, jako hydrofobowe i będą dobrze rozpuszczały się w niepolarnej fazie PDMS.

Ekstrakcja SBSE składa się z kilku etapów:

- Ekstrakcja (zestaw do ekstrakcji za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego przedstawiono na rysunku 22).
- Usuwanie resztek matrycy (soli, cukrów, białek i innych składników próbki) przez przemycie wodą i delikatne osuszenie.
- Izolacja analitu z sorbentu poprzez desorpcję rozpuszczalnikiem lub termiczną.

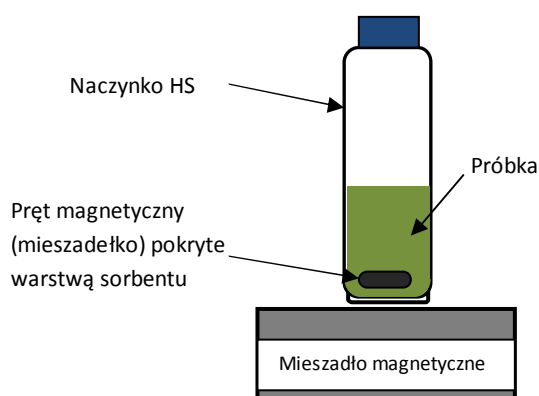
Ekstrakcję wykonuje się mieszadłem magnetycznym pokrytym warstwą sorbentu. Jest to pręt magnetyczny umieszczony w szklanej osłonie, którą pokrywa sorbent. Komercyjnie, dostępne są mieszadła o długości 1 cm, pokryte warstwą polidimetylosiloksanu, o grubości 0,5 mm. Całkowita objętość sorbentu wynosi 24 μL . SBSE wykonuje się w naczynkach HS o pojemności 30 mL, przy objętości próbek wodnych do 20 mL. Podczas ekstrakcji, mieszadło jest zanurzone w roztworze próbki lub umieszczone w gazowej fazie nadpowierzchniowej. Mieszadła pokryte PDMS można stosować wielokrotnie, nawet więcej niż 50 razy (oczywiście, po analizie, należy je rekondycjonować).

Ustalenie warunków ekstrakcji polega na:

- doborze odpowiedniego czasu ekstrakcji,
- doborze intensywności mieszania,
- doborze odpowiedniej temperatury,
- doborze odpowiedniego pH roztworu próbki,
- doborze ilości dodawanej soli obojętnej do próbki,
- wyborze modyfikatora organicznego i jego ilości,
- doborze objętości próbki i objętości fazy ekstrahującej.

Technika ekstrakcji za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego należy do metod równowagowych. Czas osiągnięcia równowagi (czas ekstrakcji) zależy od kinetyki procesu i przeciętnie wynosi 30–150 min. Zwiększenie kinetyki ekstrakcji można uzyskać przez mieszanie i podwyższenie temperatury. Rozpiętość stosowanego czasu ekstrakcji w SBSE jest duża, od minut do doby.

W trakcie mieszania zmniejsza się grubość warstwy granicznej między mieszadłem a zawartością roztworu, co przyspiesza wymianę mas. Ale bardzo szybkie mieszanie powoduje częstszy kontakt mieszadła ze ścianką naczynka i może być przyczyną uszkodzeń fizycznych fazy ekstrahującej, również generowanie bąbli przy wysokich obrotach nie wpływa dobrze na wydajność. Najczęściej współczynnik ekstrakcji wzrasta ze wzrostem obrotów do 500-750 na min, potem wzrasta niewiele lub wcale.



Rysunek 22. Zestaw do ekstrakcji za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego, SBSE

Podwyższenie temperatury przyspiesza osiągnięcie stanu równowagi. Ale współczynnik podziału a tym samym współczynnik ekstrakcji staje się mniejszy. Poza tym skraca się czas życia fazy PDMS, jeśli ekstrakcja prowadzona jest w temperaturze wyższej niż 40°C. Wpływ temperatury na współczynnik ekstrakcji zależy od właściwości analitu.

Takie parametry jak pH, dodatek soli obojętnej czy dodatek modyfikatora organicznego, wpływają na właściwości analitów lub próbki i zmieniają stan równowagi.

Dobór właściwego pH próbki ekstrahowanej za pomocą niepolarniej fazy PDMS, jest ważny dla tych próbek, których właściwości kwasowe lub zasadowe zależą od odczynu roztworu. Odpowiednią wartość pH ustala się dla uzyskania częściowo lub całkiem niejonowej postaci analitu. Poza tym, zbyt kwaśne lub zbyt zasadowe warunki nie są zalecane ze względu na możliwość degradacji fazy PDMS, co skraca jej czas życia.

Dodatek soli obojętnej (np. NaCl, KCl) modyfikuje siłę jonową roztworu próbki, co wpływa na rozpuszczalność organicznych analitów w matrycy próbki (wodzie). Dla polarnych analitów obserwowany jest wzrost wydajności ekstrakcji wraz ze wzrostem dodatku soli obojętnej do roztworu próbki. Dzieje się tak dlatego, że następuje hydratacja jonów soli nieorganicznej, przez co woda staje się mniej dostępna dla organicznych związków, zostaje utrudniony ruch ich cząsteczek i zmniejsza się rozpuszczalność.

Dla analitów hydrofobowych (o wartości $\log K_{ow} > 3,5$), dodatek soli obojętnej nie jest już tak oczywisty. Dodatek soli nie zawsze poprawia odzysk niepolarnego analitu z wody, czasem nawet zmniejsza. Dla wyjaśnienia spadku odzysku dla niepolarnych związków zaproponowano kilka hipotez:

- zmniejszenie rozpuszczalności niepolarnego związku powoduje jego zbieranie się na powierzchni próbki (efekt oleju), przez co utrudniony jest jego kontakt z fazą sorpcyjną na mieszadełku,
- wraz ze wzrostem stężenia soli zwiększa się lepkość roztworu, co zmniejsza kinetykę ekstrakcji,
- jony soli pokrywają powierzchniową warstwę polimeru PDMS i utrudniają rozpuszczanie,
- oddziaływania elektrostatyczne lub oddziaływania par jonowych między jonami soli i roztworem, utrudniają ruch analitu.

Analitycy często spotykają się z przeciwnymi skutkami wysalania w przypadku tych samych substancji, dlatego należy z wielką ostrożnością podchodzić do doboru warunków wysalania podczas ekstrakcji.

Dodatek organicznego modyfikatora, jak metanolu czy acetonitrylu zmienia warunki ekstrakcji i stan równowagi. Zmiany zależne są od właściwości chemicznych i ilości dodanego rozpuszczalnika organicznego i od właściwości analitu. Podobnie jak w przypadku dodatku soli, dodatek modyfikatora organicznego może zwiększać lub zmniejszać wydajność ekstrakcji.

Ze wzoru (48) na odzysk R wynika, że wydajność ekstrakcji jest tym wyższa im **mniejszy** jest stosunek faz wodnej do ekstrahującej, czyli im większa objętość fazy ekstrahującej, tym β mniejsze i odzysk większy. Zaobserwowano, że wpływ stosunku faz na wydajność ekstrakcji jest wyraźniejszy dla związków bardziej polarnych (o niskich wartościach K_{ow} niż dla niepolarnych (o wyższych wartościach K_{ow}). Z drugiej strony, choć większe objętości próbki nie zwiększają odzysku (R), to większa objętość próbki daje większą **masę analitu wprowadzaną do detektora**, co zwiększa jego wskazania. Przy standardowej objętości badanych próbek, wynoszącej 10 mL, stosunek β w przypadku SBSE wynosi 400 (10 mL/24 μ L), zaś w przypadku stosowania techniki SPME, gdzie objętość fazy na włóknie wynosi 5 μ L – stosunek faz β wynosi 20000 (10 mL/5 μ L). Jest to bezpośrednią przyczyną znacznie wyższego odzysku w SBSE w porównaniu do SPME.

Odzysk analitów z mieszadełka może odbywać się poprzez **desorpcję termiczną** (ang. *thermal desorption*, TD), wtedy można stosować tę ekstrakcję w połączeniu z chromatografią gazową. W desorpcji termicznej nie ma rozpuszczalnika. Mieszadełko wprowadza się do termicznego desorbera, połączonego z chromatografem gazowym. Desorpcja może trwać więcej niż 15 min. Desorber termiczny jest grzany dwuetapowo, do temperatury 150-300°C. W pierwszym etapie następuje desorpcja termiczna analitów, po czym następuje chłodzenie do temperatury 150-40°C (drugi etap), tzw. kriogenniskowanie, pozwalające zminimalizować szerokość piku na chromatogramie gazowym. Ograniczeniem termicznej desorpcji jest trwałość analitu.

Anality labilne termicznie mogą być desorbowane rozpuszczalnikiem (ang. *liquid desorption*, LD). Desorpcję rozpuszczalnikiem stosuje się również w połączeniu z chromatografią cieczą lub elektroforezą. Mieszadełko zanurzone jest w rozpuszczalniku lub mieszaninie rozpuszczalników, które muszą być dostosowane do właściwości sorbentu. Zwykle stosowane są acetonitryl, metanol lub ich mieszanina oraz mieszanina z wodą lub wodnymi buforami. Minimalna objętość rozpuszczalnika stosowanego do desorpcji

musi całkowicie pokrywać mieszadełko. Desorpcję rozpuszczalnikiem można przyspieszyć mieszaniem, ogrzewaniem lub ultradźwiękami.

Handlowo dostępne mieszadełka pokryte są niepolarnym polidimetylosiloksanem, co ogranicza zastosowanie ich do ekstrakcji związków niepolarnych. Wydajność ekstrakcji do PDMS dla związków polarnych jest bardzo mała. Stosuje się wiele modyfikacji sorbentu PDMS, zwiększających selektywność i oraz wydajność dla związków hydrofilowych. Trwają badania nad wykorzystaniem polipirolu, pianki poliuretanowej czy alkoholu poliwinylowego.

Innym sposobem umożliwiającym ekstrakcję polarnych związków do fazy PDMS jest przeprowadzanie analitów w mniej polarne pochodne. Derywatyzację można przeprowadzić bezpośrednio w naczynku ekstrakcyjnym. Po dodaniu reagenta powstaje niepolarna pochodna analitu, która może być ekstrahowana przez sorbent polidimetylosiloksanowy. Reagent może też pokrywać mieszadełko, wtedy pochodna powstaje na jego powierzchni. Niestety, dużym ograniczeniem jest niemożliwość przeprowadzenia reakcji zachodzących w bezwodnych warunkach. W tabeli 11 podano przykłady zastosowania ekstrakcji do sorbentu na ruchomym elemencie SBSE.

Tabela 11. Przykłady zastosowań techniki SBSE (na podstawie A. Prieto A., Basauri O., R. Rodil R.

Usobiaga A., Fernández L. A., Etxebarria N., Zuloaga O., Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions, *J. of Chromatography A*, 1217, 2642–2666, 2010)

Analit	Matryca, objętość	Technika ekstrakcji, sorbent	Czas ekstrakcji [min], rodzaj desorpcji	Dodatek, derywatyzacja
17β-Estradiol	Woda rzeczna, 10 mL	SBSE, PDMS, 10mm/0,5mm	120, TD	-
Chlorofenole	Osady, 0,5 g	SBSE, PDMS, 10mm/0,5mm	60, TD	Ekstrakt MeOH, ACN, acylowanie
Pestycydy	Woda, 10 mL	SBSE, PDMS, 10mm/0,5mm	30, LD	NaCl, MeOH
WWA	Woda, 10 mL	SBSE, PDMS, 10mm/0,5mm	30, LD	NaCl, MeOH
Estrogeny`	Woda, 2 mL	SBSE, PDMS, βCD 10mm/0,5mm	15, LD	30% NaCl
Fosforoorganiczne pestycydy	Gleba, 10 g	SBSE, MIP 10mm/0,5mm	60, LD	Ekstrakt
Związki organiczne	Woda, 50 mL	SBSE, PPEK, 10mm/0,5mm	20, LD	-
WWA	Woda, 50 mL	SBSE, PDMS βCD-DVB, 20mm/0,5mm	90, TD	-
Triclocarban (3,4,4'-trichlorocarbanilid)	Woda, 10 mL	SBSE, PDMS, βCD 10mm/0,5mm	120, TD	-

Tabela 11 c.d.

Analit	Matryca, objętość	Technika ekstrakcji, sorbent	Czas ekstrakcji [min], rodzaj desorpcji	Dodatek, derywatyzacja
Lotne fenole i inne polarne związki	Wina, 30 mL	SBSE, PDMS, 10mm/0,5mm	60, LD	EtOH
Herbicydy triazynowe	Woda, 4 mL	SBSE, PU,	30, LD	5% MeOH
TCA, fenole,	Wina, 10 mL	SBSE, PDMS 10mm/0,5mm	60, TD	-
17 β -Estradiol	Mocz, 1 mL	SBSE, PDMS, 10mm/0,5mm	60 (40°C), TD	acylowanie
Kofeina i jej metabolity	Płyny biologiczne, 1 mL	SBSE-RAM(alkil-diol-silica),	40, LD	10% MeOH
Lotne składniki zapachowe	Mleko ludzkie, 5 mL	SBSE, PDMS 20mm/0,5mm	60, TD	-
Hormony płciowe	Woda, mocz, 30 mL	SBSE, PDMS 20mm/1mm	120 lub 240, LD	NaCl
Antydepresanty	Osocze, 1 mL	SBSE, PDMS, 10mm/0,5mm	45, LD	Bufor boranowy

β CD - β -cyklodekstryna, MIP - Nylon 6 imprintowany cząsteczkami fosforoorganicznego pestycydu, Alkil-diol-silica RAM (metoda ograniczonego dostępu do fazy stałej), PPEsk (polimer pochodnej ftaloazyny, zawierającej grupę slufonową, eterową i ketonowe), DVB – diwinylobenzen, Pu – pianka poliuretanowa, TCA – kwas trichlorooctowy.

Istotnym problemem w ekstrakcji SBSE jest duży wpływ matrycy, ale mimo tego ograniczenia, metoda ta znajduje coraz szersze zastosowanie w analityce próbek środowiskowych, biologicznych, medycznych, żywności oraz pasz zwierzęcych i może być rutynową techniką ekstrakcji.

4.3.4. Ekstrakcja z ograniczonym dostępem do fazy stacjonarnej

Ekstrakcja do fazy stałej może odbywać się jednocześnie wg dwóch różnych mechanizmów rozdzielania. Tak się dzieje w przypadku stosowania kolumnienek z wypełnieniem typu RAM (ang. *restricted access material or restricted access media*), a metodę można nazwać ekstrakcją z ograniczonym dostępem do fazy stacjonarnej. Ograniczenie powoduje zewnętrzna, stykająca się z matrycą, powierzchnia fazy stacjonarnej, której właściwości fizyczne lub chemiczne uniemożliwiają sorpcję cząsteczek o dużych rozmiarach, takich jak: białka, kwasy nukleinowe czy polimery. Substancje niskocząsteczkowe mogą penetrować małe pory sorbentu i ulegać ekstrakcji przez podział do wnętrza fazy stacjonarnej, która ma najczęściej charakter faz odwróconych (niepolarny).

Technika RAM łączy w sobie mechanizm wykluczania z mechanizmem podziałowym.

Fazy stałe RAM, ze względu na mechanizm wykluczania makromolekuł, dzieli się na dwie grupy. W pierwszej grupie wykluczanie odbywa się z powodu fizycznej bariery, jaką jest wielkość porów powierzchni fazy stałej, a ekstrakcja analitów zachodzi wewnątrz porów. Sorbenty w tej grupie mogą mieć różny charakter, zależny od właściwości analitu, np. fazy odwrócone, jak krzemionka modyfikowana gliceryną i związana z łańcuchami węglowodorowymi C4, C8 lub C18, znana pod nazwą ADS (ang. *alkil-diol-silica*) oraz fazy z porowatej krzemionki z różnymi ligandami.

W drugiej grupie, wykluczanie odbywa się z powodu chemicznej bariery. Oprócz odpowiedniej wielkości porów, zewnętrzna warstwa sorbentu stanowi półprzepuszczalną powierzchnię - krzemionkę pokrytą białkami albo fazy z mieszanymi funkcjami lub osłoną hydrofobową. W technice RAM są również stosowane fazy stałe o specyficznych właściwościach, np. umożliwiające rozdzielanie enancjomerów lub separacja oparta na mechanizmie jonowymiennym. Struktura zewnętrznej warstwy sorbentu umożliwia desorpcję makromolekuł i stosowanie sorbentu wielokrotnie. Wewnętrzną warstwę sorbentu także najczęściej stanowi sorbent o charakterze odwróconych faz, typu ADS, na którym sorpcja zachodzi głównie na skutek oddziaływań Van der Waals'a. Sorbent ten jest stosowany do szerokiego zakresu analitów.

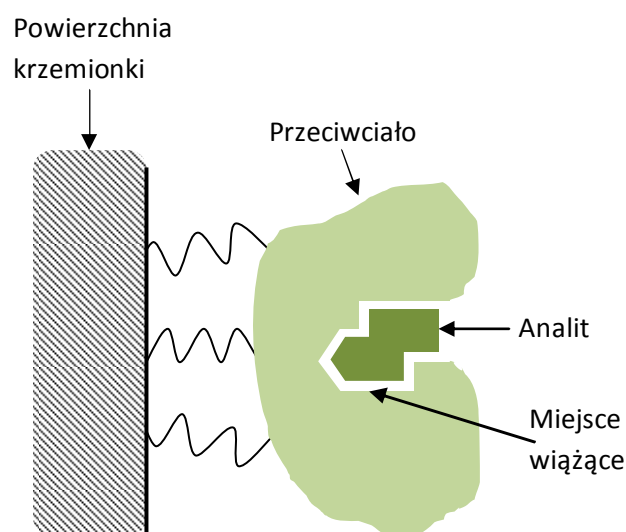
Technika z zastosowaniem RAM wykorzystywana jest przede wszystkim w analizach biologicznych, co pozwala wyeliminować z preparatyki wstępne usuwanie białek i innych dużych polarnych składników (usuwanym dotąd przez strącanie, wirowanie itp.). Technika ta stosowana jest do analizy wielu substancji, w tym leków i ich metabolitów, w płynach fizjologicznych, takich jak: osocze krwi, mocz czy wydzielina z nosa, jak również do oznaczania substancji w supernatantach przy hodowli kultur komórkowych i in. Technika ekstrakcji z ograniczonym dostępem do fazy stacjonarnej ma zastosowanie również w analizach próbek środowiskowych, np. do oznaczania herbicydów.

4.3.5. Ekstrakcja przez wykluczanie na sorbentach immunologicznych

W sytuacji, gdy analit występuje w próbkach w ilości śladowej, a substancje interferujące w dużym stężeniu, zastosowanie nieselektywnego sorbentu do ekstrakcji nie przyniesie oczekiwanych rezultatów. W takim przypadku te intensywne sygnały interferentów będą maskować sygnały analitów na chromatogramie.

Najbardziej selektywnymi sorbentami, stosowanymi do ekstrakcji do fazy stacjonarnej i redukującymi wpływ matrycy są sorbenty immunologiczne.

Sorbent immunologiczny umożliwia izolację, oczyszczanie i zagęszczanie analitu w jednej operacji. Mechanizm ekstrakcji polega na rozpoznaniu molekuły analitu przez przeciwciało (na zasadzie oddziaływania antygen-przeciwciało). Odpowiednie przeciwciała (jednego rodzaju lub różne) unieruchamia się poprzez wiązania kowalencyjne z powierzchnią nośnika, np. krzemionki (rysunek 23). Taki sorbent nazywany jest immunosorbentem (IS) i może być przewidziany do ekstrakcji pojedynczego analitu, analitu i jego metabolitów oraz klasy strukturalnie podobnych analitów. Szczególnie wydają, przy zastosowaniu immunosorbentów, jest ekstrakcja analitów z próbek biologicznych i środowiskowych.



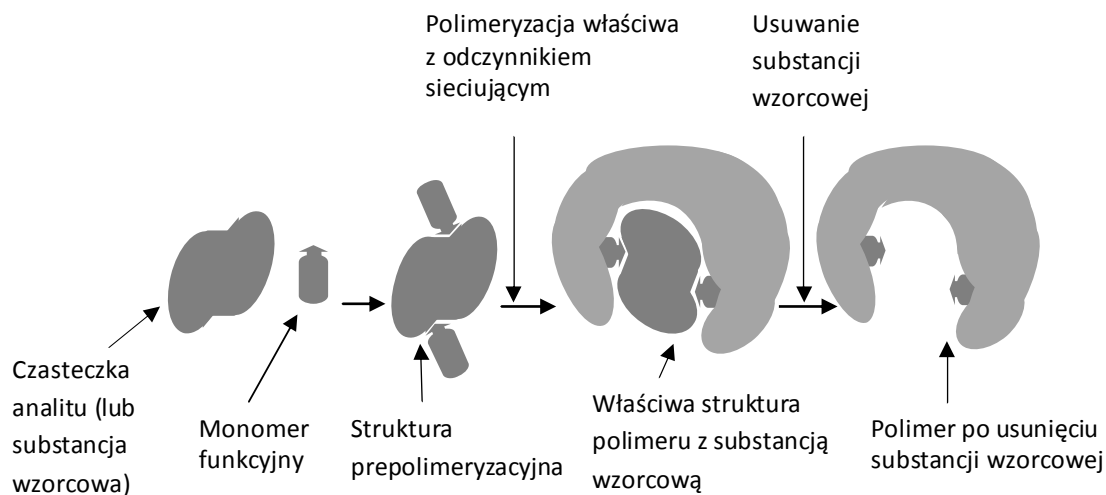
Rysunek 23. Schemat budowy i działania immunosorbentu (IS)

W analizach zanieczyszczeń środowiska, immunosorbenty zastosowano do wykrywania np. pochodnych triazyn (herbicydy), wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), pochodnych fenylomocznika (herbicydy), benzydyny, barwników azowych, aflatoksyn, ochratoksyn, leków weterynaryjnych, węglowodorów aromatycznych BTEX, kortykosteroidów i in.

Immunosorbenty stosowane są w postaci wypełnienia kolumniek SPE lub w postaci wymiennego naboju. Wysokie powinowactwo przeciwciała do analitu zapewnia bardzo wysoką selektywność, więc nie ma problemu z substancjami interferującymi z matrycy.

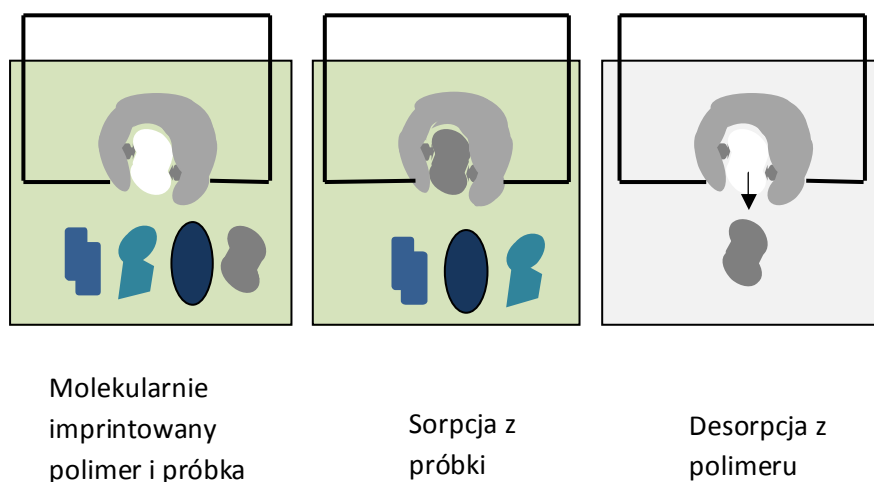
4.3.6. Ekstrakcji za pomocą polimerów z nadrukiem molekularnym

Zasada działania polimerów z nadrukiem molekularnym (ang. *molecularly imprinted polymers*, MIP) jest porównywana z rozpoznawaniem cząsteczek przez naturalne biomolekuły (receptory, enzymy, przeciwciała). W tak przygotowanym polimerze znajdują się trójwymiarowe miejsca wychwytu (wnęki), odpowiadające wymiarom i charakterowi chemicznemu cząsteczki analitu. Mechanizm ekstrakcji oparty jest na efekcie wykluczania, wynikającego z różnic w wielkości i kształcie cząsteczek oraz charakteru związku i wynikających z niego sposobów oddziaływań z polimerem (wiązania wodorowe, oddziaływania dipol-dipol, tworzenie par jonowych itp.). Na rysunku 24 przedstawiono sposób otrzymywania polimerów z nadrukiem molekularnym. Aby otrzymać polimer zdolny wychwycić cząsteczki analitu należy właściwie dobrać monomer funkcyjny oraz poszczególną substancję (analit) lub substancję, będącą analogiem strukturalnym analitu lub grupy analitów. Monomer funkcyjny jest to substancja zdolna do polimeryzacji, najczęściej posiadająca sprzężone podwójne wiązania oraz posiadająca odpowiednie grupy funkcyjne, dobrane do grup obecnych w cząsteczce analitu tak, aby mogło zachodzić wiązanie kowalencyjne lub inne oddziaływania między monomerem a analitem, np. elektrostatyczne, wodorowe czy hydrofobowe (od ich rodzaju zależą techniki modelowania polimeru).



Rysunek 24. Schemat otrzymywanie molekularnie imprintowanych polimerów

W wyniku tych oddziaływań substancja wzorcowa i monomer, rozpuszczone w wybranym rozpuszczalniku, tworzą trwałą strukturę, zwaną kompleksem prepolimeryzacyjnym. Po dodaniu odczynnika sieciującego zachodzi właściwa polimeryzacja, utrwalająca strukturę prepolimeru. Po usunięciu z polimeru substancji wzorcowej, powstaje miejsce zdolne wychwytywać selektywnie cząsteczki analitu z mieszaniny wieloskładnikowej. Molekularnie imprintowany polimer jest stabilny chemicznie i fizycznie i można go stosować wielokrotnie (rysunku 25).

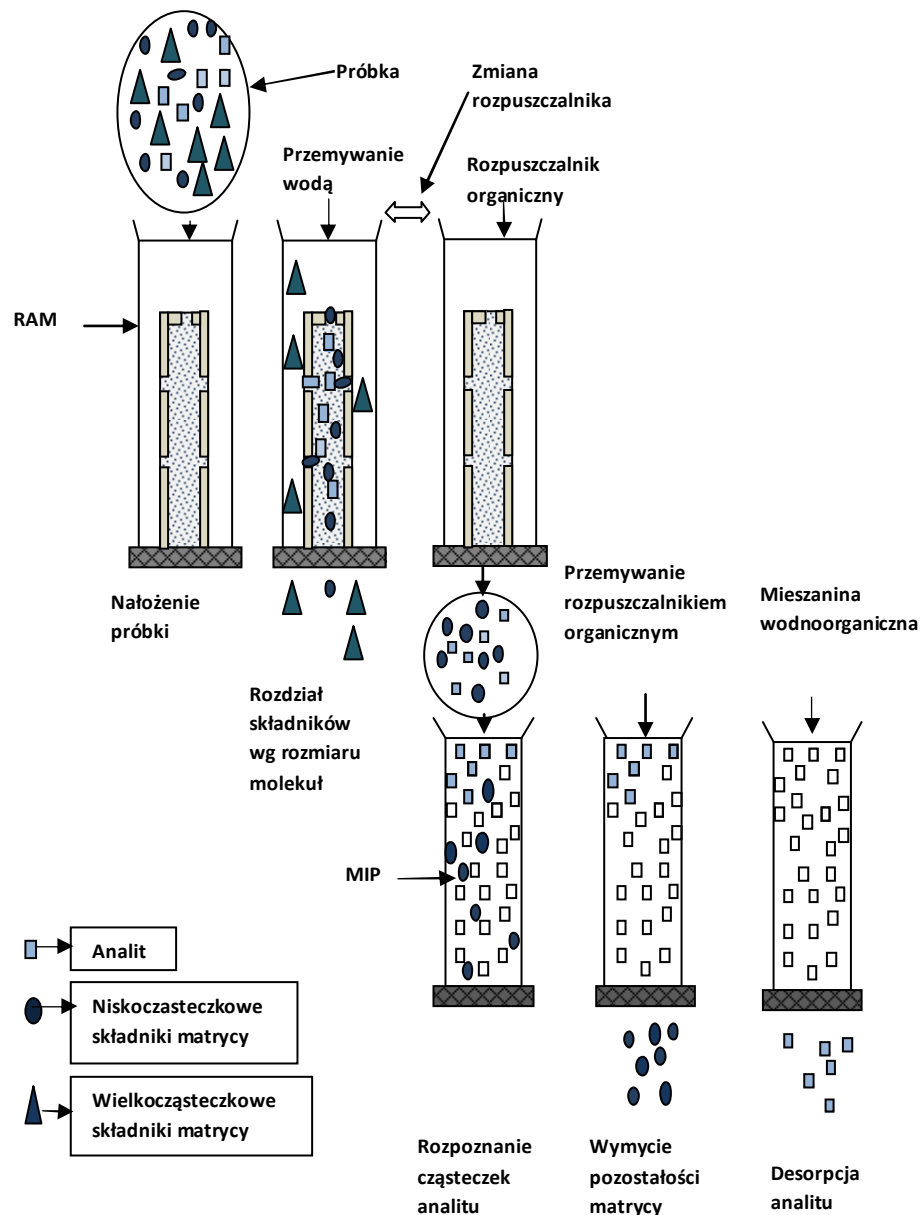


Rysunek 25. Schemat ekstrakcji za pomocą polimeru z nadrukiem molekularnym

Wśród często stosowanych monomerów funkcyjnych znajdują się: kwas akrylowy, kwas metakrylowy, kwas 4-winylobenzoowy (monomery kwaśne), winylopirydyna, winyloimidazol, alliloamina (monomery zasadowe), styren, akrylonitryl, metakrylan metylu, akrylamid (monomery obojętne). Dobór rozpuszczalnika zależy od stosowanych monomerów i substancji oznaczanej, najczęściej używane są toluen, acetonitryl, chloroform czy metanol. Molekularnie imprintowane polimery są stosowane w wielu dziedzinach, ale najszersze zastosowanie znalazły w izolacji i zagęszczaniu substancji. Jako faza stacjonarna w technice SPE stosowane są do izolowania substancji czynnych w materiale biologicznym, jak np. antybiotyków czy β -blokerów w moczu, krwi, osoczu oraz w tkankach

wątroby, nerek czy mięśni. Wykorzystywane są też w testach immunologicznych oraz do izolowania i oznaczania substancji toksycznych lub szkodliwych w próbkach środowiskowych: wodzie, glebie, żywności i paszach. Handlowo dostępne są polimery z nadrukiem do oznaczania: β -blokerów, β -receptorów, antybiotyku chloramfenikol, ryboflawiny (wit. B2), herbicydów triazynowych i in.

Nowym kierunkiem w ekstrakcji do fazy stałej jest połączenie sorbentów stosowanych w technice RAM z molekularnie imprintowanymi polimerami (RAM-MIP). Schemat takiego rozdzielania, stosowanego do izolacji triazynowych herbicydów pokazano na rysunku 26.



Rysunek 26. Schemat procedury rozdzielania za pomocą połączonych technik RAM-MIP, u góry, po lewej stronie schemat rozdzielania na kolumnie RAM, po prawej u dołu schemat procedury na kolumnie MIP (na podstawie Guiochon G., A., Beaver L., A., Progress and future of instrumental analytical chemistry applied to the environment, *Analytica Chimica Acta*, 523,1-14, 2004)

Procedura izolacji składa się z dwóch etapów:

- usunięciu z próbki wielkocząsteczkowych zanieczyszczeń,
- wyizolowanie czystego analitu z wstępnie oczyszczonej próbki.

W pierwszym etapie, po załadowaniu próbki na kolumnkę następuje odmycie wodą (roztworem wodnym) zanieczyszczeń wielkocząsteczkowych, nieprzechodzących przez małe pory wierzchniej warstwy sorbentu. Analit i inne zanieczyszczenia zostają na wewnętrznej warstwie sorbentu. Następnie, zmieniając rozpuszczalnik na organiczny, wymywa się związki z sorbentu. Wstępnie oczyszczonej próbkę nanosi się na kolumnkę, w której sorbentem jest polimer imprintowany cząsteczkami triazyny. Cząsteczki triazynowego herbicydu pozostają w aktywnych wnękach polimeru, a pozostałe składniki są usuwane wraz z rozpuszczalnikiem. Następnie, stosując mieszaninę wodno-organiczną o określonym pH, wymywa się czysty analit. Taka technika jest bardzo selektywna i pozwala unikać niekorzystnych oddziaływań w czasie analizy i może znaleźć szerokie zastosowanie w analityce medycznej. Kolumnki RAM-MIP mogą być wykorzystane wielokrotnie, po uprzednim przemyciu i kondycjonowaniu.

4.3.7. Mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu w strzykawce

Mikroekstrakcja do stałego sorbentu upakowanego w strzykawce (ang. *microextraction by packed sorbent* lub *microextraction in packed syringe*, MEPS) jest też nazywana krótką kolumną chromatograficzną w strzykawce. Jest to nowa technika ekstrakcji, choć oparta na starej zasadzie – jest miniaturyzacją ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu może być połączona bezpośrednio z chromatografem cieczowym lub gazowym lub jako odrębna metoda izolacji substancji. Najistotniejszą cechą tej techniki jest to, że złożo sorbentu jest integralną częścią strzykawki a nie osobną kolumną. Wszystkie czynności, jak przemywanie, kondycjonowanie złoża, sorpcja i desorpcja wykonywane są w tym samym miejscu - w strzykawce, którą również wprowadza się próbkę do dozownika chromatografu.

W mikroekstrakcji do fazy stałej w strzykawce stosuje się te same sorbenty, co w SPE, więc standardowe fazy RPC-18, RPC-8 i inne produkowane na bazie krzemionki oraz polimery, jak polidwinylobenzen czy molekularnie drukowane polimery a także wymiennicze jonowe i przeciwciała. Minikolumnę w strzykawce przygotowuje się w ten sposób, że do mikrostrzykawki o pojemności 100 – 250 μL wsypuje się między dwa filtry polietylenowe sorbent stały w ilości 1-4 mg, co daje mikrolitrowe objętości kolumnki. Do wymycia analitu z tak małej ilości złoża wystarczą mikrolitrowe objętości rozpuszczalnika, stosowne do dozowania do chromatografu. Strzykawka MEPS może być używana do ekstrakcji wiele razy, nawet powyżej stu.

Mikroekstrakcja do fazy stałej w strzykawce obejmuje podobne etapy jak w metodzie SPE. Po kondycjonowaniu kolumnki ekstrakcję przeprowadza się następująco: 10÷1000 μL ciekłej próbki przepuszcza się w strzykawce przez sorbent, naciągając i wypuszczając płyn wielokrotnie, aż wymagana ilość analitu zostanie zatrzymana na fazie stałej. Następnie fazę stałą należy przepłukać małą objętością rozpuszczalnika próbki (wody), aby usunąć niesorbujące się na fazie stacjonarnej substancje. Złożo wysuszyć, po czym małą objętością rozpuszczalnika organicznego lub fazy ruchomej eluować anality bezpośrednio do dozownika HPLC lub GC. Schemat

Mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu w strzykawce MEPS jest obiecującą metodą izolacji i zagęszczania substancji z wielu powodów:

- jest prosta w użyciu,
- może być całkowicie zautomatyzowana,
- jest szybka,
- redukuje ilości rozpuszczalnika i próbki,
- jest zdecydowanie tańsza od ekstrakcji do fazy stacjonarnej, SPE.

Strzykawki z upakowanym sorbentem są dostępne komercyjnie.

5. Ekstrakcja próbek stałych

Ekstrakcja w układzie ciało stałe – ciecz (ang. *solid liquid extraction*, SLE) jest podstawową metodą wyodrębniania z ciała stałego substancji rozpuszczalnych w wodzie lub rozpuszczalnikach organicznych. Ekstrakcję cieczą stosuje się do wydzielania substancji z materiału roślinnego (substancji tłuszczowych z roślin oleistych, substancji aktywnych biologicznie z ziół, owoców, korzeni, substancji zapachowych i smakowych z roślin), z materiału pochodzenia zwierzęcego (tłuszcze, witaminy) oraz z gleby, osadów i zawiesin. Ekstrakcja w układzie ciało stałe – ciecz jest też często stosowana do desorpcji analitu z sorbentu stałego.

Na wydajność i kinetykę ekstrakcji wpływają trzy, ściśle ze sobą związane, czynniki: rozpuszczalność, przenoszenie masy i wpływ matrycy.

Ekstrahowana substancja musi być dobrze rozpuszczalna w stosowanym ekstrakcie. Rozpuszczalność analitu zależy od rodzaju rozpuszczalnika, a dla wybranego rozpuszczalnika, od temperatury i ciśnienia. Aby zaistniała ekstrakcja w układzie dwufazowym ciało stałe – ciecz konieczna jest desorpcja analitu z powierzchni matrycy i rozpuszczenie go w rozpuszczalniku. W tym celu musi nastąpić transport rozpuszczalnika do wnętrza matrycy (miejsca adsorpcji), a następnie przeniesienie roztworu z miejsc desorpcji. Transport masy (rozpuszczalnika i analitu) zależy od współczynników dyfuzji i struktury matrycy.

Współczynniki dyfuzji zmieniają się ze zmianą warunków ekstrakcji. Podwyższona temperatura, niska lepkość rozpuszczalnika, rozdrobnienie matrycy oraz mieszanie w czasie ekstrakcji przyspieszają przenoszenie masy.

Matryca może znacznie wpływać na wydajność ekstrakcji, zwłaszcza, jeśli silnie oddziałuje z analitem. W takim przypadku nawet bardzo dobrze rozpuszczalny analit jest niedostępny, bo silnie związany z matrycą zalega w jej porach.

Próbki stałe wymagają wstępnego przygotowania przed ekstrakcją. Bardzo często próbki zawierają wodę, którą trzeba usunąć, by ułatwić penetrację rozpuszczalnika organicznego. Woda zawarta w matrycy ogranicza dostęp do zaadsorbowanego analitu, zmniejsza jego rozpuszczalność w

rozpuszczalniku organicznym i sprawia duże problemy przy izolacji z ekstraktu. Sposób usuwania wody zależy od rodzaju matrycy i lotności oraz trwałości analitu (nie trwałość w obecności tlenu czy promieniowania UV). Zwykle próbki suszy się w temperaturze pokojowej do tzw. powietrznie suchych, lub w suszarce, w temperaturze 40°C. Próbki z nielotnymi analitami można liofilizować, dla usunięcia wody. Wysuszone próbki należy rozdrobnić. W zależności od rodzaju próbki rozdrabnianie wykonuje się przez kruszenie w specjalnych urządzeniach, mielenie w młynach lub rozcieranie w moździerzach. Niestety, w ten sposób nie można postępować z próbkami zawierającymi lotne anality lub/i zagrażające zdrowiu. W takim przypadku zaleca się osuszanie próbki przez roztrzenie z bezwodnym siarczanem sodu lub ziemią okrzemkową (diatomitem).

Wybór techniki ekstrakcji zależy przede wszystkim od stanu skupienia matrycy, właściwości i stężenia analitu oraz właściwości i stężenia substancji przeszkadzających. Technikę ekstrakcji należy dostosować do celu, czasu analizy, sposobu przygotowania próbki do ekstrakcji oraz czułości i selektywności metody końcowego oznaczenia, jeśli takie jest stosowane.

Wybór rozpuszczalnika podyktowany jest właściwościami analitów, matrycy oraz substancji przeszkadzających. W zależności od celu ekstrakcji, rozpuszczalnik powinien dobrze izolować różne klasy związków lub selektywnie określony związek.

Niezależnie od celu ekstrakcji, rozpuszczalnik lub mieszanina rozpuszczalników powinna być tak dobrana, by w najmniejszym stopniu współekstrahowała substancje przeszkadzające.

5.1. Ekstrakcja próbek stałych fazą gazową

Oznaczanie lotnych substancji, rozpuszczonych lub zaadsorbowanych w kompleksie matrycy stałej (np. glebie, żywności, farmaceutykach czy polimerach) metodami tradycyjnymi może być mało powtarzalne i niedokładne. Metody tradycyjne wymagają wstępnego przygotowania próbki, jak suszenie czy rozdrabnianie. Są to czynności, które powodują duże straty ilościowe związków lotnych. Zateżnienie ekstraktów to kolejny etap strat analitów. Jednym ze sposobów dokładnego oznaczenia lotnych związków organicznych (ang. *volatile organic compounds*, VOCs) jest **ekstrakcja do fazy gazowej**. Ekstrakcję prowadzi się w układzie zamkniętym, próbka może być ekstrahowana w stanie natywnym. Poza tym, ekstrakt gazowy może być bezpośrednio badany najlepszą, do oznaczenia analitów lotnych, techniką chromatografii gazowej.

5.1.1 Ekstrakcja do gazowej fazy nadpowierzchniowej

Ekstrakcję do fazy gazowej można przeprowadzać w układzie statycznym (ekstrakcja równowagowa, SHS) lub dynamicznym (PT), w którym nie musi być osiągnięty stan równowagi termodynamicznej. Aby ułatwić desorpcję analitów z fazy stałej i rozpuszczenie w fazie gazowej, często dodaje się do próbki niewielką ilość wody lub innego rozpuszczalnika.

Sposoby i zasady ekstrakcji do fazy gazowej przedstawione są w rozdziale: **4.1.1. Ekstrakcja do gazowej fazy nadpowierzchniowej**.

5.1.2. Ekstrakcja dynamiczna techniką wymywania i wychwytywania

Sposoby i zasady ekstrakcji do fazy gazowej techniką wymywania i wychwytywania przedstawione są w rozdziale: **4.1.2. Ekstrakcja strumieniem gazu przepływającym przez próbkę.**

5.1.3. Ekstrakcja strumieniem gazu z desorpcją termiczną

W metodzie desorpcji termicznej i ekstrakcji strumieniem gazu czynnikiem ekstrahującym jest temperatura. Pod wpływem ogrzewania substancje desorbują się z matrycy stałej i są przenoszone strumieniem gazu do pułapki analitów lub bezpośrednio do analizatora, np. chromatografu gazowego. Ten sposób ekstrakcji jest przede wszystkim stosowany do desorpcji analitów z adsorbentów stałych lub filtrów, które były użyte do izolacji substancji z matryc gazowych czy ciekłych i stosowany zarówno w laboratoriach analitycznych jak i przemyśle.

W przemyśle, do desorpcji związków organicznych z sorbentu stałego, np. do desorpcji rozpuszczalników z węgla aktywnego, najczęściej stosuje się przegrzaną parę wodną. Para wodna spełnia tu podwójną rolę: dostarcza ciepła do desorpcji termicznej i wypiera cząsteczki rozpuszczalnika, adsorbując się na węglu aktywnym. Desorpcję termiczną przeprowadza się również gorącym gazem obojętnym. Przez złożę przepuszcza się podgrzany gaz, który je ogrzewa, umożliwiając termiczną desorpcję zaadsorbowanych związków, przenoszonych następnie strumieniem gazu. Proces taki można prowadzić w otwartym układzie przepływu gazu obojętnego (gaz nie jest zawracany do desorpcji) i zamkniętym (kołowym), z zawracaniem do ekstrakcji.

Inny sposobem jest ekstrakcja gazem obojętnym złoża podgrzanego do temperatury desorpcji. Taki sposób jest stosowany w analityce, w urządzeniach zwanych desorberami termicznymi. Stosując odpowiednią temperaturę desorpcji, można ekstrahować anality lotne (VOCs) oraz wysokowrzące, jak WWA czy PCB.

Desorbery termiczne składają się z komory, ogrzewanej i termostatowanej elektrycznie, do której wkłada się pojemnik(rurkę) z sorbentem stałym, zaworu wielodroźnego i sterownika elektronicznego. Najprostszy sposób desorpcji polega na połączeniu desorbera termicznego z chromatografem gazowym i bezpośrednim wprowadzeniu desorbowanych analitów wraz ze strumieniem gazu nośnego na kolumnę chromatograficzną. Ten sposób stosowany jest do związków, których temperatura wrzenia nie przekracza 200°C. Bardziej skomplikowanym sposobem, z zastosowaniem międzyoperacyjnego wzbogacania analitów, jest:

- desorpcja termiczna a następnie wymrażanie uwolnionych analitów pustej kapilarze, dla ich zagęszczenia,
- desorpcja termiczna analitów a następnie adsorpcja ich na innym sorbencie, z którego desorpcja wprost do kolumny chromatograficznej jest łatwiejsza.

Zagęszczenie desorbowanych termicznie analitów można uzyskać przez ich bezpośrednie wprowadzenie na czoło kolumny chromatograficznej, które jest utrzymywane w temperaturze pokojowej lub chłodzone za pomocą par ciekłego azotu lub ditlenku węgla. Rozdzielanie chromatograficzne prowadzone jest następnie w programowanej temperaturze kolumny.

Termiczna desorpcja nie wymaga skomplikowanej procedury ekstrakcji, odzwierciedla rzeczywisty skład próbki, nawet lotnych składników i nie wymaga dużych ilości próby.

Dużą zaletą desorpcji termicznej w połączeniu z chromatografią gazową jest brak dużego sygnału rozpuszczalnika, który może maskować obecność innych związków. Termiczna desorpcja w połączeniu z chromatografią gazową jest stosowana do analizy lotnych związków organicznych (VOCs) w powietrzu atmosferycznym i w pomieszczeniach zamkniętych. Stosowana jest również, jako technika izolacji różnych zanieczyszczeń, zaadsorbowanych w pyłach, jak pestycydy, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne i wiele innych substancji.

5.2. Ekstrakcja w układzie ciało stałe – ciecz

Stosowane obecnie techniki ekstrakcji próbek stałych cieczą można podzielić na:

- techniki tzw. klasyczne,
- techniki klasyczne wspomagane,
- współczesne techniki ekstrakcji, z zastosowaniem niekonwencjonalnych rozpuszczalników oraz warunków procesu.

Klasyczne techniki ekstrakcji, choć ciągle stosowane, skutecznie wypierane są przez modyfikowane sposoby izolacji substancji. Stosowanie fizycznych metod wspomagania ekstrakcji, takich jak: zwiększanie ciśnienia ekstrahenta, stosowanie promieniowania mikrofalowego lub fal ultradźwiękowych, zdecydowanie zwiększa wydajność ekstrakcji, co z kolei zmniejsza zużycie lotnych i szkodliwych rozpuszczalników oraz energii.

5.2.1. Ekstrakcja rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie

Najprostszą techniką klasyczną, choć niewygodną, jest ciągle stosowana **ekstrakcja rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie**. Jest ona długotrwała, wymagająca pracy i dużej ilości ekstrahenta. Próbkę po wysuszeniu i rozdrobnieniu umieszcza się w naczyniu, zalewa rozpuszczalnikiem i wytrząsa. Próbkę ekstrahuje się wielokrotnie, za każdym razem świeżą porcją rozpuszczalnika. Uzyskane porcje ekstraktu łączy się, sączy dla oddzielenia cząstek stałych próbki i odparowuje rozpuszczalnik.

5.2.2. Ekstrakcja przez homogenizację próbki z rozpuszczalnikiem

Do próbek roślinnych i biologicznych często stosuje się **homogenizację próbki z rozpuszczalnikiem**. Próbkę zalewa się odpowiednim rozpuszczalnikiem i rozdrabnia przez miksowanie lub ucieranie. Ekstrakcja zachodzi jednocześnie z rozdrabnianiem. Uzyskany ekstrakt jest następnie oddzielany od nierozpuszczalnej pozostałości przez sączenie lub częściej, zwłaszcza w przypadku próbek biologicznych, poprzez wirowanie. Pozostały osad można zawrócić do następnej ekstrakcji. Powtarzanie homogenizacji kilkoma porcjami świeżego rozpuszczalnika daje większą wydajność ekstrakcji. W niektórych przypadkach istnieje potrzeba podgrzania rozdrobnionej w rozpuszczalniku próbki, wtedy należy ją przenieść do kolby i ogrzewać pod chłodnicą zwrotną. Taka metoda nazywa się digestią i stosowana jest bardzo często w analityce farmaceutycznej.

5.2.3. Ekstrakcja przez zmydlanie (saponifikacja)

Sposób związania analitu z matrycą próbki stałej zależy od budowy jego cząsteczki. Np. węglowodory czy sterole związane są z hydrofobowymi regionami cząsteczek białkowych czy tłuszczowo-

białkowych wiązaniami hydrofobowymi lub Van der Waalsa. W takim przypadku do ich ekstrakcji można użyć rozpuszczalnika niepolarnego, jak eter dietylowy, heksan czy chloroform. Anality związane wiązaniami wodorowymi czy elektrostatycznymi muszą być ekstrahowane rozpuszczalnikami polarnymi, jak metanol czy etanol, aby nastąpiło rozerwanie wiązań wodorowych i dezaktywacja miejsc przyciągania elektrostatycznego. Jeśli analit jest związany z matrycą wiązaniami kowalencyjnymi, np. kwasy tłuszczowe związane estrowo, amidowo czy glikozydowo z białkami czy polisacharydami, można go ekstrahować dopiero po hydrolizie tych wiązań. Wykonuje się zazwyczaj hydrolizę alkaliczną, stosując alkoholowy roztwór wodorotlenku sodu lub potasu. Reakcję tę nazwano zmydleniem, bo jej produktem są mydła - sole sodowe czy potasowe kwasów tłuszczowych. Po zmydleniu do próbki dodaje się wodę, roztwór zobojętnia i wolne kwasy można ekstrahować niepolarnym rozpuszczalnikiem.

Reakcje zmydlenia przeprowadza się bardzo często, w przypadku próbek pochodzenia roślinnego czy zwierzęcego, np. przy oznaczaniu steroli w komórkach roślinnych.

Sterole występują w formie wolnej lub związane estrowo lub glikozydowo. Związki steroli można wyekstrahować odpowiednim rozpuszczalnikiem, a następnie przeprowadzić reakcję zmydlenia i izolować wolne sterole niepolarnym rozpuszczalnikiem.

Reakcję zmydlenia przeprowadza się również ze względu na charakter matrycy. Gdy analit niepolarny znajduje się w również niepolarniej matrycy, np. witaminy A, D, E (rozpuszczalne w tłuszczach) zawarte w oleju.

Przeprowadzając zmydlenie zmienia się charakter matrycy (np. oleju) na polarny, wtedy niepolarne składniki można ekstrahować niepolarnym rozpuszczalnikiem.

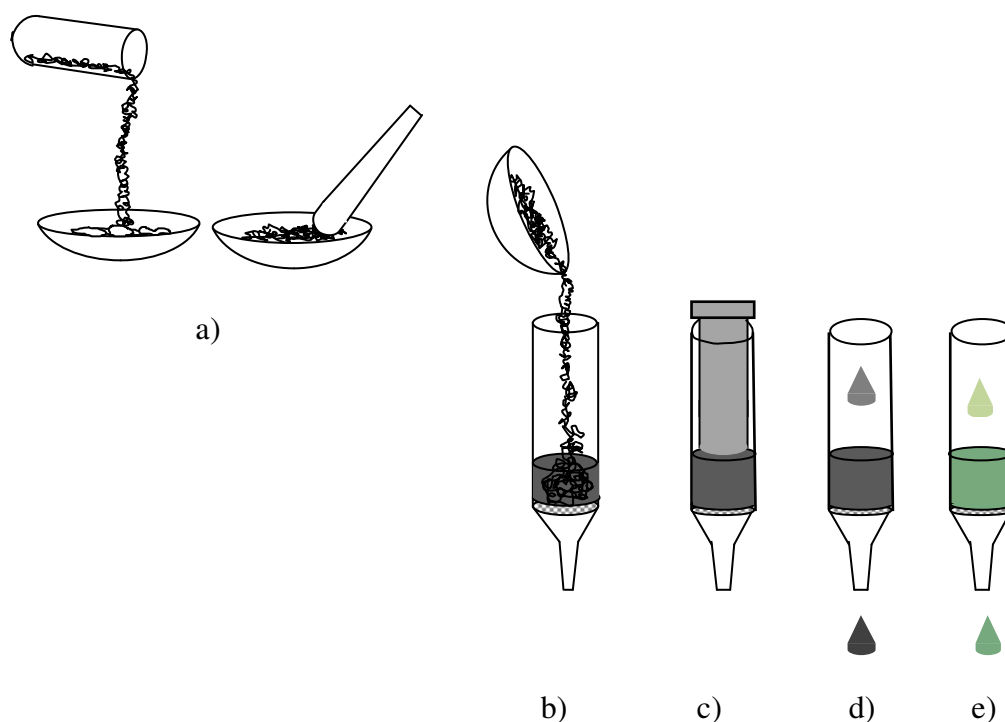
Podobnie można oznaczyć benzo(a)piren (rakotwórczy wielopierścieniowy węglowodór aromatyczny) w oleju. Zmydlenie oleju powoduje, że próbka zmienia charakter na polarny, z którego łatwo wyekstrahować węglowodór niepolarnym rozpuszczalnikiem. Reakcję zmydlenia przeprowadza się na gorąco, pod chłodnicą zwrotną, a ekstrakcję - jedną z technik w układzie ciecz - ciecz. Ekstrakcję połączoną ze zmydleniem, bardzo często stosuje się przy ekstrakcji materiału roślinnego i zwierzęcego.

5.2.4. Ekstrakcja za pomocą strumienia rozpuszczalnika

Ekstrakcja za pomocą strumienia rozpuszczalnika polega na ciągłym przepływie rozpuszczalnika przez próbkę. Próbka jest umieszczona w kolumnie, przez którą jest pompowany rozpuszczalnik. Zaletą tego procesu jest to, że próbka, będąca w nieprzerwanym kontakcie z rozpuszczalnikiem, styka się ciągle ze świeżą jego porcją. Proces ten można prowadzić w podwyższonej temperaturze, ale nieprzekraczającej temperatury wrzenia zastosowanego rozpuszczalnika. Rozpuszczalnik z ekstraktem jest odprowadzany do destylacji, po czym jako czysty zwracany jest do procesu. Ekstrakcję za pomocą strumienia rozpuszczalnika nazywa się perkolacją i często stosuje w przemyśle tłuszczowym.

5.2.5. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem

Wyodrębnianie za pomocą strumienia rozpuszczalnika wraz z jednoczesnym wstępnym rozdzielaniem mieszaniny można uzyskać, stosując **ekstrakcję za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem** (ang. *matrix solid-phase dispersion*, - MSPD). Ekstrakcja polega na wymywaniu substancji z próbki stałej zmieszanej z sorbentem. Charakter sorbentu dobierany jest do natury matrycy i właściwości substancji izolowanej oraz interferentów i może służyć do zatrzymywania jednych lub drugich. Stosowane są sorbenty polarne, np. żel krzemionkowy, Florisil, tlenek glinu lub niepolarne – np. krzemionka związana z łańcuchami węglowodorowymi C-8 lub C-18. Ucieranie próbki z dużą ilością sorbentu mechanicznie niszczy strukturę tkanki roślinnej czy zwierzęcej, powoduje rozproszenie i sorpcję próbki na powierzchni sorbentu poprzez hydrofobowe i hydrofilowe oddziaływania. Wynikiem tego jest jakby nowa struktura sorbentu, będącego jednorodną mieszanką próbki i wypełniacza, wolnej od płynów i prawie suchej. Podczas przepływu rozpuszczalnika przez tę mieszaninę, następuje ekstrakcja i podział ekstraktu między fazę ciekłą - rozpuszczalnik a fazę stałą – sorbent. Wykonanie ekstrakcji techniką MSPD przedstawiono na rysunku 28.



Rysunek 28. Schemat ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem (MSPD)

Etapem pierwszym jest rozdrobnienie i dokładne wymieszanie próbki stałej z sorbentem (rysunek 28a). Masa próbki zależy od stężenia analitu i czułości metody stosowanej w kolejnym etapie analizy, najczęściej wynosi od 0,5 do 1,0 g. Próbkę miesza się z sorbentem zwykle w proporcji 1 do 4. Stosunek masy próbki do masy sorbentu zależy od natury matrycy, w przypadku próbek zawierających dużo wody (owoce, warzywa) masa sorbentu może być większa niż czterokrotna

masa próbki. Mieszaninę próbki i sorbentu umieszcza się w kolumnie (rysunek 28b). Na wierzchu złoże nakłada się filtr z bibuły i zawartość kolumny delikatnie ugniata tłoczkiem od strzykawki lub bagietką (rysunek 28c). Następnym etapem jest wymycie substancji przeszkadzających (rysunek 28d) odpowiednim rozpuszczalnikiem: np. wodą, buforem, mieszaniną wody z metanolem lub acetonitrylem lub rozpuszczalnikiem niepolarnym. Rozpuszczalniki niepolarne, np. heksan, stosuje się w celu odmycia tłuszczów, utrudniających penetrację eluentu. Na każde 100 mg mieszaniny próbki z sorbentem zużywa się 1-2 mL rozpuszczalnika. Usuwanie interferentów powinno trwać nie dłużej, jak 1-2 min, aby nie doprowadzić do wymycia substancji oznaczanej. Przed elucją analitów złoże w kolumnie należy wysuszyć, szczególnie, gdy eluentem ma być rozpuszczalnik niepolarny. Złoże suszy się pod próżnią, w strumieniu azotu lub przez odwirowanie. Ostatnim etapem jest izolowanie analitu (rysunek 29e) rozpuszczalnikiem, w ilości minimum 250 μ L/100 mg złoże. Dla powtarzalności oznaczeń należy również zachować stałą szybkość elucji i prowadzić ją dwuetapowo, stosując kilkuminutowe nasiąkanie.

MSPD to ekstrakcja na mikroskalę, która została zastosowana po raz pierwszy 1989 r. Jest to technika stosowana do oznaczania organicznych analitów, jak: leki, steroidy i inne pozostałości farmaceutyków, pestycydy, polichlorowane bifenylole (PCB) w próbkach stałych lub semi-stałych. Szczególnie jest przydatna w oznaczaniu substancji w próbkach zawierających dużo wody: warzywach, owocach oraz w matrycach biologicznych: tkance mięśniowej, wątrobie czy tłuszczu. Wadą tej metody są małe odzyski analitów.

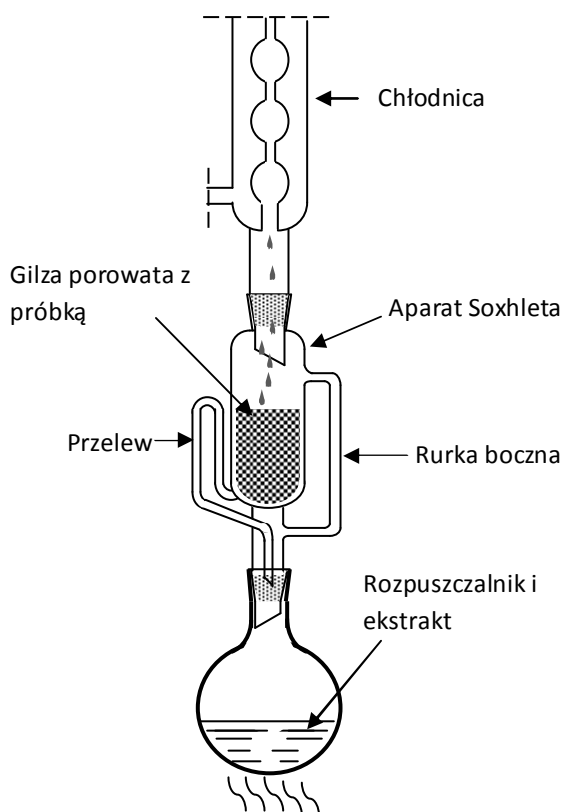
5.2.6. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika w aparacie Soxhleta

Klasyczną ekstrakcją ciągłą próbek stałych jest ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika w aparacie Soxhleta. Jest to jedna z najstarszych metod, zastosowana po raz pierwszy w 1879 roku przez Franza Ritтера von Soxhleta, niemieckiego chemika. Początkowo aparat Soxhleta był stosowany do ekstrakcji tłuszczu z próbek stałych. Potem okazało się, że jest to uniwersalna metoda izolacji substancji średniolotnych i nielotnych oraz trwałych termicznie z wielu matryc stałych, jak gleby, osadów, pyłów, sorbentów stałych z zaadsorbowanymi związkami z matryc ciekłych i gazowych, żywności, pasz, materiału roślinnego i zwierzęcego, próbek biologicznych, farmaceutyków i in.

Ekstrakcja w aparacie Soxhleta jest połączeniem ekstrakcji i destylacji. Oba procesy odbywają się w obiegu zamkniętym, w wyniku których próbka jest ekstrahowana wielokrotnie, za każdym razem świeżą porcją rozpuszczalnika.

Ekstrakcja w aparacie Soxhleta jest zdecydowanie bardziej ekonomiczna niż klasyczna ekstrakcja przez wytrząsanie, bo zmniejsza zużycie rozpuszczalnika. Schemat budowy aparatu Soxhleta przedstawiono na rysunku 29. Główną część zestawu stanowi aparat Soxhleta, czyli pojemnik szklany na próbkę, zaopatrzony w rurkę przelewową (syfon) i rurkę boczną, umożliwiającą przepływ par rozpuszczalnika do chłodnicy. W pojemniku umieszcza się gilzę z twardej bibuły filtracyjnej lub wykonaną z innego, porowatego materiału, zawierającą ekstrahowaną próbkę. Aparat Soxhleta łączy się od dołu z kolbą okrągłodenną, zawierającą ekstrahujący rozpuszczalnik, a od góry z chłodnicą zwrotną. Połączenia aparatu z chłodnicą i kolbą są szlifowe i muszą być szczelne. Kolbę z rozpuszczalnikiem ogrzewa się, utrzymując łagodny stan wrzenia. Pary rozpuszczalnika przechodzą rurką boczną do chłodnicy, gdzie ulegają schłodzeniu i skropleniu. Kondensat z chłodnicy wpływa do

gilzy z próbką i pojemnika szklanego, powoli je wypełniając. Gdy poziom rozpuszczalnika w pojemniku osiągnie wysokość rurki bocznej, ekstrakt przelewa się do kolby.



Rysunek 29. Schemat budowy zestawu do ekstrakcji za pomocą aparatu Soxhleta

Proces ten powtarza się automatycznie tak długo, jak długo ogrzewana jest kolba z rozpuszczalnikiem. Z kolby odparowuje tylko rozpuszczalnik i w czasie procesu stężenie ekstraktu w kolbie wzrasta. Kolbę należy ogrzewać łagodnie, by nie przegrzać ekstraktu.

Dobór warunków ekstrakcji w aparacie Soxhleta polega przede wszystkim na wyborze rozpuszczalnika i określeniu czasu ekstrakcji. Przy wyborze rozpuszczalnika obowiązuje zasada, że „podobne rozpuszcza podobne”.

Dla ułatwienia rozpuszczania analitów w rozpuszczalniku organicznym, próbkę należy wysuszyć i rozdrobnić. W aparacie Soxhleta substancje ekstrahowane są ciepłym rozpuszczalnikiem, a temperatura ekstrakcji zależy od temperatury kondensatu, a ta od temperatury wrzenia użytego rozpuszczalnika. Substancja ekstrahowana nie styka się z gorącymi parami rozpuszczalnika. To jest korzystne dla analitów lotnych i niestabilnych termicznie, które mogłyby się rozłożyć lub być porywane wraz z parami rozpuszczalnika. Z kolei niższa temperatura zmniejsza rozpuszczalność analitów, przez co ekstrakcja jest powolna. Ekstrakcja jest powolna, dlatego że podczas napełniania pojemnika kondensatem przebiega statycznie (nie ma ruchu rozpuszczalnika względem próbki). Jedynie przelewanie ekstraktu do kolby odbywa się szybko i jest to jednocześnie mechaniczne płukanie zawartości gilzy. Szybkie przelewanie ułatwia wymianę warstwy

rozpuszczalnika bezpośrednio przylegającej do powierzchni próbki. Ekstrakcja w aparacie Soxhletha trwa długo i zwykle wynosi od 6 do 48 godzin.

Czas ekstrakcji można określać ilością pojedynczych cykli (przelewów), których powinno być minimalnie 30.

Czas trwania ekstrakcji ustala się eksperymentalnie, sprawdzając, czy rozpuszczalnik w gilzie zawiera jeszcze substancje ekstrahowane (próba na szkiełku zegarkowym). Ilość użytego rozpuszczalnika zależy od naważki próbki, zwykle stosuje się 300 mL na 10 g próbki.

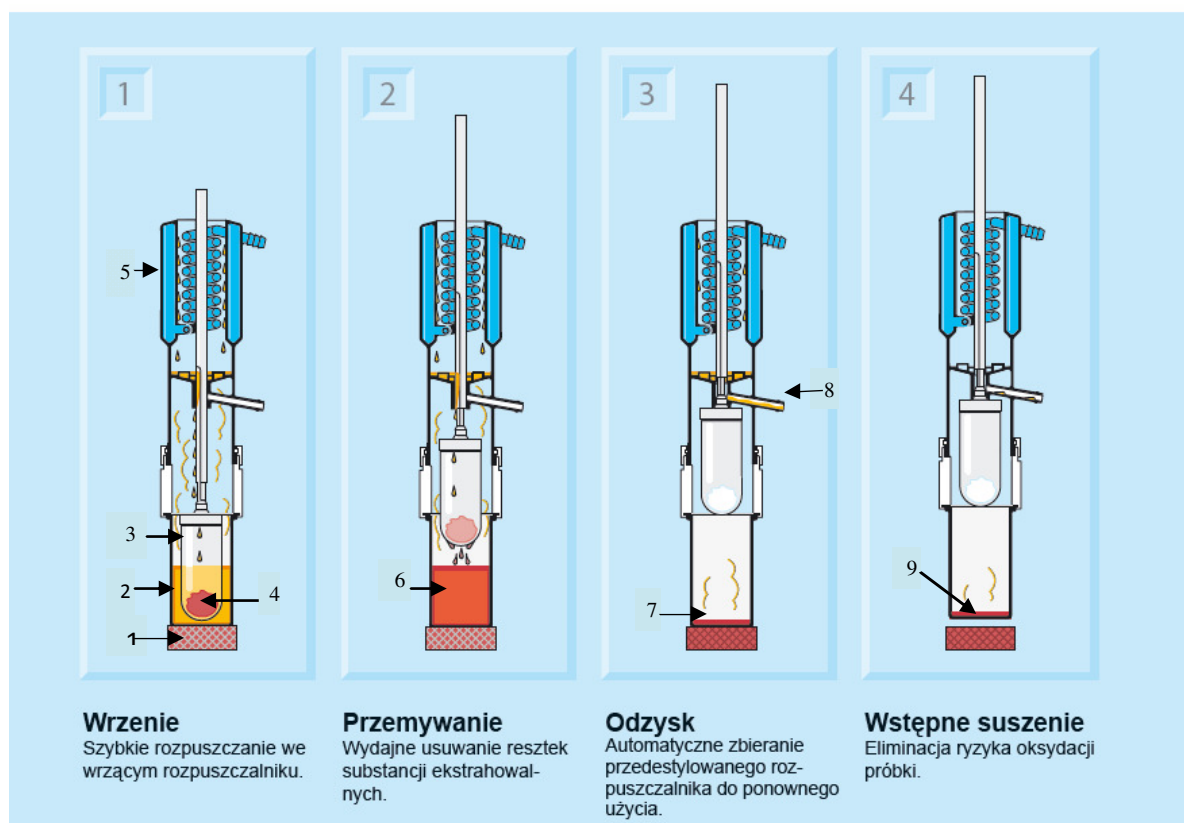
Technika ekstrakcji w aparacie Soxhletha, mimo że jest procedurą długotrwałą, daje najdokładniejsze wyniki i jest stosowana, jako metoda odniesienia dla innych, szybkich technik i wciąż ulepszana.

Aby zwiększyć szybkość i wydajność ekstrakcji, zastosowano cylindryczne, wykonane ze stali nierdzewnej, autoklawy z aparatem Soxhletha wewnątrz, umożliwiające ekstrakcję w podwyższonym ciśnieniu. Taki zestaw musi być zaopatrzone w system pomp do wody chłodzącej, dla otrzymania kondensatu. Ekstrakcja pod zwiększonym ciśnieniem jest krótka, redukuje zużycie rozpuszczalnika, ale aparatura jest droga. Jest stosowana do izolacji chloroorganicznych pestycydów i polichlorowanych bifenyli w warzywach (marchew, pomidory), w oliwie i liofilizowanym mięsie ryb.

Inny sposób na poprawę parametrów ekstrakcji za pomocą aparatów Soxhletha zaproponowano w automatycznych ekstraktorach, wprowadzonych przez firmę Buchi oraz firmę Foss. Ekstrakcja w automatycznych ekstraktorach składa się z dwóch etapów:

- ekstrakcji właściwej we wrzącym rozpuszczalniku,
- ekstrakcji dodatkowej (przemycania) kondensatem rozpuszczalnika.

Podwójną ekstrakcję umożliwia konstrukcja aparatu, w którym pojemnik z gilzą może się znajdować na dwu różnych poziomach: we wrzącym rozpuszczalniku i ponad jego powierzchnią. Aparat firmy Foss umożliwia również zagęszczanie i wstępne suszenie ekstraktu wraz z odzyskiem rozpuszczalnika. Budowę zasadę działania automatycznego ekstraktora Soxtec™ 2050, firmy Foss przedstawiono na rysunku 30. Ekstraktor Soxtec™ składa się z systemu ogrzewania elektrycznego (1), pojemnika na rozpuszczalnik (2), gilzy (3) na próbkę (4) oraz chłodnicy zwrotnej (5). Proces ekstrakcji w aparacie Soxtec™ 2050 składa się z czterech etapów. W pierwszym etapie gilza z próbką zanurzona jest we wrzącym rozpuszczalniku, gdzie temperatura i ruch wrzącej cieczy ułatwiają szybką ekstrakcję. Po głównym etapie ekstrakcji, gilza z próbką zostają podniesione i znajdują się nad powierzchnią ekstraktu (6). W tym etapie, który odbywa się jak w tradycyjnym aparacie Soxhletha, następuje dokończenie ekstrakcji i przepłukanie próbki i gilzy czystym rozpuszczalnikiem. Po zakończeniu ekstrakcji ekstrakt zostaje zagęszczony (7) a odparowany i skroplony w chłodnicy rozpuszczalnik, króćcem (8) zostaje zebrany do ponownego użycia. W ostatnim etapie ekstrakt jest wstępnie suszony (9) przez łagodne ogrzewanie nad powierzchnią płyty grzejnej. Zestaw do ekstrakcji Soxtec™ 2050 składa się z sześciu stanowisk, co oznacza możliwość ekstrakcji jednocześnie 6 próbek. Cały proces jest w pełni zautomatyzowany.



Rysunek 30. Zasada działania automatycznego ekstraktora Soxtec™ 2050 (za zgodą Dyrektora Działu Handlowego FOSS Polska)

W aparacie Soxtec można oznaczać zawartość różnych substancji rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych, w takich matrycach, jak: produkty żywnościowe, pasze, gleba, polimery, produkty włókiennicze, masa papiernicza i inne. System Soxtec jest oficjalnie zaaprobowany i stosowany m.in. w normie ISO1444:1996, dotyczącej oznaczania wolnego tłuszczu w mięsie i produktach mięsnych, oraz w normie EPA 3541, dotyczącej oznaczania polichlorowanych bifenyli w glebie i osadach.

Ekstrakcja w aparacie Soxhletha może być wspomagana ultradźwiękami, zestaw taki przedstawiono na rysunku 31, w kolejnym rozdziale.

Ekstrakcja w aparacie Soxhletha wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (ang. *microwave assisted soxhlet extraction*, MASE) prowadzona jest zawsze w systemie otwartym, czyli przy ciśnieniu atmosferycznym (patrz rozdz.: II.5.2.8. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana promieniowaniem mikrofalowym). Po włączeniu aparatu, gdy pary rozpuszczalnika po skropleniu w chłodnicy wypełnią pojemnik z próbką, włączane jest promieniowanie mikrofalowe. Mikrofałe są ogniskowane wyłącznie na pojemniku z próbką. Po określonym czasie, gdy promieniowanie zostanie wyłączone, otwiera się zawór na syfonie i ekstrakt spływa do kolby, po czym zaczyna się kolejny cykl. Aparaty do MASE są zautomatyzowane, czas procesu jest krótki a ekstrakcja zachodzi z dużą wydajnością.

5.2.7. Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami

Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (ang. *ultrasound-assisted extraction*, UAE) stosowana jest do próbek stałych lub semistałych. Próbkę miesza się z rozpuszczalnikiem ekstrahującym i poddaje działaniu ultradźwięków. Rozchodzenie się fal dźwiękowych w cieczy związane jest z cyklami zagęszczenia i rozrzedzenia, które w cieczy i gazie są zmianami ciśnienia (fala ciśnienia).

Zmienne ciśnienie akustyczne powoduje zjawiska wtórne, które przyspieszają proces ekstrakcji. Wśród zjawisk wtórnych, największe znaczenie w procesie przenoszenia mas ma kawitacja – proces dynamicznego tworzenia się, wzrostu i zaniku pęcherzy parowo gazowych w cieczy.

Tworzenie się pęcherzyków lub innych obszarów zamkniętych, tzw. kawern, zawierających parę danej cieczy, gaz lub mieszaninę parowo-gazową następuje w cyklu rozrzedzenia, czyli zmniejszenia ciśnienia. Działają wtedy duże siły rozciągające, powodujące lokalne rozerwania ciągłego ośrodka (cieczy). Nadmiar energii przenoszony przez falę akustyczną powoduje wzrost i w końcu implozję pęcherzyka, która jest źródłem lokalnych fal udarowych (szybka adiabatyczna kompresja gazu powoduje w pęcherzyku lokalny, gwałtowny wzrost temperatury do 5000°C i ciśnienia do 100 MPa). Proces tworzenia się i rozerwania pęcherzyka trwa 0,0004 s. Kiedy kawitacja zachodzi w cieczy pokrywającej powierzchnię ciała stałego, kawerny i pęcherzyki zapadają się niesymetrycznie, tworząc silny strumień cieczy w kierunku powierzchni (o szybkości do 400 km/h). Tak silny strumień powoduje poważne uszkodzenie w miejscu uderzenia i udostępnia do ekstrakcji nową powierzchnię próbki.

Kawitacja, tarcie na powierzchniach międzyfazowych i absorpcja energii fali akustycznej oraz związane z nimi wydzielanie ciepła sprawia, że wspomaganie ekstrakcji ultradźwiękami zwiększa rozpuszczalność, dyfuzję, penetrację rozpuszczalnika i transport analitu, a to zdecydowanie skraca czas ekstrakcji i zwiększa jej wydajność.

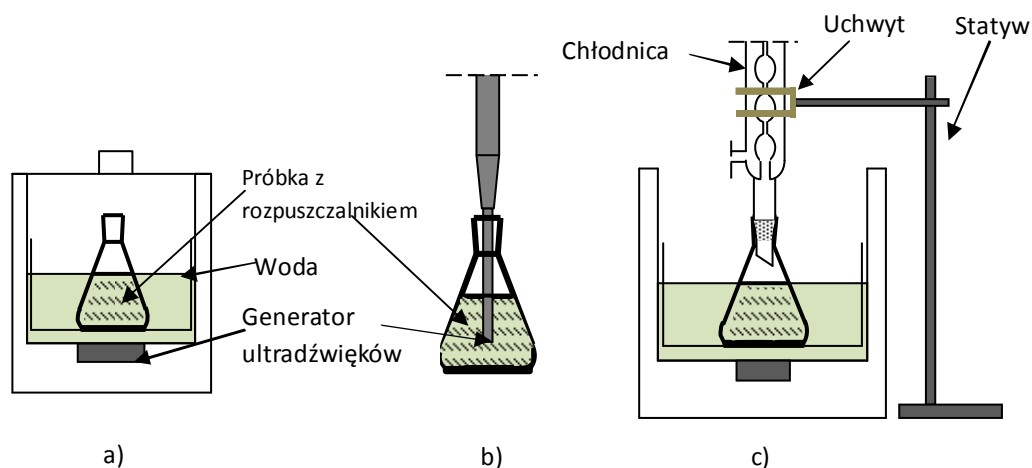
W ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami stosuje się drgania akustyczne o niedużej częstotliwości, rzędu 20÷50 kHz (rzadziej 500 kHz), ale o dużym natężeniu – 140÷160 dB (dla wywołania kawitacji).

Ekstrakcję można przeprowadzać dwoma sposobami, pierwszy to zastosowanie łaźni ultradźwiękowej (rysunek 31a i 31c). W tym celu próbkę umieszcza się w szklanym lub metalowym naczyniu i wstawia do łaźni. Zaletą tego sposobu jest możliwość jednoczesnej ekstrakcji wielu próbek. Drugim sposobem jest użycie sondy generującej ultradźwięki, zanurzonej bezpośrednio do próbki (rysunek 31b). Ten sposób stosuje się wtedy, gdy jest konieczność użycia dużej energii, np. do rozerwania tkanek czy komórek.

Ilość energii, jaką należy dostarczyć do próbki, zależy od wielu czynników: lepkości i temperatury próbki, obecności par i gazów w cieczy, stężenia i wielkości cząsteczek stałych oraz kształtu i geometrii komory z cieczą.

Dużą zaletą ekstrakcji ultradźwiękami jest możliwość przeprowadzania jej z dużą wydajnością w pokojowej temperaturze, co jest bardzo korzystne dla nietrwałych analitów.

Do ekstrakcji wspomaganiej ultradźwiękami stosowane są różne rozpuszczalniki, w zależności od właściwości chemicznych analitu i matrycy, łącznie z wodą oraz ich mieszaniny. Podczas ekstrakcji lotnymi rozpuszczalnikami, zwłaszcza w podwyższonej temperaturze, można zastosować zestaw z chłodnicą zwrotną, pokazany na rysunku 31c. Ekstrakcję w aparacie Soxhletha można wspomagać również ultradźwiękami, jak to pokazano na rysunku 32. Czas trwania ekstrakcji rozpuszczalnikiem, wspomaganym ultradźwiękami jest krótki w porównaniu z klasycznymi metodami i, w zależności od próbki, wynosi od 10 min do 1 h.



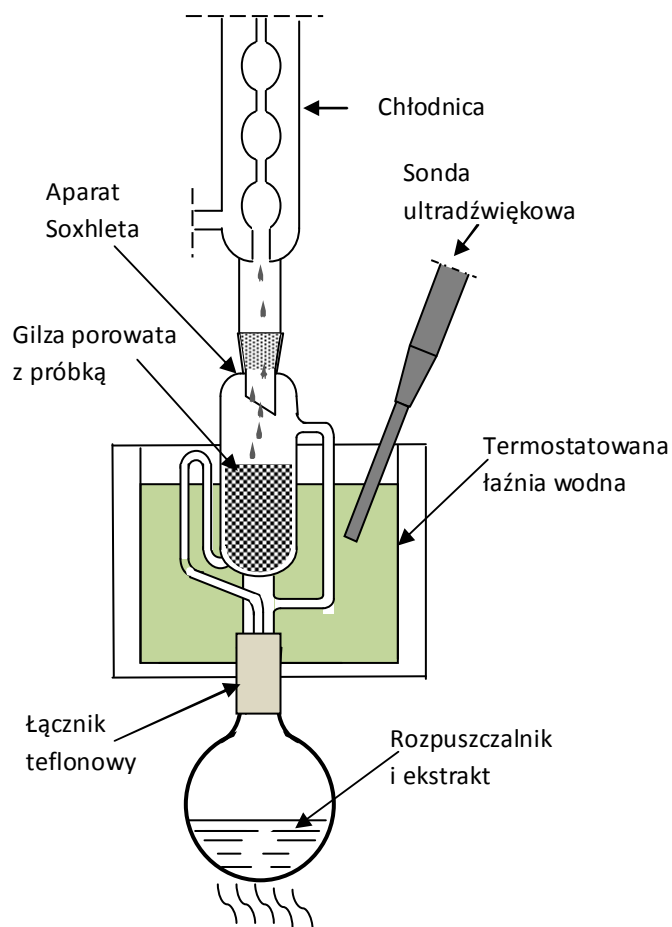
Rysunek 31. Ekstrakcja rozpuszczalnikiem wspomaganą ultradźwiękami, a,c – w łaźni ultradźwiękowej i b – z zastosowaniem sondy generującej ultradźwięki

Niedogodnością ekstrakcji rozpuszczalnikiem wspomaganą ultradźwiękami jest konieczność oddzielenia ekstraktu od pozostałości poekstrakcyjnej. Technika ta może również powodować częściową degradację analitu. W czasie kawitacji mogą tworzyć się wolne rodniki lub inne reaktywne składniki, prowadzące do przemian oznaczanych substancji.

Ekstrakcja rozpuszczalnikiem wspomaganą ultradźwiękami jest szeroko stosowana w przemyśle farmaceutycznym (np. ekstrakcja alkaloidów z roślin), perfumeryjnym i spożywczym (np. intensyfikacja wydobycia cukru z buraków albo tranu z wielorybów i ryb) i innych. Ekstrakcja ultradźwiękowa znajduje szerokie zastosowanie w analityce, głównie w biologii i biotechnologii, farmacji oraz ochronie środowiska (np. izolacja pozostałości pestycydów z warzyw i owoców).

5.2.8. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym

Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym (ang. *microwave-assisted extraction*, MAE) jest powszechnie stosowaną techniką do izolacji analitów z próbek stałych. W technice tej wykorzystuje się zjawisko bezpośredniej absorpcji promieniowania mikrofalowego przez cząsteczki substancji. Skuteczność wspomaganie ekstrakcji promieniowaniem mikrofalowym wynika ze sposobu przekazywania energii cieplnej. Tradycyjne ogrzewanie próbki czy rozpuszczalnika polega na przekazywaniu energii cieplnej ze źródła przez konwekcję lub przewodzenie, co długo trwa i wiąże się ze stratami energii. Mikrofałe natomiast dostarczają energię bezpośrednio cząsteczce związku chemicznego.



Rysunek 32. Ekstrakcja w aparacie Soxhleta wspomagana ultradźwiękami

Przekazywanie energii mikrofal może odbywać się na dwa sposoby. Pierwszy wynika z **polaryzacji dipolowej**. W polu elektrycznym, cząsteczki związków o momencie dipolowym różnym od zera, ulegają polaryzacji, czyli ustawiają się zgodnie z kierunkiem i zwrotem tego pola. W przypadku mikrofal o częstotliwości 2,45 GHz (taka częstotliwość stosowana jest w piecach mikrofalowych), pole elektryczne zmienia zwrot $4,9 \times 10^9$ razy na sekundę (co pół okresu fali promieniowania, $2 \times 2,45 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$). Zmiany pola wymuszają ruch drgający dipoli, które usiłują ustawić się zgodnie z jego kierunkiem. Intensywność oscylacji zależy m.in. od wielkości momentu dipolowego. Ruch cząsteczek o większym momencie dipolowym, np. acetonu (2,69 D), metanolu (2,87 D), acetonitrylu (3,44 D) jest intensywniejszy niż cząsteczek o mniejszym momencie dipolowym, np. heksanu (<0,1 D). Zmieniając swoje położenie, dipole uderzają w sąsiadujące z nimi cząsteczki, przekazując im swoją energię. W ten sposób ciepło rozchodzi się szybko i równomiernie w całej próbce. Cząsteczki, które mają moment dipolowy równy 0, np. izooktan, nie wykonują ruchów w polu elektrycznym.

Drugi sposób przekazywania energii mikrofal opiera się na **ruchliwości jonów** w roztworze w polu elektromagnetycznym (dodatnie przemieszczają się w jedną, ujemne w drugą stronę) i wynikającym z niego **przewodnictwie jonowym**. Ciepło próbki jest wynikiem tarcia między poruszającymi się jonami a roztworem.

Innym wskaźnikiem określającym zdolność materii do przekształcania energii mikrofal w energię cieplną jest **tg δ** , zwany **tangensem kąta strat**, **tangensem strat** lub **tangensem delta**. Termin

strata odnosi się do straty (oddania) energii fali w wyniku jej absorpcji, a wartości $\tan \delta$ dla poszczególnych rozpuszczalników można odnaleźć w tablicach fizycznych.

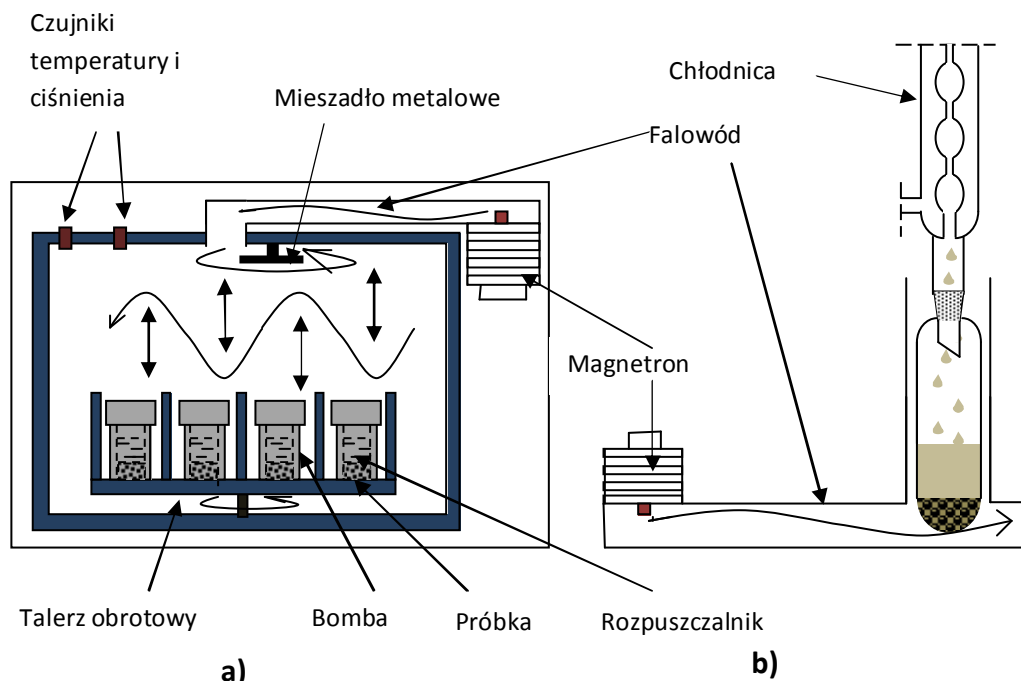
Wybór warunków ekstrakcji ze wspomaganie promieniowaniem mikrofalowym uzależniony jest od wyboru rozpuszczalnika, który przede wszystkim ma rozpuszczać substancję ekstrahowaną. Jeśli to możliwe, ekstrahent powinien mieć moment dipolowy różny od zera, czyli być rozpuszczalnikiem polarnym, np.: metanol, etanol, woda, aceton, octan etylu, dichlorometan, acetonitryl i inne.

Rozpuszczalniki, które mają dużą wartość tangensa δ , np. metanol ($\tan \delta = 0,64$), woda ($\tan \delta = 0,157$) lub mieszaniny niepolarnych z polarnymi będą absorbowały promieniowanie mikrofalowe i szybko się grzały. Takie rozpuszczalniki zostają podgrzane bardzo szybko do temperatury powyżej temperatury wrzenia - ten sposób ekstrakcji wymaga specjalnej aparatury, w tzw. układzie zamkniętym. Umożliwia on szybką ekstrakcję analitów z matrycy.

Jeśli substancja jest ekstrahowana rozpuszczalnikiem nieabsorbującym promieniowania mikrofalowego, nie ulega on podgrzaniu. W tym przypadku mikrofałe są absorbowane nie przez ekstrahent, a przez zdolne do absorpcji składniki próbki, które następnie oddają ciepło do rozpuszczalnika.

Składnikiem próbki, który ogrzewa całość jest bardzo często woda w niej zawarta oraz inne polarne substancje. W tym przypadku temperatura nie jest wysoka i ekstrakcja może być przeprowadzana w układzie otwartym, przy ciśnieniu atmosferycznym. Schemat urządzenia do ekstrakcji w układzie zamkniętym przedstawiony jest na rysunku 33a. Próbkę z rozpuszczalnikiem znajduje się w zamkniętym naczyniu, najczęściej teflonowym, zwanym bombą, ponieważ temperatura roztworu dochodzi zwykle do $150\div 190^{\circ}\text{C}$ lub wyżej i wzrasta ciśnienie. Obudowa bomby teflonowej musi być z materiału przepuszczającego (nieabsorbującego) promieniowanie mikrofalowe i musi posiadać wskaźnik ciśnienia i zawór bezpieczeństwa, który uruchamia się, gdy ciśnienie przekroczy wartość 10 MPa. Materiał obudowy pozwala wyjąć bombę z pieca mikrofalowego bezpośrednio po ekstrakcji, gdyż nie nagrzewa się. Źródłem promieniowania mikrofalowego jest magnetron, połączony z komorą pieca falowodem. Dla uśrednienia energii stosowane jest metalowe mieszadło i obrotowa podstawa, na której znajdują się próbki w bombach. Czujniki temperatury i ciśnienia połączone są z bombami. Komercyjnie dostępne są zestawy do MAE, o różnej pojemności naczynia ekstrakcyjnego, od 20 do 120 mL.

Schemat urządzenia do ekstrakcji wspomaganie promieniowaniem mikrofalowym przy ciśnieniu atmosferycznym przedstawiono na rysunku 33b. W tym urządzeniu energia mikrofałi jest kierowana tylko do jednego naczynia, wykonanego zwykle ze szkła lub kwarcu. W ekstrakcji wspomaganie mikrofalami używa się od 2 do 20 g próbki i do 30 mL rozpuszczalnika. Czas trwania ekstrakcji zwykle nie przekracza 30 min ($10\div 20$ min), czas chłodzenia trwa ok. 20 min.

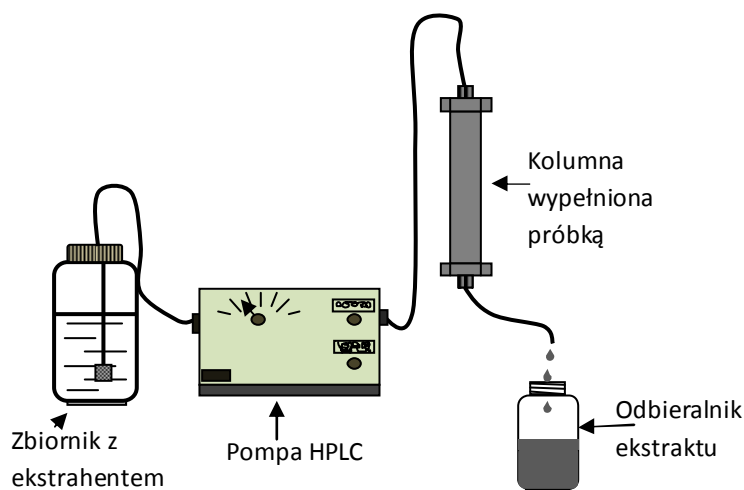


Rysunek 33. Zestawy do ekstrakcji wspomagananej promieniowaniem mikrofalowym, a – do ciśnieniowej ekstrakcji (w naczyniu zamkniętym), b - do ekstrakcji przy ciśnieniu atmosferycznym (w naczyniu otwartym)

W urządzeniach do celów badawczych wykorzystuje się mikrofałe o częstotliwości 2,45 GHz (piece mikrofalowe do zamkniętej ekstrakcji pod podwyższonym ciśnieniem, (rys. 34a) oraz o częstotliwości 0,9 GHz (w piecach do otwartej ekstrakcji pod ciśnieniem atmosferycznym, rys. 34b). Generator mikrofal – magnetron jako źródło ciepła zastosowano po raz pierwszy w 1946 r. W laboratorium, pierwszy raz wykorzystano piec mikrofalowy do mineralizacji kwasowej próbek w 1975 r., a do ekstrakcji związków organicznych – 1986 r. MAE jest obecnie szeroko stosowaną techniką ekstrakcji w oznaczaniu takich zanieczyszczeń środowiska, jak: wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, polichlorowane bifenyle, pestycydy, fenole, olej mineralny. Stosowana jest do oznaczeń w glebie, roślinach i innych próbkach stałych, jak polimery - do oznaczania oligomerów, tabletki – do oznaczania składu, zioła – do izolacji związków biologicznie aktywnych oraz wiele innych. EPA (Environmental Protection Agency) wprowadziła ekstrakcję wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym jako standardową metodę ekstrakcji semilotnych i nielotnych składników z próbek stałych.

5.2.9 Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika pod zwiększonym ciśnieniem

Zwiększone ciśnienie rozpuszczalnika ułatwia jego penetrację w głąb stałej matrycy, dzięki temu ekstrakcja jest wydajniejsza. Ekstrakcję za pomocą rozpuszczalnika pod zwiększonym ciśnieniem wykonuje się wykorzystując pompę chromatografu cieczowego. Rozdrobnioną próbkę umieszcza się w kolumnie a następnie za pomocą pompy chromatografu, przepuszcza się przez nią rozpuszczalnik pod zwiększonym ciśnieniem (rysunek 34).



Rysunek 34. Zestaw do ekstrakcji rozpuszczalnikiem pod zwiększonym ciśnieniem

Próbki przed ekstrakcją można mieszać (ucierając) z wypełniaczem, np. z adsorbentem polarnym, takim jak: żel krzemionkowy lub tlenek glinu. Adsorbent wiąże wodę zawartą w próbce, co ułatwia penetrację rozpuszczalnika organicznego oraz zmienia oddziaływania między matrycą próbki a analitami, ułatwiając ich desorpcję i rozpuszczanie w ekstrahencie. Ten sposób ekstrakcji stosuje się do izolacji z próbek gleby wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) lub polichlorowanych bifenyli (PCB).

5.2.10. Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika

W przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika (ang. *pressurized fluid extraction*, PFE lub *accelerated solvent extraction*, ASE lub *pressurized liquid extraction*, PLE) stosuje się konwencjonalne rozpuszczalniki, ekstrakcję przeprowadza w szczelnym, wytrzymałym naczyniu, zwanym celką ekstrakcyjną, a przyspieszenie ekstrakcji osiąga przez stosowanie wysokiej temperatury (100÷200°C), co w zamkniętym naczyniu powoduje wzrost ciśnienia nawet do 20 MPa.

Metoda przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika stosowana jest do izolacji ilości śladowych analitów z próbek stałych i semistałych. Jest metodą szybką i gwarantującą dużą wydajność, powszechnie zalecaną dla analitów lub/i matryc trwałych temperaturowo.

Podgrzewanie cieczy w zamkniętym naczyniu powoduje wzrost ciśnienia i wzrost temperatury wrzenia, dlatego ekstrakcja może być przeprowadzana cieczą, mimo że jej temperatura znacznie przewyższa temperaturę wrzenia w warunkach normalnych.

Podwyższona temperatura i ciśnienie wpływają na właściwości rozpuszczalnika, próbki oraz ich wzajemne oddziaływania.

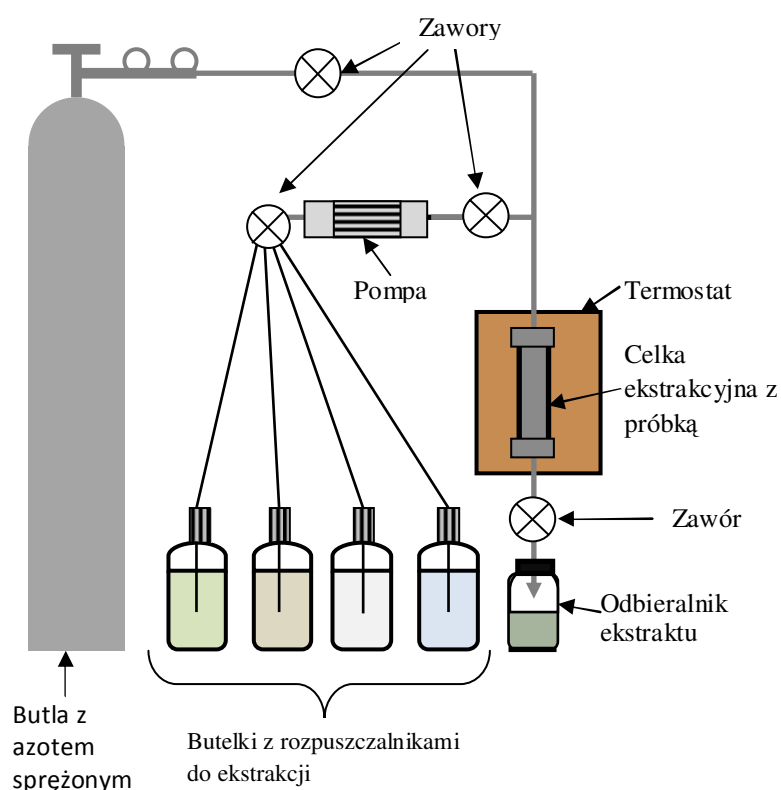
Głównym powodem dużej wydajności techniką ASE jest temperatura, która powoduje zwiększenie rozpuszczalności substancji oraz zwiększenie kinetyki przenoszenia masy – szybszej desorpcji analitu z fazy stałej i szybszej dyfuzji do rozpuszczalnika. Wysoka temperatura zmniejsza lepkość

rozpuszczalnika oraz napięcie powierzchniowe, co ułatwia penetrację rozpuszczalnika w głąb matrycy.

Drugim powodem większej wydajności w wysokiej temperaturze jest zakłócanie stanu równowagi na powierzchni styku rozpuszczalnik – matryca, przez osłabienie oddziaływań rozpuszczalnika z matryca typu sił Van der Waalsa, wiązań wodorowych czy przyciągania dipoli. Daje to lepszy kontakt rozpuszczalnika z próbką, co konsekwencji skraca czas ekstrakcji i ilość rozpuszczalnika.

W przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika ciśnienie nie odgrywa aż tak dużej roli jak temperatura, jednak umożliwia głębszą penetrację w matrycę i ekstrakcję analitów zatrzymanych w porach. Wymuszanie penetracji jest szczególnie korzystne przy wilgotnych próbkach i matrycach silnie adsorbujących anality.

Zestaw do przyspieszonej ekstrakcji próbek stałych za pomocą rozpuszczalników przedstawiono na rysunku 35.



Rysunek. 35. Schemat zestawu do przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalników z próbek stałych

Składa się on z termostатовanej komory (pieca), w której umieszcza się celkę z ekstrahowaną próbką, pompy dozującej rozpuszczalnik, odbieralnika ekstraktu i zbiornika obojętnego gazu sprężonego oraz szeregu zaworów, umożliwiających odpowiednie dozowanie. Celka wykonana jest najczęściej ze stali kwasoodpornej. Po umieszczeniu celki z próbką w termostacie, układ wypełnia się zimnym rozpuszczalnikiem i następnie włącza ogrzewanie komory termostatu. Ekstrakcję prowadzi się zwykle w zakresie temperatur 100÷200°C w czasie 5÷10 min. Ciśnienie w celce ekstrakcyjnej może wzrosnąć do ok. 20 MPa. Jeśli ekstrakcja jest jednostopniowa, analit wypłukuje się świeżą porcją rozpuszczalnika do naczynka na ekstrakt. Ruch rozpuszczalnika jest wymuszany ciśnieniem gazu z

butli (najczęściej azotu). Jeśli ekstrakcja ma być wielokrotna, ponownie napełnia się układ zimnym ekstrahentem, włącza ogrzewanie komory termostatu i powtarza cały cykl.

W technice ASE stosuje się kilku gramowe naważki próbek, maksymalnie od 10 do 30 g i małe ilości (kilka mL) rozpuszczalników, stosownie do ilości próbki. Przy oznaczaniu WWA w glebie możliwa była nawet miniaturyzacja ekstrakcji, w której użyto 50 mg próbki i 100 μ L estrahenta. Technika przyspieszonej ekstrakcji próbek stałych za pomocą rozpuszczalników może być w pełni zautomatyzowana i umożliwia wielokrotną ekstrakcję jednym lub różnymi rozpuszczalnikami. Czas ekstrakcji zależy od ilości cykli, jeden cykl trwa zwykle kilka minut.

W przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika wykorzystuje się takie same rozpuszczalniki jak w klasycznych metodach. Najczęściej są to aceton, octan etylu, dichlorometan, heksan, toluen, woda. Często stosuje się mieszaninę rozpuszczalników lub dodatek kwasów: octowego, fosforowego i trifluorooctowego.

Na szczególną uwagę zasługuje przyspieszona ekstrakcja za pomocą wody. Technikę tę nazywa się SHWE (ang. *subcritical hot-water extraction*) lub PHWE (ang. *plessurized hot water extraction*).

Woda, poniżej punktu krytycznego, który osiąga w temperaturze 374°C i ciśnieniu 22 MPa, zmienia swoje właściwości.

W warunkach normalnych, 20°C i ciśnieniu atmosferycznym, wartość stałej dielektrycznej wody wynosi $\epsilon = 78,3$, natomiast w temperaturze 250°C i ciśnieniu 5 MPa, wartość ϵ spada do ok. 27, co zbliża właściwości wody w tych warunkach do właściwości etanolu w warunkach normalnych ($\epsilon_{\text{etanol}} = 24,3$). W konsekwencji zwiększa się rozpuszczalność w wodzie wielu związków średnipołarnych. Poza tym wzrost temperatury i ciśnienia zmniejsza napięcie powierzchniowe wody oraz lepkość, co zwiększa wydajność ekstrakcji.

W przyspieszonej ekstrakcji wodą stosuje się temperatury od 100 do 374°C i ciśnieniu pozwalającym utrzymać stan ciekły wody. Jeśli woda przejdzie w stan pary stanie się bardzo korozyjnym i agresywnym dla analitów medium, o czym należy pamiętać przy doborze warunków ekstrakcji.

Woda nie jest rozpuszczalnikiem, który można stosować bezpośrednio w chromatografii gazowej. Konieczna staje się więc ekstrakcja z wody do rozpuszczalnika organicznego (LLE, SDME) lub do fazy stałej (SPME, SBSE). Ekstrakcja z wody jest bardzo wydajna, bo przy obniżaniu temperatury ekstraktu wodnego do pokojowej, rozpuszczalność analitów gwałtownie spada.

Najczęściej wymieniane zalety techniki przyspieszonej ekstrakcji próbek stałych za pomocą rozpuszczalników to:

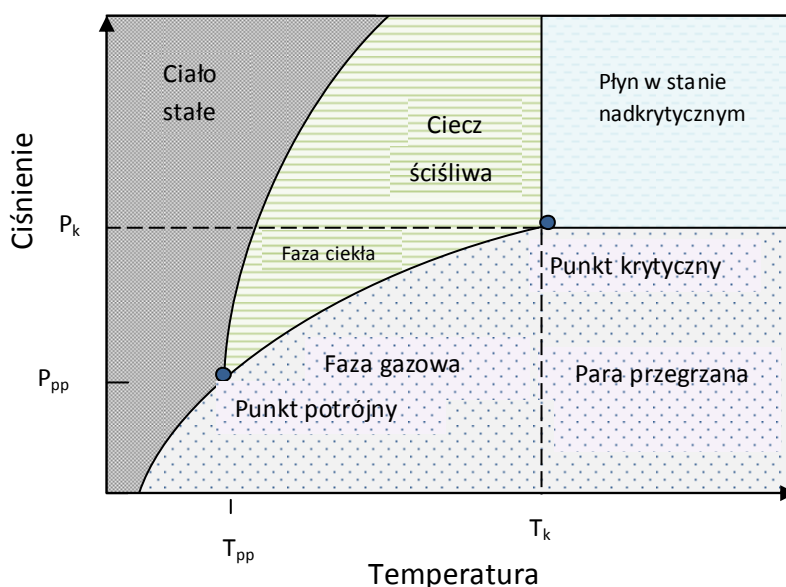
- nie wymaga suszenia próbek (ciśnienie i temperatura zapewniają wystarczającą penetrację matrycy przez rozpuszczalniki o różnej polarności),
- korzystna kinetyka ekstrakcji - desorpcja z matrycy, rozpuszczanie w ekstrahencie i transport analitów zachodzą szybko),
- krótkie czasy ekstrakcji, wynikające z kinetyki,
- możliwość zbudowania zestawu do ASE,
- łatwość automatyzacji procesu,
- łatwość obsługi aparatu.

Technikę przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika początkowo zastosowano do ekstrakcji organicznych, śladowych zanieczyszczeń gleby i osadów ściekowych. Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (*ang.* Environmental Protection Agency, EPA) wprowadziła ASE jako metodę standardową izolacji organicznych analitów ze środowiskowych próbek stałych, zwłaszcza do ekstrakcji WWA, oleju mineralnego oraz **trwałych zanieczyszczeń środowiska**, tzw. **POP** (*ang.* *persistent organic pollutants*) z gleby, osadów oraz pyłów. Do POP zalicza się takie zanieczyszczenia, jak: chloroorganiczne i fosforoorganiczne pestycydy, polichlorowane bifenylole i dioksyny. Obecnie technika ASE jest stosowana do oznaczania pestycydów w roślinach, produktach żywnościowych i w tkankach zwierzęcych, do oznaczania aflatoksyn, furanów, związków cyjanoorganicznych. Stosowana jest również do izolowania plastyfikatorów z polimerów, dodatków i aktywnych składników farmaceutyków jak i izolacji tłuszczów z próbek żywności.

5.2.11. Ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym

Cieczą a raczej płynem w stanie nadkrytycznym jest medium znajdujące się w warunkach powyżej warunków punktu krytycznego, tzn. ma temperaturę wyższą od temperatury krytycznej i jest pod ciśnieniem wyższym od ciśnienia krytycznego. Definicję tę obrazuje diagram przemian fazowych przedstawiony na rysunku 36.

Wykres przemian fazowych przy zmianie temperatury i ciśnienia charakteryzują dwa punkty, które określają, w jakich warunkach trwałe są różne stany skupienia substancji. Są to punkt potrójny i punkt krytyczny. Punktem potrójnym jest stan, w którym współistnieją w stanie równowagi termodynamicznej trzy stany skupienia danej substancji.



Rysunek 37. Schemat typowego diagramu przemian fazowych w układzie ciśnienia i temperatury dla czystej substancji

Przy wartościach ciśnienia i temperatury poniżej wartości punktu potrójnego mogą istnieć tylko dwie fazy; stała i gazowa, oddziela je krzywa sublimacji. Powyżej wartości punktu potrójnego, w zależności

od zmian wartości ciśnienia i temperatury, aż do wartości punktu krytycznego, mogą istnieć trzy stany skupienia substancji – gazowa, ciekła i stała. Fazę stałą od ciekłej oddziela krzywa topnienia, fazę ciekłą od gazowej – krzywa parowania (wrzenia). Powyżej wartości określanych przez punkt krytyczny, substancja znajduje się w stanie nadkrytycznym, w którym zanika różnica między gazem a cieczą i zmiany ciśnienia i temperatury powyżej tego punktu nie zmieniają jej stanu skupienia.

Punkt potrójny i punkt krytyczny są wielkościami charakterystycznymi dla danej substancji.

Substancja w stanie nadkrytycznym ma właściwości pośrednie między gazem a cieczą. Płyn w stanie nadkrytycznym ma gęstość zbliżoną do gęstości cieczy ($0,2 \div 0,9$ g/mL), lepkość zbliżoną do lepkości gazu (10^{-4} g/s cm) a współczynnik dyfuzji mniejszy niż dla gazu ale wyższy niż dla cieczy (10^{-4} cm²/s).

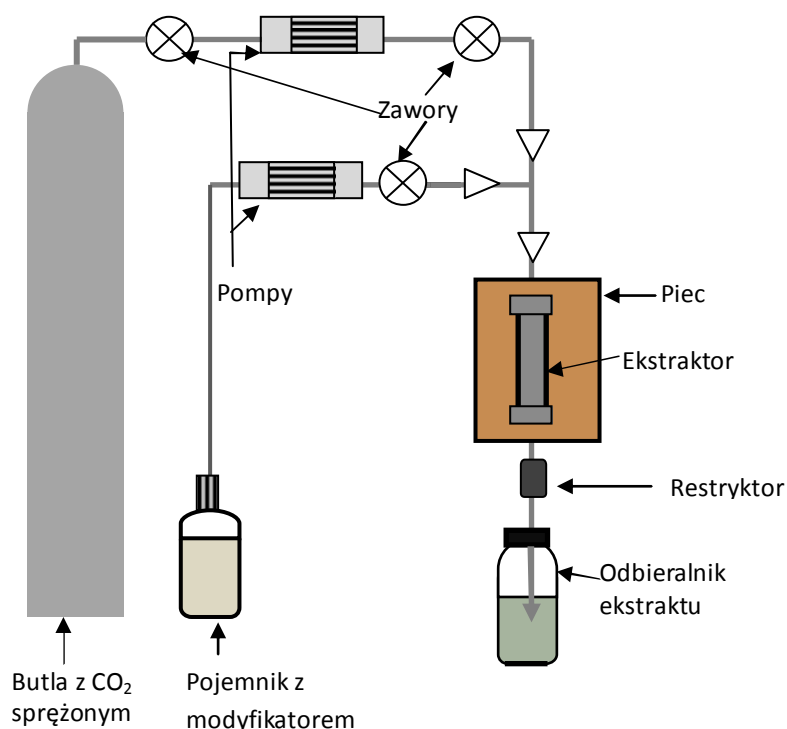
Gęstość płynu w stanie nadkrytycznym sprawia, że substancje rozpuszczają się w nim jak w cieczy, mała lepkość płynu i niskie napięcie powierzchniowe sprzyjają penetracji matrycy, podobnej do penetracji gazu, współczynnik dyfuzji powoduje, że przenoszenie masy jest szybsze niż w cieczy.

Wymienione cechy są bardzo korzystne dla procesu ekstrakcji. Rozpuszczalność w płynie nadkrytycznym zależy przede wszystkim od temperatury i gęstości, a w mniejszym stopniu od ciśnienia. Wiele substancji w stanie nadkrytycznym posiada dobre właściwości rozpuszczania, jednak w ekstrakcji znalazło zastosowanie tylko kilka. Ograniczeniem są wysokie wartości ciśnienia i temperatury stanu krytycznego.

Najpowszechniej stosowany jest ditlenek węgla (CO₂), przede wszystkim dlatego, że ma niską temperaturę krytyczną (31,1°C), niskie ciśnienie krytyczne (7,38 MPa), jest nietoksyczny i niepalny oraz łatwy do otrzymania o wysokiej czystości. Ditlenek węgla jest niepolarny, więc można nim ekstrahować tylko niepolarne i średniopolarne związki. Ekstrakcja polarnych i silnie związanych z matrycą związków za pomocą samego CO₂ w stanie nadkrytycznym jest niewydajna, ale można zastosować dodatek małych ilości (1÷10%) substancji polarnych, zw. modyfikatorami. Najczęściej stosowanymi modyfikatorami są metanol, etanol, alkohol izopropylowy, aceton, acetonitryl, dichlorometan, toluen, kwas mrówkowy i ditlenek siarki.

Ekstrakcję płynem w stanie nadkrytycznym (ang. *supercritical fluid extraction*, SFE) można przeprowadzać statycznie i dynamicznie. Próbki o zwartej strukturze matrycy, zawierające trudno rozpuszczalne anality muszą mieć zapewniony długi czas kontaktu z ekstrahentem, dlatego ich ekstrakcję przeprowadza się sposobem statycznym. Próbkę umieszcza się w płynie w stanie nadkrytycznym i po określonym czasie ekstrakcji, usuwa płyn z analitami do odbieralnika. Sposób dynamiczny stosuje się do próbek łatwo penetrowanych przez płyn i zawierających anality dobrze w nim rozpuszczalne. Płyn w stanie nadkrytycznym przepuszcza się w sposób ciągły przez próbkę a ekstrakt zbierany jest w odbieralniku. Sposób dynamiczny ekstrakcji może być prowadzony również z wielokrotnym zawracaniem ekstrahenta do próbki (recykulacja), zanim zostanie zebrany w odbieralniku. W odbieralniku następuje odzyskiwanie analitów z roztworu. Schemat zestawu do ekstrakcji płynem w stanie nadkrytycznym przedstawiono na rysunku 37. Zestaw składa się z pieca o regulowanej temperaturze, w którym znajduje się ekstraktor, restryktora i odbieralnika ekstraktu. Do ekstraktora doprowadzany jest, ze stalowej butli, sprężony CO₂ oraz - jeśli to konieczne – modyfikator.

Sprężony CO₂ i modyfikator, po osiągnięciu w piecu właściwej temperatury stanu nadkrytycznego, stanowią ekstrahent, który jest wprowadzany do próbki w sposób statyczny lub dynamiczny. Po zakończeniu procesu ekstrakt wprowadzany jest do odbieralnika poprzez restryktor (przewężenie), którego zadaniem jest obniżenie ciśnienia wychodzącego płynu. Stosowane są dwie grupy restryktorów, stałe i zmienne.



Rysunek 37. Schemat zestawu do ekstrakcji płynem (CO₂) w stanie nadkrytycznym

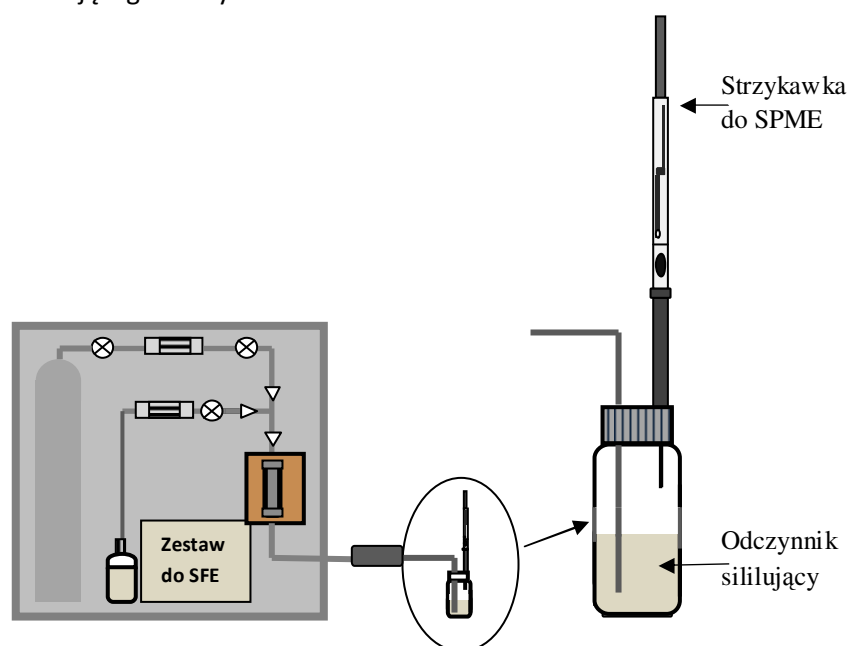
Restryktor stały to rurka o stałej średnicy wykonana z metalu lub topionej krzemionki lub kwarcu. Restryktor zmienny ma kryzę lub otwór wylotowy sterowany elektronicznie. Restryktory stałe często zatykają się z powodu zamarzania wody, przy szybkim rozprężaniu płynu oraz z powodu obecności siarki elementarnej lub dużych ilości węglowodorów czy tłuszczów w ekstrakcie.

Są za to bardzo tanie i łatwe do zamontowania, w porównaniu do bardzo drogich restryktorów zmiennych (elektronicznych). Po obniżeniu ciśnienia, ekstrakt jest kierowany do odbieralnika. Stosowane są dwa sposoby odzyskiwania analitów z ekstraktu: absorpcja w rozpuszczalniku i adsorpcja na sorbencie stałym. Absorpcja w rozpuszczalniku jest prosta i łatwa w optymalizacji warunków, ale wiąże się ze stratami analitu w postaci aerozolu lub/i stratą rozpuszczalnika. Warunki adsorpcji na sorbencie stałym są trudniejsze do ustalenia, ale odzysk jest bez strat i istnieje możliwość selektywnego wymywania substancji z adsorbentu.

Dobór warunków SFE powinien uwzględniać parametry procesu (ciśnienie, temperaturę, szybkość przepływu w procesie dynamicznym, czas ekstrakcji, wielkość próbki i pojemność ekstraktora) oraz właściwości chemiczne i fizyczne matrycy (np. postać fizyczna, jednorodność, rozpuszczalność, zdolność do adsorpcji i desorpcji analitów i in.).

Zmieniając parametry procesu, zmienia się właściwości płynu w stanie nadkrytycznym. Gęstość płynu ulega zmianie ze zmianą ciśnienia oraz temperatury. Płyn o mniejszej gęstości ma właściwości rozpuszczalników niepolarnych, natomiast o dużej gęstości – właściwości bardziej polarnych rozpuszczalników, jak dichlorometanu. Duże znaczenie w zwiększaniu rozpuszczalności analitów ma dodatek do CO₂ modyfikatora. Czas ekstrakcji i szybkość przepływu płynu w procesie dynamicznym należy dopasować do właściwości matrycy, aby zapewnić wystarczający czas kontaktu CO₂ z analitem. Można zmodyfikować również próbkę przez wymieszanie jej z sorbentem stałym o odpowiednich właściwościach, aby nie dopuścić do ekstrakcji związków przeszkadzających. Dodatek do próbki polarnego żelu krzemionkowego powoduje zatrzymanie w matrycy wielu balastowych, polarnych i średnio polarnych substancji. SFE trwa zwykle od 10 do 60 min, w analityce próbki mają zwykle masę mniejszą niż 10 g a minimalna ilość płynu wynosi ok. 10 mL. W metodzie dynamicznej szybkość przepływu płynu wynosi od 1 do 4 mL/min.

Płyn w stanie nadkrytycznym do ekstrakcji zastosowano po raz pierwszy w 1978 r. Technikę tę wprowadził koncern Kraft General Foods, obecny Maxwell House Coffee Division do produkcji kawy bezkofeinowej. Obecnie jest szeroko stosowaną techniką ekstrakcji zanieczyszczeń środowiska, jak WWA i innych węglowodorów, PCB, fenoli, pestycydów, herbicydów z próbek stałych. SFE stosuje się również do oznaczania zanieczyszczeń wody, po izolacji z wody do sorbentu stałego (zanieczyszczenia na sorbencie stałym są stałą próbką). Ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym znalazła również zastosowanie w izolacji zanieczyszczeń z żywności i paszy, do izolacji aktywnych biologicznie składników ziół, przy oznaczaniu aktywnych składników farmaceutyków i kosmetyków. SFE jest również łączona z innymi technikami ekstrakcyjnymi, np. przy oznaczaniu parabenowych (estry kwasu p-hydroksybenzoesowego) środków konserwujących i polifenolowych przeciwutleniaczy w kosmetykach zastosowano ekstrakcję SFE w połączeniu z bezpośrednią derywatyzacją analitów i ekstrakcją metodą HS-SPME. Parabeny i polifenole są nietlotne, aby je oznaczać metodą chromatografii gazowej, należy je przeprowadzić w pochodne, np. w etery silylowe. Schemat takiej procedury przedstawiono na rysunku 38. Ekstrakt uzyskany techniką SFE jest wprowadzany do odbieralnika, zawierającego odczynnik do silylowania.



Rysunek 38. Schemat zestawu do izolacji parabenów i polifenoli z kosmetyków połączonymi metodami SFE i HS-SPME

Parabeny i polifenole zawierają grupy hydroksylowe, które reagują z odczynnikami. W wyniku reakcji powstają etery silylowe, sorbujące się na włóknie SPME. Włókno z analitami jest następnie wprowadzane do dozownika chromatografu gazowego i analizowane połączonymi technikami chromatografii gazowej i spektrometrii mas (GC/MS). Ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym ma wiele zalet:

- możliwość stosowania do termolabilnych związków,
- niezbyt wysokie ciśnienie krytyczne, umożliwiające łatwe konstrukcyjne systemy regulacji ciśnienia a tym samym gęstości płynu, co daje dużą selektywność procesu,
- łatwość usuwania ekstrahenta (nie zostawia śladów),
- dostępność i niski koszt CO₂,
- możliwość bezpośredniego analizowania ekstraktu metodą chromatografii gazowej;
- możliwość połączenia z innymi technikami (chromatograficznymi i elektromigracyjnymi).

Najczęściej SFE jest stosowana w oznaczeniach zanieczyszczeń środowiska (ponad 40% wszystkich zastosowań), w przemyśle (ok. 20%) oraz w analizie żywności (ok. 14%).

5.2.12. Ekstrakcja poprzez mineralizację

Oznaczanie całkowitej zawartości pierwiastków w próbkach stałych wymaga uprzedniej ich mineralizacji.

Mineralizacja jest zespołem procesów w wyniku, których związki organiczne przekształcane są w proste związki mineralne takie, jak: CO₂, H₂O, NH₃ i inne. W środowisku naturalnym procesy mineralizacji zachodzą z udziałem najczęściej organizmów żywych. W przypadku mineralizacji z dostępem tlenu mówimy o butwieniu, w warunkach beztlenowych zaś o gniciu.

W chemii analitycznej, mineralizacja próbki stałej prowadzi do otrzymania związków mineralnych, które łatwo przeprowadzić ilościowo do roztworu. Podczas mineralizacji ogólna struktura poszczególnych części próbki, w tym minerałów ulega destrukcji, odwrotnie niż w analizie specjacyjnej. Wybór sposobu mineralizacji zależy od rodzaju analizowanej próbki i od oznaczanego pierwiastka. Do najważniejszych sposobów mineralizacji zaliczamy mineralizację na mokro oraz mineralizację na sucho, a każdą z nich można przeprowadzić metodą redukcyjną lub utleniającą. Najczęściej stosowaną metodą pozyskiwania analitów w postaci dogodnej do oznaczenia jest **mineralizacja utleniająca na mokro**. W tej technice używa się mieszaniny jednego lub kilku kwasów mineralnych (najczęściej: HNO₃, H₂SO₄, HClO₄) oraz związku o właściwościach utleniających (np. H₂O₂). Przykładem mineralizacji utleniającej mokrej jest metoda Kjeldahla, wykorzystywana głównie do oznaczania azotu organicznego. Mineralizację w kwasie azotowym z dodatkiem kwasu nadchlorowego lub wody utlenionej stosuje się do pozyskiwania metali, boru, fosforu, siarki i chlorowców z próbek organicznych.

Mineralizacja jest procesem długotrwałym, dlatego wspomagana jest:

- stosowaniem podwyższonej temperatury,
- wykorzystaniem promieniowania UV, jako katalizatora reakcji utleniania,

- wykorzystaniem łaźni ultradźwiękowej, wykorzystanie zjawiska kawitacji,
- użyciem energii mikrofalowej, jako nośnika energii bezpośrednio do cząsteczki związku mineralizowanego,
- użyciem podwyższonego ciśnienia.

Wśród metod mineralizacji na sucho stosuje się stapianie z solami mineralnymi o właściwościach utleniających, jak NaNO_3 , KNO_3 , Na_2CO_3 . Proces ten ułatwia rozpuszczanie w kwasach lub wodzie oznaczanych analitów.

6. Literatura

1. Kocjan, R. (red.) *Chemia analityczna. Podręcznik dla studentów*; Wydawnictwo Lekarskie PZWL: Warszawa, 2000; Tom 2.
2. Kośmider, J.; Mazur-Chrzanowska, B.; Wyszyński, B. *Odory*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 2002.
3. Mitra, S. (red.) *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons Inc.: New York, 2003.
4. Molenda, J.; Steczko, K. *Ochrona środowiska w gazownictwie i wykorzystaniu gazu*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne: Warszawa, 2000.
5. Namieśnik, J. (red.) *Metody instrumentalne w kontroli zanieczyszczeń środowiska*; Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej: Gdańsk, 1992.
6. Namieśnik, J.; Jamróiewicz, Z.; Pilarczyk, M.; Torres, L. *Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 2000.
7. Namieśnik, J.; Jamróiewicz, Z. (red.) *Fizykochemiczne metody kontroli zanieczyszczeń środowiska*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne: Warszawa, 1998.
8. Paderewski, M. L. *Procesy adsorpcyjne w inżynierii chemicznej*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne: Warszawa, 1999.
9. Abdel-Rehim, M. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 2569-2580.
10. Babic, S.; Petrovic, M.; Kastelan-Macan, M. *J. Chromatogr. A* **1998**, 823, 3-9.
11. Beyer, A.; Biziuk, M. *Ecol. Chem. Eng. S* **2007**, 14, 291-313.
12. Cheng, D. H.; Chen, X. W.; Shu, Y.; Wang, J. H. *Talanta* **2008**, 75, 1270-1278.
13. Ciemniak, A. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* **2007**, 3, 54-61.
14. Clement, M.; Arzel, S.; Le Bot, B.; Seux, R.; Millet, M. *Chemosphere* **2000**, 40, 49-56.
15. Curyło, J.; Wardencki, W.; Namieśnik, J. *Pol. J. Environ. Stud.* **2007**, 16, 5-16.
16. Dąbrowska, H.; Dąbrowski, Ł.; Biziuk, M.; Gaca, J.; Namieśnik, J. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1003, 29-42.
17. Deng, C.; Yao, N.; Wang, B.; Zhang, X. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1103, 15-21.
18. Dziadek, K.; Waclawek, W. *Chemia, Dydaktyka, Ekologia i Metrologia* **2005**, 10, 33-37.
19. Eskilsson, C. S.; Bjorklund, E. *J. Chromatogr. A* **2000**, 902, 227-250.
20. Fernandes, J. O.; Soares, C. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1175, 1-6, 2007
21. Ge, L.; Wang, X. T.; Tan, S. N.; Tsai, H. H.; Yong, J. W. H.; Hu, L. *Talanta* **2010**, 81, 1861-1864.
22. González, E. J.; González, B.; Calvar, N.; Domínguez, A. *Fluid Phase Equilibria* **2010**, 295, 249-254.
23. Guan, W.; Wang, Y.; Xu, F.; Guan, Y. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1177, 28-35.
24. Guiochon, G. A.; Beaver, L. A. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 523, 1-14.
25. Hennion, M.-C. *J. Chromatogr. A* **1999**, 856, 3-54.
26. Hu, Y.; Zheng, Y.; Zhu, F.; Li, G. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1148, 16-22.
27. Huie, C. W. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 373, 23-30.
28. Jeannot, M. A.; Cantwell, F. F. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 235-239.
29. Jonsson, S.; Hagberg, J.; Bavel B. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 4962-4967.
30. Karasova, G.; Brandsteterova, A.; Lachova, M. *Czech J. Food Sci.* **2003**, 21, 219-234.
31. Kawaguchi, M.; Takahashi, S.; Seshimo, F.; Sakui, N.; Okanouchi, N.; Ito, R.; Inoue, K.; Yoshimura, Y.; Izumi, S.; Makino, T.; Nakazawa, H. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1046, 83-88.
32. Klein, D. R.; Flannelly, D.F.; Schultz, M. M. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 1742-1747.
33. Kloskowski, A.; Pilarczyk, M.; Namieśnik, J. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 7363-7367.

34. Koning, S.; Janssen, H. G.; Brinkman, U. A. Th. *Chromatographia* **2009**, 69, Supplement 1, 33-78.
35. Kosikowska, M.; Biziuk, M. *Ecol. Chem. Eng. S* **2009**, 16, 207-220.
36. Kot, A.; Namieśnik, J. *Trends Anal. Chem.* **2000**, 19, 69-79.
37. Kotowski, W. *Ecol. Chem. Eng. S* **2008**, 15, 43-60.
38. Liang, P.; Liu, R.; Cao J. *Microchim. Acta* **2008**, 160, 135-139.
39. Liu, H.; Dasputa P. K. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1817.
40. Lopez, P.; Sanchez, C.; Batlle, R.; Nerian, C. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 4348-4356.
41. Luque de Castro, M. D.; Priego-Capote, F. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 2383-2389.
42. Maltez, H. F.; Borges, D. L. G.; Carasek, E.; Welz, B.; Curtius, A. J. *Talanta* **2008**, 74, 800-805.
43. Nováková, L.; Vlčková, H. *Anal. Chim. Acta* **2009**, 656, 8-35.
44. Onuska, F. I.; Terry, K.A. *Chromatographia* **1993**, 36, 191-194.
45. Poole, C. F.; Poole, S. K. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 2268-2286.
46. Prieto, A.; Basauri, O.; Rodin, R.; Usobiaga, A.; Fernández, L. A.; Etxebarria, N.; Zuloaga, O. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 2642-2666.
47. Przyjazny, A.; Kokosa, J. M. *J. Chromatogr. A* **2002**, 977, 143-153.
48. Raynie, D. E. *Anal. Chem.* 2006, 78, 3997-4003.
49. See, H. H.; Sanagi, M. M.; Ibrahim, W.; Naim, A. A. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 1767-1772.
50. Shariati-Feizabadi, S.; Yamini, Y.; Bahramifar, N. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 489, 21-31.
51. Smith, R. M. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1000, 3-27.
52. Souza Pinheiro, A.; Andrade, J. B. *Talanta* **2009**, 79, 1354-1359.
53. Wardencki, W.; Curyło, J.; Namieśnik, J. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2007**, 70, 275-288.
54. Waterman, D.; Horsfield, B.; Leistner, F.; Hall, K.; Smith, S. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3563-3567.
55. Wei, G-T.; Yang, Z.; Chen, C-J. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 488, 183-192.
56. Xu, H.; Pan, W.; Song, D.; Yang, G. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 9351-9356.
57. Yang, T-J.; Tsai, F-J.; Chen, C-Y.; Yang, T. C-C.; Lee, M-R. *Anal. Chim. Acta* **2010**, 668, 188-194.
58. Zougagh, M.; Valcarcel, M.; Rios, A. *Trends Anal. Chem.* **2004**, 23, 399 - 405.
59. US EPA Method 3546.
60. US EPA Method 3545A.
61. Dmochowski, D.; Prędecka, A.; Dmochowska, A. *Zeszyty Naukowe SGSP* **2008**, 37, 49-61,
http://www.zn.sgsp.edu.pl/37/zn_nr_37.pdf
62. Luliński, P.; Cieślak, A.; Maciejewska, D. *Biul. Wydz. Farm. WUM* **2008**, 1, 1-11,
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>
63. Namieśnik, J. *Materiały z Konferencji Zielona Chemia Analityczna*, Ślesin, 11-13.05.2009,
http://www.sge.com.pl/sympozja/pdfy/slesin2009_namiesnik.pdf
64. Świetlik, R; Trojanowska, M. *Monitoring Środowiska Przyrodniczego* **2008**, 9, 29-36,
<http://www.ujk.edu.pl/ios/wydawnictwa/z9/Ryszard%20Swietlik.pdf>

III. Techniki chromatograficzne

1. Wprowadzenie do chromatografii

1.1. Wstęp

Chromatografia jest jedną z głównych technik separacyjnych stosowanych przede wszystkim w analizie związków chemicznych. Umożliwia ona wykrywanie badanej substancji i oznaczanie jej ilości w próbkach o złożonym składzie. Próbki mogą być gazowe, ciekłe lub stałe, zaś sam proces chromatograficzny może być prowadzony albo przy użyciu kosztownej aparatury, albo powszechnie dostępnego sprzętu laboratoryjnego.

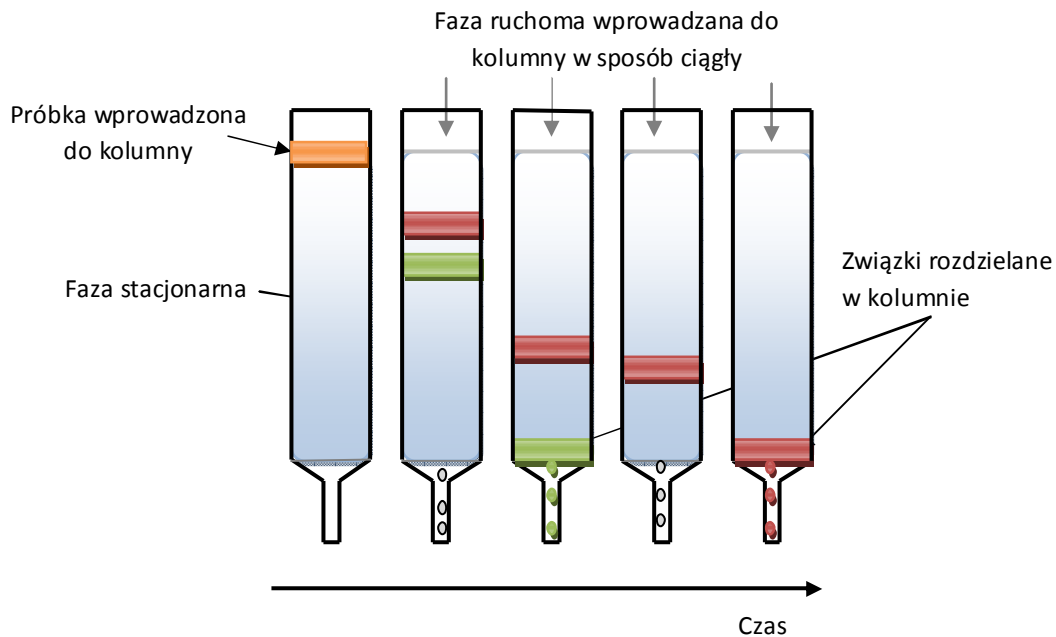
Chromatografia jest zarówno metodą analityczną jak i metodą preparatywną służącą do izolacji czystych substancji. Jest obecnie najbardziej rozpowszechnioną i jednocześnie wszechstronną techniką separacyjną, dostępną nie tylko w nowoczesnych laboratoriach. Stosuje się ją powszechnie w przemyśle chemicznym, farmaceutycznym, kosmetycznym, spożywczym a także w służbie zdrowia, ochronie środowiska, rolnictwie i innych gałęziach przemysłu i gospodarki.

Chromatografia narodziła się na początku XX wieku w wyniku prac rosyjskiego botanika, Michaiła Semenowicza Cwieta (1872-1919), którego współcześnie uważa się za jej twórcę. Cwiet, pracując *nota bene* na Uniwersytecie Warszawskim i zajmując się badaniem barwników roślinnych podjął próbę rozdzielania ich na kolumnie wypełnionej adsorbentem. Kolorowe pasma barwników, uzyskane na kolumnie w czasie rozdzielania dały początek nazwie chromatografia (z greckiego: *chromatos* = barwa oraz *grapho* = pisze), stąd aparat do rozdzielania na kolumnie został nazwany chromatografem. Prace Cwieta zostały docenione dopiero w połowie XX wieku wraz z rozwojem badań nad fizykochemią powierzchni i zjawisk międzyfazowego podziału, które zapoczątkowały intensywny rozwój chromatografii. Obecnie chromatografia jest stosowana do separacji wszystkich (nie tylko barwnych) rodzajów związków chemicznych.

Chromatografia jest oparta na systemie dwóch niemieszających się faz: fazy stacjonarnej (nieruchomej) oraz fazy ruchomej, która porusza się wzdłuż fazy stacjonarnej. próbka jest wprowadzana do kolumny w postaci wąskiego pasma, co znaczy, że ma niewielką objętość (rysunek 1). Składniki próbki są separowane dzięki temu, iż w różny sposób dzielą się pomiędzy obie fazy i tym samym przemieszczane są przez fazę ruchomą z różną prędkością. Kinetyczny ruch cząsteczek powoduje ciągłą wymianę składników próbki pomiędzy obydwoma fazami. Jednocześnie faza ruchoma porusza się wzdłuż fazy stacjonarnej i cząsteczki, które są w danym momencie rozpuszczone w fazie ruchomej poruszają się wraz z nią. Natomiast te cząsteczki, które są w danym momencie zatrzymane przez fazę stacjonarną, nie przemieszczają się wzdłuż kolumny. Składniki próbki, które wykazują większe powinowactwo do fazy ruchomej poruszają się znacznie szybciej niż składniki, które wykazują większe powinowactwo do fazy stacjonarnej, i tym samym te pierwsze wcześniej opuszczają układ chromatograficzny. Tak więc separacja składników próbki jest spowodowana różnymi szybkościami migracji poszczególnych składników próbki w układzie chromatograficznym.

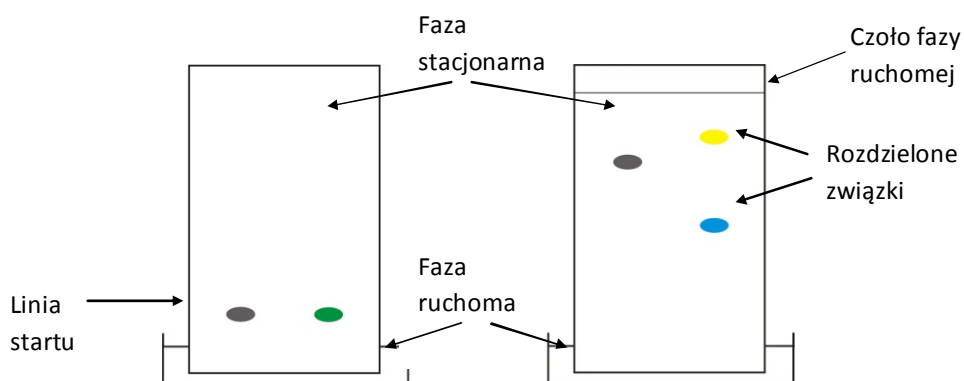
Proces chromatograficzny można prowadzić w kolumnach chromatograficznych (rysunek 1) bądź techniką planarną (rysunek 2). Najprostsza chromatografia kolumnowa wymaga jedynie szklanej rurki (kolumny) zakończonej zaworem. Szklana kolumna jest wypełniona fazą stacjonarną, przez którą przepływa faza ruchoma. Badaną mieszaninę (próbkę) wprowadza się na początek (czoło) złoża fazy stacjonarnej, a następnie przepuszcza się fazę ruchomą przez kolumnę. W tym czasie składniki próbki

ulegają separacji i kolejno opuszczają kolumnę, czyli ulegają **elucji** z kolumny (są eluowane, eluują się z kolumny).



Rysunek 1. Chromatografia kolumnowa

Technika planarna polega na wykonaniu procesu chromatograficznego na bibule lub na cienkich warstwach fazy stacjonarnej osadzonych na podłożu z płytek szklanych, folii aluminiowej lub polimerach (chromatografia cienkowarstwowa) (rysunek 2). Główną różnicą pomiędzy chromatografią kolumnową a chromatografią cienkowarstwową jest kształt fazy stacjonarnej, czyli kształt złoża chromatograficznego. W chromatografii cienkowarstwowej faza ruchoma porusza się w górę płytki chromatograficznej dzięki działaniu sił kapilarnych.



Rysunek 2. Chromatografia cienkowarstwowa, płytka przygotowana do rozdzielania z naniesionymi plamkami badanych próbek (po lewej), płytka po wykonaniu rozdzielania (po prawej)

1.2. Podstawowe definicje chromatograficzne

Intensywny rozwój chromatografii spowodował powstanie wielu terminów i pojęć związanych z tą techniką separacyjną. Ich znajomość jest niezbędna do prawidłowego zrozumienia tej dziedziny wiedzy. Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) opublikowała nomenklaturę chromatograficzną w języku angielskim w 1993 roku. Nomenklatura ta została przetłumaczona na język polski i wydana przez Polskie Towarzystwo Chemiczne w 1996 roku. W niniejszym rozdziale zostaną przedstawione podstawowe pojęcia i definicje wybrane z nomenklatury chromatograficznej.

Chromatografia jest fizyczną metodą rozdzielania, w której składniki rozdzielane ulegają podziałowi pomiędzy dwie niemieszające się fazy; jedna z nich jest nieruchoma (faza stacjonarna), a druga (faza ruchoma) porusza się w określonym kierunku.

Faza stacjonarna – jedna z dwóch faz tworzących układ chromatograficzny, określane też terminem **złoże chromatograficzne**. Faza stacjonarna może być stała lub ciekła. Jeżeli faza stacjonarna jest cieczą to może być albo związana chemicznie z ciałem stałym (nośnikiem) albo unieruchomiona na nim fizycznie.

Faza ruchoma – płyn (gaz lub ciecz), który przemieszcza się przez nieruchomą fazę stacjonarną albo wzdłuż niej w określonym kierunku. W chromatografii gazowej stosujemy termin **gaz nośny** natomiast w chromatografii ciekłowej stosujemy termin **eluent** dla określenia fazy ruchomej. Wyróżniamy **eluent** (faza ruchoma wprowadzana do kolumny) oraz **eluat** (faza ruchoma, wraz z rozpuszczonymi w niej składnikami próbki, opuszczająca kolumnę), a proces przemieszczania się **eluentu** przez kolumnę i opuszczania kolumny przez **eluat** nazywa się **elucją**.

Chromatografia elucyjna – technika, w której faza ruchoma przemieszcza się ciągle przez złoże chromatograficzne natomiast próbka jest wprowadzona do układu w jednej porcji.

Strefa (pasma) – objętość złoża chromatograficznego, w której znajduje się jeden lub więcej składników próbki.

Chromatogram (gazowy, ciekłowy) jest to wykres przedstawiający zmiany stężenia analitu w fazie ruchomej opuszczającej kolumnę w zależności od czasu lub objętości fazy ruchomej.

Chromatograf jest to przyrząd lub zestaw przyrządów służący do wykonywania rozdzielania chromatograficznego. Najważniejsze części chromatografu to dozownik, kolumna chromatograficzna oraz detektor.

Dozownik – urządzenie za pomocą, którego wprowadzamy próbkę do fazy ruchomej przed złożem chromatograficznym lub na to złoże.

Detektor – urządzenie, które określa zmiany w składzie fazy ruchomej przepływającej przez niego poprzez pomiar jej właściwości fizycznych lub chemicznych. Innymi słowy jest to urządzenie, które monitoruje skład wyływającego z kolumny eluatu w sposób ciągły, a zapis wskazań detektora w czasie rozdzielania to chromatogram.

Kolumna – rurka ze znajdującą się w niej fazą stacjonarną, przez którą przepływa faza ruchoma.

Kolumna pakowana – rurka zawierająca złoże chromatograficzne w całej objętości.

Kolumna otwarta – kolumna o małej średnicy, w której faza stacjonarna jest naniesiona w postaci warstwy na wewnętrznej ścianie rurki a faza ruchoma przepływa w sposób swobodny. Stosuje się też pojęcia: **kolumna o przekroju otwartym** bądź **kolumna kapilarna**.

Chromatografia w odwróconym układzie faz – rodzaj chromatografii cieczowej, w której faza ruchoma jest znacznie bardziej polarna niż faza stacjonarna.

Chromatografia w normalnym układzie faz – rodzaj chromatografii cieczowej, w której faza ruchoma jest mniej polarna niż faza stacjonarna.

Elucja izokratyczna – proces rozdzielania chromatograficznego z wykorzystaniem fazy ruchomej o niezmiennym składzie jakościowym i ilościowym.

Elucja gradientowa - proces rozdzielania chromatograficznego z wykorzystaniem fazy ruchomej o zmieniającym się, w sposób ciągły lub stopniowo, składzie jakościowym lub/i ilościowym. Techniki chromatograficzne dzieli się według następujących kryteriów:

- stanu skupienia fazy ruchomej,
- mechanizmu rozdzielania,
- sposobu prowadzenia procesu chromatograficznego (kształt złoża chromatograficznego, skala procesu).

Ze względu na stan skupienia fazy ruchomej wyróżniamy następujące rodzaje chromatografii:

- **chromatografia gazowa** (GC) – technika rozdzielania, gdzie fazą ruchomą jest gaz; w chromatografii gazowej zawsze stosujemy kolumny chromatograficzne,
- **chromatografia cieczowa** (LC) – technika rozdzielania, gdzie fazą ruchomą jest ciecz; w chromatografii cieczowej rozdzielania chromatograficzne można prowadzić w kolumnach bądź techniką planarną, wyróżnia się również **wysokosprawną chromatografię cieczową** (HPLC) a także **ultrasprawną chromatografię cieczową** (UPLC),
- **chromatografia z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym** (SFC) – technika rozdzielania, w której faza ruchoma jest płynem powyżej jego krytycznej temperatury i krytycznego ciśnienia; stosuje się również terminy: chromatografia fluidalna czy chromatografia nadkrytyczna.

Ze względu na mechanizm rozdzielania wyróżniamy następujące rodzaje chromatografii:

- **chromatografia adsorpcyjna** – rozdzielanie jest wynikiem różnic pomiędzy składnikami próbki w zdolności do adsorbowania się na powierzchni ciała stałego (adsorbentu),
- **chromatografia podziałowa** – rozdzielanie jest wynikiem różnej rozpuszczalności składników próbki w fazie stacjonarnej (w przypadku chromatografii gazowej) lub różnej rozpuszczalności składników w fazie stacjonarnej i ruchomej (w przypadku chromatografii cieczowej),
- **chromatografia jonowa (jonowymienna)** – technika, w której rozdzielanie jest wynikiem różnej zdolności składników próbki do ulegania wymianie jonowej,
- **chromatografia wykluczania** – technika, w której o rozdziale składników próbki decydują różnice w wielkościach cząsteczek i/lub w ich kształcie; w przeszłości stosowane były również nazwy: chromatografia żelowa, sączenie molekularne, chromatografia sitowa,
- **chromatografia powinowactwa** - technika, w której rozdzielanie jest wynikiem biologicznej specyficzności oddziaływań między dwiema substancjami – oznaczanym składnikiem próbki i reaktywnym chemicznie ligandem związanym z powierzchnią nośnika, ten rodzaj chromatografii jest stosowany do izolacji i oczyszczania białek oraz kwasów nukleinowych.

Ze względu na sposób prowadzenia procesu chromatograficznego wyróżnia się następujące rodzaje chromatografii:

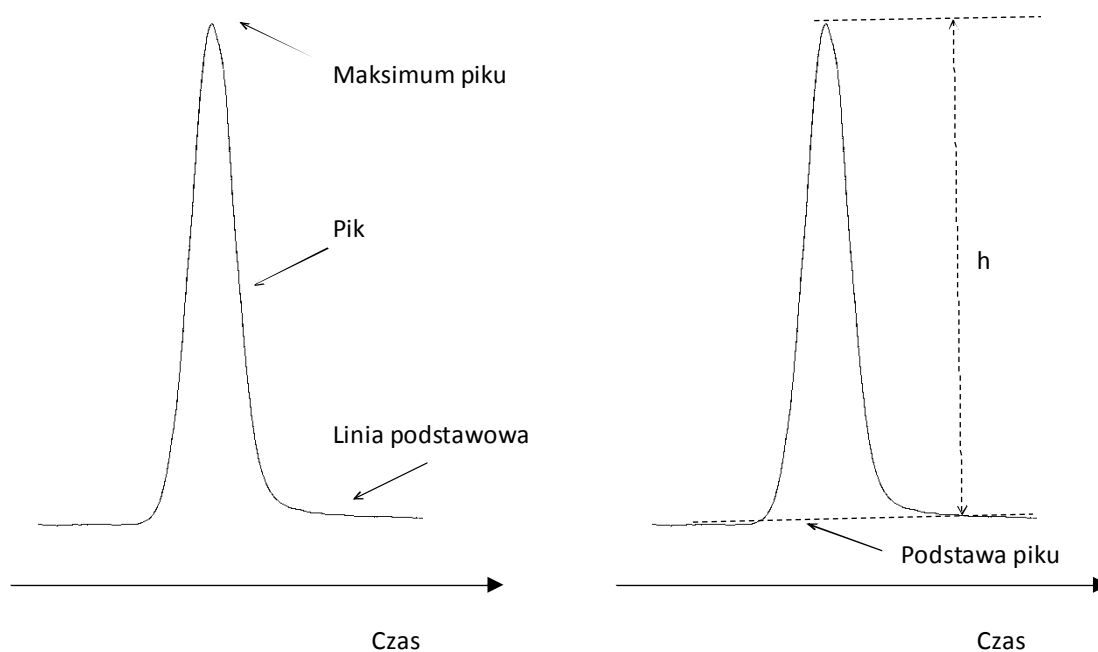
- **chromatografia kolumnowa** – technika rozdzielania, w której faza stacjonarna znajduje się w rurce (kolumnie), cząstki stałej fazy stacjonarnej albo nośnika pokrytego ciekłą fazą

stacjonarną wypełniają całą objętość rurki (kolumna pakowana) lub są osadzone na wewnętrznych ściankach rurki (kolumna otwarta, czyli kolumna ze swobodnym przepływem fazy ruchomej),

- **chromatografia planarna** – technika rozdzielania, w której faza stacjonarna jest płaską warstwą; różni się tu chromatografię bibułową oraz chromatografię cienkowarstwową (**TLC**), gdzie faza stacjonarna jest naniesiona w postaci warstwy na płytkę,
- **chromatografia analityczna i preparatywna** – techniki różniące się ze względu na skalę procesu; obie chromatografie: kolumnowa i planarna mogą być prowadzone w skali analitycznej i preparatywnej.

1.3. Chromatogram

W każdej technice chromatograficznej na początku rozdziela się badaną próbkę a następnie przeprowadza się detekcję poszczególnych składników. Wynik procesu chromatograficznego zapisuje się w postaci chromatogramu przedstawiającego wykres wskazań sygnału uzyskanego w detektorze (odpowiadającego zmianom stężenia substancji w fazie ruchomej opuszczającej kolumnę i przechodzącej przez detektor) w funkcji czasu lub (rzadko) w funkcji objętości fazy ruchomej (rysunek 3 i 4). Na osi X chromatogramu mierzymy czas natomiast na osi Y – wielkość (wysokość lub powierzchnia) pików .



Rysunek 3. Pik chromatograficzny

Zapis stężenia pojedynczej substancji w fazie ruchomej w funkcji czasu ma postać krzywej Gaussa i nosi nazwę **piku** (ang. *peak* - szczyt) (rysunek 3). Inaczej mówiąc jest to część chromatogramu ilustrująca sygnał detektora w czasie, gdy kolumnę opuszcza składnik próbki.

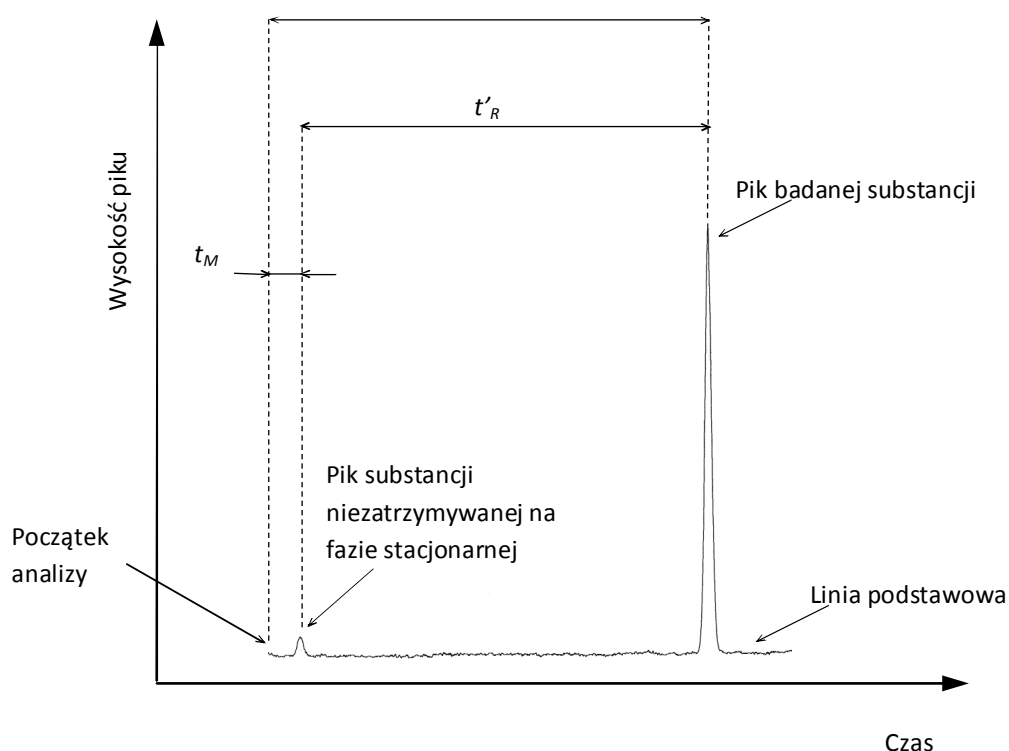
Wysokość pików (h) – jest to odległość pomiędzy podstawą pików a maksimum pików (rys. 4). Wysokość pików mierzy się do linii podstawowej pików a nie do osi X chromatogramu. Wielkość pików, w tym i wysokość, jest proporcjonalna do ilości rozdzielanej substancji a więc może służyć do analizy

ilościowej. Jednakże, bardziej rozpowszechnione w analizie ilościowej, bo dokładniejsze, jest korzystanie z pola powierzchni piku.

Linia podstawowa (linia zerowa) – jest to część chromatogramu ilustrująca sygnał detektora w czasie, gdy z kolumny wypływa jedynie faza ruchoma.

Podstawa piku – jest wyznaczana poprzez interpolację linii podstawowej chromatogramu pomiędzy końcami piku.

Chromatogram przedstawiony na rysunku 4 zawiera pik substancji niezatrzymywanej na fazie stacjonarnej. Na rysunku przedstawiono też podstawowe parametry retencyjne chromatografowanych substancji.



Rysunek 4. Chromatogram elucyjny oraz podstawowe parametry retencyjne: czas retencji substancji niezatrzymywanej t_M , całkowity czas retencji t_R oraz zredukowany czas retencji t'_R badanej substancji

Chromatogram dostarcza wielu cennych informacji, w tym dwie najważniejsze:

- o składzie jakościowym rozdzielanej próbki (położenie piku substancji na chromatogramie, czyli czas retencji piku, pozwala na jej identyfikację),
- o składzie ilościowym rozdzielanej próbki (wysokość i pole powierzchni piku substancji odpowiada jej stężeniu w próbce).

W praktyce, nie zawsze w badanej próbce występują substancje niezatrzymywane na fazie stacjonarnej, co powoduje, że wyznaczenie czasu retencji substancji niezatrzymywanej nie jest sprawą prostą. W chromatografii gazowej taką substancją byłby hel.

1.4. Podstawowe parametry retencyjne

Retencja (łac. *retentio* – powstrzymywanie) w chromatografii charakteryzuje **czas przebywania substancji w kolumnie chromatograficznej**. Składniki próbki mogą wędrować przez kolumnę chromatograficzną wolniej niż faza ruchoma - to zjawisko nazywa się retencją. Na chromatogramie można określić parametry retencyjne rozdzielanej substancji. Parametry retencji opisują zachowanie się rozdzielanych składników mieszaniny. Parametry retencji wyznacza się poprzez pomiar odległości na chromatogramie, zapisywanym przez rejestrator na papierze z określoną prędkością i przeliczeniu na czas lub odczytuje bezpośrednio z wydruku chromatogramu, zapisanego przez odpowiednie urządzenie (np. komputer). Sposób pomiaru jest przedstawiony na rysunku 5. Najczęściej stosowane w chromatografii parametry retencyjne to:

- **czas retencji substancji niezatrzymywanej t_M** - czas liczony od momentu wprowadzenia do kolumny (od początku analizy) substancji niezatrzymywanej przez fazę stacjonarną do momentu pojawienia się na chromatogramie maksimum piku; odpowiada czasowi, w którym faza ruchoma migruje przez kolumnę chromatograficzną oraz przez dozownik, detektor i łączniki; poprzednio nazywany również **czasem martwym** lub **czasem zerowym**,
- **objętość retencji substancji niezatrzymywanej V_M** - objętość fazy ruchomej, która jest potrzebna do elucji substancji niezatrzymywanej przez fazę stacjonarną; poprzednio nazywana objętością martwą lub zerową; objętość retencji substancji niezatrzymywanej jest oczywiście proporcjonalna do czasu retencji substancji niezatrzymywanej:

$$V_M = t_M F_c \quad (1)$$

gdzie:

F_c - natężenie przepływu fazy ruchomej (objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej) w temperaturze kolumny,

- **całkowity czas retencji t_R** - czas liczony od momentu wprowadzenia badanej substancji do kolumny (od początku analizy) do momentu pojawienia się na chromatogramie maksimum piku, czyli momentu maksymalnego stężenia substancji na wyjściu z kolumny,
- **całkowita objętość retencji V_R** - objętość fazy ruchomej, która jest potrzebna do elucji badanej substancji mierzona od momentu wprowadzenia substancji do kolumny do momentu pojawienia się na chromatogramie maksimum piku; całkowita objętość retencji jest proporcjonalna do całkowitego czasu retencji:

$$V_R = t_R F_c \quad (2)$$

- **zredukowany czas retencji t'_R** - różnica pomiędzy całkowitym czasem retencji badanej substancji i czasem retencji substancji niezatrzymywanej:

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

- Zredukowany czas retencji charakteryzuje retencję substancji na fazie stacjonarnej i jest charakterystyczny dla danej substancji a więc może służyć do jej identyfikacji,
- **zredukowana objętość retencji V'_R** - różnica pomiędzy całkowitą objętością retencji badanej substancji i objętością retencji substancji niezatrzymywanej:

$$V'_R = V_R - V_M \quad (4)$$

- **współczynnik retencji k** – miara czasu, w jakim substancja przebywa w fazie stacjonarnej, w stosunku do czasu, w którym przebywa ona w fazie ruchomej; określa, ile razy dłużej substancja jest zatrzymywana przez fazę stacjonarną niż potrzebowałaby na przejście przez kolumnę z szybkością fazy ruchomej. Współczynnik retencji oblicza się z następującego wzoru:

$$k = \frac{t'_R}{t_M} \quad (5)$$

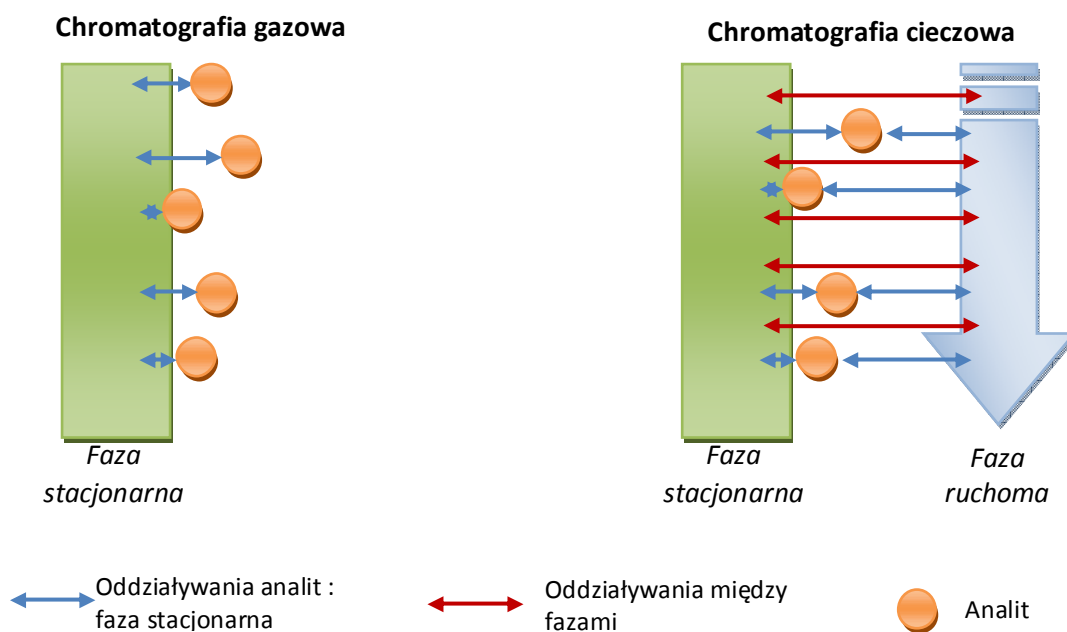
Współczynnik retencji jest to jednocześnie stosunek ilości substancji w fazie stacjonarnej do ilości tej substancji w fazie ruchomej w stanie równowagi.

1.5. Podstawy teoretyczne procesu chromatograficznego

Pomiędzy cząsteczkami próbki a cząsteczkami fazy stacjonarnej i fazy ruchomej zachodzą oddziaływania międzycząsteczkowe, które różnią się między sobą, w zależności od charakteru związków oddziałujących (*por. roz. 1.2.3*) i od miejsca występowania – na powierzchni graniczących ze sobą faz, np. podczas adsorpcji lub w całej objętości faz układu, jak w przypadku podziału (*por. roz. 1.2.2*). Oddziaływania międzycząsteczkowe powodują, że składniki mieszaniny są w różnym stopniu zatrzymywane przez fazę stacjonarną. Oczywiście silniejsze oddziaływanie z fazą stacjonarną powoduje większą retencję danego składnika próbki i tym samym późniejsze opuszczenie układu (np. kolumny chromatograficznej). Oddziaływania międzycząsteczkowe mogą zachodzić tylko między składnikami próbki a fazą stacjonarną, jak w przypadku chromatografii gazowej, gdzie gaz nośny nie oddziałuje ze składnikami próbki natomiast w chromatografii cieczowej zachodzą oddziaływania międzycząsteczkowe pomiędzy wszystkimi elementami układu – fazą stacjonarną, fazą ruchomą (rozpuszczalnikiem) i składnikami próbki (rysunek 6). Tym samym w chromatografii gazowej jedynie faza stacjonarna wpływa na retencję a w przypadku chromatografii cieczowej, na retencję składników próbki wpływa zarówno faza stacjonarna jak i faza ruchoma.

Składniki mieszaniny wprowadzanej do kolumny chromatograficznej migrują poprzez kolumnę z różną prędkością a tym samym opuszczają ją w różnym czasie. Zatrzymywanie składników próbki na powierzchni fazy stacjonarnej jest spowodowane różnorodnymi zjawiskami, takimi jak:

- adsorpcja,
- podział,
- oddziaływania jonowe,
- oddziaływania jonowo-asocjacyjne,
- efekty związane z rozmiarami cząsteczek (wykluczanie),
- powinowactwo biologiczne.



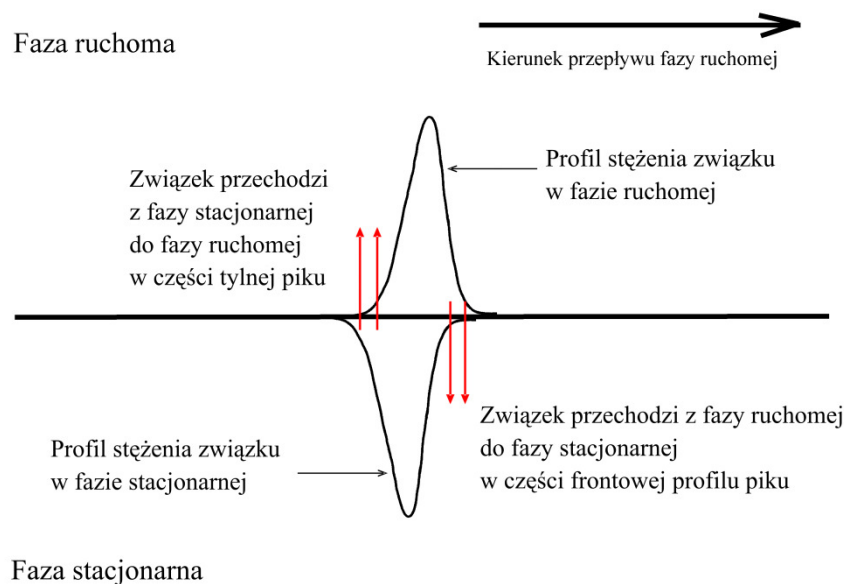
Rysunek 6. Oddziaływania międzycząsteczkowe w chromatografii gazowej oraz w chromatografii ciekowej

Oddziaływania międzycząsteczkowe, które biorą udział w procesie chromatograficznym są efektem występowania sił międzycząsteczkowych, takich jak:

- siły dyspersyjne,
- polarne (oddziaływania dipol-dipol, oddziaływania π - π , wiązania wodorowe),
- jonowe.

Proces chromatograficzny może być prowadzony trzema technikami: **techniką elucyjną**, jako analiza czołowa oraz jako rozwijanie przez rugowanie. Współcześnie, większość rozdzieleń chromatograficznych jest wykonywana techniką elucyjną; pozostałe techniki są stosowane bardzo rzadko. W technice elucyjnej następuje seria procesów adsorpcji-desorpcji chromatografowanego związku zachodzących pomiędzy dwiema fazami: stacjonarną i ruchomą. Istotę procesu oddaje rysunek 7.

Profile stężeń związku w obu fazach odpowiadają krzywym Gaussa. Poruszająca się faza ruchoma przesuwa profil stężenia związku w fazie ruchomej do przodu w porównaniu z fazą stacjonarną. To powoduje, że stężenie związku w fazie ruchomej w części frontowej piku przekracza stan równowagi i następuje przejście części masy związku z fazy ruchomej do fazy stacjonarnej. Odwrotny proces następuje w tylnej części piku. Pasma związku porusza się wzdłuż kolumny chromatograficznej w rezultacie transferu związku z fazy ruchomej do stacjonarnej we frontowej połowie piku przy jednoczesnym transferze związku z fazy stacjonarnej do ruchomej w części tylnej piku.

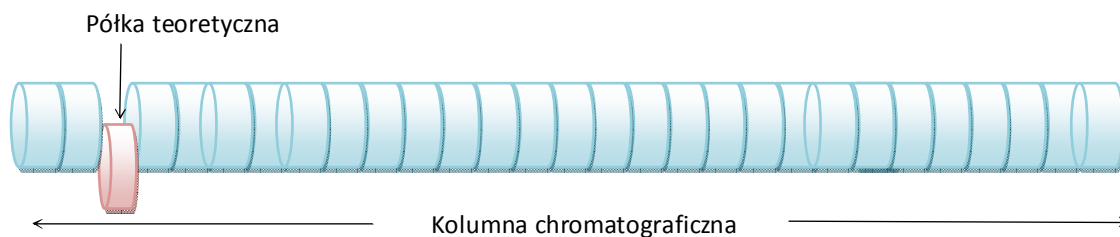


Rysunek 7. Proces elucji związku w chromatografii [na podstawie *Chromatography theory*. Cazes J., Scott R.P.W., 2002]

Istnieją dwie fundamentalne teorie chromatograficzne: teoria póltek oraz teoria kinetyczna. Teoria póltek opisuje czynniki, które kontrolują retencję chromatograficzną oraz pozwala na obliczenie objętości retencji. Teoria kinetyczna opisuje zjawisko rozmycia pasma chromatograficznego.

1.5.1. Teoria póltek

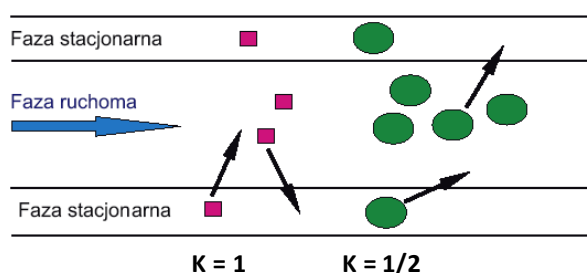
W chromatografii podziałowej rozdzielanie składników próbki jest wynikiem ich różnej rozpuszczalności w fazach chromatograficznych. Dla zobrazowania procesu podziału przyjmuje się, że kolumna chromatograficzna składa się z wielkiej ilości połączonych ze sobą sekcji, czyli tzw. póltek teoretycznych (rysunek 8). Termin ten został zaczerpnięty z teorii destylacji i ma wymiar całkowicie teoretyczny. Pod pojęciem **półki teoretycznej** rozumiemy taką objętość kolumny, w której zostaje osiągnięty stan (dynamicznej) równowagi pomiędzy stężeniem związku w fazie stacjonarnej, a jego stężeniem w fazie ruchomej.



Rysunek 8. Ilustracja półki teoretycznej kolumny chromatograficznej

Tak jak to opisano wcześniej, rozkład cząsteczek analitu pomiędzy dwie niemieszające się fazy charakteryzuje stała podziału K opisana równaniem Nernsta (*por. roz. 1.2.2* równanie 26)

Kiedy substancja jest wprowadzona do kolumny chromatograficznej natychmiast dzieli się pomiędzy fazę stacjonarną a fazę ruchomą w „pierwszej półce” zgodnie z wartością stałej podziału. Rozpuszczone w fazie ruchomej cząsteczki substancji poruszają się wraz z nią, aż napotykają fazę stacjonarną w „drugiej półce”. Ponownie dzielą się pomiędzy obie fazy zgodnie z wartością stałej podziału. Jednocześnie stężenie substancji w fazie ruchomej w „pierwszej półce” ulega zmniejszeniu, a więc część cząsteczek przechodzi z fazy stacjonarnej do fazy ruchomej, aby stosunek stężeń odpowiadał wartości stałej podziału. W krótkim czasie wszystkie cząsteczki substancji przechodzą z „pierwszej półki” do następnej. Faza ruchoma porusza się poprzez kolejne półki i w każdej z nich ustala się lokalna równowaga opisana prawem Nernsta. Proces trwa dopóki wszystkie cząsteczki substancji nie opuszczą kolumny chromatograficznej.



Rysunek 9. Mechanizm procesu chromatograficznego na przykładzie chromatografii gazowej na kolumnie o przekroju otwartym; rozdzielane substancje charakteryzują się różnicowanymi stałymi podziału K

Gdy do kolumny chromatograficznej wprowadzona jest mieszanina dwóch lub więcej substancji, charakteryzujących się różnymi stałymi podziału, substancje, których stała podziału jest mniejsza od jedności ($K < 1$) migrują znacznie szybciej przez kolumnę niż te, których $K > 1$. W rezultacie, substancje o niższej wartości stałej podziału ulegają rozdzielaniu od substancji o jej wyższej wartości (rysunek 9).

Teoria półek wprowadza fundamentalne równanie chromatografii łączące całkowitą objętość retencji substancji V_R ze stałą podziału K :

$$V_R = V_m + KV_s + V_E \quad (6)$$

gdzie:

V_R – objętość retencji substancji,

K – stała podziału,

V_m – objętość fazy ruchomej,

V_s – objętość fazy stacjonarnej,

V_E – objętość pozakolumnowa (objętość dozownika, łączników itp.); dla $V_E \ll V_m$, wartość V_E pomija się.

Objętość retencji substancji niezatrzymywanej na kolumnie V_M w praktyce jest sumą objętości fazy ruchomej V_m oraz objętości pozakolumnowej V_E :

$$V_M = V_m + V_E \quad (7)$$

gdzie:

V_M – objętość retencji substancji niezatrzymywanej na kolumnie,

V_m – objętość fazy ruchomej,

V_E – objętość pozakolumnowa.

Czas retencji t_R jest proporcjonalny do objętości retencji:

$$V_R = t_R V_C \quad (8)$$

gdzie:

V_R – objętość retencji substancji,

t_R – czas retencji substancji,

F_C – natężenie przepływu fazy ruchomej.

Z równania wywodzącego się z teorii pótek wynikają praktyczne wnioski:

- im większa wartość stałej podziału K , tym większy czas retencji t_R danego związku,
- wzrost objętości fazy stacjonarnej V_s powoduje wzrost czasu retencji t_R danego związku, czyli czas retencji zależy również od wymiarów kolumny.

Dla dwóch różnych związków chemicznych A i B:

$$V_{R(A)} = V_m + K_{(A)} V_s + V_E \quad (9)$$

$$V_{R(B)} = V_m + K_{(B)} V_s + V_E \quad (10)$$

Dwa różne składniki mieszaniny zostają rozdzielone, jeśli różnią się objętością retencji a tym samym różnią się stałą podziału:

$$V_{R(A)} \neq V_{R(B)}$$

$$K_{(A)} \neq K_{(B)}$$

Współczynnik retencji k jest definiowany jako stosunek liczby moli substancji w fazie stacjonarnej do liczby moli substancji w fazie ruchomej:

$$k = \frac{n_s}{n_m} = \frac{c_s V_s}{c_m V_m} \quad (11)$$

gdzie:

k – współczynnik retencji,

n_s – liczba moli substancji w fazie stacjonarnej,

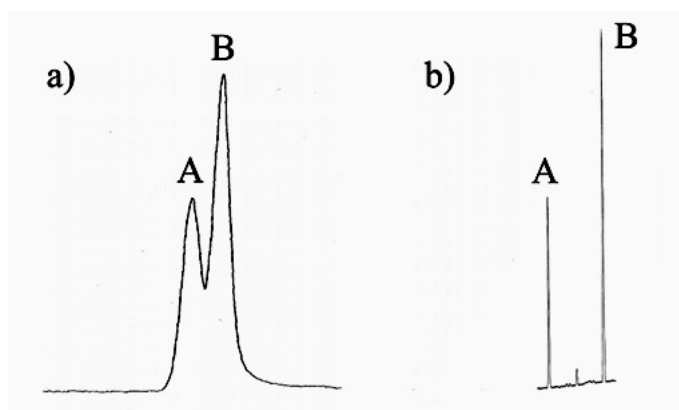
n_m – liczba moli substancji w fazie ruchomej.

Współczynnik retencji k jest zależny od stałej podziału K :

$$k = K \frac{V_s}{V_m} \quad (12)$$

1.5.2. Teoria kinetyczna

Teoria kinetyczna jest drugą fundamentalną teorią chromatograficzną. Opisuje **przyczyny poszerzenia pasma chromatograficznego**. Obszar w złoże chromatograficznym, w którym znajduje się substancja rozdzielana (pasma) stale poszerza się w czasie, kiedy substancja migruje poprzez złoże chromatograficzne. Poszerzanie się pasma chromatograficznego jest wynikiem zachodzących w kolumnie procesów kinetycznych i termodynamicznych. Efektem tego, widocznym na chromatogramie, może być szeroki pik substancji.



Rys. 10. Porównanie chromatogramów mieszaniny substancji A i B otrzymanych na kolumnie o niskiej sprawności (a) oraz o dużej sprawności (b)

Na rysunku 10 przedstawiono dwa przykłady rozdzielania chromatograficznego mieszaniny dwóch substancji A i B, różniących się czasami retencji. Poszczególne składniki mieszaniny są rozdzielone jedynie wtedy, jeżeli profil stężenia (pik) każdego z nich jest dostatecznie wąski, aby piki nie łączyły się ze sobą.

Sprawność kolumn chromatograficznych decyduje o tym, czy uzyskane piki są wąskie czy szerokie. Sprawność kolumn zależy od liczby pól teoretycznych (N) w danej kolumnie. Im więcej pól teoretycznych, tym kolumna jest sprawniejsza i uzyskane piki rozdzielanych substancji są węższe.

Liczba pól teoretycznych zależy od długości kolumny L oraz od wysokości pojedynczej półki H :

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

gdzie:

N – liczba pól teoretycznych,

L – długość kolumny,

H – wysokość równoważna półce teoretycznej, inaczej oznaczana $WRPT$.

Im większa jest wysokość półki teoretycznej, tym mniej półek teoretycznych znajduje się w danej kolumnie i tym mniej sprawna jest kolumna, co powoduje, że uzyskane piki rozdzielanych substancji są szersze.

Wysokość półki teoretycznej zależy od warunków eksperymentalnych w danym układzie chromatograficznym, między innymi od liniowej prędkości przepływu fazy ruchomej przez kolumnę. Dla danego układu chromatograficznego istnieje optymalna liniowa prędkość przepływu fazy ruchomej, przy której uzyskuje się najmniejszą wysokość półki teoretycznej, a więc największą sprawność kolumny.

W praktyce liniową prędkość przepływu fazy ruchomej oblicza się poprzez podzielenie długości kolumny L przez czas retencji substancji niezatrzymywanej t_M :

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (14)$$

gdzie:

u – liniowa prędkość przepływu fazy ruchomej.

Wzory opisujące zależność wysokości półki teoretycznej od liniowej prędkości przepływu fazy ruchomej są bardzo podobne w chromatografii gazowej oraz w chromatografii ciekłowej. W przypadku chromatografii gazowej stosujemy równanie van Deemtera natomiast w chromatografii ciekłowej równanie Kennedy'ego i Knoxa.

Wysokość półki teoretycznej H opisana jest równaniem van Deemtera:

$$H = A + \frac{B}{u} + C_s u + C_m u \quad (15)$$

gdzie:

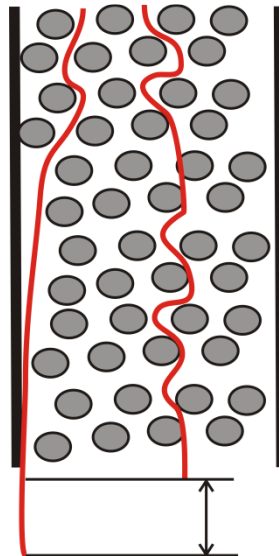
A – dyfuzja wirowa,

B – dyfuzja podłużna w fazie ruchomej,

C_s – opór przenoszenia masy związany z fazą stacjonarną,

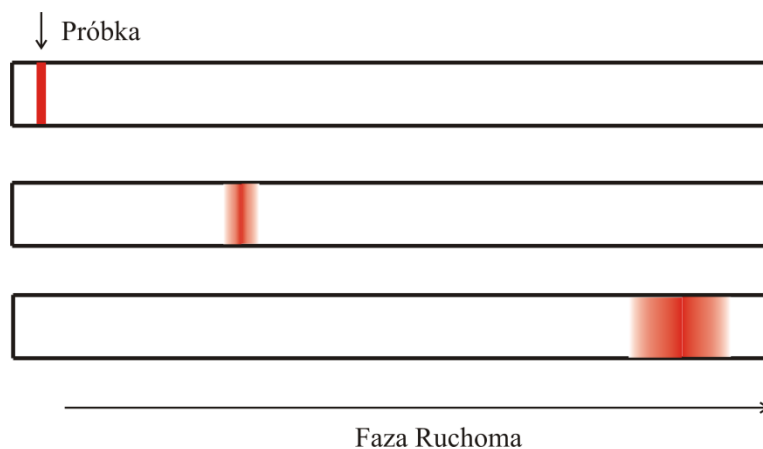
C_m – opór przenoszenia masy związany z fazą ruchomą.

W kolumnie wypełnionej fazą stacjonarną cząsteczki chromatografowanego związku poruszają się różnymi drogami (rysunek 11), co powoduje, że ich czasy przebywania w kolumnie, a tym samym ich czasy retencji są różne. Zjawisko to nosi nazwę dyfuzji wirowej i jest powodem rozmycia piku. Dyfuzja wirowa występuje w kolumnach pakowanych, w których cząstki fazy stacjonarnej wypełniają całą wewnętrzną objętość kolumny, a jej efekt, czyli rozmycie pików zależy od wymiarów cząstek wypełnienia kolumny, ich kształtu, porowatości i sposobu upakowania w kolumnie.



Rysunek 11. Mechanizm dyfuzji wirowej. Czerwone linie pokazują różne drogi cząsteczek w wypełnieniu kolumny [na podstawie *Chromatography theory*. Cazes J., Scott R.P.W., 2002]

Dyfuzja podłużna jest efektem przypadkowych ruchów cząsteczek chromatografowanego związku w fazie ruchomej (rysunek 12), którym ulegają w sposób naturalny w cieczy lub w gazie. Profil stężenia związku w fazie ruchomej ma kształt krzywej Gaussa, ponieważ proces dyfuzji jest przypadkowy.

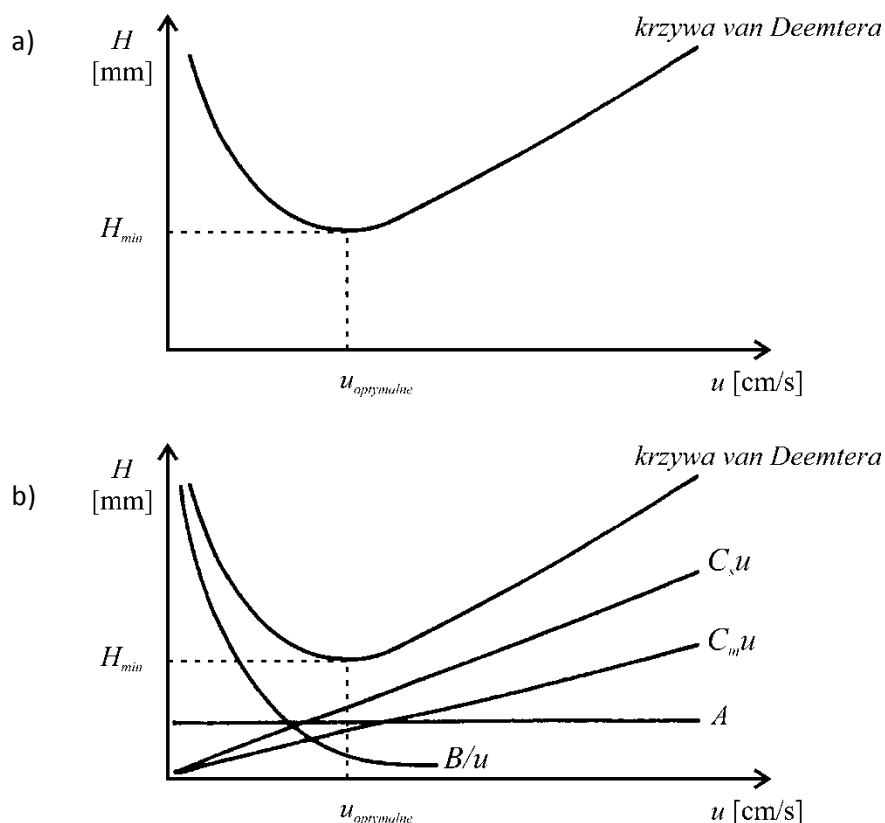


Rysunek 12. Poszerzanie pasma chromatograficznego w kolumnie z powodu dyfuzji podłużnej na podstawie [Chromatography theory. Jack Cazes, Raymond P. W. Scott, 2002]

Parametry C w równaniu van Deemtera dotyczą oporów przenoszenia masy. Parametr C_s dotyczy oporu przenoszenia masy związanego z fazą stacjonarną. W trakcie migracji przez kolumnę cząsteczki związku chromatografowanego są przenoszone ciągle z fazy ruchomej do stacjonarnej i odwrotnie. Proces ten nie jest błyskawiczny, ale wymaga określonego czasu, czego efektem jest poszerzanie się pasma chromatograficznego. Parametr C_m dotyczy oporu przenoszenia masy pomiędzy sąsiednimi strumieniami fazy ruchomej.

Równanie van Deemtera pokazuje jak wysokość płytki teoretycznej zależy od liniowej prędkości przepływu fazy ruchomej i jest równaniem hiperboli (rysunek 13a). Dla danego układu chromatograficznego istnieje optymalna prędkość przepływu fazy ruchomej, przy której uzyskuje się najmniejszą wartość wysokości płytki teoretycznej a więc największą sprawność kolumny.

Rysunek 13b ilustruje wpływ indywidualnych czynników (A , B/u , $C_s u$, $C_m u$) na wysokość płytki teoretycznej i na wypadkową krzywą van Deemtera. Wartości A , B i C są określone i stałe dla określonej substancji chromatografowanej i określonych warunków chromatograficznych.



Rysunek 13. Krzywa van Deemtera. Zależność wysokości płytki teoretycznej od prędkości przepływu fazy ruchomej w chromatografii gazowej [na podstawie *Instrumental Methods of Analysis*. Willard *et al.*, 1988]

W przypadku chromatografii gazowej czynnik C_m jest mało znaczący i można go zaniedbać. Równanie van Deemtera w chromatografii gazowej podaje się często w formie uproszczonej:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (16)$$

gdzie:

C – opór przenoszenia masy.

Równanie Kennedy'ego i Knoxa opisujące zależność wysokości płytki teoretycznej od prędkości przepływu fazy ruchomej w chromatografii ciekowej:

$$H = Au^{1/3} + \frac{B}{u} + Cu \quad (17)$$

Wysokość półki teoretycznej H oraz prędkość przepływu fazy ruchomej u w chromatografii cieczowej mogą być wyrażone jako tzw. wartości zredukowane: zredukowana wysokość półki teoretycznej h oraz zredukowana prędkość fazy ruchomej v . Wielkości zredukowane są bezwymiarowe i umożliwiają porównanie właściwości różnych kolumn chromatograficznych w chromatografii cieczowej. Na sprawność kolumn w chromatografii cieczowej duży wpływ ma średnia średnica cząstek d_p wypełnienia kolumny, czyli fazy stacjonarnej. Zredukowana wysokość półki teoretycznej w chromatografii cieczowej jest stosunkiem wysokości półki teoretycznej H do średniej średnicy cząstek wypełnienia kolumny d_p :

$$h = \frac{H}{d_p} \quad (18)$$

gdzie:

h – zredukowana wysokość półki teoretycznej,

d_p – średnia średnica cząstek fazy stacjonarnej.

Zredukowana prędkość fazy ruchomej w chromatografii cieczowej:

$$v = \frac{ud_p}{D_M} \quad (19)$$

gdzie:

v – zredukowana liniowa prędkość przepływu fazy ruchomej,

D_M – współczynnik dyfuzji w fazie ruchomej.

Wykorzystując pojęcia zredukowanej wysokości półki teoretycznej i zredukowanej prędkości fazy ruchomej, równanie Knoxa można przedstawić w następującej formie:

$$h = Av^{1/3} + \frac{B}{v} + Cv \quad (20)$$

Wartość zredukowanej wysokości półki teoretycznej określa liczbę cząstek wypełnienia kolumny tworzących jedną półkę teoretyczną kolumny. W chromatografii cieczowej, kolumna ma dobrą sprawność, gdy h ma wartość w przedziale 2 – 3, jeżeli wartość $h > 10$ to kolumna jest źle upakowana lub wypełnienie jest złej jakości.

1.6. Sprawność kolumn chromatograficznych

Liczbę półek teoretycznych, czyli sprawność kolumny można wyznaczyć bezpośrednio z chromatogramu przy użyciu substancji testowej. Substancją testową może być związek, dla którego współczynnik retencji k mieści się w granicach od 5 do 10. Pik substancji testowej powinien być symetryczny (rysunek 14). Liczbę półek teoretycznych w kolumnie wyznacza się z następujących zależności:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad (21)$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (22)$$

lub

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_B} \right)^2 \quad (23)$$

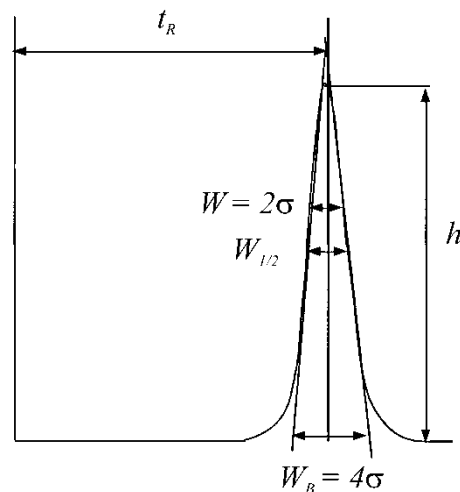
gdzie:

σ – odchylenie standardowe krzywej Gaussa (szerokość pików na wysokości równej $0,882 h$),

$W_{1/2}$ – szerokość pików w połowie jego wysokości,

W_B – szerokość pików przy podstawie.

Wszystkie wielkości mierzone są w jednostkach czasu i wyznaczone bezpośrednio z chromatogramu (rys. 14). Liczba pólk teoretycznych jest oczywiście wartością bezwymiarową.



Rysunek 14. Wielkości odczytywane z chromatogramu; wyznaczenie liczby pólk teoretycznych z pików chromatograficznego

Efektywną liczbę pólk teoretycznych w kolumnie wyznacza się z następujących zależności:

$$N_{ef} = 5,54 \left(\frac{t_R - t_M}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (24)$$

lub

$$N_{ef} = \left(\frac{k}{1+k} \right)^2 N \quad (25)$$

gdzie:

N_{ef} – efektywna liczba pólk teoretycznych,

Sprawność rozdzielania jest wyrażana także rozdzielczością pików. Rozdzielczość pików określa rozdzielanie dwóch pików z uwzględnieniem ich średnich szerokości na linii podstawy. Rozdzielczość pików liczy się z następującego wzoru:

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_{B1} + W_{B2}} \quad (26)$$

gdzie:

R_S – rozdzielczość pików, nazywana też zdolnością rozdzielczą kolumny,

t_{R1} – czas retencji substancji 1,

t_{R2} – czas retencji substancji 2, przy czym $t_{R2} > t_{R1}$,

W_{B1} – szerokość pików 1 na linii podstawy,

W_{B2} – szerokość pików 2 na linii podstawy.

Purnell wprowadził zależność łączącą w sobie wielkość rozdzielczości pików (R_S), selektywność rozdzielania (α) oraz sprawność kolumny (N):

$$R_S = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \sqrt{N_2} \quad (27)$$

gdzie:

k_2 – współczynnik retencji substancji 2, przy czym $t_{R2} > t_{R1}$,

N_2 – liczba pólek teoretycznych odniesiona do substancji 2,

α – współczynnik selektywności.

Współczynnik selektywności α liczymy z następującego wzoru:

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1} \quad (28)$$

gdzie:

t'_{R1} – zredukowany czas retencji substancji 1,

t'_{R2} – zredukowany czas retencji substancji 2, przy czym $t_{R2} > t_{R1}$,

k_1 – współczynnik retencji substancji 1,

k_2 – współczynnik retencji substancji 2.

1.7. Analiza jakościowa

Analizę jakościową technikami chromatograficznymi można wykonać dwoma sposobami:

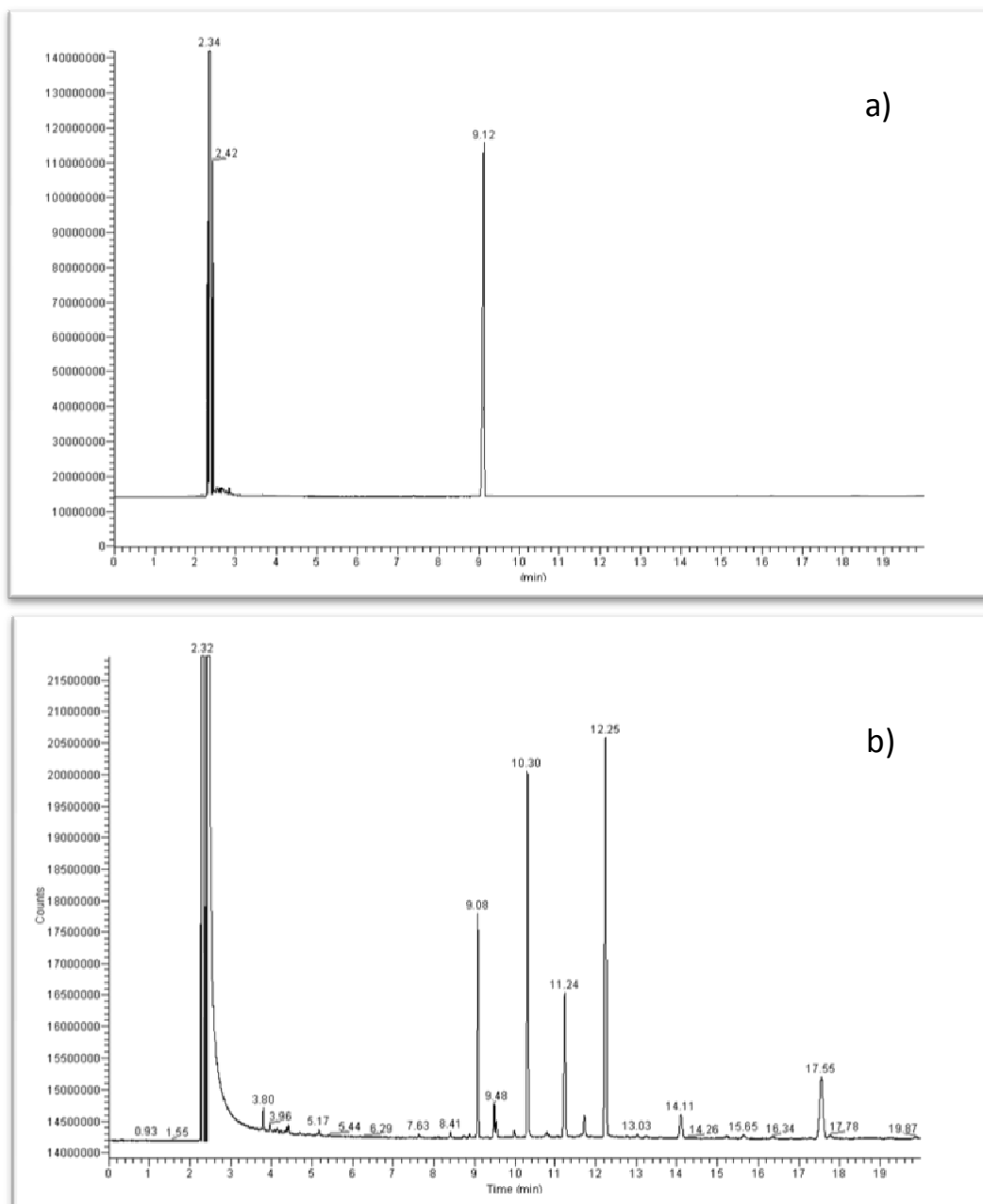
- poprzez wykorzystanie parametrów retencyjnych analitu (czas retencji, indeksy retencji),
- poprzez stosowanie detekcji o dużym potencjale identyfikacyjnym, takiej jak spektrometrię mas czy spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR).

Parametry retencyjne służą do identyfikacji związków chemicznych analizowanych technikami separacyjnymi, ponieważ w danych warunkach chromatograficznych określony związek chemiczny ma zawsze taką samą retencję.

Jednakowe warunki chromatograficzne oznaczają jednakowy rodzaj i wymiary kolumny chromatograficznej, rodzaj i prędkość przepływu fazy ruchomej, temperaturę analizy itd.

Do identyfikacji związków chemicznych metodą chromatografii gazowej oraz chromatografii ciekłej stosuje się wielkość czasu retencji lub zredukowanego czasu retencji. Identyfikację

składnika próbki wykonuje się w ten sposób, że w stałych warunkach chromatograficznych analizuje się bezpośrednio po sobie badaną próbkę oraz wzorec (rysunek 15), następnie porównuje się czasy retencji składników próbki oraz wzorca. Jeżeli są inne to na pewno można wykluczyć identyczność substancji. Jeżeli są takie same to istnieje duże prawdopodobieństwo, że są to identyczne substancje. Należy zwrócić uwagę, że pomiar czasu retencji może być obarczony niewielkimi błędami (rzędu setnych części minuty) wynikającymi ze sposobu dozowania czy chociażby z opóźnienia w naciśnięciu przycisku rozpoczynającego pomiar (rysunek 15).



Rys. 15. Chromatogramy GC-FID roztworu dokošanu ($t_R = 9,12$ min) (a) oraz badanej próbki (b), pik o $t_R = 9,08$ min na chromatogramie badanej próbki jest pikiem dokošanu, piki o $t_R = 2,34$ min oraz o $t_R = 2,42$ min na chromatogramie roztworu dokošanu są pikami rozpuszczalników, w których rozpuszczono wzorec dokošanu, również pik o $t_R = 2,32$ min na chromatogramie badanej próbki jest pikiem rozpuszczalnika

Jednakże niektóre związki chemiczne o różnej budowie mogą przypadkowo wykazywać taką samą retencję. Aby uzyskać większą pewność co do tożsamości związku należy powtórzyć analizę jakościową, stosując inne warunki chromatograficzne, to znaczy używając kolumny chromatograficznej wypełnionej fazą stacjonarną o innej polarności.

Zamiast czasów retencji można porównywać zredukowane czasy retencji analitu i wzorca, co prowadzi do dokładniejszych wyników, ale wymaga znajomości czasu zerowego.

Niewielkie różnice warunków chromatograficznych pomiędzy analizą próbki oraz analizą wzorca (rysunek 15) mogą prowadzić do błędnej interpretacji wyników. Aby temu zapobiec można dodać wzorec do badanej próbki i następnie sprawdzić, czy uzyskujemy jeden czy dwa piki chromatograficzne. Taką sytuację przedstawia rysunek 19: po dodaniu wzorca do próbki pik analitu zwiększył się, co oznacza, że jest to ta sama substancja.

Wadą powyższych metod jest konieczność dysponowania wzorcami wielu związków chemicznych oraz wstępnymi informacjami, co do charakteru próbki. Ten sposób identyfikacji stosujemy najczęściej wtedy, kiedy poszukujemy w próbce określonej substancji. Jeżeli próbka jest zupełnie nieznaną to dobieranie wzorców metodą „prób i błędów” jest praktycznie niewykonalne. Wtedy lepszą alternatywą jest stosowanie detektorów jakościowych.

Do identyfikacji związków chemicznych metodą chromatografii gazowej stosuje się także **indeksy Kovátsa** (nazywane również **indeksami retencji**).

Indeks retencji jest w znacznym stopniu niezależny od warunków analizy chromatograficznej i przez to jest charakterystyczny dla danego związku w określonej temperaturze analizy i polarności fazy stacjonarnej.

Identyfikacja nieznanego związku może nastąpić poprzez porównanie wyznaczonych indeksów retencji z danymi zamieszczonymi w literaturze naukowej. Indeks retencji substancji X wyznacza się w stosunku do retencji n -alkanów, jednego o (z) atomach węgla w łańcuchu, eluowanego z kolumny przed substancją, i drugiego o ($z + 1$) atomach węgla w łańcuchu, eluowanego z kolumny za substancją. Indeks retencji n -alkanu wynosi stukrotność liczby atomów węgla, czyli na przykład dla n -pentanu indeks retencji wynosi 500.

Indeks Kovátsa dla substancji X , wyznaczony w warunkach izotermicznych, oblicza się ze wzoru:

$$K_I = 100z + 100 \frac{\log t'_{R_X} - \log t'_{R_Z}}{\log t'_{R_{Z+1}} - \log t'_{R_Z}} \quad (29)$$

gdzie:

t'_{R_Z} – zredukowany czas retencji n -alkanu o (z) atomach węgla w łańcuchu,

t'_{R_X} – zredukowany czas retencji substancji X ,

$t'_{R_{Z+1}}$ – zredukowany czas retencji n -alkanu o ($z + 1$) atomach węgla w łańcuchu,

$$t'_{R_Z} < t'_{R_X} < t'_{R_{Z+1}}.$$

W przypadku chromatografii gazowej z programowaniem temperatury analizy, indeks retencji wyznacza się stosując bezpośrednio wartości liczbowe zredukowanych czasów retencji. Indeks

retencji dla substancji X , wyznaczony w warunkach programowanej temperatury, oblicza się ze wzoru:

$$R_I = 100z + 100 \frac{t'_{R_X} - t'_{R_Z}}{t'_{R_{Z+1}} - t'_{R_Z}} \quad (30)$$

Wyrażenie w liczniku i mianowniku wzoru (30) oznacza różnicę czasów retencji, więc w przypadku chromatografii gazowej z programowaniem temperatury analizy można wyznaczyć indeks retencji stosując wartości całkowitych czasów retencji zamiast zredukowanych czasów retencji. Wzór można łatwo przekształcić korzystając z zależności:

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

gdzie:

t'_R – zredukowany czas retencji substancji,

t_R – całkowity czas retencji substancji,

$$R_I = 100z + 100 \frac{t_{R_X} - t_{R_Z}}{t_{R_{Z+1}} - t_{R_Z}} \quad (31)$$

gdzie:

t_{R_Z} – czas retencji n -alkanu o (z) atomach węgla w łańcuchu,

t_{R_X} – czas retencji substancji X ,

$t_{R_{Z+1}}$ – czas retencji n -alkanu o ($z + 1$) atomach węgla w łańcuchu,

$$t_{R_Z} < t_{R_X} < t_{R_{Z+1}}.$$

Detektor o dużym potencjale identyfikacyjnym, taki jak spektrometr mas (MS), pozwala na analizę jakościową składników próbki, ponieważ dostarcza informacji o ich masie cząsteczkowej i budowie strukturalnej. W wyniku połączenia chromatografu ze spektrometrem mas uzyskuje się rozdzielenie mieszaniny składników próbki w kolumnie chromatograficznej a następnie identyfikację poszczególnych składników próbki w spektrometrze mas. Możliwe jest połączenie chromatografu gazowego ze spektrometrem mas (GC-MS) a także chromatografu cieczowego ze spektrometrem mas (LC-MS). Wynikiem analizy techniką spektrometrii mas jest widmo mas. Widmo mas zawiera informację o masie cząsteczkowej badanego związku oraz o budowie strukturalnej. Widmo mas jest charakterystyczne dla określonego związku chemicznego i dzięki temu pozwala na jego identyfikację, albo poprzez interpretację widma albo poprzez proste porównanie z katalogami widm.

1.8. Analiza ilościowa

Techniki chromatograficzne, podobnie jak większość technik instrumentalnych, należą do metod porównawczych, które wymagają kalibracji względem wzorców.

Analiza ilościowa w technikach chromatograficznych opiera się na tym, że ilość (masa lub stężenie) składnika próbki jest proporcjonalna do powierzchni (lub wysokości) jego piku.

Analizę można wykonać poprzez porównywanie powierzchni (lub wysokości) piku analitu z powierzchnią (lub wysokością) piku wzorca o znanej masie lub stężeniu. Wyniki analizy chromatograficznej zależą od jakości zastosowanego chromatografu oraz warunków analizy.

Parametr mierzony, pole powierzchni lub wysokość pików, jest funkcją stężenia (lub masy) chromatografowanej substancji.

$$A = f(c) \quad (32)$$

$$h = f(c) \quad (33)$$

gdzie:

A – pole powierzchni pików,

h – wysokość pików,

c – stężenie substancji w próbce dozowanej do chromatografu.

Najczęściej stosowane są trzy metody analizy ilościowej:

- metoda krzywej kalibracyjnej (kalibracja bezwzględna),
- metoda wzorca wewnętrznego,
- metoda dodatku wzorca.

1.8.1. Metoda krzywej kalibracyjnej

W metodzie krzywej kalibracyjnej mierzony parametr (pole powierzchni lub wysokość pików) jest funkcją liniową stężenia. Można go opisać równaniem prostej:

$$h = ac + b \quad (34)$$

gdzie:

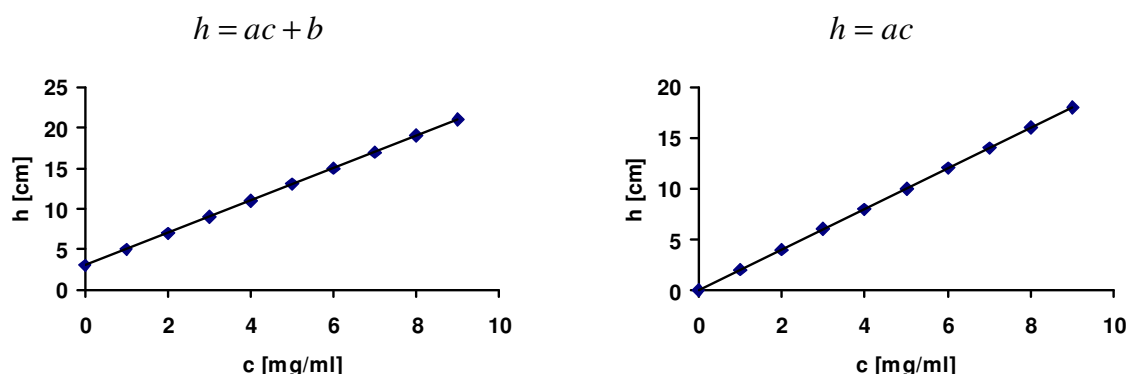
c – stężenie substancji w próbce dozowanej do chromatografu,

a – współczynnik kierunkowy prostej,

b – wartość stała, będąca wartością wyznaczoną dla ślepej próby.

Podobną postać ma również równanie wykorzystywane w metodzie krzywej kalibracyjnej w przypadku, kiedy mierzymy pole powierzchni pików a nie jego wysokość.

Zależność mierzonego parametru (pola powierzchni lub wysokości pików) od stężenia związku można przedstawić graficznie (rysunek 16).



Rysunek 16. Przykłady krzywych kalibracyjnych, zależność wysokości pików chromatograficznych (h) od stężenia badanego związku (c)

Współczynnik a określa czułość metody; im większe zmiany parametru mierzonego na jednostkę stężenia c , tym większa jego wartość i tym wyższa czułość metody. Metody o małym kącie nachylenia krzywych kalibracyjnych nie są przydatne do celów analitycznych. Wartość stała b może przyjmować wartości dodatnie, ujemne lub zero.

W metodzie krzywej kalibracyjnej przygotowuje się szereg roztworów o znanych stężeniach substancji analizowanych oraz tzw. **ślepią próbę** – roztwór, w którym są wszystkie składniki roztworów wzorcowych z wyjątkiem analitu. Następnie wykonuje się analizę chromatograficzną każdego roztworu i mierzy się pole powierzchni (lub wysokość) piku substancji analizowanej. Pole powierzchni lub wysokość piku mierzy się również dla próbki badanej, nanosi na krzywą kalibracyjną i odczytuje stężenie analitu w próbce badanej lub oblicza się je z równania prostej.

Metodę krzywej kalibracyjnej stosuje się wtedy, kiedy można z dużą dokładnością wyznaczyć objętość dozowanych próbek. Jest to najczęściej stosowana metoda analizy ilościowej w chromatografii cieczowej.

1.8.2. Metoda wzorca wewnętrznego

W metodzie wzorca wewnętrznego do badanej próbki dodaje się określoną ilość wzorca (substancji standardowej), dobrze oddzielającego się w danych warunkach analizy od wszystkich badanych składników próbki. Wzorzec powinien mieć właściwości fizyko-chemiczne maksymalnie zbliżone do właściwości substancji badanej, **nie może być składnikiem analizowanej próbki**, poza tym powinien być nielotny, trwały i dostępny w postaci czystej. Ilość dodanego wzorca powinna być porównywalna z ilością badanej substancji.

Sygnal większości detektorów zależy od rodzaju analizowanych związków i dlatego **stosunek wysokości (lub powierzchni) pików dwóch związków nie jest równy stosunkowi ich zawartości w mieszaninie**. W chromatografii gazowej odpowiedź detektora płomieniowo-jonizacyjnego (FID) jest wprost proporcjonalna do liczby atomów węgla niezwiązanych z tlenem a nie do masy związku. Równania krzywej kalibracyjnej dla analitu i dla wzorca, który jest inną substancją, nie będą identyczne. Metodę wzorca wewnętrznego można zastosować, jeżeli wartości b w obu równaniach będą równe zero.

$$\begin{cases} h_a = a_a c_a \\ h_w = a_w c_w \end{cases} \quad (35)$$

gdzie:

h_a – wysokość piku analitu,

a_a – współczynnik kierunkowy prostej (analit),

c_a – stężenie analitu w próbce dozowanej do chromatografu,

h_w – wysokość piku wzorca,

a_w – współczynnik kierunkowy prostej (wzorzec),

c_w – stężenie wzorca w próbce dozowanej do chromatografu.

Równania można podzielić stronami:

$$\frac{h_a}{h_w} = \frac{a_a c_a}{a_w c_w} \quad (36)$$

Wprowadzając tzw. współczynnik odpowiedzi f :

$$f = \frac{a_a}{a_w} \quad (37)$$

Otrzymuje się równania stosowane w metodzie wzorca wewnętrznego:

$$\frac{h_a}{h_w} = f \frac{c_a}{c_w} \quad (38)$$

$$\frac{h_a}{h_w} = f \frac{m_a}{m_w} \quad (39)$$

gdzie:

- c_a – stężenie analitu w próbce,
- m_a – masa analitu w próbce,
- c_w – stężenie wzorca w próbce.
- m_w – masa wzorca w próbce,
- f – współczynnik odpowiedzi.

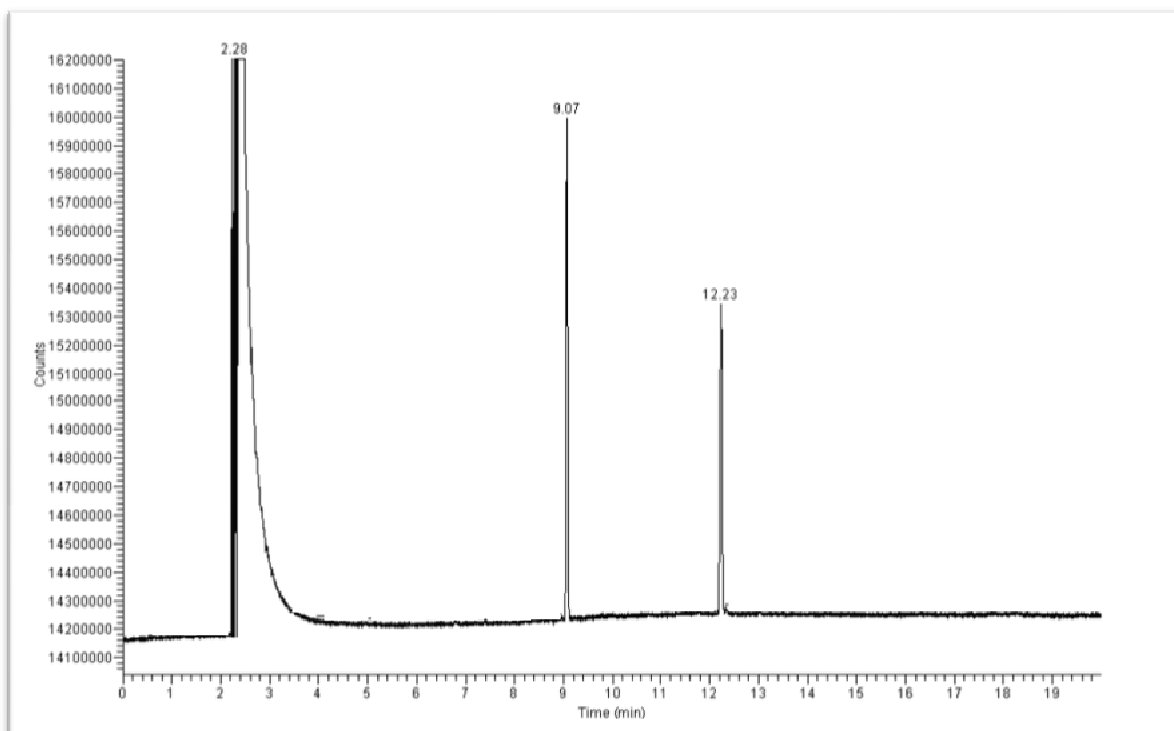
Podobną postać mają również równania wykorzystywane w metodzie wzorca wewnętrznego w przypadku, kiedy mierzy się pole powierzchni pików a nie jego wysokość.

Współczynnik odpowiedzi jest wartością charakterystyczną dla określonej pary związków chemicznych, analitu i wzorca wewnętrznego, zależną od warunków przeprowadzanej analizy.

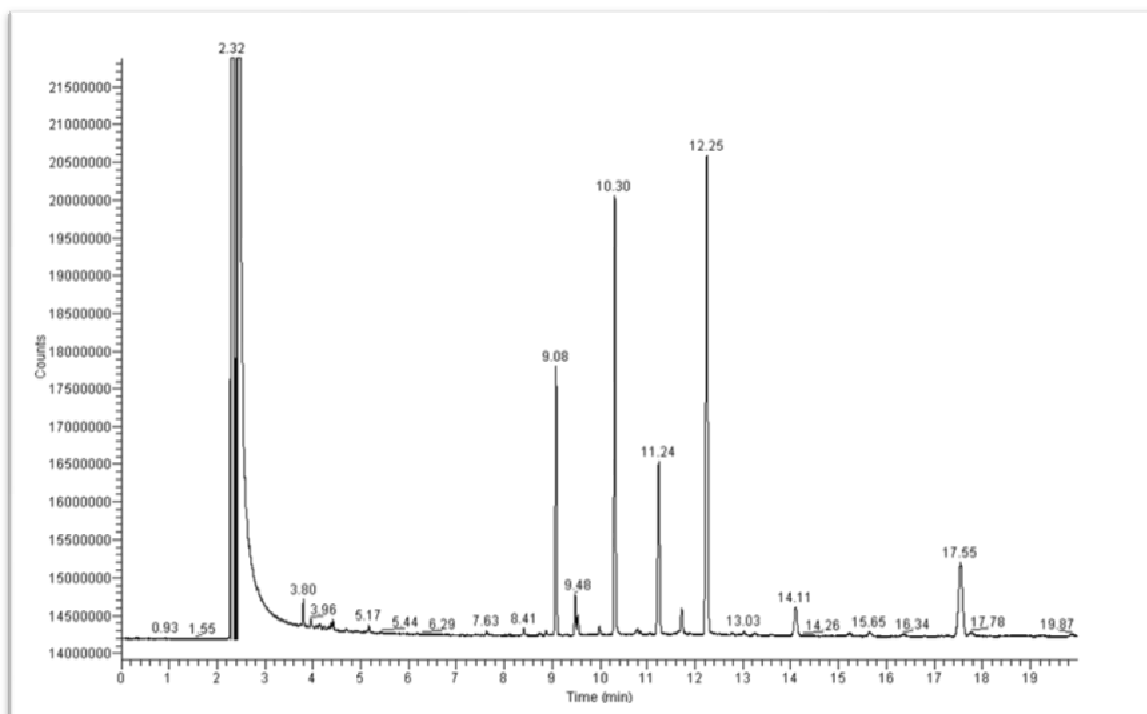
Wykonanie analizy składa się z dwóch etapów. W pierwszym etapie przygotowuje się roztwór wzorcowy zawierający analit oraz wybrany wzorzec wewnętrzny o określonych znanych stężeniach (c_a' oraz c_w'). Wykonuje się analizę roztworu wzorcowego i mierzy wysokość pików analitu oraz wysokość pików wzorca wewnętrznego (h_a' oraz h_w') (rysunek 17). Znając wartości c_a' , c_w' , h_a' oraz h_w' , można wyznaczyć eksperymentalnie wartość współczynnika detekcji f , korzystając z wzoru (38) lub (39), stosowanego w metodzie wzorca wewnętrznego.

W drugim etapie dodaje się określoną znaną ilość wzorca wewnętrznego do badanej próbki (c_w), wykonuje analizę roztworu próbki i mierzy wysokość pików analitu oraz wysokość pików wzorca wewnętrznego (h_a oraz h_w) (rysunek 18). Znając wartość wyznaczonego wcześniej współczynnika detekcji f , korzysta się z wzoru (38) lub (39), stosowanego w metodzie wzorca wewnętrznego i oblicza zawartość analitu w próbce.

Metoda wzorca wewnętrznego jest często stosowana w chromatografii gazowej. Powodem jest przede wszystkim mnogość operacji wykonywanych na próbce (min. ekstrakcji i przeprowadzania jej w pochodne odpowiednie do analizowania metodą GC), w których czasie może nastąpić pewna utrata próbki. Inne przyczyny to: problemy z określeniem małych objętości rozpuszczalnika, w którym rozpuszcza się badaną próbkę, niemożność uzyskania powtarzalnego dozowania przy zastosowaniu dozownika z dzieleniem oraz to, że eliminuje się konieczność wykonania krzywej kalibracyjnej.



Rysunek 17. Chromatogram GC-FID roztworu wzorcowego, wzorzec wewnętrzny ($t_R = 9,07$ min; $c = 1$ mg/ml) oraz analit ($t_R = 12,23$ min; $c = 1$ mg/ml); na podstawie zamieszczonych danych można obliczyć wartość współczynnika detekcji f (sposób wyznaczania wysokości pików chromatograficznych jest wyjaśniony na rysunku 4)



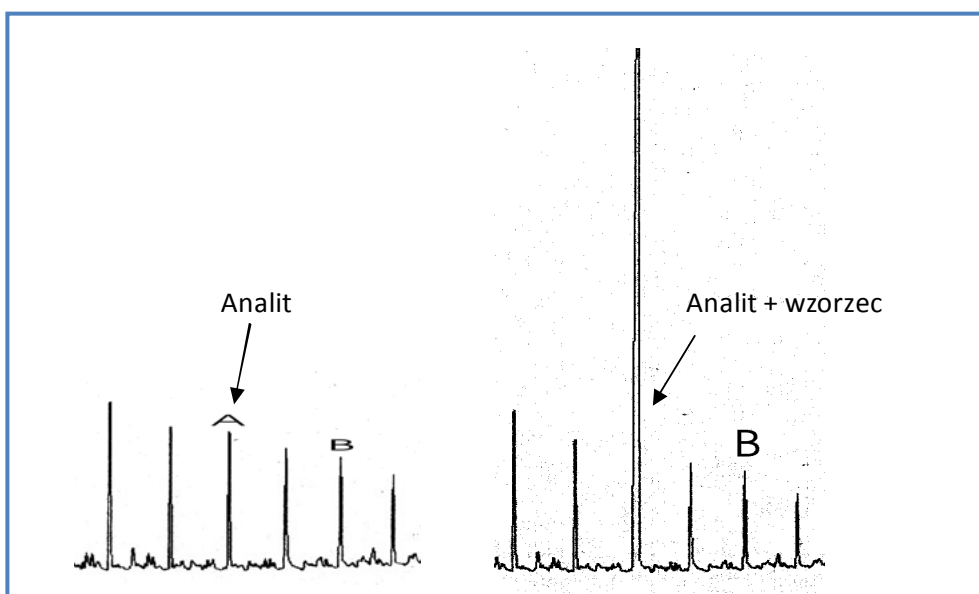
Rysunek 18. Chromatogram GC-FID badanej próbki, wzorzec wewnętrzny ($t_R = 9,08$ min; $c = 0,4$ mg/ml) oraz analit ($t_R = 12,25$ min) (na podstawie zamieszczonych danych oraz wyznaczonej wartości współczynnika detekcji f można obliczyć stężenie analitu w próbce)

1.8.3. Metoda dodatku wzorca

Metodę dodatku wzorca stosuje się, jeżeli równanie krzywej kalibracyjnej ma przebieg prostoliniowy zaś wartość b jest równa zero. Ponadto, objętość próbki wprowadzanej na kolumnę chromatograficzną musi być stała. Warunek ten jest spełniony w przypadku stosowania dozowników z pętlą dozowniczą. Procedura oznaczeń w metodzie dodatku wzorca jest następująca:

- pobiera się dwie identyczne próbki 1 i 2,
- przygotowuje się próbkę 1 i wykonuje analizę chromatograficzną, mierząc pole powierzchni lub wysokość piku analitu;
- do próbki 2 dodaje się **znaną ilość wzorca, który jest badaną substancją** (analitem), roztwór miesza i wykonuje analizę chromatograficzną, mierząc pole powierzchni lub wysokość piku analitu; wartość parametru mierzonego wzrasta, a wzrost jest proporcjonalny do ilości dodanego analitu (rysunek 19).

Wynikiem dodania roztworu wzorca jest zmiana objętości próbki badanej, stąd należy skorygować stężenia. W przypadku stosowania mikrostrzykawkę i wprowadzania niewielkich (rzędu kilku μl) objętości roztworu wzorca do analizowanej próbki, które nie wpływają w zasadniczy sposób na zmianę objętości próbki, taka korekta objętości nie jest konieczna.



Rysunek 19. Chromatogramy próbki 1 (z lewej) oraz próbki 2 z dodatkiem wzorca (z prawej)

Stężenie analitu można wyliczyć na podstawie układu dwóch równań:

$$\begin{cases} h_1 = ac \\ h_2 = a(c + c_w) \end{cases} \quad (40)$$

gdzie:

h_1 – wysokość piku analitu zmierzona dla próbki 1 bez dodatku wzorca,

a – współczynnik kierunkowy prostej,

c – stężenie analitu w badanej próbce,

h_2 – wysokość pików zmierzona dla próbki 2 po dodaniu wzorca,
 c_w – stężenie wzorca w badanej próbce.

Z równania pierwszego oblicza się a :

$$a = \frac{h_1}{c} \quad (41)$$

Po podstawieniu a do równania drugiego otrzymuje się:

$$h_2 = \frac{h_1}{c} (c + c_w) \quad (42)$$

Po rozwiązaniu równania względem c otrzymuje się równanie stosowane w metodzie dodatku wzorca:

$$c = \frac{h_1 c_w}{h_2 - h_1} \quad (43)$$

1.8.4. Metoda normalizacji wewnętrznej

Metoda normalizacji wewnętrznej polega na wyznaczeniu udziału procentowego wszystkich substancji w próbce. Jest to najprostsza metoda analizy ilościowej, umożliwiająca oszacowanie względnych ilości składników próbki, na przykład przy oznaczaniu czystości próbki. Warunkiem koniecznym stosowania metody normalizacji wewnętrznej jest, aby wszystkie składniki próbki (anality) wyluowały z kolumny chromatograficznej i zostały zarejestrowane na chromatogramie. Metoda normalizacji wewnętrznej jest stosowana przede wszystkim w chromatografii gazowej (GC-FID) natomiast nie jest stosowana w chromatografii cieczowej.

Metoda prostej normalizacji wewnętrznej

Powierzchnie pików chromatograficznych mierzy się, a ich sumę przyjmuje za 100% próbki (pomijając pik rozpuszczalnika, w którym rozpuszczono próbkę badaną. Powierzchnia sygnału określonego związku w stosunku do sumy powierzchni wszystkich sygnałów odpowiada zawartości związku w próbce:

$$\%_i = \frac{A_i}{\sum A_i} 100 \quad (44)$$

gdzie:

$\%_i$ – udział % określonego analitu w próbce,
 A_i – powierzchnia pików określonego analitu.

Jednakże, aby uzyskać dokładne wyniki, detektor musi wykazywać taką samą odpowiedź (takie same współczynniki detekcji) dla wszystkich analitów obecnych w próbce.

Metoda normalizacji wewnętrznej z zastosowaniem współczynników korekcyjnych

Jeśli analizuje się związki o podobnych właściwościach fizykochemicznych, tak jak na przykład składniki szeregu homologicznego, to nie jest konieczne wyznaczanie współczynników korekcyjnych (dla substancji o różnych właściwościach fizykochemicznych należy je koniecznie wprowadzić, w przeciwnym wypadku otrzyma się tylko szacunkowe wyniki ilościowe).

W celu wyznaczenia współczynników korekcyjnych sporządza się roztwór wzorcowy, zawierający znane ilości wszystkich analitów występujących w badanej próbce i oblicza jego skład procentowy. Po wykonaniu analizy chromatograficznej roztworu wzorcowego wyznacza się współczynniki korekcyjne dla każdego analitu:

$$f_i = \frac{S_{i(m)}}{S_{i(chr)}} \quad (45)$$

gdzie:

f_i – współczynnik korekcyjny określonego analitu,

$S_{i(m)}$ – zawartość procentowa określonego analitu w roztworze wzorcowym obliczona przy uwzględnieniu naważek wszystkich składników,

$S_{i(chr)}$ – zawartość procentowa określonego analitu w roztworze wzorcowym wyznaczona na podstawie analizy chromatograficznej roztworu wzorcowego.

Dysponując wyznaczonymi współczynnikami korekcyjnym dla każdego analitu w próbce można obliczyć dokładną (skorygowaną) zawartość procentową każdego analitu w badanej próbce:

$$\%_i = \frac{f_i \times A_i}{\sum (f_i \times A_i)} 100 \quad (46)$$

gdzie:

$\%_i$ – udział % określonego analitu w próbce,

A_i – powierzchnia piku określonego analitu,

f_i – współczynnik korekcyjny określonego analitu.

2. Chromatografia cieczowa

2.1. Wstęp

Chromatografia cieczowa jest rodzajem chromatografii, w której fazą ruchomą jest ciecz, natomiast fazą stacjonarną może być ciało stałe (chromatografia adsorpcyjna) lub ciecz osadzona na nośniku (chromatografia podziałowa). Warunkiem stosowania chromatografii cieczowej jest rozpuszczalność w fazie ruchomej analitów rozdzielanych. Za pomocą chromatografii cieczowej można analizować około 80% znanych związków chemicznych, stosując różne jej rodzaje, klasyfikowane wg kilku głównych kryteriów.

Ze względu na geometrię układu chromatografię cieczową można podzielić na:

- chromatografię kolumnową,
- chromatografię planarną.

Chromatografię kolumnową można dalej podzielić na:

- chromatografię kolumnową niskociśnieniową (zwykłą, tradycyjną),
- wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC).

Ze względu na mechanizm oddziaływania rozdzielanych związków z fazą stacjonarną, chromatografię cieczową można podzielić na:

- chromatografię adsorpcyjną,
- chromatografię podziałową,
- chromatografię jonową,
- chromatografię jonowo-asocjacyjną,
- chromatografię wykluczania,
- chromatografię powinowactwa.

W chromatografii cieczowej na przebieg i efekty separacji związków wpływają właściwości zarówno fazy stacjonarnej jak i fazy ruchomej. Chromatografię adsorpcyjną oraz chromatografię podziałową dzieli się na chromatografię w normalnym układzie faz oraz chromatografię w odwróconym układzie faz. Jeżeli faza stacjonarna jest polarna to faza ruchoma jest mniej polarna lub niepolarna. Jest to **chromatografia w normalnym układzie faz (NP)**. W chromatografii w normalnym układzie faz jako składniki fazy ruchomej stosuje się niepolarne rozpuszczalniki, takie jak: heksan, eter izopropylowy, chloroform i in. (*patrz rozdział 2.3.4*). Rozpuszczalniki sklasyfikowane według wzrastającej polarności, a tym samym według wzrastającej mocy elucyjnej w chromatografii w normalnym układzie faz nazywamy **szeregiem eluotropowym rozpuszczalników** (*por.roz. II. 2.3.4, tab. 1*).

Czas retencji związku rozdzielanego w chromatografii w normalnym układzie faz ulega skróceniu, jeżeli zastosuje się rozpuszczalnik o większej sile elucyjnej (większej polarności) natomiast wydłuży się, jeżeli zastosuje się rozpuszczalnik o mniejszej sile elucyjnej (mniejszej

W chromatografii w normalnym układzie faz, jako fazę stacjonarną stosuje się przede wszystkim żel krzemionkowy (*por.roz. II.2.3.3*), a także fazy związane chemicznie, w których struktury wchodzą polarne grupy funkcyjne.

Jeżeli faza stacjonarna jest niepolarna, to faza ruchoma jest polarna. Jest to **chromatografia w odwróconym układzie faz (RP)**. W chromatografii w odwróconym układzie faz składnikami fazy ruchomej są rozpuszczalniki polarne, takie jak: mieszanina woda-metanol lub woda-acetonitryl.

Wzrost zawartości wody w fazie ruchomej powoduje wydłużenie czasów retencji związków rozdzielanych i odwrotnie – wzrost zawartości modyfikatora organicznego (metanolu lub acetonitrylu) w fazie ruchomej powoduje skrócenie czasów retencji związków rozdzielanych w chromatografii w odwróconym układzie faz.

Niejednokrotnie w układach fazy ruchomej znajdują się także odpowiednie roztwory buforowe, umożliwiające utrzymanie odpowiedniego pH w trakcie procesu separacyjnego.

Elucję, czyli wymywanie rozdzielanych związków z fazy stacjonarnej za pomocą fazy ruchomej, można prowadzić jednym rozpuszczalnikiem lub jedną mieszaniną rozpuszczalników o określonym stałym składzie i jest to elucja izokratyczna.

Elucja izokratyczna jest to rodzaj elucji, podczas której skład jakościowy i ilościowy fazy ruchomej pozostaje stały.

Elucja gradientowa polega na tym, że prowadzi się wymywanie kolejno kilkoma rozpuszczalnikami lub kolejno kilkoma mieszaninami rozpuszczalników, o wzrastającej lub malejącej mocy elucyjnej.

Elucja gradientowa jest to rodzaj elucji, w którym skład fazy ruchomej zmienia się w sposób ciągły lub stopniowo.

2.2. Chromatografia cienkowarstwowa

2.2.1. Wstęp

Termin chromatografia cienkowarstwowa (TLC) został wprowadzony przez E. Stahla w 1956 i oznacza proces chromatograficzny prowadzony na cienkiej warstwie fazy stacjonarnej, naniesionej na podłoże z płytek szklanych lub z folii aluminiowych czy polimerowych (*por. roz. III.1.1, rysunek 2*). TLC jest rodzajem chromatografii cieczowej planarnej.

Zaletą chromatografii cienkowarstwowej jest przede wszystkim możliwość analizy substancji nielotnych lub o małej lotności, zarówno substancji niepolarnych, polarnych lub o średniej polarności, a także w formie zjonizowanej. Jednak przede wszystkim głównymi zaletami tej techniki wciąż pozostają prostota i niska cena sprzętu, niewymagającego dostępu do elektryczności. Warunki analiz TLC mogą być łatwo modyfikowane z możliwością stosowania realtywnie reaktywnych rozpuszczalników jak i próbek, co jest ograniczeniem w chromatografii kolumnowej (niektóre próbki czy reaktywne rozpuszczalniki mogą zniszczyć lub uszkodzić kolumnę GC lub HPLC). Kolejną zaletą jest również łatwość detekcji, dzięki której wszystkie składniki próbki mogą być monitorowane, co jest ważne przy sprawdzaniu czystości próbki.

Obecnie chromatografię cienkowarstwową stosuje się powszechnie w:

- analizie farmaceutycznej, głównie przy identyfikacji analitów, testach czystości, oznaczaniu składników aktywnych, pomocniczych i konserwantów oraz kontroli procesu produkcji,
- analizie medycznej, kryminalistycznej i biochemicznej przy oznaczaniu aktywnych substancji i ich metabolitów w matrycach biologicznych oraz przy diagnostyce chorób,
- analizie kosmetycznej przy analizie surowców i produktów, konserwantów, środków powierzchniowo-czynnych, kwasów tłuszczowych, składników perfum i innych,
- analizie żywności przy oznaczaniu pestycydów i środków grzybobójczych w wodzie pitnej, oznaczaniu substancji zakazanych w warzywach, mięsie, oznaczaniu witamin i innych,
- analizie zanieczyszczeń środowiska (sporadycznie).

2.2.2. Proces chromatograficzny

Proces chromatograficzny przeprowadza się w odpowiednich komorach chromatograficznych (rysunek 20). Próbkę nanosi się na płytkę TLC w postaci roztworu o bardzo małej objętości, tworząc małą plamkę w punkcie startowym (rysunek 2). Płytki umieszcza się w komorze chromatograficznej, w której na dnie znajduje się faza ruchoma. W wyniku działania sił kapilarnych faza ruchoma wędruje w górę płytki. Jest to proces rozwijania chromatogramu **metodą wstępującą**.

Oddziaływanie substancji znajdujących się w próbce z adsorbentem oraz z poruszającym się rozpuszczalnikiem powoduje rozdzielanie się składników próbki na płytce. W wyniku rozdzielania poszczególne składniki tworzą oddzielne plamki. W przedstawionym na rysunku 2 rozdziale TLC, plamka z lewej strony nie uległa rozdzielaniu (lub jest pojedynczą substancją) natomiast plamka z prawej strony uległa rozdzielaniu.

Proces separacji składników próbki naniesionej na płytkę TLC nazywa się rozwijaniem chromatogramu.

Plamki rozdzielonych składników (o ile nie posiadają grup chromoforowych w zakresie widzialnym) uwidacznia się, czyli wywołuje.

Chromatogramy wywołuje się najczęściej odczynnikami chemicznymi, które tworzą barwne związki z analitami. Często ogląda się chromatogramy TLC oświetlane nadfioletem, aby zobaczyć substancje wykazujące właściwości fluorescencyjne pod wpływem promieniowania UV.

W chromatografii cienkowarstwowej stosuje się takie same fazy ruchome, jak w kolumnowej chromatografii cieczowej, dlatego dobór fazy ruchomej jest oparty na tych samych zasadach (*por. roz. III.2.3.4.*). Fazy stacjonarne stosowane w TLC są również podobne, jak w kolumnowej chromatografii cieczowej i są opisane w następnych rozdziałach. Najbardziej popularną fazą stacjonarną stosowaną w TLC jest żel krzemionkowy (*por. roz. III.2.3.3.*). Średni rozmiar cząstek złoża fazy stacjonarnej to 11 μm w analitycznej TLC i 5 μm w wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC), natomiast w preparatywnej TLC - powyżej 20 μm . W chromatografii cienkowarstwowej stosuje się również złoża chemicznie zmodyfikowane, np. grupami NH_2 (normalny układ faz) lub grupami oktadecylowymi C-18 (odwrócony układ faz).



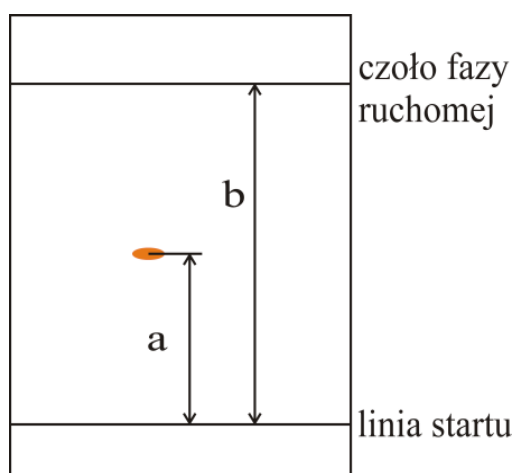
Rysunek 20. Komora do chromatografii cienkowarstwowej

Podstawowym parametrem w chromatografii cienkowarstwowej, który określa położenie substancji na chromatogramie, jest współczynnik opóźnienia R_F . Jest to stosunek drogi migracji substancji (a) do drogi przebytej przez fazę ruchomą (b):

$$R_F = \frac{a}{b} \quad (51)$$

Współczynnik opóźnienia przyjmuje wartości od 0 do 1. Jest charakterystyczny dla danej substancji w danych warunkach chromatograficznych i może służyć do jej identyfikacji.

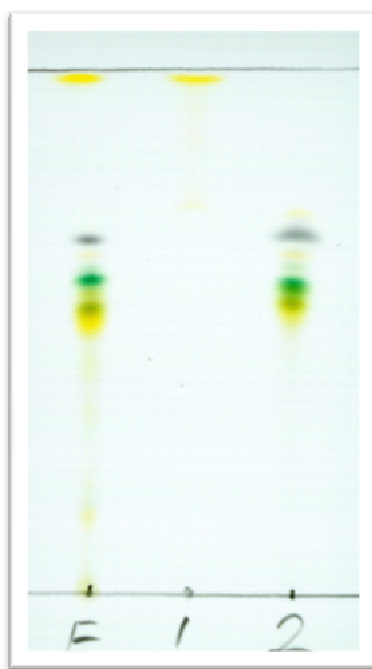
Sposób jego wyznaczania jest pokazany na rysunku 21.



Rysunek 21. Sposób pomiaru współczynnika opóźnienia R_F

Jeżeli dana substancja ma tę samą wartość współczynnika opóźnienia, jaką ma wzorzec, wyznaczoną w takich samych warunkach chromatograficznych, to prawdopodobnie jest identyczna ze wzorcem. Najczęściej analizę jakościową wykonuje się w ten sposób, że na jedną płytkę TLC nanosi się badaną

próbkę oraz obok nanosi się również wzorzec. Po rozwinięciu płytki sprawdza się, która plamka badanej próbki ma taką samą wartość współczynnika opóźnienia jak wzorzec. Na rysunku 22 przedstawiono chromatogram TLC ekstraktu barwników wyizolowanych ze szpinaku. W punkcie E naniesiono cały ekstrakt, w punkcie 1 – wzorzec, którym jest czysty β -karoten a w punkcie 2 – jedną z frakcji, wydzieloną z ekstraktu metodą niskociśnieniowej chromatografii preparatywnej. β -karoten stanowi pomarańczową plamkę o wartości R_f bliskiej jedności. Podobna plamka znajduje się w całym ekstrakcie, natomiast wydzielona frakcja nie zawiera β -karotenu.



Rysunek 22. Przykładowy chromatogram TLC ekstraktu barwników ze szpinaku (E), wzorca β -karotenu (1) i frakcji ekstraktu wydzielonej metodą niskociśnieniowej chromatografii preparatywnej (2)

Wyróżniamy następujące sposoby rozwijania chromatogramów:

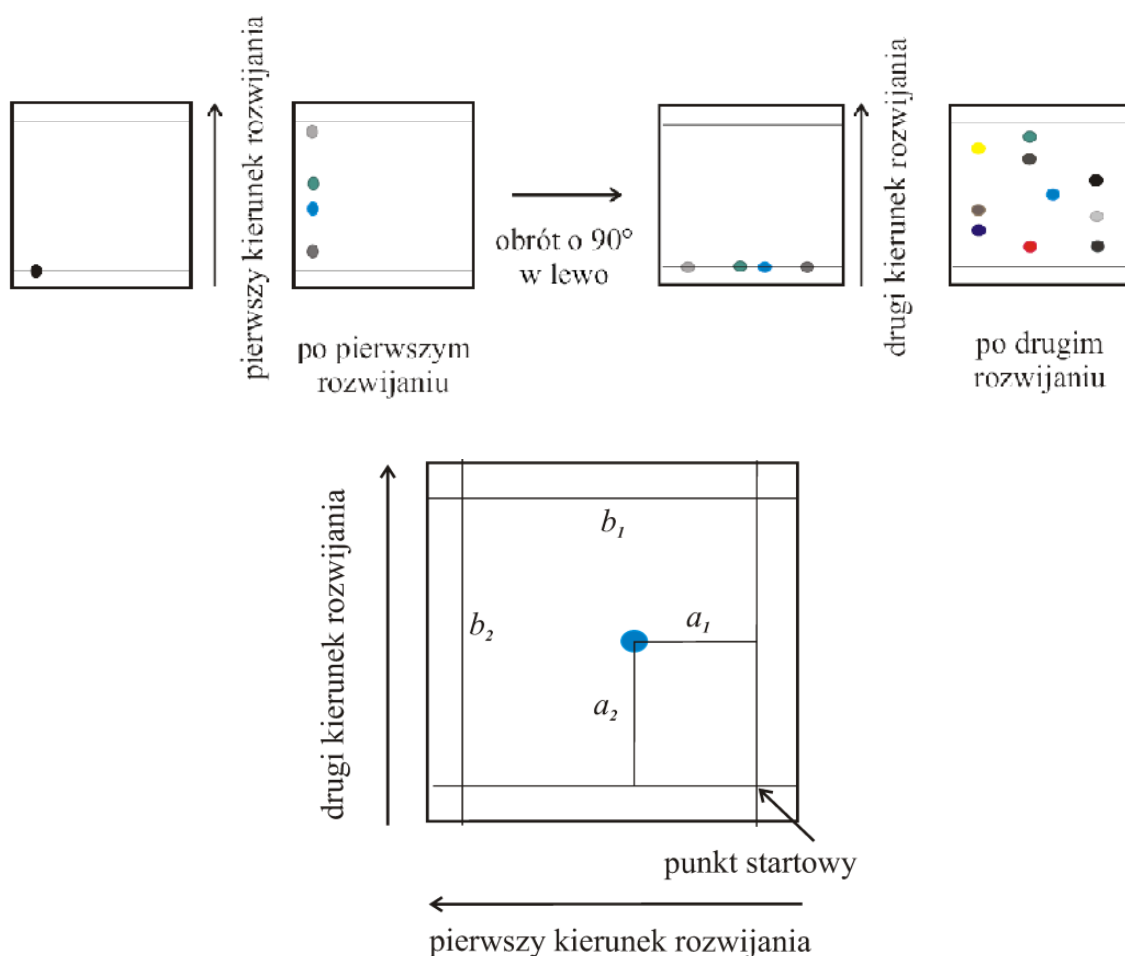
- metoda wstępująca (rysunek 2 i 22), która jest najczęściej stosowana,
- metoda zstępująca (spływowa), polegająca na tym, że rozpuszczalnik podawany jest od góry płytki TLC; w metodzie tej ruch fazy ruchomej wywołowany jest siłami kapilarnymi i dodatkowo siłą ciężenia (w praktyce bardzo rzadko używana),
- metoda dwukierunkowa (dwuwymiarowa), 2D-TLC (rysunek 23),
- metoda horyzontalna, polegająca na rozwijaniu chromatogramu na płytkach ułożonych poziomo w specjalnej komorze.

Niekiedy mieszaniny związków są trudne do rozdzielania za pomocą jednowymiarowych technik TLC. Często ma to miejsce w przypadku mieszanin związków naturalnych. Aby uzyskać pełne rozdzielanie związków o podobnych właściwościach chemicznych stosuje się technikę dwuwymiarową (2D-TLC). Pojedynczą próbkę nanosi się w jednym rogu płytki TLC, którą następnie rozwija się w pierwszym kierunku (rys. 23), uzyskując częściowe rozdzielanie składników próbki (cztery frakcje).

Chromatogram po wysuszeniu i obróceniu o 90° jest rozwijany ponownie, ale w drugim kierunku (prostopadłym do pierwszego) i z użyciem fazy ruchomej o innym składzie. Tym samym cztery uzyskane frakcje (plamki) stanowią punkty startowe. W wyniku drugiego procesu rozdzielania, każda z frakcji ma możliwość separacji na pojedyncze składniki: frakcje pierwsza, trzecia i czwarta (od prawej) są mieszaniną 3 substancji, frakcja druga jest pojedynczym związkiem.

W dwuwymiarowej chromatografii cienkowarstwowej położenie substancji na chromatogramie określają dwa współczynniki opóźnienia: $R_{F1} = a_1/b_1$ oraz $R_{F2} = a_2/b_2$.

Sposób wyznaczania obu współczynników przedstawiony jest na rysunku 23.



Rysunek 23. Dwuwymiarowa chromatografia cienkowarstwowa (2D-TLC); zasada rozwijania oraz sposób wyznaczania wartości współczynników opóźnienia w obu kierunkach rozwijania: $R_{F1} = a_1/b_1$ oraz $R_{F2} = a_2/b_2$

2.2.3. Zasady dobrej praktyki laboratoryjnej w TLC

Płytki TLC gotowe do użycia są dostępne komercyjnie. Płytki są pakowane i przechowywane w odpowiednich pudełkach. **Można je łatwo uszkodzić, co negatywnie wpływa na proces**

chromatograficzny. Przestrzeganie pewnych zasad pozwala poprawnie przeprowadzić rozdzielanie na płytkach TLC.

Zasady poprawnego rozdziału na płytkach TLC:

- **powierzchni płytek nie wolno dotykać palcami,**
- **przy cięciu płytki nożyczkami nie wolno zniszczyć warstwy fazy stacjonarnej,**
- **dobrze jest usunąć ukruszoną część fazy stacjonarnej z brzegu, który był płytki,**
- **dobrze jest wstępnie przemyć płytkę TLC metanolem lub innym rozpuszczalnikiem, używanym później do rozwijania chromatogramu, aby pozbyć się zanieczyszczeń zaabsorbowanych w fazie stacjonarnej; przemytą płytkę suszy się i przechowuje w szczelnie zamkniętym naczyniu,**
- **fazę stacjonarną (żel krzemionkowy) można aktywować, poprzez suszenie płytki TLC w ciągu 30 minut w temp. 120 °C dla usunięcia części zaadsorbowanej wody z żelu krzemionkowego, obniżającej jego aktywność (aktywowane płytki przechowuje się w szczelnie zamkniętym naczyniu),**
- **na płytce delikatnie zaznacza się miękkim ołówkiem jedynie punkt startowy i ewentualnie linię końcową czoła fazy ruchomej, za pomocą niewielkiej kreski o szerokości 0,5 cm z boku płytki. Opis nanoszonych próbek najlepiej zamieścić w zeszyte laboratoryjnym a nie na płytce TLC. Zniszczenie powierzchni fazy stacjonarnej poprzez rysowanie na płytce powoduje błędy w analizach TLC.**

Nanoszenie próbki na płytkę TLC

Punkt startowy, gdzie nanosi się próbkę, nie powinien być za nisko na płytce TLC, aby plamka nie była zanurzona w fazie ruchomej. Z tego samego powodu, przy wkładaniu płytki do komory chromatograficznej, należy unikać gwałtownych ruchów. Należy ponadto pamiętać, że im mniejsza jest objętość naniesionego roztworu próbki tym lepiej. Przy analizie jakościowej nanosi się od 0,5 do 2,0 μl roztworu próbki, przy określaniu czystości próbki - około 10 μl nanoszonych w niewielkich porcjach. Plamka naniesionej próbki powinna być jak najmniejsza. Średnica plamki nie powinna przekraczać 2 mm. Należy także starannie wybrać rozpuszczalnik do rozpuszczenia próbki: im mniejsza siła elucyjna rozpuszczalnika tym lepiej, bo uzyskuje się plamkę o mniejszej średnicy, im lotniejszy rozpuszczalnik, tym łatwiej go usunąć. Z plamki naniesionej próbki należy usunąć rozpuszczalnik. W przypadku lotnych związków rozpuszczonych w lotnym rozpuszczalniku, pozostawia się płytkę na kilka minut w temp. pokojowej., Do suszenia nie powinno się stosować suszarki do włosów, choć jest dość powszechnie używana w większości laboratoriów (lotne związki mogą zostać usunięte ze strumieniem powietrza). W przypadku termicznie stabilnych substancji, rozpuszczonych w chloroformie lub metanolu płytkę pozostawia się na 20 minut w suszarce, w temperaturze bliskiej temperatury wrzenia rozpuszczalnika, tu stosowanie suszarki do włosów może być niewystarczające.

Rozwijanie chromatogramów TLC

W tym procesie niezbędne jest odpowiednie, wcześniejsze nasylenie komory chromatograficznej oparami fazy ruchomej.

Należy pamiętać, iż każda płytka „ma prawo” do swojej własnej fazy ruchomej. Oznacza to, że nie wolno używać komory chromatograficznej napełnionej jedną fazą ruchomą do rozwijania kolejnych płytek TLC, zwłaszcza, jeśli używa się fazy ruchomej będącej mieszaniną kilku rozpuszczalników.

Podczas chromatografowania może nastąpić zmiana składu fazy ruchomej, dlatego komorę należy napełniać świeżą fazą ruchomą przed rozwijaniem każdej płytki. Jeżeli faza ruchoma jest jednoskładnikowa, to sprawdza się jej czystość i ilość, i ewentualnie uzupełnia lub wymienia. Najlepiej używać świeżo przygotowanej fazy ruchomej. Przechowywane przez długi czas roztwory fazy ruchomej mogą zmieniać swój skład i w sposób negatywny wpływać na wynik analizy. Komora chromatograficzna nie powinna stać pod wyciągiem laboratoryjnym w trakcie rozwijania chromatogramu. Przepływ powietrza zmienia temperaturę, a to wpływa na rozdzielanie chromatograficzne. **Nie wolno także poruszyć komory chromatograficznej w trakcie rozwijania chromatogramu.**

2.3. Chromatografia kolumnowa niskociśnieniowa

2.3.1. Wstęp

Zaletą niskociśnieniowej chromatografii kolumnowej jest możliwość rozdzielania dużych ilości próbki, zazwyczaj większych niż za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Z tego powodu ten rodzaj chromatografii jest najczęściej stosowany, jako rodzaj **chromatografii preparatywnej pozwalającej na separację dużych ilości związków.**

W chromatografii kolumnowej niskociśnieniowej stosuje się zarówno polarne jak i niepolarne fazy stacjonarne. Stosowanie w chromatografii niskociśnieniowej faz stacjonarnych niepolarnych (chromatografia w odwróconym układzie faz, RP) jest dużo rzadsze niż stosowanie faz stacjonarnych polarnych (chromatografia w normalnym układzie faz, NP), ze względu na zdecydowanie wyższą cenę takich źródeł chromatograficznych.

Chromatografią cieczową w normalnym układzie faz jest chromatografia adsorpcyjna, pozwalająca na separację związków organicznych na klasy związków wg ich polarności.

Rozdzielanie mieszaniny związków organicznych, nieróżniących się grupami funkcyjnymi (nieróżniących się polarnościami) wymaga wyższej, niż w chromatografii adsorpcyjnej, rozdzielczości. Separacja w chromatografii adsorpcyjnej zależy od różnic w rodzaju i ilości grup funkcyjnych a nie od różnic w masie cząsteczkowej związków. Złożone mieszaniny mogą więc być podzielone na klasy związków, na przykład: alkanany, alkeny, estry, alkohole i in. Chromatografia cieczowa adsorpcyjna została opisana w rozdziale III.2.4.3.

W preparatywnej chromatografii niskociśnieniowej dominuje używanie żelu krzemionkowego, jako polarnej fazy stacjonarnej. Kolejność elucji związków z kolumny zależy od ich polarności. Związki o niskiej polarności są eluowane jako pierwsze od chwili wprowadzenia, a następnie eluują związki o większej polarności (rysunek 24).



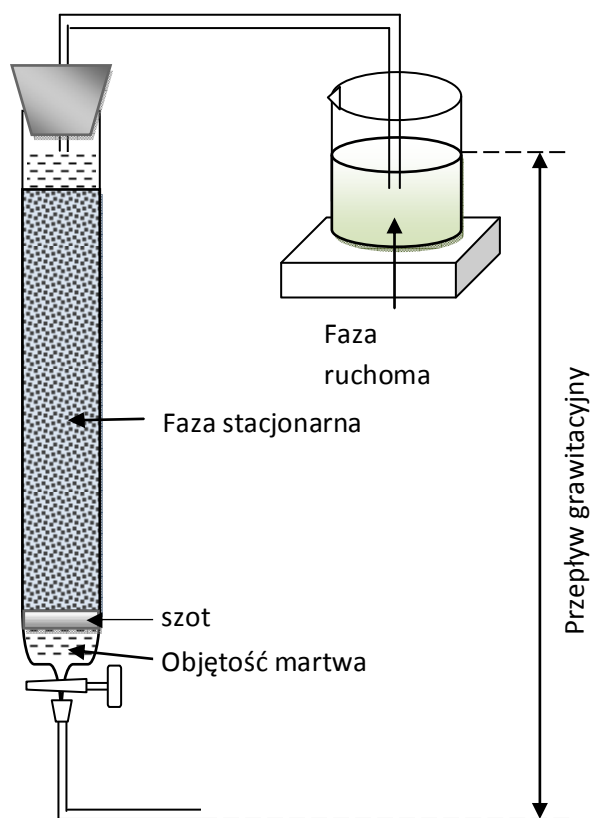
Rysunek 24. Kolejność elucji związków z żelu krzemionkowego [na podstawie *Laboratory Chromatography Guide*. Talamona, 2005]

2.3.2. Proces chromatograficzny

Zasadniczą częścią każdego zestawu do niskociśnieniowej chromatografii kolumnowej jest kolumna ze szkła obojętnego (rysunek 25), której wymiary są dostosowane do skali przeprowadzanego rozdzielania. Najczęściej mieści ona od 10 do 100 g fazy stacjonarnej, co wystarcza do separacji od 0,1 do kilku gramów próbki. Z reguły dobiera się taką ilość fazy stacjonarnej, aby masa rozdzielanej próbki wynosiła 5-10% masy fazy stacjonarnej. Dla przyspieszenia przepływu fazy ruchomej stosuje się słabe ssanie (pompka wodna) lub słabe tłoczenie.

Napełnianie kolumny fazą stacjonarną można przeprowadzać na sucho i na mokro. W metodzie na sucho fazę stacjonarną wsypuje się małymi porcjami do kolumny i ubija pałeczką szklaną. Następnie przemywa się ją fazą ruchomą. Metoda na mokro polega na wprowadzaniu do kolumny zawiesiny fazy stacjonarnej w fazie ruchomej. W obu metodach napełnianie należy wykonać w taki sposób, by złożo było jednorodne, pozbawione pęcherzyków powietrza i tak ułożone, by nie zmieniało objętości w czasie procesu rozdzielania.

Powierzchnia złoża powinna być stale pokryta płynem od chwili nalania pierwszych porcji fazy ruchomej aż do zakończenia procesu chromatograficznego.



Rysunek 25. Zestaw do chromatografii cieczowej niskociśnieniowej

Metoda napełniania kolumny na mokro jest łatwiejsza i częściej stosowana. Rozpoczynając proces chromatograficzny nanosi się badaną próbkę w postaci roztworu na wierzchnią warstwę fazy stacjonarnej, wypełniającą kolumnę. Wybór rozpuszczalnika do nanoszenia próbki zależy przede wszystkim od rozpuszczalności jej składników, poza tym należy wybierać rozpuszczalnik charakteryzujący się możliwie jak najmniejszą siłą elucyjną. Następnie eluuje się, czyli wymywa rozdzielone składniki próbki z fazy stacjonarnej, przepuszczając fazę ruchomą przez kolumnę. Fazę ruchomą wprowadza się do zbiornika na wierzchołku kolumny. Wyptywającą z kolumny fazę ruchomą zawierającą separowane składniki próbki zbiera się, jako tzw. **frakcje**, do kolejnych próbek lub cylindrów miarowych.

Zbieranie frakcji zaczyna się od momentu wprowadzenia próbki na wierzch fazy stacjonarnej, czyli od początku procesu chromatograficznego.

Poszczególne frakcje odparowuje się i bada innymi metodami. Do monitorowania składu frakcji w chromatografii niskociśnieniowej można stosować analizę techniką TLC. Proces rozdzielania LC można również łatwo monitorować, jeżeli związki rozdzielane są barwnikami.

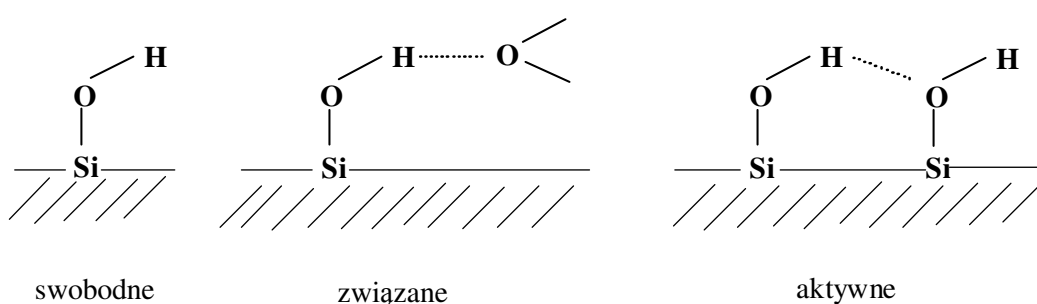
2.3.3. Żel krzemionkowy jako faza stacjonarna

Żel krzemionkowy jest polarnym adsorbentem o ogólnym wzorze sumarycznym $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Jest to materiał porowaty i amorficzny. Kontrolując proces produkcji żelu krzemionkowego, można uzyskać

materiał o bardzo rozwiniętej powierzchni właściwej od 200 do 800 m²/g. Na powierzchni żelu krzemionkowego znajdują się następujące grupy:

- silanolowe: $\equiv\text{Si}-\text{OH}$
- siloksanowe: $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$.

Obecność przede wszystkim polarnych grup silanolowych powoduje, że jest on polarną fazą stacjonarną, stosowaną w chromatografii w normalnym układzie faz. Właściwości różnych grup silanolowych zależą od wzajemnej odległości i przestrzennego rozmieszczenia. Grupy związane, połączone ze sobą wiązaniem wodorowym mają właściwości protonoakceptorowe natomiast grupy silanolowe swobodne oraz aktywne stanowią centra silnie protonodonorowe (rysunek 26). Uważa się, że największą rolę w procesie adsorpcji odgrywają grupy swobodne i aktywne a adsorpcja na powierzchni żelu krzemionkowego polega przede wszystkim na tworzeniu z nimi wiązań wodorowych.



Rysunek 26. Typy grup silanolowych na powierzchni żelu krzemionkowego [na podstawie *Liquid column chromatography: a survey of modern techniques and applications*. Deyl et al., 1975]

Aktywność żelu krzemionkowego zależy od ilości wody zaadsorbowanej na jego powierzchni, gdyż powoduje ona dezaktywację tej powierzchni. Przed użyciem można aktywować żel krzemionkowy poprzez wygrzewanie w temp. 120 °C, aby częściowo usunąć zaadsorbowaną wodę. Żel krzemionkowy jest stosowany w chromatografii cieczowej również jako nośnik ciekłych faz stacjonarnych (*por. roz. III.2.4.4*).

2.3.4. Klasyfikacja rozpuszczalników w normalnym układzie faz

Rozpuszczalniki, które są składnikami fazy ruchomej w chromatografii cieczowej wpływają na rozdzielanie chromatograficzne ze względu na ich **polarność i selektywność**.

Rozpuszczalniki, które są bardziej polarne powodują mniejszą retencję związków w chromatografii w normalnym układzie faz (NP). Efektywność wymywania związku z kolumny napełnionej polarną fazą stacjonarną zależy od mocy elucyjnej (siły elucyjnej) rozpuszczalnika (ϵ_0), która z kolei zależy od jego polarności (P') i można ją wyznaczyć eksperymentalnie. Polarność rozpuszczalników wynosi od $P'=0$ dla niepolarnego rozpuszczalnika, jakim jest pentan, do $P'=10,2$ dla bardzo polarnej wody. W tab. 1 zamieszczone są wartości P' oraz moc elucji popularnych rozpuszczalników, używanych jako składniki faz ruchomych w chromatografii cieczowej.

Rozpuszczalniki sklasyfikowane według wzrastającej mocy elucyjnej nazywa się szeregiem eluotropowym rozpuszczalników.

Znajomość szeregu eluotropowego rozpuszczalników ułatwia dobranie odpowiedniej fazy ruchomej do rozdzielania chromatograficznego badanej mieszaniny związków.

Właściwości rozpuszczalnika, które wpływają na selektywność to:

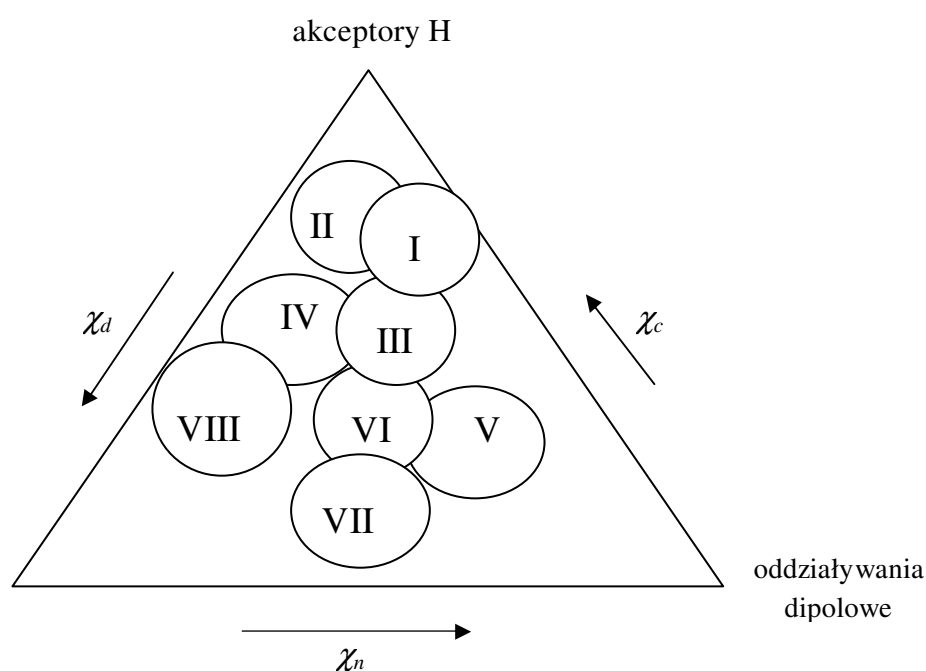
- właściwości zasadowe, czyli zdolność do przyjmowania protonów (akceptor protonów),
- właściwości kwasowe, czyli zdolność do oddawania protonów (donor protonów),
- zdolność do tworzenia dipoli.

Tabela 1. Właściwości wybranych rozpuszczalników. Moc elucyjna rozpuszczalnika (ϵ_0) jest podana dla żelu krzemionkowego[na podstawie *Handbook of HPLC*. Katz *et al.*, 1998]

Rozpuszczalnik	ϵ_0	P'	χ_c	χ_d	χ_n	Grupa
<i>n</i> -Heptan	0,00	-	-	-	-	
<i>n</i> -Heksan	0,00	0,1	-	-	-	
Cykloheksan	-	0,17	-	-	-	
Czterochlorek węgla	0,11	1,56	0,26	0,40	0,34	
Eter izopropylowy	0,32	1,83	0,51	0,10	0,39	I
Chloroform	0,26	4,31	0,31	0,35	0,34	VIII
Chlorek metylenu	0,30	4,29	0,27	0,33	0,40	VII
Eter metylo- <i>tert</i> -butylowy	0,47	-	0,41	0,19	0,40	I
Tetrahydrofuran	0,53	4,28	0,36	0,22	0,42	III
Octan etylu	0,48	4,24	-	-	-	
Trietyloamina	-	2,19	0,66	0,08	0,26	
Acetonitryl	0,52	5,64	0,33	0,25	0,42	VI
Dioksan	0,51	5,27	0,37	0,23	0,40	II
<i>tert</i> -Butanol	-	4,03	0,56	0,20	0,24	II
<i>n</i> -Butanol	-	4,11	0,54	0,18	0,28	II
Izopropanol	0,60	3,92	0,57	0,17	0,26	II
Etanol	-	4,40	0,52	0,19	0,29	II
Metanol	0,70	5,10	0,48	0,22	0,31	II
Woda	-	10,2	0,37	0,37	0,26	VIII

Aby określić udział każdej z właściwości w ogólnej polarności rozpuszczalnika (P') podzielono ją na trzy parametry: χ_c (akceptor protonów), χ_d (donor protonów) oraz χ_n (zdolność do tworzenia dipoli). Na przykład dla chloroformu, który jest średnio polarnym rozpuszczalnikiem ($P' = 4,31$), wartości poszczególnych parametrów wynoszą: $\chi_c = 0,31$, $\chi_d = 0,35$, $\chi_n = 0,34$, co oznacza, że udział właściwości zasadowych wynosi 31%, udział właściwości kwasowych wynosi 35% zaś udział oddziaływań dipolowych wynosi 34% (tabela 1).

Rozpuszczalniki zostały uporządkowane i podzielone na grupy mające podobną selektywność. Klasyfikacja rozpuszczalników ze względu na selektywność jest przedstawiana graficznie w postaci trójkąta selektywności rozpuszczalników (rysunek 27).



Rysunek 27. Trójkąt selektywności rozpuszczalników Snydera [na podstawie *Handbook of HPLC*. Katz *et al.*, 1998]

Grupy rozpuszczalników o podobnej selektywności zachodzą na siebie. Przy wybieraniu rozpuszczalników, jako składników fazy ruchomej należy przestrzegać zasady, że jeżeli rozpuszczalnik z jednej grupy nie ma dostatecznej selektywności to należy wybrać drugi rozpuszczalnik z innej grupy, aby poprawić tę selektywność.

Dwa rozpuszczalniki z tej samej grupy mają podobną selektywność i zamienianie ich nie poprawi rozdzielania chromatograficznego. Na przykład: zastosowanie eteru izopropylowego do separacji nie dało zadowalającej selektywności. Eter izopropylowy należy do grupy I, która znajduje blisko górnego rogu trójkąta. Aby poprawić selektywność rozdzielania należy w drugiej próbie zastosować rozpuszczalnik o odmiennych właściwościach, np. chlorek metylenu z grupy VII, która jest oddalona od grupy I.

Faza ruchoma jest często mieszaniną rozpuszczalników. Jeżeli używa się mieszaniny dwóch rozpuszczalników, to rozpuszczalnik o mniejszej sile elucyjnej oznacza się literą A zaś rozpuszczalnik o większej mocy elucyjnej - B. W normalnym układzie faz, gdy niepolarnym rozpuszczalnikiem organicznym jest na przykład heksan (A) a polarnym na przykład propanol (B), to wzrost zawartości % B w fazie ruchomej zmniejsza retencję badanego związku. Polarność (siła elucyjna) takiej mieszaniny jest korygowana poprzez zawartość rozpuszczalnika nieselektywnego takiego jak heksan lub inne nasycone węglowodory, które nie wpływają na selektywność fazy ruchomej.

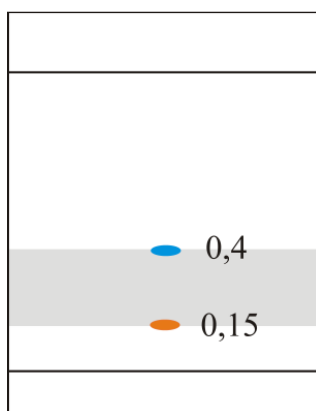
2.3.5. Dobór warunków rozdzielania w chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym za pomocą analizy TLC

Warunki rozdzielania LC na żelu krzemionkowym można przetestować i zaplanować wcześniej za pomocą analizy TLC na płytkach pokrytych również żelem krzemionkowym. Byłoby idealnie, gdyby charakterystyka złoża do LC jak i TLC była identyczna, tzn. ten sam typ i rozmiar porów złoża. Różne żele krzemionkowe mają różne parametry. Jeżeli nie dobierze się identycznego złoża w TLC i w LC, to dobór warunków rozdzielania za pomocą analizy TLC będzie jedynie przybliżeniem.

Rozdzielanie w chromatografii kolumnowej zależy od fazy stacjonarnej oraz od fazy ruchomej.

Składniki fazy ruchomej dobieramy w taki sposób, aby uzyskać najlepszą selektywność rozdziału oraz dobrać odpowiednią siłę elucyjną fazy ruchomej.

Faza ruchoma powinna być tak dobrana, aby uzyskać współczynnik opóźnienia R_F w zakresie 0,15 – 0,4 w analizie TLC dla interesujących nas związków (rysunek 28). Różnica współczynników opóźnienia dla związków powinna być jak największa; zadowalające efekty uzyskuje się, gdy $\Delta R_F \geq 0,15$.



Rysunek 28. Optymalny zakres współczynnika opóźnienia wynosi od 0,15 (substancja pomarańczowa) do 0,4 (substancja niebieska) przy zastosowaniu wybranej fazy ruchomej

Współczynnik $R_F = 1$ oznacza, że badany związek eluuje z czołem fazy ruchomej w TLC i tak samo będzie się zachowywał w LC. Opuści kolumnę chromatograficzną po tym, jak opuści ją jedna objętość fazy ruchomej równa w tym przypadku objętości retencji substancji niezatrzymywanej V_M (dawniej

zwana objętością martwą lub objętością zerową). Wartość $R_F = 0,1$ oznacza, że dystans, jaki badany związek pokonuje na płytce TLC od linii startu wynosi 1/10 dystansu, jaki pokonuje faza ruchoma. Czyli badany związek wymaga 10-krotnie większej objętości fazy ruchomej ($V_R=10 \times V_M$, V_R - objętość retencji), aby opuścić kolumnę chromatograficzną. W doborze fazy ruchomej do LC na podstawie zachowania się związku w analizie TLC pomocna jest następująca zależność:

$$V_R = \frac{1}{R_F} V_M \quad (52)$$

gdzie:

V_R – objętość retencji substancji badanej,
 V_M – objętość retencji substancji niezatrzymywanej,
 R_F – współczynnik opóźnienia substancji badanej.

Zależność tę można wyprowadzić z następujących wzorów na współczynnik retencji:

$$k = \frac{1 - R_F}{R_F} \quad k = \frac{V_R - V_M}{V_M} \quad (53, 54)$$

gdzie:

k – współczynnik retencji substancji badanej,
 V_R – objętość retencji substancji badanej,
 V_M – objętość retencji substancji niezatrzymywanej,
 R_F – współczynnik opóźnienia substancji badanej.

Objętość retencji substancji niezatrzymywanej V_M jest w przybliżeniu równa objętości fazy ruchomej znajdującej się w kolumnie, czyli fazy ruchomej znajdującej się pomiędzy cząstkami wypełnienia kolumny oraz wewnątrz porów tychże cząstek. W chromatografii niskociśnieniowej objętość fazy ruchomej w kolumnie oznacza się często symbolem CV (ang. *column volume*).

W przykładzie przedstawionym na rys. 28, wartość współczynnika opóźnienia związku pomarańczowego, wynosząca w analizie TLC - 0,15 ($0,15 = V_M/V_R$, ze wzoru 45) oznacza, że objętość fazy ruchomej V_R potrzebna do elucji tego związku z kolumny LC musi być 6,6 razy większa od objętości retencji substancji niezatrzymywanej V_M . Wartość współczynnika opóźnienia związku niebieskiego, wynosząca w analizie TLC - 0,4 ($0,4 = V_M/V_R$) oznacza, że objętość fazy ruchomej V_R potrzebna do elucji tego związku z kolumny LC musi być 2,5 razy większa od objętości retencji substancji niezatrzymywanej V_M .

Przykład wyboru fazy ruchomej do elucji izokratycznej

Rozpuszczalniki mogą mieć taką samą siłę elucyjną a uzyskane wyniki rozdzielania mogą być zupełnie różne. Wybór składu fazy ruchomej dokonuje się najczęściej w dwóch etapach:

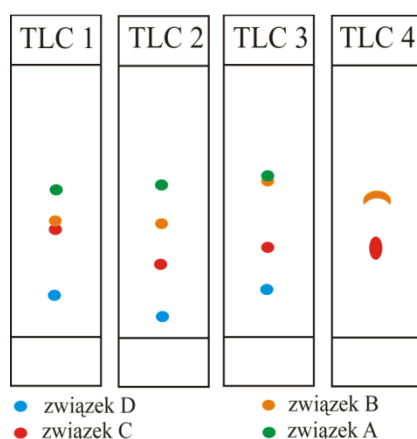
- dobór rozpuszczalnika o najlepszej selektywności dla oznaczanych substancji,
- dobór odpowiedniej mocy elucyjnej fazy ruchomej, zawierającej uprzednio wybrany, selektywny rozpuszczalnik.

Proces wyboru składu fazy ruchomej przedstawiono w poniższym przykładzie.

Rozdzielana próbka stanowi mieszaninę czterech związków (A, B, C i D). W pierwszym etapie doboru składu fazy ruchomej porównuje się rozpuszczalniki z różnych grup, korzystając z trójkąta selektywności rozpuszczalników (rysunek 27) i wykonuje analizy TLC w wybranych rozpuszczalnikach. Dla badanej mieszaniny wybrano cztery rozpuszczalniki i wykonano w nich analizy TLC:

- octan etylu (TLC 1),
- eter diizopropylowy (TLC 2),
- chloroform (TLC 3),
- chlorek metylenu (TLC 4).

Wyniki wykonanych analiz przedstawiono na rysunku 29 oraz w tabeli 2. Na chromatogramie TLC 4 nie uzyskano separacji, co oznacza, że chlorek metylenu nie jest rozpuszczalnikiem o odpowiedniej selektywności do rozdzielania badanych substancji. Najlepsze rozdzielenie (najlepszą selektywność) uzyskano przy zastosowaniu eteru diizopropylowego (TLC 2). Potwierdzają to wyniki zebrane w tab. 2, w której zamieszczono wartości R_F dla badanych związków w kolejnych analizach oraz wyliczone (ze wzoru 45), odpowiadające im wartości V_R i ΔV_R , jako krotności objętość retencji substancji niezatrzymywanej V_M . Największe różnice w objętości fazy ruchomej, potrzebnej do wymycia z kolumny kolejnych związków, uzyska się stosując eter diizopropylowy.



Rysunek 29. Analizy TLC mieszaniny zawierającej związki: A, B, C i D przy zastosowaniu czterech różnych faz ruchomych: 1, 2, 3, i 4 [na podstawie *Laboratory Chromatography Guide*. Talamona, 2005]

Tabela 2. Wyniki analizy TLC mieszaniny zawierającej związki A, B, C i D przy zastosowaniu trzech różnych faz ruchomych [na podstawie *Laboratory Chromatography Guide*. Talamona, 2005]

Związek	TLC 1			TLC 2			TLC 3		
	R_F	V_R	ΔV_R	R_F	V_R	ΔV_R	R_F	V_R	ΔV_R
A	0,54	1,8		0,56	1,8		0,6	1,7	
			0,5			0,6			0,1
B	0,43	2,3		0,42	2,4		0,55	1,8	
			0,2			1,3			1,1
C	0,40	2,5		0,27	3,7		0,35	2,9	
			3,7			8,8			2,4
D	0,16	6,2		0,08	12,5		0,19	5,3	

W drugim etapie dobiera się odpowiednią moc elucyjną fazy ruchomej. Moc elucyjną fazy ruchomej można dopasować poprzez dodanie do niej rozpuszczalnika nieselektywnego o małej mocy elucyjnej, na przykład niskowrzącego węglowodoru nasyconego, który nie wpływa na selektywność fazy ruchomej (eteru diizopropylowego).

W podanym powyżej przykładzie, z mieszaniny należy wydzielić związek B oraz związek C. Optymalny zakres wartości współczynnika opóźnienia R_F to 0,15 – 0,4. Z tab. 2 wynika, że siłę elucyjną fazy ruchomej należy zmniejszyć. Do tego celu wybrano heksan i wykonano kolejną analizę TLC badanej mieszaniny przy użyciu fazy ruchomej o składzie: heksan-eter diizopropylowy (3:1, v/v). Wynik tej analizy przedstawiono na rys. 30 oraz w tab. 3. Uzyskano, mieszczące się w optymalnym zakresie, wartości współczynnika opóźnienia R_F nie tylko dla substancji B i C, ale i dla pozostałych, przy zachowaniu odpowiedniej selektywności rozdzielania. Wynikające z wartości R_F objętości retencji V_R dla substancji A, B, i C są również optymalne. Nie jest konieczne wymywanie substancji D dużą objętością fazy ruchomej ($25,2 \times V_M$), gdyż stanowi ona w podawanym przykładzie substancję zbędną.

W ten sposób dobrana faza ruchoma pozwala rozdzielić na kolumnie chromatograficznej wybrane związki B i C z odpowiednią selektywnością oraz przy użyciu optymalnych objętości fazy ruchomej potrzebnych do ich elucji z kolumny.

Tabela 3. Wyniki analizy TLC mieszaniny zawierającej związki A, B, C i D przy zastosowaniu fazy ruchomej: heksan-eter diizopropylowy (3:1, v/v) [na podstawie *Laboratory Chromatography Guide*. Talamona, 2005]

Związek	R_F	V_R
A	0,37	2,7
B	0,25	4,0
C	0,12	8,4
D	0,04	25,2



Rysunek 30. Analiza TLC mieszaniny zawierającej związki: A, B, C i D przy zastosowaniu fazy ruchomej: heksan-eter diizopropylowy (3:1, v/v) [na podstawie *Laboratory Chromatography Guide*. Talamona, 2005]

Przykład wyboru fazy ruchomej do elucji gradientowej

Przedstawiony wcześniej przykład dotyczył elucji izokratycznej, czyli takiej, gdzie skład fazy ruchomej jest stały w ciągu całego rozdzielania chromatograficznego. Jeżeli związki różnią się mocno polarnością to trudno jest dobrać taki skład fazy ruchomej, aby uzyskać siłę elucyjną odpowiednią dla wszystkich składników próbki. W takim przypadku stosuje się w chromatografii kolumnowej **elucję gradientową**.

Sposób postępowania jest następujący:

- dobranie w analizie TLC rozpuszczalnika z odpowiednią selektywnością,
- dobranie kilku faz ruchomych, składających się z wybranego rozpuszczalnika selektywnego (składnik *B*) i niepolarnego rozpuszczalnika organicznego (składnik *A*, obniżający moc elucji), ale różniących się siłą elucyjną dzięki zastosowaniu różnego składu procentowego (na przykład 2% *B*, 5% *B*, 10% *B*, 25% *B* itd.) mieszaniny,
- sprawdzenie w analizie TLC zaproponowanych faz ruchomych a następnie wybranie takiej sekwencji rozpuszczalników, która pozwoli optymalnie wyeluować badane związki.

Proces rozdzielania mieszaniny związków na kolumnie chromatograficznej wykonuje się, stosując kolejno mieszaniny rozpuszczalników o zwiększającej się sile elucyjnej, uzyskanej dzięki zwiększającej się procentowej zawartości rozpuszczalnika bardziej polarnego (%*B*).

2.4. Wysokosprawna chromatografia cieczowa

2.4.1. Wstęp

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) jest szeroko stosowaną nowoczesną techniką separacyjną. Z punktu widzenia mechanizmu separacji, HPLC można najogólniej podzielić na następujące rodzaje:

- chromatografię adsorpcyjną,
- chromatografię podziałową,
- chromatografię jonową,
- chromatografię wykluczania,
- chromatografię powinowactwa.

Wybierając odpowiednią metodę chromatograficzną należy rozważyć wybrane informacje o badanej próbce i jej składnikach, takie jak: chemiczna budowa składników próbki, masy cząsteczkowe, stężenia i liczebność składników, rozpuszczalność, widma UV-Vis składników a także inne dostępne. Po zebraniu informacji, dla ułatwienia wyboru odpowiedniej techniki chromatograficznej, stosuje się pewne zasady.

Głównymi kryteriami wyboru metody chromatograficznej są wielkość cząsteczek rozdzielanych związków i ich rozpuszczalność w wodzie.

Jeśli składniki próbki, mają **masy cząsteczkowe mniejsze niż 2000 daltonów**, to w przypadku próbki nierozpuszczalnej w wodzie i zawierającej związki alifatyczne bądź aromatyczne – stosuje się:

- chromatografię adsorpcyjną do separacji związków na grupy (analiza grupowa) lub do separacji izomerów,

- chromatografię podziałową w odwróconym układzie faz do separacji związków z grup homologicznych.

Jeśli próbka jest rozpuszczalna w wodzie i zawiera związki obdarzone ładunkiem (jony lub formy zdysocjowane) – stosuje się chromatografię jonową.

W przypadku składników próbki, których **masy cząsteczkowe przekraczają 2000 daltonów**, stosuje się chromatografię wykluczania, która jest najlepszym wyborem:

- dla próbek rozpuszczalnych w wodzie – używa się roztworów wodnych, jako fazy ruchomej,
- dla próbek nierozpuszczalnych w wodzie, jako fazę ruchomą stosuje się inne, odpowiednie rozpuszczalniki.

Chromatografia powinowactwa jest stosowana do separacji próbek pochodzenia biologicznego.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) charakteryzuje się wysoką sprawnością, dobrą rozdzielczością, krótkim czasem analizy oraz stosowaniem wysokich ciśnień. W tabeli 4 przedstawiono porównanie niektórych parametrów kolumn chromatograficznych, stosowanych w chromatografii niskociśnieniowej i wysokosprawnej.

Tabela 4. Porównanie przykładowych parametrów kolumn do chromatografii cieczowej niskociśnieniowej i wysokosprawnej

Parametr	Chromatografia niskociśnieniowa	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
Rozmiar cząstek wypełnienia kolumny [μm]	100–600	5
Długość kolumny [cm]	10–100	25
Średnica wewnętrzna kolumny [mm]	20–50	4,6
Sprawność [liczba półek/m]	<100	15000
Ciśnienie na wlocie kolumny [MPa]	0,001–0,01	5–20

Zasadniczą różnicą pomiędzy chromatografią kolumnową niskociśnieniową a chromatografią wysokosprawną jest rozmiar cząstek wypełnienia kolumny. W HPLC stosuje się drobne ziarna wypełnienia, o wymiarach rzędu 5 μm lub mniejsze. Tak małe ich rozmiary poprawiają upakowanie kolumny, co zdecydowanie zmniejsza dyfuzję wirową i pozwala osiągnąć wysoką sprawność kolumny. Mały rozmiar ziaren wypełnienia wymaga jednocześnie stosowania wysokiego ciśnienia, aby wymusić przepływ fazy ruchomej przez kolumnę.

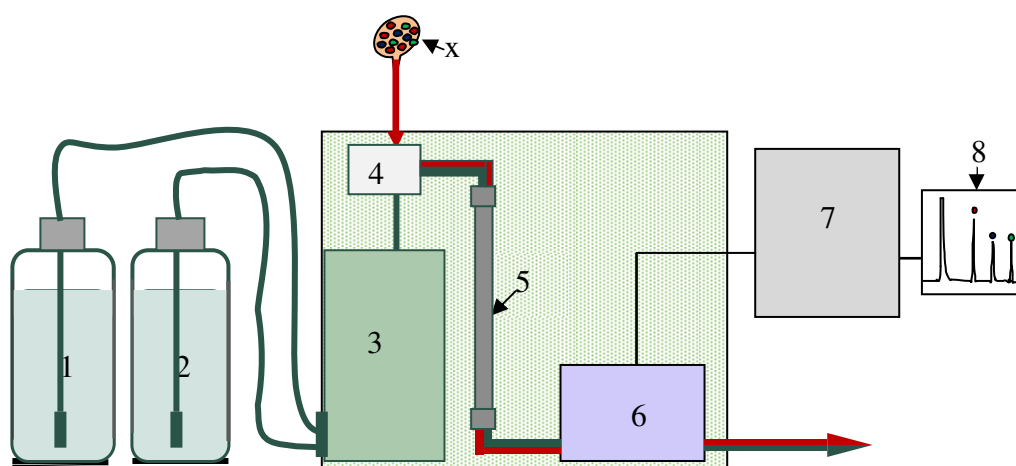
2.4.2. Aparatura

Analizę związków chemicznych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykonuje się przy użyciu chromatografów cieczowych. Schemat chromatografu cieczowego przedstawiono na rysunku 31. Podstawowymi częściami każdego chromatografu cieczowego są:

- zbiornik fazy ruchomej,
- pompa,
- dozownik,
- kolumna,
- detektor,

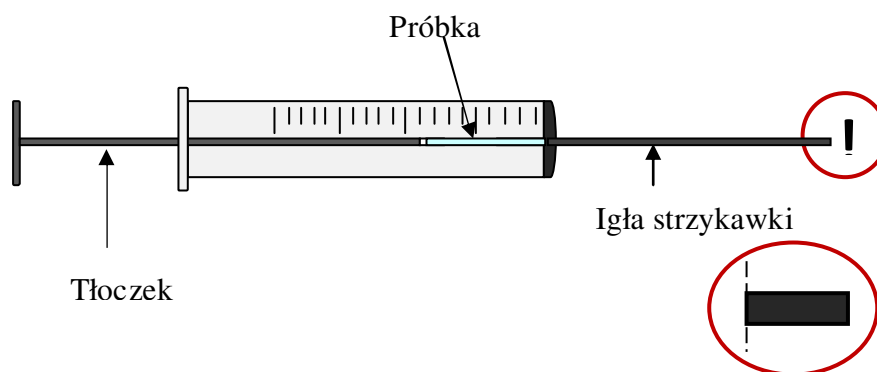
- komputer lub rejestrator.

Zasada działania chromatografu cieczowego jest następująca. Faza ruchoma jest pobierana przez pompę (3) ze zbiorników (1 lub/i 2) i następnie tłoczona pod ciśnieniem poprzez dozownik (4) do kolumny chromatograficznej (5) i dalej do detektora (6). Próbkę (x) w postaci roztworu wprowadza się do strumienia fazy ruchomej w dozowniku. Składniki próbki wraz z fazą ruchomą przedostają się do kolumny, gdzie są rozdzielane, po czym trafiają wraz z fazą ruchomą do detektora. Detektor wykrywa składniki próbki w fazie ruchomej i wysyła sygnał do komputera (7), w którym jest on zapisywany w postaci pików chromatograficznych, tworząc chromatogram (8). Kolumna dodatkowo może być umieszczana w termostacie.



Rysunek 31. Schemat blokowy chromatografu cieczowego HPLC. 1, 2 – zbiorniki składników fazy ruchomej, 3 – pompa, 4 – dozownik, 5 – kolumna, 6 – detektor, 7 – komputer lub rejestrator (linia zielona pokazuje drogę fazy ruchomej, linia czerwona – drogę rozdzielanej próbki; obie drogi łączą się w dozowniku)

Chromatografy cieczowe są wyposażone w dozowniki umożliwiające wprowadzenie ciekłych próbek pod ciśnieniem atmosferycznym do kolumny, w której panuje zwiększone ciśnienie nawet rzędu kilkudziesięciu MPa. Próbkę dozuje się przy użyciu szklanej mikrostrzykawki (rysunek 32), której igła ma tępo zakończony koniec.

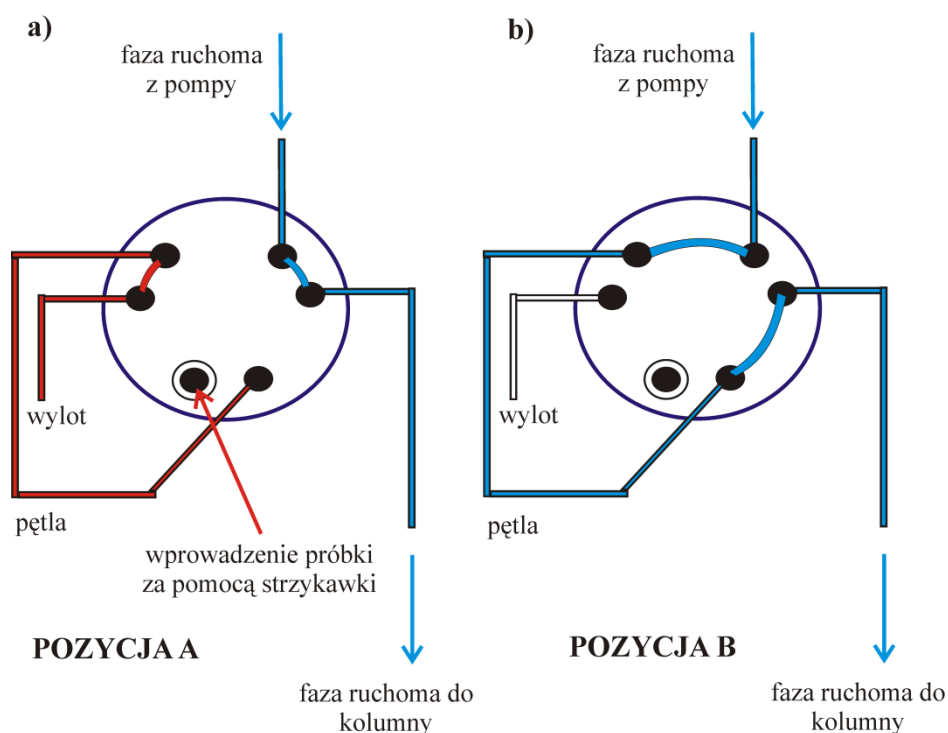


Rysunek 32. Mikrostrzykawka do odmierzania małych objętości cieczy (Uwaga! Koniec igły mikrostrzykawki stosowanej do dozowania próbki w HPLC jest tępo zakończony)

Najczęściej stosuje się sześciopiętne zawory dozujące (rysunek 33). Kierunek przepływu fazy ruchomej przez dozownik zależy od położenia dźwigni zaworu:

- pozycja A (*LOAD*) – faza ruchoma omija pętlę dozującą, można ją przepłukać i napełnić za pomocą szklanej mikrostrzykawki; w pętli panuje ciśnienie atmosferyczne,
- pozycja B (*INJECT*) – faza ruchoma przepływa przez pętlę dozującą i zabiera ze sobą znajdującą się w pętli próbkę wprowadzając ją jednocześnie do kolumny; jest to początek analizy chromatograficznej.

Ciekawą animację pokazującą proces dozowania próbki na kolumnę za pomocą zaworu dozującego można obejrzeć w Internecie: http://www.restek.com/info_sixport.asp



Rysunek 33. Dozownik HPLC – zasada działania; (a) - wprowadzanie próbki za pomocą mikrostrzykawki do pętli oraz (b) - dozowanie do kolumny

Kolumna chromatograficzna jest zasadniczym elementem chromatografu – w niej zachodzi proces rozdzielania składników wprowadzonej próbki. Kolumny stosowane w HPLC są wykonane ze stali i fabrycznie wypełnione fazą stacjonarną (rysunek 34). Używane są kolumny o różnych wymiarach, najczęściej o długości od 10 do 30 cm i o średnicy od 4 do 5 mm. Cząstki wypełnienia kolumny mają zazwyczaj średnicę około 3 do 6 μm . Współcześnie jednak coraz popularniejsze stają się zminiaturyzowane formy kolumn chromatograficznych, zwłaszcza przy zastosowaniu tzw. ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC), gdzie długość kolumn nie przekracza 2,5 cm, a cząstki wypełnienia mają średnicę poniżej 2 μm .



Rysunek 34. Kolumny HPLC

W chromatografii cieczowej stosuje się różne typy detektorów do wykrywania określonych grup związków chemicznych. Są to przede wszystkim detektory spektrofotometryczne. Ich zasada działania polega na rejestrowaniu różnicy właściwości fazy ruchomej oraz poszczególnych składników chromatografowanej próbki. Faza ruchoma opuszczając kolumnę chromatograficzną przepływa przez przepływową komórkę pomiarową w detektorze. Pojemność takiej komórki jest bardzo mała, rzędu 0,01 – 10 μl .

Najczęściej stosowanym detektorem jest **detektor spektrofotometryczny UV**. Mierzy on absorpcję promieniowania w zakresie UV/Vis zgodnie ze znanym prawem Lamberta-Beera:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon bc} \quad (55)$$

gdzie:

- I – natężenie promieniowania po przejściu przez komórkę pomiarową detektora,
 - I_0 – natężenie promieniowania przed komórką pomiarową detektora,
 - ϵ – współczynnik absorpcji,
 - b – długość celki pomiarowej,
 - c – stężenie badanej substancji w fazie ruchomej w komórce pomiarowej detektora.
- Detektor rejestruje bezpośrednio absorbancję A i podaje ją jako wartość bezwymiarową:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (56)$$

gdzie:

- A – absorbancja,
- I – natężenie promieniowania po przejściu przez komórkę pomiarową detektora,
- I_0 – natężenie promieniowania przed komórką pomiarową detektora.

Warunkiem stosowania detektora spektrofotometrycznego UV jest zdolność badanych substancji do pochłaniania promieniowania UV. Absorpcja promieniowania z zakresu UV/Vis przez cząsteczkę związku chemicznego związana jest z przejściami elektronów wiązań pojedynczych (σ), wiązań wielokrotnych (π) oraz elektronów wolnych par elektronowych (n) z orbitalu o niższej energii na wolny orbital o wyższej energii. Przejścia elektronów wiązań pojedynczych ($\sigma \rightarrow \sigma^*$) wymagają najwyższej energii, która odpowiada zakresowi fal poniżej 200 nm. W detektorach UV nie

wykorzystuje się zakresu promieniowania poniżej 190 nm, gdyż wymagałoby to układu próżniowego. W detektorach takich wykorzystuje się natomiast absorpcję promieniowania przez ugrupowania chromoforowe. Typowymi chromoforami są sprzężone wiązania podwójne węgiel-węgiel i węgiel-heteroatom oraz ugrupowania aromatyczne, w których pochłanianie energii w zakresie UV/Vis związane jest z przejściami elektronów π oraz n na orbital π^* .

Aby możliwe było przeprowadzenie pomiaru detektorem UV/Vis w chromatografii cieczowej, faza ruchoma nie powinna absorbować promieniowania przy zastosowanej długości fali.

Najprostsze detektory umożliwiają wykrywanie rozdzielanych związków przy jednej długości fali – 254 nm, natomiast inne umożliwiają płynną regulację długości fali w zakresie UV/Vis. Popularne są również detektory z matrycą fotodiodową (ang. *diode array detector*, DAD). Detektor DAD umożliwia rejestrację całego widma badanej substancji w trakcie jej przechodzenia przez detektor, dzięki czemu można ją zidentyfikować.

Detektor spektrofotometryczny UV jest niewrażliwy na zmiany przepływu fazy ruchomej i zmiany temperatury. Może być także stosowany w elucji gradientowej.

Detektor refraktometryczny jest detektorem uniwersalnym. Wykonuje nim się pomiar różnicy między współczynnikiem załamania światła fazy ruchomej oraz rozdzielanych substancji. W detektorze refraktometrycznym znajdują się dwie komórki pomiarowe:

- przez jedną przepływa „czysta” faza ruchoma (eluent),
- przez drugą przepływa faza ruchoma opuszczająca kolumnę zawierająca substancje rozdzielane (eluat z kolumny).

Im większa jest różnica współczynników załamania światła między fazą ruchomą a substancją, tym lepsza jest czułość detektora. Im większe stężenie substancji rozdzielanej, tym większa różnica współczynników załamania światła i tym większy sygnał z detektora.

Detektor refraktometryczny może być stosowany jedynie w elucji izokratycznej, w elucji gradientowej ciągła zmiana składu fazy ruchomej powodowałaby ciągłą zmianę współczynnika załamania światła. Zmienność wartości współczynnika załamania światła powodują również zmiany przepływu fazy ruchomej i zmiany temperatury, dlatego detektor refraktometryczny musi być termostatowany. Detektory refraktometryczne stosuje się między innymi do analiz węglowodanów.

Detektor konduktometryczny (przewodnościowy) stosuje się do detekcji związków obdarzonych ładunkiem. Detektor konduktometryczny mierzy zmiany przewodnictwa eluatu w porównaniu z eluentem, czyli „czystą” fazą ruchomą. Pomiar polega na zmierzeniu przewodności cieczy znajdującej się pomiędzy dwoma elektrodami, do których podłącza się zmienne napięcie. Przewodność właściwa jest liniową funkcją stężenia rozcieńczonego elektrolitu i dlatego detektor konduktometryczny znalazł zastosowanie w chromatografii jonowej. Zgodnie ze znanym prawem Kohlrauscha, przewodność elektryczna rozcieńczonych roztworów elektrolitów jest sumą przewodności poszczególnych jonów w roztworze pomnożonych przez ich wartościowości i stężenia:

$$\kappa = \sum \frac{\lambda_i^0 z_i c_i}{1000} \quad (57)$$

gdzie:

κ – przewodność właściwa [$\mu\text{S}/\text{cm}$],

λ_i^0 – graniczna przewodność molowa [$\text{S}\cdot\text{cm}^2/\text{mol}$],

z_i – wartościowość jonu,
 c_i – stężenie molowe jonu [mol/L].

2.4.3. Chromatografia adsorpcyjna

Chromatografia adsorpcyjna zachodzi w układzie ciecz-ciało stałe (LSC, ang. *liquid-solid chromatography*). Fazą stacjonarną jest adsorbent - ciało stałe.

W chromatografii adsorpcyjnej cząsteczki substancji rozdzielanej konkurują z cząsteczkami fazy ruchomej o miejsca adsorpcji na powierzchni fazy stacjonarnej. Im silniejsza adsorpcja cząsteczek fazy ruchomej na powierzchni fazy stacjonarnej tym mniejsza adsorpcja cząsteczek substancji rozdzielanych. Czyli im oddziaływanie cząsteczek fazy ruchomej z powierzchnią fazy stacjonarnej jest silniejsze, tym łatwiej wypierają one z tej powierzchni cząsteczki substancji zaadsorbowanej.

Efektywność wymywania substancji z adsorbentu zależy od mocy elucyjnej fazy ruchomej. Im moc elucyjna fazy ruchomej jest większa tym czasy retencji substancji rozdzielanych są niższe.

Uszeregowanie rozpuszczalników wg wzrastającej mocy elucyjnej nosi miano szeregu eluotropowego (*por. roz. III.2.3.4.*).

Fazą stacjonarną w chromatografii adsorpcyjnej jest najczęściej żel krzemionkowy (*por. roz. III.2.3.3.*), rzadziej tlenek glinu bądź węgiel aktywny. Żel krzemionkowy ma charakter polarny i stosowany jest jako faza stacjonarna w chromatografii w normalnym układzie faz. W takim przypadku kolejność elucji substancji rozdzielanych na kolumnie zależy od ich polarności. Substancje o niskiej polarności eluują się pierwsze a następnie eluują te o większej polarności.

Fazy ruchome używane w chromatografii w normalnym układzie faz zostały opisane w rozdziale 2.3.4.

Chromatografia adsorpcyjna pozwala na rozdział mieszaniny związków na klasy związków o tych samych grupach funkcyjnych (analiza grupowa).

Na przykład, z użyciem tej techniki można wydzielić klasę wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych od węglowodorów alifatycznych. Z drugiej strony nie można rozdzielić grupy węglowodorów alifatycznych na pojedyncze związki homologiczne.

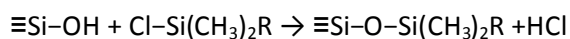
Chromatografia adsorpcyjna jest stosowana również do rozdzielania izomerów strukturalnych, które różnią się przestrzennym rozmieszczeniem grup funkcyjnych w cząsteczkach, w odniesieniu do miejsc adsorpcji na powierzchni żelu krzemionkowego.

2.4.4. Chromatografia podziałowa

Chromatografia podziałowa zachodzi w układzie ciecz-ciecz (LLC, ang. *liquid-liquid chromatography*). Fazą stacjonarną jest ciecz związana chemicznie z ciałem stałym, które jest jej nośnikiem. Obie ciecze, faza ruchoma i faza stacjonarna, nie mogą wzajemnie rozpuszczać się w sobie, aby mógł powstać układ dwufazowy. Ten warunek jest spełniony, gdy jedna faza jest polarna a druga niepolarna, lub odwrotnie.

Podstawowym nośnikiem fazy stacjonarnej jest mikroporowaty żel krzemionkowy o niewielkich ziarnach (3, 5 lub 10 μm). Sam żel krzemionkowy jest stosowany jako faza stacjonarna w chromatografii adsorpcyjnej, natomiast w chromatografii podziałowej jest jedynie nośnikiem, z którym faza stacjonarna jest chemicznie związana.

Na powierzchni żelu krzemionkowego znajdują się grupy silanolowe ($\equiv\text{Si-OH}$) zdolne do różnego typu reakcji chemicznych. W reakcji żelu krzemionkowego z pochodnymi chlorosilanów powstaje wiązanie silanolowe (silikonowe) wg poniżej reakcji:



W wyniku tych reakcji, grupy hydroksylowe obecne na powierzchni żelu krzemionkowego są zastępowane nowymi grupami: alkilowymi, fenyłowymi, cyjanopropyłowymi lub propyloaminowymi. Reakcje te służą do otrzymywania faz stacjonarnych niepolarnych oraz faz stacjonarnych polarnych. Taki typ faz stacjonarnych nazywa się ogólnie **fazami związanymi**.

Mechanizm separacji związków na fazach stacjonarnych związanych ma głównie charakter podziałowy, stąd nazwa – chromatografia podziałowa. W chromatografii podziałowej rozdzielanie składników próbki jest wynikiem ich różnej rozpuszczalności w fazach chromatograficznych.

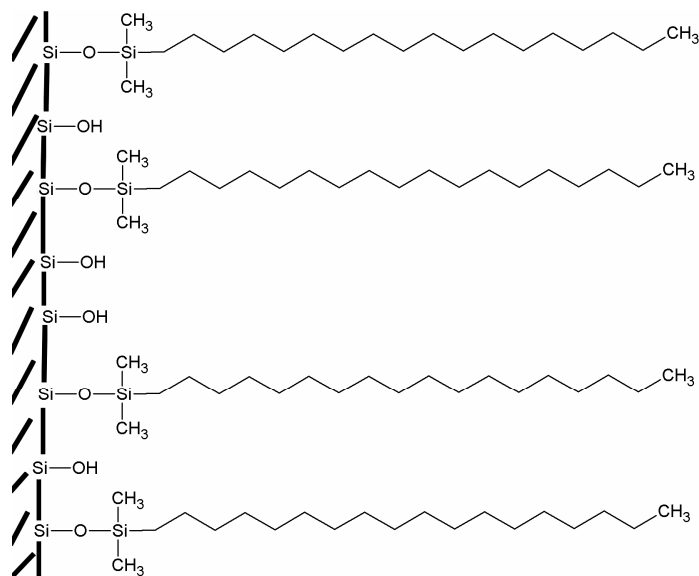
Jednakże nie wszystkie grupy hydroksylowe na powierzchni żelu krzemionkowego są zastępowane nowymi grupami i w konsekwencji powierzchnia żelu krzemionkowego jest pokryta związanymi grupami oraz wolnymi grupami silanolowymi. Te grupy silanolowe, chociaż częściowo ekranowane grupami organicznymi, mogą jednak wpływać na proces rozdzielania chromatograficznego. Stąd chromatografia na fazach związanych przebiega w pewnym stopniu również przy udziale procesów adsorpcyjnych.

W zależności od tego, jakie grupy (niepolarne czy polarne) zastosuje się do modyfikacji powierzchni żelu krzemionkowego, otrzymuje się:

- fazę stacjonarną niepolarną, stosowaną w chromatografii w odwróconym układzie faz (RP),
- fazę stacjonarną polarną, stosowaną w chromatografii w normalnym układzie faz (NP).

Chromatografia w odwróconym układzie faz

W chromatografii w odwróconym układzie faz najczęściej stosowana jest związana faza oktadecylosilanowa (oznaczana skrótami: ODS, RP-18 lub C_{18}), w której grupy alkilowe na powierzchni żelu krzemionkowego mają 18 atomów węgla w łańcuchach (rysunek 35). Te łańcuchy alkilowe mają charakter hydrofobowy a więc związana faza stacjonarna będzie również niepolarna. Łańcuch alkilowy może być także zakończony grupą fenyłową ($-\text{C}_6\text{H}_5$) lub dwoma grupami fenyłowymi. Separacja substancji za pomocą chromatografii w odwróconym układzie faz jest podobna do ekstrakcji różnych substancji z wody do rozpuszczalnika organicznego, takiego jak na przykład oktanol (*por. roz. 1.2.4*). Substancje hydrofobowe (niepolarne) przechodzą do niepolarnego rozpuszczalnika. Faza stacjonarna oktadecylosilanowa jest mniej polarna niż faza ruchoma o składzie woda-metanol lub woda-acetonitryl.



Rysunek 35. Związana faza oktadecylosilanowa

Substancje bardziej hydrofobowe są silniej zatrzymywane w fazie stacjonarnej i eluują z kolumny później niż substancje bardziej polarne. Na przykład węglowodory są silniej zatrzymywane na kolumnie niż alkohole. Wzrost zawartości wody w fazie ruchomej powoduje wydłużenie czasów retencji związków rozdzielanych i odwrotnie – wzrost zawartości metanolu lub acetonitrylu (składnika organicznego) w fazie ruchomej powoduje skrócenie czasów retencji związków rozdzielanych w chromatografii w odwróconym układzie faz.

Chromatografia w odwróconym układzie faz jest stosowana do rozdzielania większości związków organicznych. Pozwala na rozdzielanie mieszaniny związków na pojedyncze związki homologiczne. Z szeregu homologicznego węglowodórów, pierwsze eluują się węglowodory o mniejszych masach cząsteczkowych a potem te o większych masach cząsteczkowych. Rozpuszczalność węglowodórów o mniejszych masach cząsteczkowych w polarnej fazie ruchomej jest większa niż tych o większych masach cząsteczkowych, które są silniej zatrzymywane w niepolarniej fazie stacjonarnej.

Chromatografia w normalnym układzie faz

Związane fazy stacjonarne o charakterze hydrofilowym (średniopolarne), które można stosować w chromatografii w normalnym układzie faz to:

- fazy z grupami cyjanopropylowymi: $-(CH_2)_3-CN$,
- fazy z grupami propyloaminowymi: $-(CH_2)_3-NH_2$.

Fazy ruchome używane w chromatografii w normalnym układzie faz zostały opisane w rozdziale III.2.3.4.

2.4.5. Chromatografia jonowa

Chromatografia jonowa jest odmianą wysokosprawnej chromatografii cieczowej stosowaną do separacji i analizy anionów i kationów oraz innych związków chemicznych w formie zdysocjowanej.

Chromatografię jonową stosuje się między innymi do oznaczania anionów i kationów w wodach i ściekach. Zalety chromatografii jonowej:

- możliwość jednoczesnego oznaczania kilkunastu jonów,
- możliwość oznaczania jednocześnie kationów i anionów,
- możliwość oznaczania jonów pierwiastka na różnych stopniach utlenienia (analiza specjacyjna),
- wykrywalność jonów na poziomie $\mu\text{mol/l}$ lub mniejszym,
- wysoka selektywność oznaczania jonów w próbkach o złożonym składzie,
- niewielka ilość próbki potrzebna do analizy,
- prosty sposób przygotowania próbek do analizy,
- krótki czas analizy.

Chromatografia jonowa różni się od innych rodzajów wysokosprawnej chromatografii cieczowej rodzajem stosowanych wypełnień kolumn, rodzajem eluentów oraz ewentualnie stosowaniem dodatkowego urządzenia (kolumny tłumienia lub supresora) do obniżania przewodności elektrycznej eluentu. Chromatografię jonową dzieli się na dwa rodzaje:

- chromatografię jonową z tłumieniem przewodności fazy ruchomej,
- chromatografię jonową bez tłumienia przewodności fazy ruchomej.

Jeżeli stosuje się obniżanie przewodności elektrycznej eluentu to jest to chromatografia jonowa z tłumieniem przewodności. W chromatografii jonowej bez tłumienia przewodności nie ma potrzeby stosowania ani supresora, ani kolumny tłumienia. Eluent jest tak dobrany, aby jego przewodność była odpowiednio niska i umożliwiała detekcję konduktometryczną jonów próbki. Chromatografia jonowa bez tłumienia przewodności jest stosowana rzadko; dominuje stosowanie chromatografii jonowej z tłumieniem przewodności i ten rodzaj chromatografii zostanie opisany poniżej.

Ze względu na agresywne działanie faz ruchomych (eluentów), zwykły chromatograf HPLC zbudowany z metalowych części, nie nadaje się do stosowania w chromatografii jonowej. Chromatograf jonowy składa się z następujących części:

- zbiornik fazy ruchomej,
- pompa,
- dozownik,
- przedkolumna,
- kolumna analityczna,
- supresor lub kolumna tłumienia,
- detektor,
- komputer lub rejestrator.

Zasada działania chromatografu jonowego jest następująca. Faza ruchoma jest pobierana przez pompę ze zbiornika i następnie tłoczona pod ciśnieniem poprzez dozownik i przedkolumnę do kolumny chromatograficznej. Próbkę wprowadza się do strumienia fazy ruchomej w dozowniku. Jony obecne w próbce są rozdzielane na kolumnie. Eluat przechodzi do supresora (lub do kolumny tłumienia), gdzie w wyniku reakcji chemicznych przewodność elektryczna eluentu ulega obniżeniu. Dzięki temu przewodność elektryczna jonów próbki jest wysoka w porównaniu do obniżonej

przewodności elektrycznej jonów eluentu. Umożliwia to odróżnienie jonów próbki od jonów eluentu i ich detekcję w detektorze konduktometrycznym.

Detektor wysyła sygnały do komputera, w którym są one zapisywane w postaci pików chromatograficznych, tworząc chromatogram. W chromatografii jonowej występują następujące mechanizmy rozdzielania jonów:

- wymiana jonowa,
- wykluczanie jonów,
- tworzenie par jonowych.

Chromatografia wymiany jonowej jest nazywana po prostu chromatografią jonową (IC), podczas gdy chromatografia par jonowych (IPC) i chromatografia wykluczania jonowego (IEC) są uważane za techniki bardziej wyspecjalizowane.

Wysokosprawna chromatografia jonowa

W wysokosprawnej chromatografii jonowej zachodzi mechanizm wymiany jonowej (rysunek 36), która polega na wymianie jonów pomiędzy roztworem a jonitem.

Jonity, inaczej **wymieniacze jonowe**, są to stałe substancje nieorganiczne lub organiczne zawierające jony zdolne do wymiany na inne jony o tym samym ładunku, znajdujące się w roztworze, w którym wymieniacze jonowe są nierozpuszczalne.

Jonity są wielkocząsteczkowymi ciałami stałymi o strukturze przestrzennej usieciowanej. Mają zdolność wymiany jonów z roztworem, w którym się znajdują. We współczesnej chromatografii jonowej stosuje się jonity syntetyczne, czyli wielkocząsteczkowe polimery organiczne z wbudowanymi grupami funkcyjnymi, zdolnymi do wymiany jonów w roztworze elektrolitu. Są nierozpuszczalne w wodzie i w większości rozpuszczalników organicznych. Najczęściej są to kopolimery styrenu i diwinylolobenzenu (PS/DVB). Jonity składają się z kulistych cząsteczek polimerów o średnicy od 5 do 15 μm . Jonity dzieli się na następujące rodzaje:

- **kationity** - grupami funkcyjnymi są kationy zdolne do wymiany; jeżeli kationit jest polimerem organicznym to stosuje się również nazwę **żywica kationowymnienna**,
- **anionity** - grupami funkcyjnymi są aniony zdolne do wymiany; jeżeli anionit jest polimerem organicznym to stosuje się również nazwę **żywica anionowymnienna**,
- **wymieniacze amfoteryczne** - w zależności od pH roztworu mają zdolność wymiany anionów albo kationów,
- **wymieniacze bipolarne** - mogą jednocześnie wymieniać aniony i kationy.

O właściwościach kolumny wypełnionej żywicą jonowymienną decyduje rodzaj żywicy, stopień jej usieciowania, rodzaj i ilość grup jonowymiennych, stopień oddziaływań hydrofobowych oraz wielkość cząstek wypełnienia.

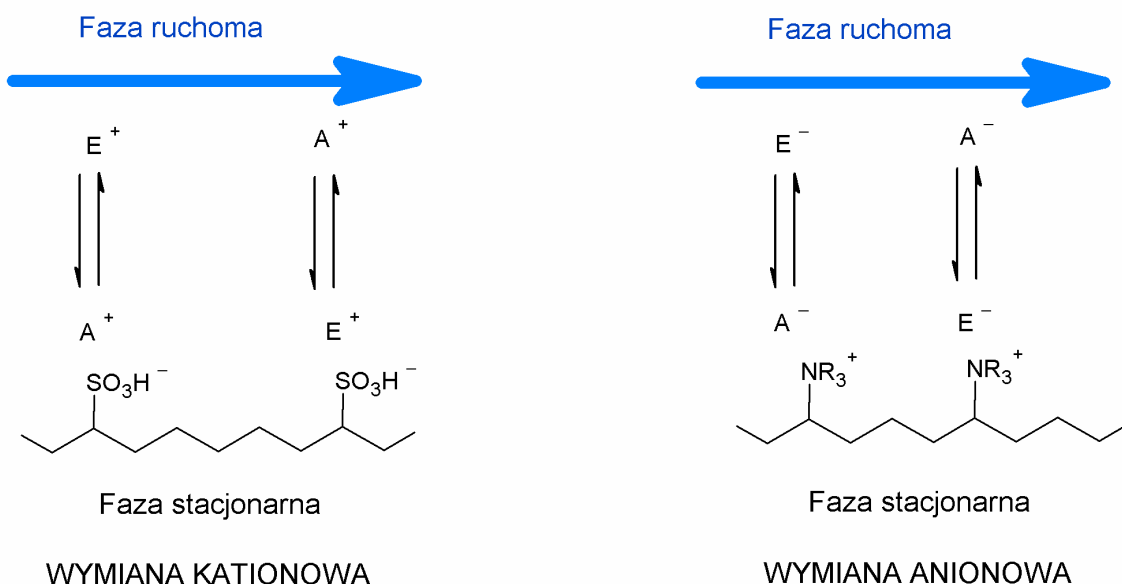
Faza stacjonarna w wysokosprawnej chromatografii jonowej jest jonitem z grupami funkcyjnymi o stałym ładunku, w których bezpośrednim otoczeniu znajdują się odpowiednie przeciwjony, zapewniające

elektryczną obojętność układu. Zwykle przeciwjon pochodzi z fazy ruchomej i dlatego też jest nazywany jony eluentu. Przy wymianie anionów grupami funkcyjnymi są czwartorzędowe zasady amoniowe, zaś przy wymianie kationów – grupy sulfonowe lub karboksylowe. Przeciwjon może być wymieniony przez jon substancji analizowanej, który zostanie czasowo zatrzymany w kolumnie. Jony składników analizowanej próbki i różnią się pomiędzy sobą czasem przebywania w kolumnie wynikającym z ich różnego powinowactwa do fazy stacjonarnej. Na rysunku 36 pokazano schematycznie procesy wymiany jonowej.

W chromatografii jonowej czas retencji analizowanych jonów zależy przede wszystkim od liczby i rodzaju grup funkcyjnych związanych na powierzchni jonitu, ale także od siły jonowej i rodzaju eluentu oraz pH eluentu.

Ogólne zasady elucji w chromatografii jonowej:

- ze wzrostem wartościowości jonu analitu zwiększa się jego powinowactwo do grupy funkcyjnej jonitu - jony trójwartościowe są silniej wiązane niż jony dwuwartościowe, dla elucji jonów trójwartościowych trzeba użyć eluentu o większej sile jonowej niż dla dwuwartościowych,
- jeżeli analizowane jony mają tę samą wartościowość, to im większy jest promień jonowy i stopień polaryzacji, tym silniej jon jest zatrzymywany na jonicie,
- jony analitów, charakteryzujących się silnymi oddziaływaniami hydrofobowymi lub van der Waalsa z fazą stacjonarną, będą eluowały później niż jony o słabszych oddziaływaniach, na przykład jony połączone z pierścieniem aromatycznym będą się silniej wiązać z żywicą polistyrenową niż pozostałe jony, nieposiadające układu aromatycznego.



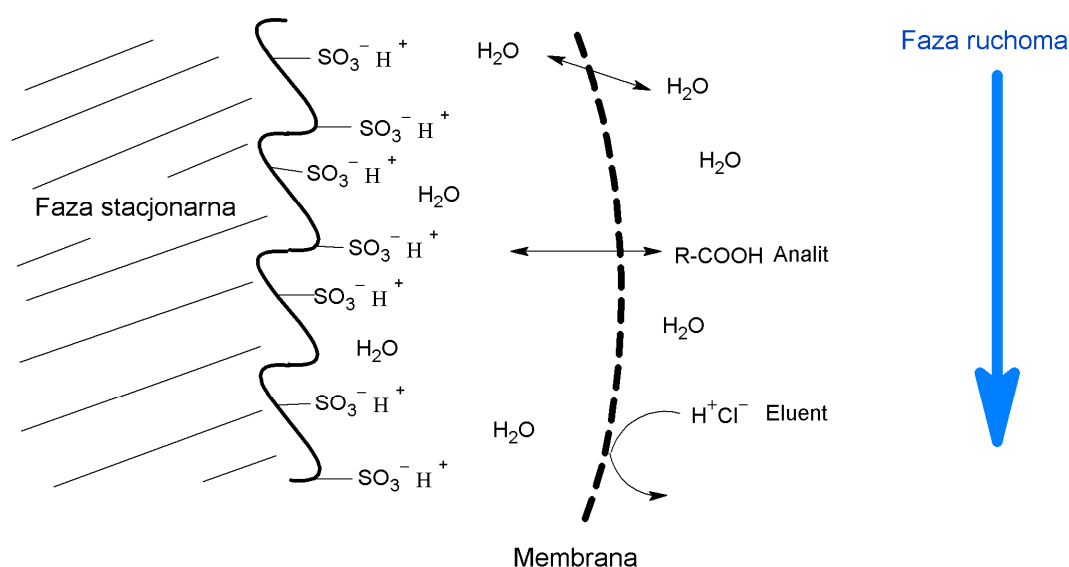
Rysunek 36. Mechanizm wymiany jonowej (A – jony analitu, E – jony eluentu) [na podstawie *Praktyczna chromatografia jonowa*. Viehweger K. H. (red.), Metrohm]

Podobnie jak we wszystkich rozdzielaniach metodą chromatografii cieczowej, również w chromatografii jonowej faza ruchoma wpływa na separację analitów. Dobiera się rodzaj przeciwjonu, pH oraz siłę jonową eluentu. Dla mocnych kationitów i anionitów im wyższa siła jonowa eluentu, tym wyższa jego siła elucyjna. Natomiast pH eluentu powinno być tak dopasowane, aby zapewniało dysocjację jonów analitu oraz jonów związanych z powierzchnią jonitu.

Eluentami stosowanymi do rozdzielania anionów w chromatografii jonowej z tłumieniem przewodności są najczęściej wodne roztwory węglanu sodu Na_2CO_3 , wodorowęglanu sodu NaHCO_3 lub ich mieszaniny (elucja izokratyczna) lub wodne roztwory NaOH lub $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (elucja gradientowa). Do oznaczania kationów eluentami są głównie kwasy mineralne, takie jak HCl lub HNO_3 .

Wysokosprawna chromatografia wykluczania jonowego

W chromatografii wykluczania jonowego wykorzystane jest zjawisko równowagi membranowej Donnana. Równowaga membranowa Donnana jest to stan ustalający się między dwoma roztworami przedzielonymi membraną półprzepuszczalną. W chromatografii wykluczania jonowego funkcję półprzepuszczalnej membrany pełni porowaty wymienniczk jonowy. Oddziela on wodną fazę ruchomą od wodnej fazy stacjonarnej zawartej w porach wymienniacza. Membrana jest przepuszczalna tylko dla związków niezjonizowanych lub słabo zjonizowanych. Ulegają one podziałowi pomiędzy fazę stacjonarną i fazę ruchomą a tym samym wolniej migrują przez kolumnę. Natomiast jony, które nie wnikają do wnętrza porów wypełnienia kolumny, nie są zatrzymywane przez kolumnę.



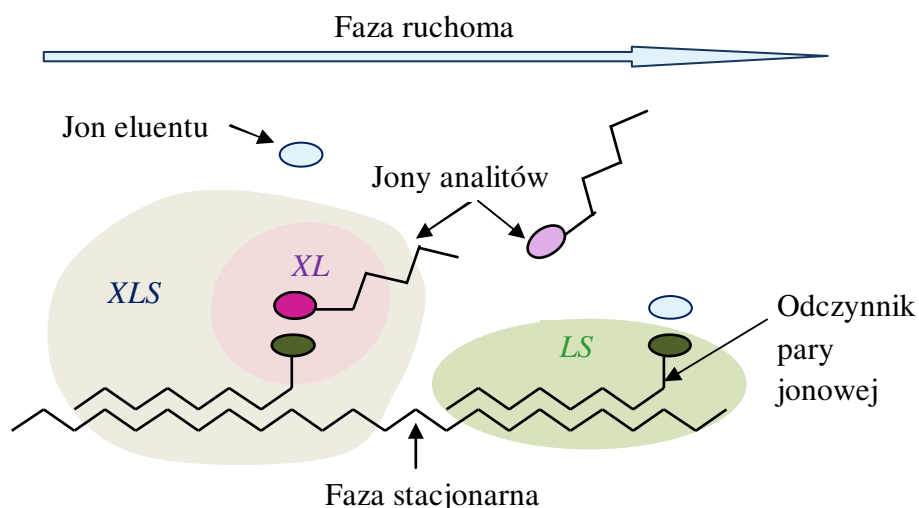
Rysunek 37. Mechanizm wykluczania Donnana w chromatografii wykluczania jonowego na przykładzie kwasu karboksylowego [na podstawie *Praktyczna chromatografia jonowa*. Viehweger K. H. (red.), Metrohm]

Najważniejszym zastosowaniem chromatografii wykluczania jonowego jest analiza słabych kwasów, takich jak kwasy karboksylowe, lub zasad. Na rysunku 37 pokazano mechanizm separacji metodą IEC na przykładzie kwasu karboksylowego R-COOH . Wypełnieniem kolumny jest sulfonowany wymienniczk kationowy, którego grupy sulfonowe z protonami, jako jonami przeciwnymi są elektrycznie obojętne. Grupy funkcyjne są uwodnione zaś uwodniona warstwa jest ograniczona przez hipotetyczną, ujemnie

naładowaną membranę Donnana. Przez membranę przenika swobodnie woda natomiast organiczne kwasy karboksylowe mogą przeniknąć, jeżeli będą w postaci niezdysocjowanej. Kwasy karboksylowe, mające niskie wartości stałych kwasowych (pK_A), są w mocno kwaśnych eluentach praktycznie całkowicie niezdysocjowane. Fazą ruchomą jest w takim przypadku roztwór mocnego kwasu mineralnego.

Chromatografia par jonowych

W chromatografii par jonowych, zwanej również chromatografią jonowo-asocjacyjną, do fazy ruchomej dodawany jest tak zwany odczynnik pary jonowej. Składa się on ze związków powierzchniowoczynnych (anionowych lub kationowych), takich jak sole tetraalkiloamonowe lub kwasy *n*-alkilosulfonowe. Jony analitu *X* oddziałują z jonami *L* odczynnika pary jonowej. Tworzy się kompleks typu *XL*. Kompleks *XL* może wiązać się w sposób odwracalny z niepolarną powierzchnią fazy stacjonarnej *S*, tworząc z kolei kompleks *XLS*. Jeżeli rozdzielane jony próbki (w postaci kompleksów *XL*) różnią się powinowactwem do niepolarnej fazy stacjonarnej, to będą eluowały z kolumny w różnym czasie i ulegną rozdzielaniu. W chromatografii par jonowych stosuje się hydrofobowe fazy stacjonarne, takie same jak w chromatografii podziałowej, np. RP-18 czy RP-8. Na rysunku 38 pokazano schematycznie mechanizm wymiany jonowej w chromatografii par jonowych.



Rysunek 38. Mechanizm wymiany jonowej w chromatografii par jonowych [na podstawie *Praktyczna chromatografia jonowa*. Viehweger K. H. (red.), Metrohm]

2.4.6. Chromatografia wykluczania

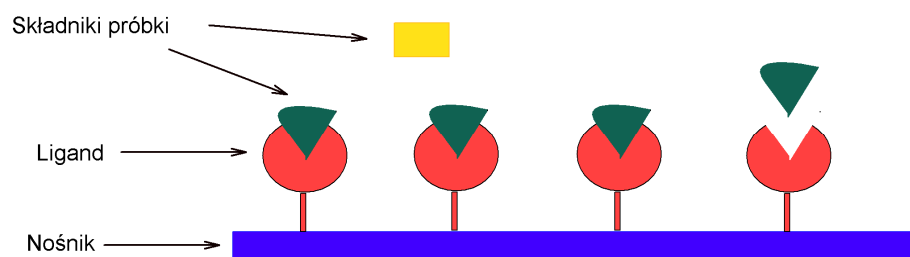
W chromatografii wykluczania rozdzielanie składników próbki zależy od różnic w wymiarach cząsteczek i/lub w ich kształcie. Próbka wprowadzana jest do kolumny wypełnionej fazą stacjonarną o określonych wymiarach cząstek i o określonych wymiarach porów. Cząsteczki składników próbki, o wymiarach mniejszych niż wymiary porów cząstek wypełnienia kolumny, penetrują wewnątrz porów i zostają zatrzymane na kolumnie natomiast cząsteczki o większych wymiarach eluują się z kolumny pierwsze.

2.4.7. Chromatografia powinowactwa

Chromatografia powinowactwa (AC, ang. *affinity chromatography*) pozwala na rozdzielenie mieszanin substancji dzięki wykorzystaniu specyficznych oddziaływań biologicznych. Takie oddziaływania można zaobserwować pomiędzy przeciwciałami i antygenami (zasada klucza i dziurki do klucza), enzymami i substratami, enzymami i inhibitorami lub hormonami i receptorami.

Są to bardzo specyficzne oddziaływania między dwiema substancjami, decydujące o bardzo dobrej selektywności rozdzielenia. Jedną z tych substancji jest reaktywnym ligandem, związanym chemicznie z powierzchnią nośnika i tworzy fazę stacjonarną, drugą substancją jest analit, wykazujący powinowactwo do ligandu.

W chromatografii powinowactwa wykorzystuje się najczęściej przeciwciała lub enzymy unieruchomione na nośniku. Jeśli w próbce występuje odpowiedni antygen lub substrat, to jest on selektywnie zatrzymywany na kolumnie.



Rysunek 39. Mechanizm rozdzielenia składników próbki w chromatografii powinowactwa

Chromatografia powinowactwa jest często stosowana w analizie i preparatyce substancji aktywnych biologicznie, na przykład w farmakologii.

3. Chromatografia gazowa

3.1. Wstęp

W chromatografii gazowej (GC) fazą ruchomą jest gaz, zwany w tym przypadku gazem nośnym. Fazą stacjonarną w chromatografii gazowej może być ciecz osadzona na nośniku stałym w postaci jednorodnego filmu (warstwy) lub ciało stałe – adsorbent. W pierwszym przypadku układ nazywamy chromatografią podziałową (ang. *gas-liquid chromatography*, GLC) natomiast w drugim, chromatografią adsorpcyjną (ang. *gas-solid chromatography*, GSC).

Chromatografia gazowa jest stosowana do analiz związków chemicznych, które w warunkach analizy chromatograficznej, mają postać gazów lub par. Są to substancje gazowe, ciekłe i stałe, których temperatura wrzenia lub sublimacji nie przekracza 350 - 400°C.

Typowy chromatogram otrzymywany poprzez analizę roztworu próbki badanej metodą chromatografii gazowej zamieszczony jest na rysunku 15b. Najczęściej pierwszy pik, jaki pojawia się na chromatogramie próbki jest pikiem rozpuszczalnika, w którym została ona rozpuszczona. Zwykle pik rozpuszczalnika jest też największym sygnałem na chromatogramie.

3.2. Aparatura

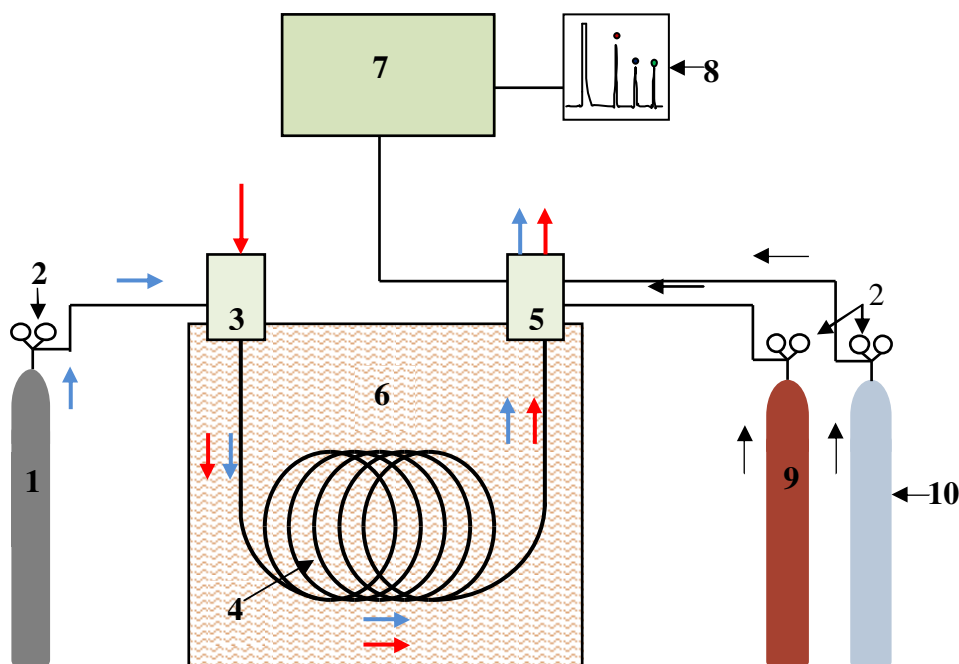
Analizę związków chemicznych techniką chromatografii gazowej wykonuje się przy użyciu chromatografów gazowych. Schemat chromatografu gazowego przedstawiono na rysunku 40. Gaz nośny (faza ruchoma) doprowadzony z butli (1) płynie przez regulator przepływu (2) do dozownika (3), a następnie przez kolumnę (4) i detektor (5), skąd jest usuwany na zewnątrz do atmosfery. Kolumna jest umieszczona w termostacie (piecu chromatograficznym) (6). Temperatura dozownika, detektora i kolumny jest odpowiednio regulowana. Do dozownika wprowadza się próbkę, która po przejściu w stan pary w dozowniku, miesza się ze strumieniem gazu nośnego i następnie jest przenoszona do kolumny. W kolumnie następuje rozdzielenie chromatograficzne składników próbki, które opuszczają kolumnę wraz z gazem nośnym i trafiają kolejno do detektora. Składniki próbki generują w detektorze sygnał elektryczny i w ten sposób są monitorowane. Sygnały elektryczne po wzmacnieniu we wzmacniaczu mogą być rejestrowane w komputerze lub rejestratorze (7) w postaci chromatogramu (8).

Gaz nośny

W chromatografii gazowej fazą ruchomą stanowią gazy o małej gęstości, niskiej lepkości, w których współczynniki dyfuzji są duże. Najczęściej jest to: wodór, azot, argon lub hel. Gazy te przechowywane są w postaci sprężonej w butlach stalowych (1 na rysunku 40).

Rodzaj gazu nośnego ma niewielki wpływ na wynik rozdzielania chromatograficznego. Zadaniem gazu jest transport próbki przez dozownik, kolumnę i detektor.

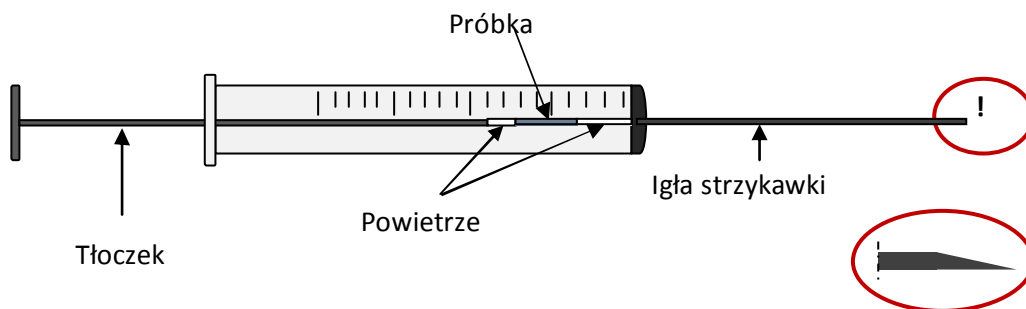
Ruch gazu przez kolumnę wymuszany jest jego ciśnieniem w butli i ustalany do odpowiedniej prędkości przepływu za pomocą reduktora ciśnienia, umieszczonego na butli (2 na rysunku 40). Przy wyborze gazu nośnego należy się kierować przede wszystkim rodzajem wybranego detektora oraz ceną, dostępnością i czystością gazu. Wymagana czystość gazów wynosi >99,999%.



Rysunek 40. Schemat blokowy chromatografu gazowego z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym FID; 1 – butla z gazem nośnym, 2 – zawór redukcyjny, 3 - dozownik, 4 – kolumna, 5 – detektor, 6 – piec chromatograficzny, 7 – komputer lub rejestrator, 8 – chromatogram, 9 – butla z wodorem, 10 – butla z powietrzem; linia niebieska pokazuje drogę gazu nośnego, linia czerwona – drogę chromatografowanej próbki, obie drogi łączą się w dozowniku

Dozownik

Dozownik jest elementem umożliwiającym wprowadzenie próbki w strumień gazu nośnego, który przenosi ją do kolumny. Stosując chromatografię gazową można analizować substancje, które w warunkach chromatografowania mają postać gazów lub par. Około 20% znanych związków chemicznych spełnia ten warunek i można je analizować techniką chromatografii gazowej. Są to substancje gazowe oraz ciekłe i stałe, których temperatura wrzenia lub sublimacji nie jest wyższa niż 350°C – 400°C. Klasyczne dozowanie próbki do typowej kolumny kapilarnej polega na wprowadzeniu niewielkich objętości (0,1 – 2 μ l) cieczy (roztworu próbki) do dozownika za pomocą strzykawki. Prawidłowy sposób odmierzania w strzykawce danej objętości roztworu próbki przedstawia rysunek 41.



Rysunek 41. Mikrostrzykawka do odmierzania małych objętości cieczy (**Uwaga!** Koniec igły mikrostrzykawki stosowanej do dozowania próbki w chromatografii gazowej jest ostro zakończony)

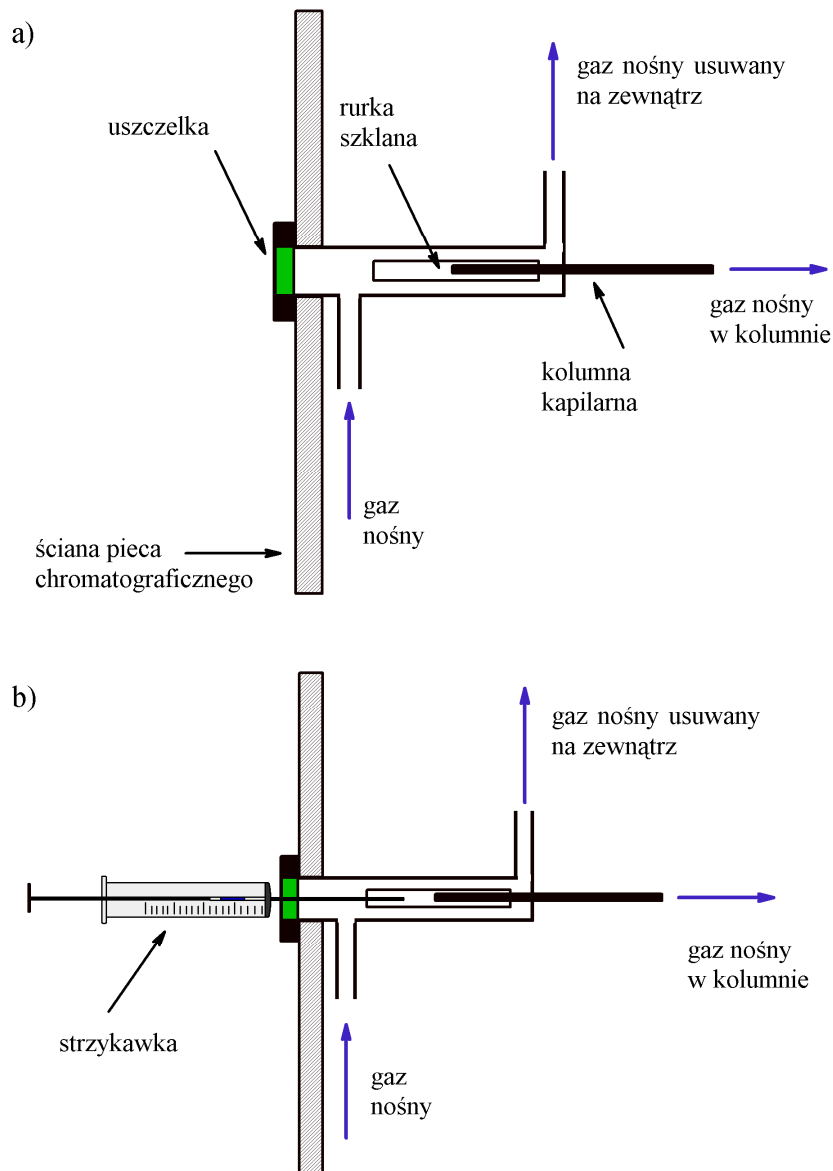
Po wprowadzeniu roztworu próbki do dozownika następuje gwałtowne przejście rozpuszczalnika i próbki w stan gazu, który po zmieszaniu z gazem nośnym jest wprowadzany na kolumnę.

Praktyczne zasady dozowania próbki za pomocą mikrostrzykawki:

- strzykawkę należy trzymać za część szklaną a nie za tłoczek,
- strzykawka jest bardzo delikatna, upuszczenie jej na twardą powierzchnię powoduje jej zniszczenie,
- nie napełnia się całej strzykawki roztworem próbki, ponieważ w trakcie dozowania do chromatografu gazowego część roztworu może wydostać się na zewnątrz,
- przed nabraniem roztworu próbki do strzykawki dobrze jest zwilżyć ją za pomocą rozpuszczalnika, w którym jest rozpuszczona (napełniając strzykawkę rozpuszczalnikiem i usuwając go), pozwoli to na dokładniejsze odmierzenie właściwej objętości roztworu próbki,
- należy nabierać niewielkie ilości (0,1 – 2 μ l) roztworu próbki do strzykawki,
- nie należy zostawiać roztworu próbki w igle strzykawki, należy przesunąć tłoczek tak, aby zobaczyć powietrze w strzykawce (rys. 44); w igle strzykawki o pojemności 10 μ l mieści się około 0,5 μ l cieczy, pozostawiona w igle ciecz, po wprowadzeniu do gorącego dozownika może spowodować wyrzucenie zawartości strzykawki w wyniku gwałtownego wzrostu ciśnienia,
- igłę strzykawki przed dozowaniem próbki do chromatografu należy wytrzeć, najlepiej papierowym ręcznikiem, zapobiegnie to zabrudzeniu membrany,
- tłoczek jest dłuższy od szklanej części strzykawki i nie należy go naciskać zbyt mocno przy dozowaniu próbki, ponieważ można go zgiąć lub złamać,
- strzykawkę należy umyć rozpuszczalnikiem od razu po dozowaniu próbki i schować do właściwego opakowania,
- mycie strzykawki polega na wielokrotnym napełnianiu czystym rozpuszczalnikiem i usuwaniu go, stosowane tradycyjnie trzykrotne umycie jest niewystarczające.

Dla większości kolumn kapilarnych, dopuszczalna objętość próbki wynosi 0,01 do 0,001 μ l cieczy, dlatego w chromatografii kapilarnej stosuje się często **dozowniki z dzieleniem strumienia gazu nośnego** (rysunek 42). Takim dozownikiem dozuje się do kolumny tylko niewielką część próbk, np. 1/100 – 1/300, a pozostała część jest usuwana na zewnątrz i tracona. Dzielenie próbki powinno pozwolić przede wszystkim zredukować rozmycie piku chromatograficznego, które jest związane z procesem gwałtownego odparowywania substancji w dozowniku i w ten sposób polepszyć rozdzielczość, dlatego tzw. stosunek dzielenia jest ważnym parametrem, który charakteryzuje ten

sposób dozowania. Określa on stosunek objętościowy szybkości wypływu gazu nośnego zaworem odprowadzającym na zewnątrz do szybkości przepływu gazu nośnego przez kolumnę.



Rysunek 42. Schemat dozownika z dzieleniem strumienia gazu nośnego (a) oraz proces dozowania za pomocą mikrostrzykawki (b) [na podstawie *Quantitative Chromatographic Analysis*. Beesley et al., 2000]

Kolumna chromatograficzna

W kolumnie chromatograficznej zachodzi właściwy proces chromatografowania i dlatego jej rodzaj ma wpływ decydujący na wynik analizy chromatograficznej, czyli na jakość rozdzielania składników próbki. Rozróżnia się następujące rodzaje kolumn (rysunek 43):

- pakowane (kolumny z wypełnieniem): analityczne, mikropakowane i preparatywne,
- kolumny o przekroju otwartym – kapilarne.

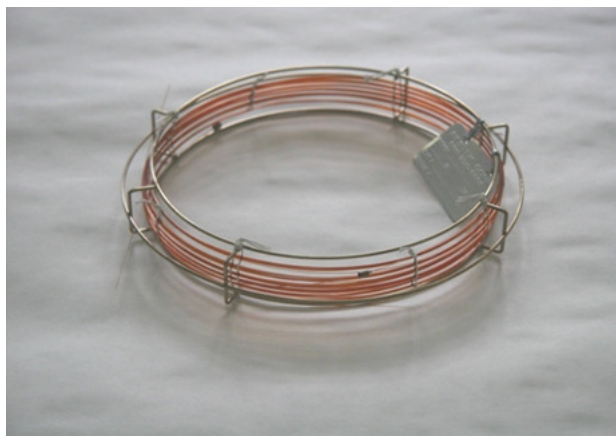
Kolumny pakowane napełnione są złożem zawierającym fazę stacjonarną w całej swojej objętości. Ten rodzaj kolumn jest najczęściej stosowany do preparatywnego otrzymywania niewielkich ilości czystych związków chemicznych.

Kolumny kapilarne pozwalają na osiągnięcie dużo wyższych sprawności niż kolumny pakowane i obecnie większość analiz chromatograficznych wykonuje się przy zastosowaniu kolumn kapilarnych. Kolumny kapilarne mają około 100 tys. pól teoretycznych. Fazy stacjonarne w kolumnach kapilarnych mogą być zarówno adsorbentami, jak i cieczami i mogą być osadzone na ściankach kapilar w różny sposób.

a)



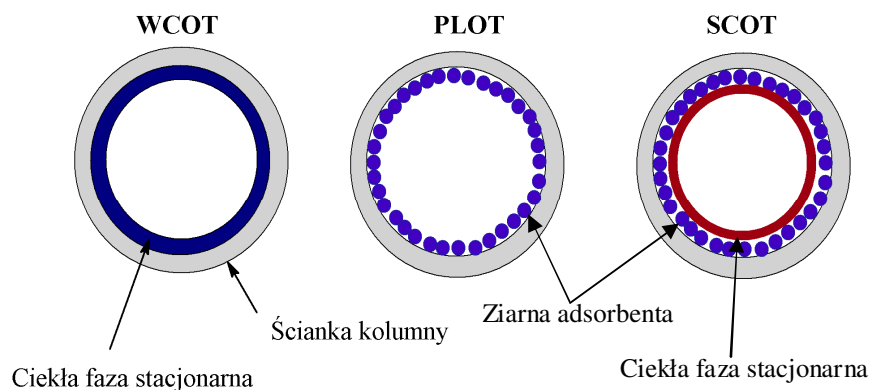
b)



Rysunek 43. Kolumna pakowana (a) oraz kolumna kapilarna (b)

Wyróżnia się następujące rodzaje kolumn kapilarnych (rysunek 44):

- WCOT (ang. *wall-coated open tubular*) – kapilary ze ściankami wewnętrznymi pokrytymi nieotwartą ciekłą fazą stacjonarną, najczęściej związaną chemicznie ze ściankami kolumny; jest to najbardziej popularny typ kolumn,
- PLOT (ang. *porous layer open tubular*) – kapilary ze ściankami pokrytymi warstwą ziaren adsorbenta,
- SCOT (ang. *support-coated open tubular*) – ziarna wypełnienia pokryte są ciekłą fazą stacjonarną, obecnie rzadko stosowane.



Rysunek 44. Schematyczne przekroje kolumn kapilarnych

Kolumny kapilarne do GC są najczęściej wykonane ze stopionego kwarcu, czyli ditlenku krzemu. Stopiony kwarc jest łatwy do formowania, elastyczny i dużo wytrzymalszy niż inne szkła, co powoduje, że można wyprodukować kapilary o średnicy wewnętrznej od 0,1 do 1 mm i długości od 10 do 60 m. Średnica wewnętrzna kolumn kapilarnych wynosi najczęściej: 0,1 mm, 0,25 mm, 0,32 mm lub 0,53 mm. Najczęściej używane są kolumny o wymiarach 0,25 mm × 30 m. Kolumny kapilarne przechowuje się w postaci zwoju, w uchwytach chroniących je przed uszkodzeniem (rys. 43b).

Adsorbenty stosowane w chromatografii gazowej to adsorbenty węglowe, żele krzemionkowe, sита molekularne i polimery porowate.

Adsorbenty stosuje się do analiz gazów i węglowodorów o niskich masach cząsteczkowych.

Ciekłe fazy stacjonarne w chromatografii gazowej to najczęściej:

- fazy niepolarne – węglowodory, będące dobrymi rozpuszczalnikami substancji niepolarnych, np. skwalan,
- fazy średniopolarne, tzw. silikony, są to siloksany o różnej masie cząsteczkowej, z których najczęściej stosowane są polidimetylosiloksan, polimetylofenylosiloksan i policycjanoalkilosiloksan,
- fazy polarne - glikole polietylenowe (np. Carbowax) oraz estry,
- fazy polarne oparte o kopolimery styrenu i diwinylobenzenu (np. Porapak Q).

Detektory

Substancje rozdzielane w kolumnie chromatograficznej są wykrywane przez detektor w miarę, jak eluują z kolumny. Detektor reaguje sygnałem elektrycznym na obecność chromatografowanego związku chemicznego w gazie nośnym opuszczającym kolumnę. Detektory można podzielić na:

- nieselektywne - detektory uniwersalne, reagują na wszystkie składniki próbki,
- selektywne - reagują na pewną grupę związków, które mają podobne właściwości chemiczne lub fizyczne,
- specyficzne - reagują na pojedynczy związek chemiczny.

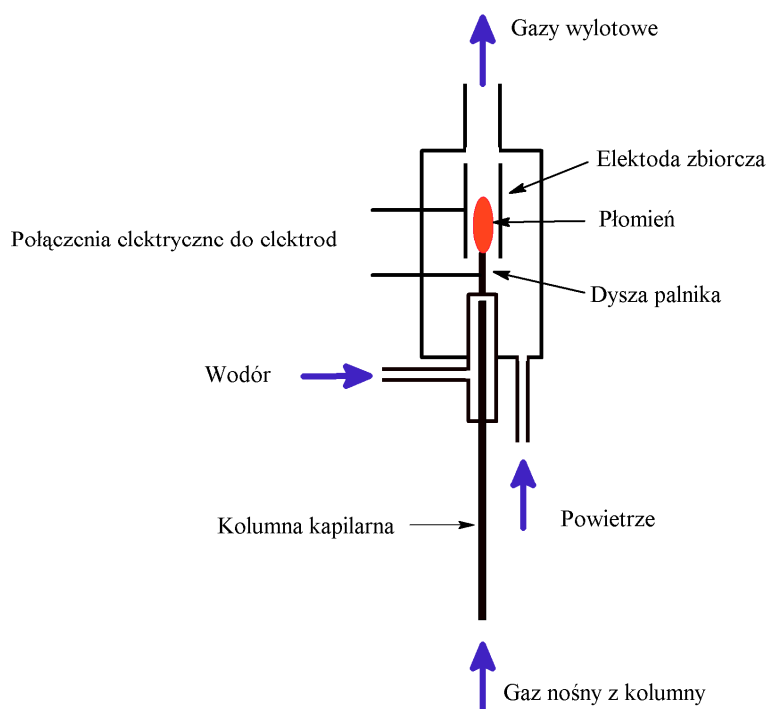
Najczęściej używanym detektorem jest **detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID)**. Jest to detektor uniwersalny, czyli taki, który jest czuły na prawie wszystkie związki organiczne.

Detektor płomieniowo-jonizacyjny FID nie wykrywa obecności związków nieorganicznych oraz niektórych związków węgla, jak: CO, CO₂, CS₂, HCOOH, COCl₂.

Zasada działania detektora FID przedstawiona jest na rysunku 45. Do detektora doprowadzane są z butli dwa gazy: wodór i powietrze (9 i 10 na rysunku 40). Natężenie przepływu wodoru i powietrza regulowane są reduktorami (2 na rysunku 40). Gaz nośny wyptywający z kolumny jest mieszany z wodorem i kierowany przez dyszę do komory, przez którą przepływa powietrze. Wodór spala się tworząc płomień. Składniki próbki doprowadzone wraz z gazem nośnym do płomienia ulegają spalaniu. Niewielka część atomów węgla (około 0,0018 %) ulega jonizacji w trakcie spalania, co odpowiada wytworzeniu około dwóch jonów lub elektronów na 10⁵ cząsteczek analitu dostarczonych

do detektora. W komorze znajdują się dwie elektrody: jedną jest dysza palnika, drugą (zbierającą) stanowi pierścień umieszczony w odpowiedniej odległości od dyszy. Powstający prąd jonowy jest wzmacniany i rejestrowany przez potencjometr. Sygnał z detektora jest proporcjonalny do liczby atomów węgla niezwiązanych z tlenem a więc w przybliżeniu jest proporcjonalny do masy substancji (atomy węgla związane z tlenem lub siarką nie tworzą w detektorze jonów, dlatego FID nie jest czuły na wymienione wyżej tlenowe i siarkowe związki węgla).

Chromatograf gazowy może być sprzężony ze spektrometrem mas (GC/MS), który w takim połączonym układzie będzie pełnił funkcję detektora. Układ GC/MS został opisany w rozdziale III.4.



Rysunek 45. Schemat detektora FID [na podstawie *Quantitative Chromatographic Analysis*. Beesley *et al.*, 2000]

3.3. Wybór parametrów analizy GC

Parametry analizy metodą chromatografii gazowej dobierane są do konkretnego analitu i konkretnej próbki. Najważniejsze parametry pracy układu chromatograficznego to:

- rodzaj fazy stacjonarnej,
- wymiary kolumny,
- temperatura pieca chromatograficznego,
- rodzaj detektora i dozownika,
- temperatura detektora i dozownika,
- wielkość dozowanej próbki.

Wybór fazy stacjonarnej do analizy nie jest sprawą łatwą i ciągle jeszcze bywa dokonywany eksperymentalnie. Najważniejszą cechą faz stacjonarnych, decydującą o oddziaływaniu z cząsteczkami związków rozdzielanych jest ich polarność.

Ogólne zasady wyboru ciekłych faz stacjonarnych (GLC) są następujące:

- do rozdziału substancji niepolarnych stosuje się fazę stacjonarną niepolarną,
- do rozdziału substancji polarnych stosuje się fazę stacjonarną polarną,
- związki niepolarne są rozdzielane na niepolarnej fazie stacjonarnej zgodnie z uszeregowaniem ich według temperatur wrzenia (lotności),
- na fazie stacjonarnej polarnej związki niepolarne są eluowane przed związkami polarnymi o tej samej temperaturze wrzenia,
- na fazie stacjonarnej niepolarnej związki polarne są eluowane przed związkami niepolarnymi o tej samej temperaturze wrzenia.

Wpływ długości kolumny na wyniki analizy jest następujący: im dłuższa kolumna, tym czasy retencji są większe i tym wyraźniejsze są różnice między czasami retencji dwóch substancji. Jednak dłuższy czas analizy powoduje, że piki są bardziej rozmyte.

Temperatura kolumny ma ogromny wpływ na wynik analizy. Proces chromatograficzny można prowadzić w stałej temperaturze (tzw. **analiza izotermiczna**) lub metodą programowanej temperatury (**analiza z programowaną temperaturą**). Tę drugą chromatografię stosuje się wtedy, gdy składniki mieszaniny różnią się znacząco temperaturami wrzenia, np. węglowodory z ropy naftowej lub szereg homologiczny alkoholi.

W analizie z programowaną temperaturą roztwór próbki jest wprowadzany do kolumny chromatograficznej utrzymywanej w stosunkowo niskiej temperaturze – niższej (o około 90°C) niż temperatura wrzenia najbardziej lotnego składnika próbki. Następnie temperatura kolumny chromatograficznej jest stopniowo podwyższana. Narost temperatury jest odpowiednio programowany, może być stały, na przykład 4°C/min. Końcowa temperatura kolumny powinna być bliska temperaturze wrzenia najmniej lotnego składnika próbki, ale nie może przekraczać dopuszczalnego limitu temperaturowego pracy kolumny, określanego przez jej producenta.

Dozowana próbka powinna być bardzo mała, wówczas strefa startowa jest bardzo wąska. Wielkość próbki wprowadzonej do kolumny nie może być większa od pojemności sorpcyjnej kolumny, ponieważ przeładowanie kolumny prowadzi do złego rozdzielania składników próbki i powstawania niesymetrycznych, szerokich pików. Pojemność kolumny zwykle nie przekracza około 40 ng dla pojedynczego składnika próbki.

4. Połączenie chromatografii ze spektrometrią mas

Identyfikacja analitów jedynie na podstawie parametrów retencji, typowa w technikach chromatograficznych (GC i HPLC), jest na ogół metodą niewystarczającą, ponieważ występuje wiele różnych substancji, które mogą mieć bardzo zbliżony lub nawet identyczny czas retencji jak anality. W celu dokonania poprawnej analizy jakościowej stosuje się łączenie technik, np. chromatografię w połączeniu ze spektrometrią mas. Substancje rozdzielane w kolumnie chromatograficznej kierowane są wraz z fazą ruchomą do spektrometru mas, gdzie następuje ich jonizacja i ewentualnie fragmentacja, natomiast identyfikacja poszczególnych związków potwierdzana jest na podstawie analizy ich widm mas. Spektrometria mas (MS) jest używana do identyfikacji związków organicznych oraz do ich detekcji i oznaczeń ilościowych. Ujmując najprościej, spektrometr mas jest urządzeniem do wytwarzania jonów, czyli jonizacji cząsteczki a następnie mierzenia stosunku masy powstałych jonów do ich ładunku (m/z).

Rejestracja ilości powstałych jonów (wielkości prądu jonowego) i wartości stosunku m/z poszczególnych jonów daje zapis analizy - widmo mas.

Uzyskiwane widma mas, a tym samym rodzaj informacji o związku, zależą przede wszystkim od sposobu jonizacji.

Widmo mas jest charakterystyczne dla określonego związku chemicznego i zawiera informacje o jego masie cząsteczkowej i budowie strukturalnej.

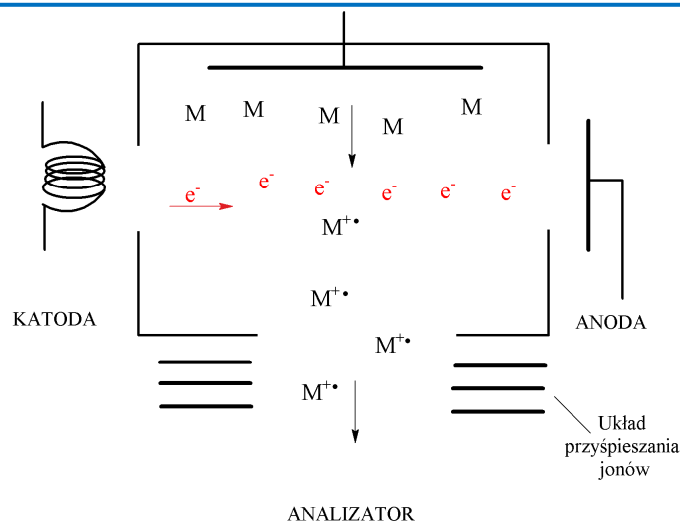
Spektrometr mas składa się z kilku istotnych elementów:

- układ wprowadzenia próbki (na przykład wprowadzenie bezpośrednie lub poprzez chromatograf gazowy czy chromatograf ciekłowy),
- komora jonizacyjna i układ przyspieszania jonów,
- analizator jonów,
- detektor jonów i rejestrator.

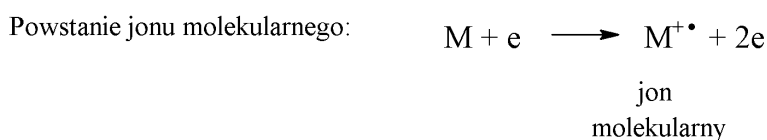
Najczęściej w spektrometrii mas stosuje się jonizację strumieniem elektronów. Jest to też jonizacja zwykle stosowana w spektrometrii mas połączonej z chromatografią gazową (GC/MS). **Jonizacja strumieniem elektronów** (ang. *electron impact*, EI) polega na bombardowaniu wiązką elektronów analizowanych cząsteczek, znajdujących się w stanie gazowym (pary) (rysunek 46) w komorze jonizacyjnej. Jonizacja przebiega w próżni rzędu 10^{-6} do 10^{-5} Tr ($1,33 \cdot 10^{-4}$ ÷ $1,33 \cdot 10^{-3}$ Pa). Wiązka elektronów jest emitowana z katody wykonanej z trudno topliwych metali, wolframu lub renu oraz ogrzewanej prądowo do temperatury kilku tysięcy stopni. Energię elektronów można zmieniać poprzez zmianę napięcia między katodą a anodą, do której kierowana jest wiązka elektronów z katody. Zwykle wszystkie pomiary wykonuje się przy standardowej energii 70 eV. Strumień elektronów wchodzi w kolizję z cząsteczkami badanego związku będącymi w stanie pary.

W wyniku bombardowania wiązką elektronów cząsteczek substancji organicznej, będącej w stanie gazowym, powstają jony zwane molekularnymi M^{+} , które mogą rozpadać się, czyli fragmentować (rysunek 47).

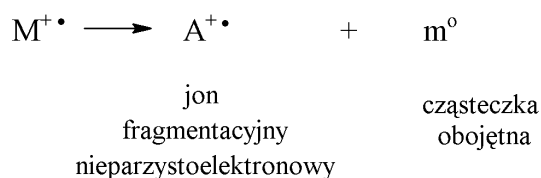
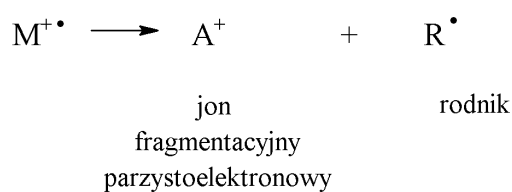
Jon molekularny jest kationorodnikiem o masie cząsteczkowej niemal identycznej jak masa cząsteczkowa związku chemicznego, z którego powstał. Pomijalna różnica masy wynika z utraty jednego elektronu z molekuly związku.



Rysunek 46. Schemat źródła jonów w jonizacji EI [na podstawie *Mass spectrometry: a foundation course*. Downard K., 2004]



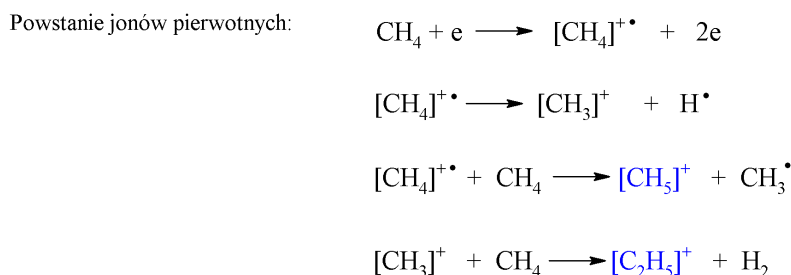
Jon molekularny może fragmentować na dwa sposoby:



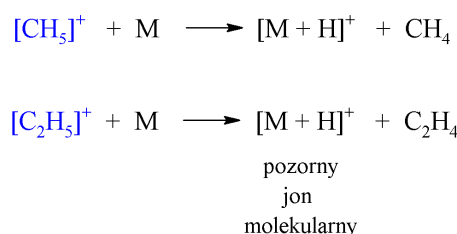
Rysunek 47. Powstawanie i drogi fragmentacji jonu molekularnego w jonizacji EI, M – molekula badanego związku, $M^{+\bullet}$ – jon molekularny

Drugi sposób jonizacji, stosowany w technice GC/MS, to **jonizacja chemiczna** (ang. *chemical ionization*, CI). Czynnikiem jonizującym cząsteczki analitu są jony, powstałe w wyniku jonizacji wiązki

elektronów specjalnie do tego celu wprowadzonego do komory jonizacyjnej, gazu reagującego. Jonizacja chemiczna następuje w wyniku reakcji cząsteczki analitu z jonem pierwotnym gazu reagującego (rysunek 48). Są to reakcje przeniesienia protonu pomiędzy jonem pierwotnym a cząsteczką analitu. Gazem reagującym jest metan, izobutan, amoniak lub woda. Warunki jonizacji są bardzo łagodne, toteż fragmentacja zachodzi w niewielkim stopniu.



Jony pierwotne reagują z cząsteczkami badanego związku:



Rysunek 49. Powstawanie pozornego jonu molekularnego w jonizacji CI - nawiasy prostokątne oznaczają, że miejsce lokalizacji ładunku nie jest określone, M – molekula badanego związku, $[\text{M} + \text{H}]^+$ – pozorny jon molekularny

W widmach mas uzyskanych techniką CI obserwuje się intensywne tzw. pozorne jony molekularne $[\text{M} + \text{H}]^+$, które służą do wyznaczenia masy cząsteczkowej badanego związku.

W widmach mas uzyskanych techniką CI obserwuje się intensywne tzw. **pozorne jony molekularne** $[\text{M} + \text{H}]^+$, które służą do wyznaczenia masy cząsteczkowej badanego związku. Masa pozornego jonu molekularnego jest o jednostkę większa niż masa cząsteczkowa związku chemicznego, z którego powstał. Pozorne jony molekularne nazywamy też jonami pseudomolekularnymi. Wadą jonizacji CI, podobnie jak EI, jest konieczność przeprowadzenia analitu w stan pary.

Powstałe w komorze jonizacyjnej jony są przyśpieszane polem elektrostatycznym o potencjale 6000-8000 V i następnie kierowane poprzez szczelinę ogniskującą do analizatora. W analizatorze strumień jonów zostaje rozdzielony według stosunku ich masy do ładunku (m/z) a następnie w detektorze następuje pomiar natężenia prądu jonowego, odpowiadającego rozdzielonym poszczególnym jonom. Wynikiem analizy MS jest widmo mas. Widma mas są rejestrowane kolejno dla każdej substancji, eluującej się z kolumny chromatograficznej.

Widmo mas EI przedstawia względne intensywności jonów fragmentacyjnych oraz jonu molekularnego, uporządkowanych według stosunku ich masy do ładunku (m/z).

Fragmentacja jest procesem charakterystycznym dla każdego związku i dlatego widmo mas pozwala na jego identyfikację. Badaną substancję można zidentyfikować korzystając z reguł fragmentacji lub przez porównanie z widmami mas substancji wzorcowych, zebranych w atlasach (katalogach) widm. Widmo mas EI zawiera informację, na jakie fragmenty rozpadł się badany związek. Jego interpretacja przypomina pracę archeologa, który na podstawie zachowanych fragmentów stara się odtworzyć pierwotny kształt rozbitego naczynia.

Jon molekularny odpowiada masie cząsteczkowej tych cząsteczek związku, które są zbudowane z najlżejszych izotopów pierwiastków, wchodzących w skład związku, np. z izotopów ^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{32}S , ^{35}Cl i ^{79}Br .

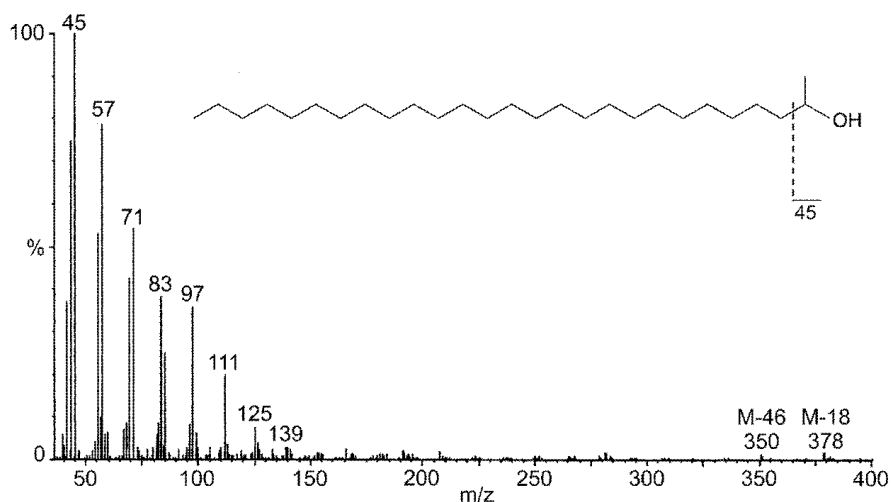
Znalezienie jonu molekularnego pozwala na określenie masy cząsteczkowej analizowanego związku. Przy zastosowaniu innych technik jonizacji, takich jak CI, APCI (jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym, ang. *atmospheric pressure chemical ionization*) czy ESI (jonizacja na drodze elektrorozpraszania, ang. *electrospray ionization*), zamiast jonu molekularnego uzyskuje się pozorne jony molekularne (jony pseudomolekularne), z których również można obliczyć masę cząsteczkową analizowanego związku. Większość pierwiastków zawiera dodatkowe izotopy, np. podstawowemu izotopowi węgla ^{12}C (98,931% rozpowszechnienia) towarzyszy izotop ^{13}C (1,069%). Skład izotopowy pierwiastków jest praktycznie stały w naturze. W badanej próbce, cząsteczki związków chemicznych są zbudowane z różnych izotopów danego pierwiastka. Powoduje to, że obok cząsteczek zbudowanych z najlżejszych izotopów pierwiastków wchodzących w skład danego związku chemicznego będą znajdować się też cząsteczki zawierające również cięższe izotopy, np. metan: $^{12}\text{C}^1\text{H}_4$ (masa cząsteczkowa 16 Da) oraz $^{13}\text{C}^1\text{H}_4$ (17 Da). W spektrometrze mas zostaną zmierzone dokładne masy jonów a więc będą rozróżnione te dwa typy cząsteczek.

Sygnały w widmie mas odpowiadające jonom zawierającym cięższe izotopy nazywa się pikami izotopowymi. Piki izotopowe mają mniejszą intensywność w widmie mas niż piki molekularne, ze względu na mniejsze rozpowszechnienie cięższych izotopów.

Stosunek intensywności jonu molekularnego do piku izotopowego w widmie mas metanu wynosi jak 99 do 1.

Przykładowe widmo mas EI jest zamieszczone na rysunku 50. Nie zawsze jon molekularny jest widoczny na widmie mas EI. Jeżeli dany związek chemiczny ulega silnej fragmentacji, to jon molekularny może nie być intensywny lub może w ogóle nie występować. W takiej sytuacji określenie masy cząsteczkowej badanego związku nie jest możliwe i należy zastosować inną metodę jonizacji np. jonizację chemiczną. Widmo mas CI zawiera przede wszystkim pozorny jon molekularny natomiast jony fragmentacyjne są nieliczne i mało intensywne, gdyż jest to tzw. łagodna technika jonizacji. Chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas (GC/MS) jest stosowana zarówno do identyfikacji składników analizowanych próbek jak i do oznaczania ilościowego poszczególnych związków. Obie techniki doskonale się uzupełniają. W technice GC/MS preferowane są kolumny kapilarne, ponieważ umożliwiają bezpośrednie wprowadzenie eluatu z kolumny do komory jonizacyjnej spektrometru. Gazem nośnym w technice GC/MS jest hel. Technika GC/MS z jonizacją strumieniem elektronów bądź z jonizacją chemiczną jest stosowana do analizy związków

organicznych, które mogą być przeprowadzone w stan pary. Z tego względu badane substancje muszą wykazywać w temperaturze pokojowej lub po ogrzaniu prężność par, co najmniej 10^{-7} do 10^{-6} Tr ($1,33 \cdot 10^{-5}$ ÷ $1,33 \cdot 10^{-4}$ Pa). Jest to istotne ograniczenie tej metody, która nie może być zastosowana do analizy związków wielkocząsteczkowych bądź polarnych, takich jak aminokwasy, peptydy, białka, węglowodany czy związki jonowe.

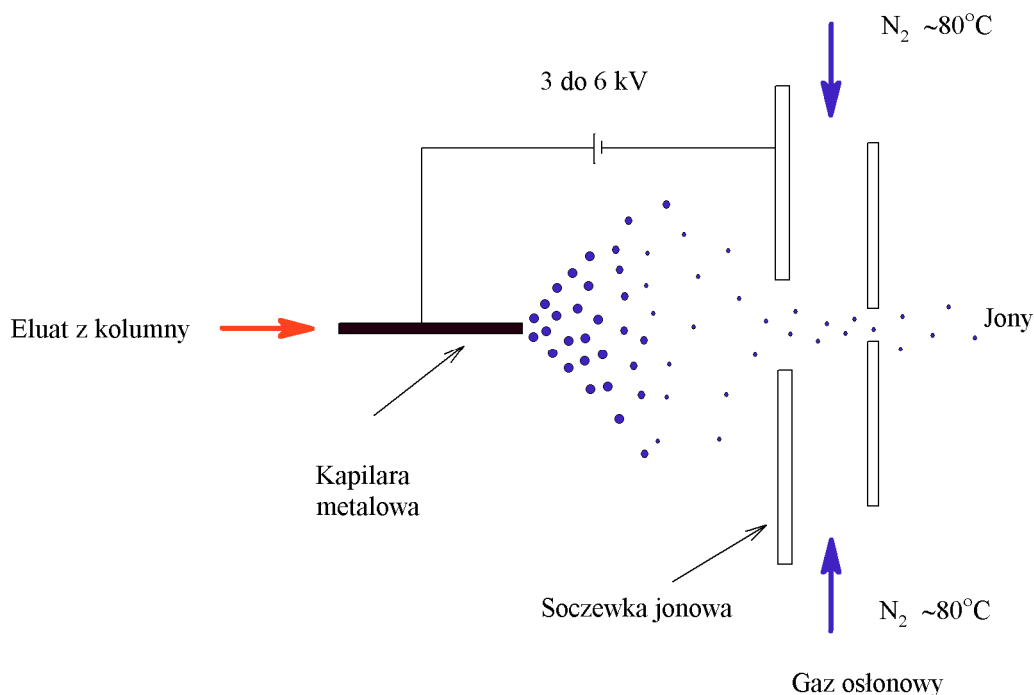


Rysunek 50. Widmo mas (EI) 2-heptakozanolu; jon molekularny 2-heptakozanolu ma niewielką intensywność i nie jest widoczny na zamieszczonym widmie mas natomiast widoczne są jony fragmentacyjne, w tym jon o wartości m/z 45, tzw. pik główny, który jest jonem o największej intensywności w widmie

Wysokosprawną chromatografię cieczą w połączeniu ze spektrometrią mas (LC/MS) lub tandemową spektrometrią mas (MS/MS) jest jedną z najpopularniejszych technik do oznaczania wielu związków organicznych w próbkach o złożonej matrycy. Wśród wielu zalet tej techniki najważniejsza to możliwość analizy związków polarnych oraz wielkocząsteczkowych. W technice LC/MS anality rozdzielane w kolumnie chromatograficznej, ze względu na różne powinowactwo do fazy stacjonarnej, są eluowane za pomocą odpowiednio dobranych faz ruchomych do komory jonizacyjnej spektrometru mas. W wielu przypadkach preferowane jest stosowanie rozdzielania w odwróconym układzie faz (RP), przy zastosowaniu kolumn z niepolarną fazą stacjonarną oraz polarnych faz ruchomych. Najczęściej stosowane są mieszaniny metanol/woda oraz acetonitryl/woda przy odpowiednio dobranym pH, z dodatkiem octanu amonu, mrówczanu amonu lub/i kwasu mrówkowego czy octowego, których dodatek powoduje zwiększenie czułości oznaczenia i poprawę jonizacji próbki. W technice LC/MS możliwe jest stosowanie źródła jonów typu ESI lub komory jonizacyjnej typu APCI. Jonizacja ESI jest najczęściej stosowaną techniką jonizacji związków polarnych natomiast dla średniopolarnych i mniej polarnych związków bardziej odpowiednia jest technika APCI.

Jonizacja na drodze elektrorozpraszania, ESI polega na tym, że w silne pole elektryczne wprowadza się strumień cieczy (eluatu z kolumny chromatograficznej) pod ciśnieniem atmosferycznym (rysunek 51). Pole elektryczne jest wytwarzane poprzez przyłożenie napięcia 3 – 6 kV pomiędzy kapilarą a elektrodą. Następuje odparowywanie kropelek rozpuszczalnika, co powoduje wzrost gradientu potencjału przy powierzchni kropli i prowadzi w efekcie do desorpcji jonów z kropli. Jonizacja ESI jest łagodną techniką jonizacji. Widma mas ESI zawierają serie wielokrotnie protonowanych pozornych

jonów molekularnych $[M + zH]^{z+}$. Jony z wieloma ładunkami są zaletą tej metody jonizacji. W spektrometrze mas mierzona jest wartość m/z , czyli wartość stosunku masy do liczby ładunków. Dzięki temu, związki o dużej masie cząsteczkowej i na przykład tworzące jony z 2 lub 3 ładunkami są analizowane przy odpowiednio niższych wartościach m/z , odpowiadających masie cząsteczkowej podzielonej odpowiednio przez 2 lub 3. Metodą ESI można analizować związki chemiczne o masie cząsteczkowej nawet rzędu 100 – 300 tys. u.



Rysunek 51. Schemat źródła jonów typu ESI [na podstawie *Spektrometria mas.* de Hoffmann E. *et al.*, 1998]

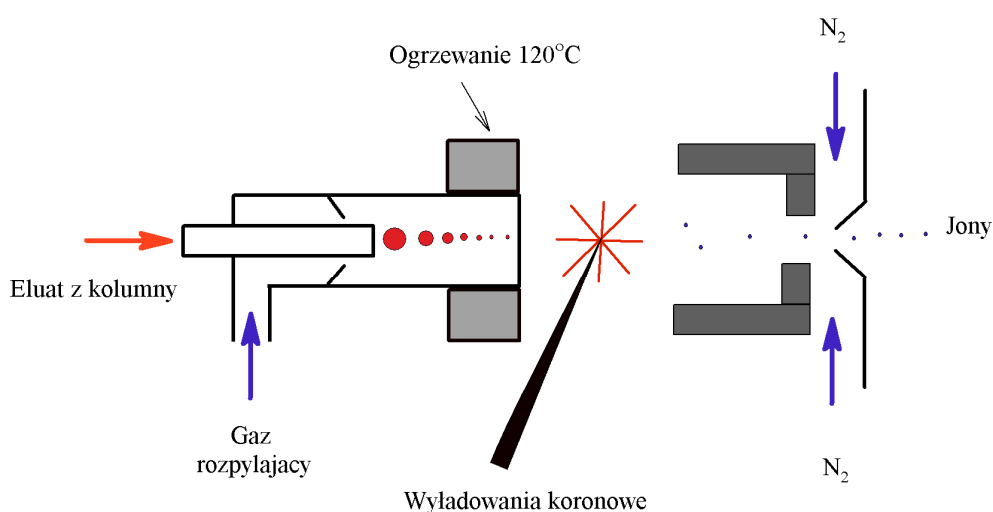
Jonizacja APCI

Źródło jonów APCI (rysunek 52) składa się z:

- kapilary, przez którą przepływa faza ruchoma z HPLC zamieniająca się w aerozol,
- ogrzewanej rurki,
- igły wyładowawczej, która produkuje jony z powstałego aerozolu.

APCI jest metodą jonizacji, w której zachodzi reakcja w fazie gazowej pod ciśnieniem atmosferycznym pomiędzy jonom pierwotnym a cząsteczką analitu. Jest to metoda podobna do jonizacji chemicznej stosowanej w technice GC/MS. Różnica polega na tym, że jony pierwotne powstają ze składników fazy ruchomej poprzez wyładowania koronowe. Zaostrzona elektroda (igła wyładowawcza) wytwarza gradient potencjału. Przy wyładowaniach koronowych powstałe napięcie jest wystarczające, aby medium uległo częściowej jonizacji natomiast za niskie, aby powstał łuk elektryczny. W atmosferze azotu i w obecności wody, pod wpływem wyładowań koronowych zachodzą reakcje, które prowadzą do powstania jonów pierwotnych. Następnie powstają protonowane pozorne jony molekularne $[M + H]^+$, poprzez przeniesienie protonu z jonu pierwotnego do cząsteczki analitu. Chociaż APCI jest

Łagodną techniką jonizacji, występującą niewielką fragmentacją cząsteczek można wykorzystać do badania struktury związku.



Rysunek 52. Schemat źródła jonów typu APCI [na podstawie *Spektrometria mas.* de Hoffmann E. *et al.*, 1998]

5. Chromatografia z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym

5.1. Wstęp

Chromatografia z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym (ang. *supercritical fluid chromatography*, SFC) jest techniką rozdzielania mieszanin związków chemicznych posiadającą właściwości pośrednie między chromatografią gazową a ciekową. W literaturze spotyka się również inne terminy na określenie tej techniki, jak: chromatografia fluidalna czy chromatografia nadkrytyczna.

Fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym jest medium znajdujące się w warunkach powyżej warunków punktu krytycznego, tzn. ma temperaturę wyższą od temperatury krytycznej i jest pod ciśnieniem wyższym od ciśnienia krytycznego. Punkt krytyczny jest wielkością charakterystyczną dla danej substancji. Poniżej wartości punktu krytycznego, w zależności od zmian wartości ciśnienia i temperatury, mogą istnieć trzy stany skupienia substancji – gazowa, ciekła i stała. Powyżej wartości ciśnienia i temperatury określanych przez punkt krytyczny, substancja znajduje się w stanie nadkrytycznym, w którym zanika różnica między gazem a cieczą. Powyżej tego punktu, niezależnie od zmian ciśnienia i temperatury, stan skupienia substancji nie zmienia się. Powyższe obrazuje diagram przemian fazowych przedstawiony na rysunku 37 w rozdziale II.5.2.11.

Substancja w stanie nadkrytycznym ma właściwości pośrednie między gazem a cieczą. Ma ona gęstość zbliżoną do gęstości cieczy, lepkość zbliżoną do lepkości gazu a współczynnik dyfuzji mniejszy niż dla gazu, ale wyższy niż dla cieczy. Porównanie właściwości gazu, cieczy i płynu w stanie nadkrytycznym przedstawiono w tabeli 5.

Gęstość płynu w stanie nadkrytycznym sprawia, że ma on dobre właściwości rozpuszczalnikowe, substancje rozpuszczają się w nim jak w cieczy, podobnie jak w chromatografii ciekowej. Mała lepkość płynu i niskie napięcie powierzchniowe powodują, że jego współczynnik dyfuzji jest wyższy niż dla cieczy, co skutkuje szybszym przenoszeniem masy, podobnie jak w chromatografii gazowej.

Tabela 5. Porównanie niektórych właściwości gazu, cieczy i płynu w stanie nadkrytycznym [na podstawie *Podstawy chromatografii*, Witkiewicz Z., WNT, Warszawa, 2000]

Parametr	Gaz	Ciecz	Płyn w stanie nadkrytycznym
Współczynnik dyfuzji [cm ² /s]	0,01 – 1,0	(0,5 – 2,0) · 10 ⁻⁵	(0,5 – 3,3) · 10 ⁻⁴
Lepkość [g/s cm]	(2,0 – 9,9) · 10 ⁻⁴	(0,3 – 2,4) · 10 ⁻²	(0,5 – 3,5) · 10 ⁻⁴
Gęstość [g/cm ³]	(0,6 – 2,0) · 10 ⁻³	0,8 – 1,0	0,2 – 0,9

Wymienione cechy płynu w stanie nadkrytycznym są bardzo korzystne dla procesu chromatograficznego. Umożliwiają rozdzielanie substancji o małej trwałości termicznej, o małej lotności i dużych masach cząsteczkowych. Chromatografia z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym jest techniką uzupełniającą, ułatwiającą rozdzielanie takich mieszanin substancji, których rozdzielanie innymi technikami chromatograficznymi jest trudne, długotrwałe lub wręcz niemożliwe.

5.2. Fazy ruchome

W chromatografii z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym duże znaczenie w procesie rozdzielania mają lotność oraz rozpuszczalność substancji badanych w fazie ruchomej. Wiele substancji w stanie nadkrytycznym posiada dobre właściwości rozpuszczania. Rozpuszczalność analitów w płynie nadkrytycznym zależy przede wszystkim od temperatury i gęstości, a w mniejszym stopniu od ciśnienia. Odpowiednią rozpuszczalność oraz niskie parametry punktu krytycznego, umożliwiające zastosowanie jako fazy ruchomej w stanie nadkrytycznym posiadają m.in.: freony, pentan, amoniak, podtlenek azotu i ditlenek węgla.

Najpowszechniej stosowany jest ditlenek węgla (CO₂), przede wszystkim dlatego, że ma niską temperaturę krytyczną (31,3°C), niskie ciśnienie krytyczne (7,29 MPa), jest nietoksyczny i niepalny oraz łatwy do otrzymania w wysokiej czystości. Gęstość ditlenku węgla w punkcie krytycznym wynosi 0,448 g/cm³. Ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym posiada właściwości protonowo-akceptorowe, posiada zdolność tworzenia wiązań wodorowych i ma niską polarność (porównywalną z polarnością heksanu). W przypadku stosowania chromatografii z kolumnami kapilarnymi, polarność ditlenku węgla jest wystarczająca nawet dla związków polarnych. Przy zastosowaniu kolumn pakunkowych, polarność ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym umożliwia chromatografię związków niepolarnych i średniopolarnych. Dla związków polarnych stosuje się polarne modyfikatory fazy ruchomej, np. alkohole, aminy, wodę. Modyfikator polarny dodany w małych ilościach (1÷10%) do ditlenku węgla zwiększa rozpuszczalność polarnych analitów, tym samym siłę elucji fazy ruchomej, selektywność procesu rozdzielania i sprawność kolumny. Dodatek modyfikatora zmienia jednak parametry krytyczne ditlenku węgla, np. podwyższa temperaturę punktu krytycznego. Zbyt wysoka temperatura może być powodem rozkładu substancji analizowanych.

5.3. Proces rozdzielania chromatograficznego

W chromatografii z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym na retencję związków rozdzielanych ma wpływ znacznie więcej czynników niż w pozostałych rodzajach chromatografii. Czas retencji zależy od:

- właściwości analitów,

- właściwości wypełnienia kolumny (rodzaju fazy stacjonarnej),
- rozmiarów kolumny,
- rodzaju, gęstości i prędkości przepływu fazy ruchomej,
- temperatury i ciśnienia w kolumnie,
- rodzaju i ilości zastosowanego modyfikatora.

Zmieniając parametry procesu, zmienia się właściwości płynu w stanie nadkrytycznym. Gęstość płynu jest podstawowym czynnikiem wpływającym na retencję, od gęstości płynu zależy jego zdolność do rozpuszczania analitów. Gęstość płynu w stanie nadkrytycznym ulega zmianie ze zmianą ciśnienia oraz temperatury. Płyn o mniejszej gęstości ma właściwości rozpuszczalników niepolarnych, natomiast o dużej gęstości – właściwości rozpuszczalników bardziej polarnych, jak np. dichlorometanu. Zmiany gęstości fazy ruchomej powodują zmiany czasu retencji analitów. Współczynnik retencji zmniejsza się ze wzrostem gęstości w stałej temperaturze oraz ze wzrostem temperatury przy stałej gęstości. Wpływ wzrostu temperatury na współczynnik retencji analitu może być odmienny dla niskich i wysokich temperatur stanu nadkrytycznego. W niższych temperaturach stanu nadkrytycznego współczynnik retencji wzrasta ze wzrostem temperatury, natomiast w wyższych temperaturach – maleje ze wzrostem temperatury dla tych samych analitów. Fakt ten tłumaczy się tym, że w niższych temperaturach stanu nadkrytycznego na retencję ma wpływ głównie proces rozpuszczania, natomiast w wyższych temperaturach stanu nadkrytycznego, którym towarzyszy wysokie ciśnienie, większe znaczenie ma lotność analizowanych związków. Przeciwnie działanie tych dwóch efektów: lotności i rozpuszczalności powoduje, że w chromatografii z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym przy stałym ciśnieniu, w zależności współczynnika retencji od temperatury istnieje wyraźne maksimum.

Warunki separacji techniką chromatografii z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym mogą być stałe lub zmienne. Opracowanie warunków procesu rozdzielania polega na:

- ustaleniu temperatury kolumny, programowaniu jej wzrostu lub obniżania, jak w chromatografii gazowej,
- programowaniu zmiany ciśnienia i gęstości fazy ruchomej,
- ustaleniu składu fazy ruchomej, zaprogramowanie zmienności składu jak w elucji gradientowej w chromatografii ciekłowej.

Zmieniać można kolejno poszczególne parametry rozdzielania lub programować jednoczesne zmiany wszystkich lub wybranych parametrów.

5.4. Aparatura

Chromatograf

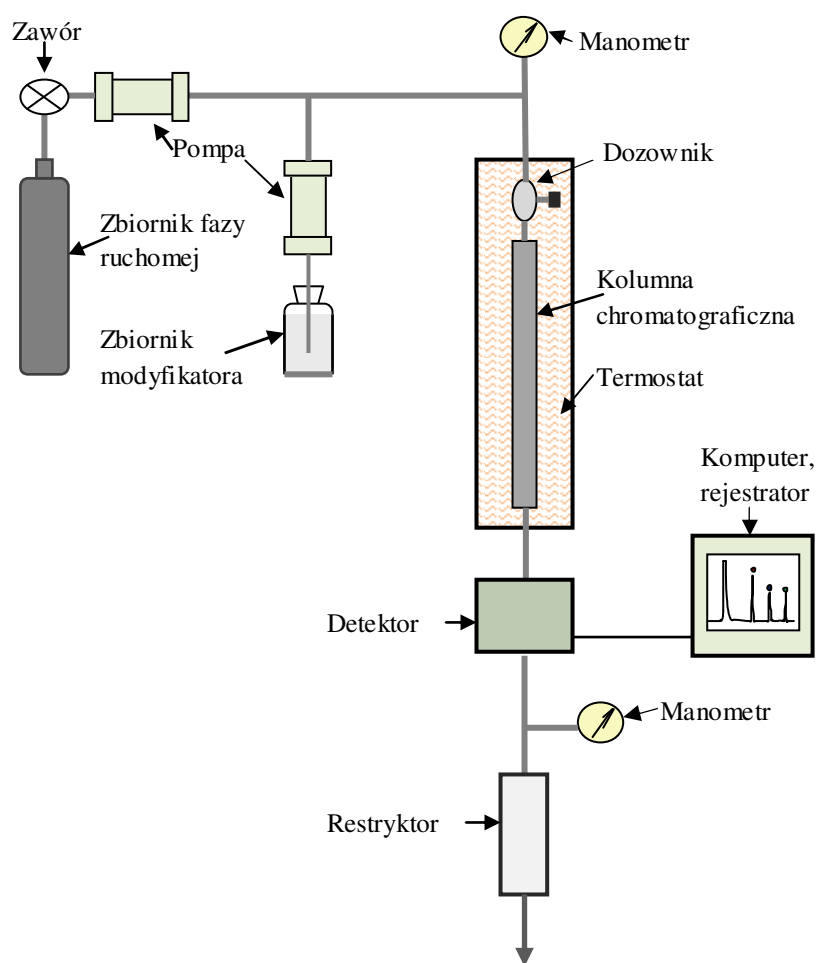
Aparaty do chromatografii z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym składają się z tych samych podstawowych elementów, co każdy chromatograf, gazowy czy ciekłowy. Nowym i istotnym elementem jest restryktor, który umożliwia utrzymanie w kolumnie odpowiednio wysokiego ciśnienia. Nowoczesne chromatografy, dostępne obecnie na rynku, dostosowane są do pracy w trzech systemach: z gazową fazą ruchomą, jako chromatograf gazowy, z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym oraz z ciekłą fazą ruchomą, jako chromatograf ciekłowy. Schemat chromatografu do pracy z fazą w stanie nadkrytycznym przedstawiono na rysunku 53.

Pompy

Odpowiedni przepływ fazy ruchomej wymuszają pompy, takie jak stosowane w chromatografii cieczowej. W przypadku stosowania ditlenku węgla, w pompach tłokowych stosuje się chłodzenie głowic do temperatury -10°C , aby zapobiec odparowywaniu fazy ruchomej i utrzymaniu jej w stanie płynnym. W przypadku stosowania pomp strzykawkowych, tłoczenie fazy ruchomej odbywa się za pomocą sprężonego helu z butli gazowej.

Dozowniki

Do wprowadzania substancji na kolumnę stosuje najczęściej zawór z pętlą, podobnie jak w chromatografii cieczowej. Do kolumn kapilarnych stosuje się zawory o pojemności pętli ok. $0,1\text{--}0,2\ \mu\text{L}$ z dzieleniem strumienia. Właściwe dozowanie próbki, zwłaszcza w analizie ilościowej jest trudne i wymaga właściwego połączenia zaworu z kolumną dla zachowania odpowiedniego ciśnienia i temperatury.



Rysunek 53. Schemat budowy chromatografu do pracy z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym

Kolumny i fazy stacjonarne

Do pracy z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym stosuje się kolumny pakowane, mikropakowane i kapilarne. Rozmiary kolumn pakowanych są podobne do rozmiarów kolumn stosowanych w chromatografii cieczowej. Kolumny kapilarne mają średnice $100\ \mu\text{m}$ lub mniejsze i długość do kilku

metrów Dla zapewnienia dobrego rozdzielania na kolumnie kapilarnej, dozowane próbki powinny być jak najmniejszej wielkości oraz konieczna jest stała prędkość przepływu fazy ruchomej przy programowanym ciśnieniu. Kolumny mikropakowane są to pakowane kolumny kapilarne o średnicach 0,25 – 0,5 mm.

Fazy stacjonarne stosowane w chromatografii z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym to, podobnie jak w HPLC, żel krzemionkowy i chemicznie związane fazy z żelem krzemionkowym, jak oktadecylosilan (RP-C18) czy żel krzemionkowy związany z grupami propyloaminowymi i inne. Od rodzaju fazy stacjonarnej zależy zakres temperaturowy pracy z fazą w stanie nadkrytycznym. Faza stacjonarna RP-C18 wytrzymuje temperaturę do 150°C, natomiast aminopropylowa - tylko 75°C. Sprawność kolumn pakowanych jest porównywalna ze sprawnością kolumn do HPLC z tym, że tę samą sprawność uzyskuje się przy przepływach fazy ruchomej 5-10 razy większych niż w HPLC, co oznacza zdecydowanie krótsze analizy w chromatografii z fazą w stanie nadkrytycznym. W kolumnach mikropakowanych wypełnieniem mogą być porowate kulki szklane, służące również jako nośnik dla różnych polimerów siloksanowych.

Detektory

Detektory stosowane w chromatografii gazowej i cieczowej mogą być wykorzystane w chromatografii z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym. W przypadku zastosowania detektorów do chromatografii gazowej, płyn wychodzący z kolumny chromatograficznej musi mieć obniżone ciśnienie (dekompresja), obniżoną temperaturę (schłodzony) i przekształcony w gaz. Przy stosowaniu detektorów do chromatografii cieczowej, eluat z kolumny może wpływać do detektora w stanie nadkrytycznym.

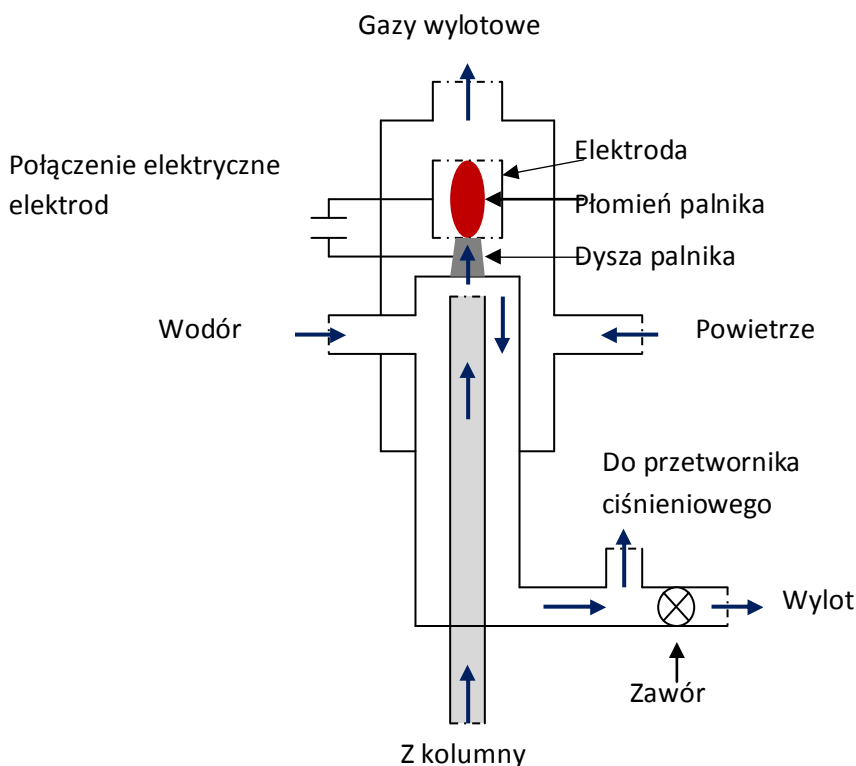
Wśród wielu detektorów używanych w chromatografii gazowej największe zastosowanie w chromatografii z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym ma detektor płomieniowo jonizacyjny (FID). Na rysunku 54 przedstawiono schemat takiego detektora. Jest on wyposażony dodatkowo w przetwornik ciśnieniowy i odpowiednie zawory, umożliwiające wprowadzanie eluatu z kolumny w postaci gazu (*por.roz. III.3.2 rys. 48*). Ograniczeniem detektora FID jest niemożność stosowania modyfikatorów organicznych, gdyż tworzą one karbojony. W chromatografii z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym z detektorem FID modyfikatorami mogą być jedynie związki nietworzące karbojonów, jak kwas mrówkowy czy woda.

Detektory optyczne stosowane w chromatografii cieczowej są również wykorzystywane w chromatografii z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym. Najczęściej, tak samo jak w HPLC, stosowany jest detektor UV. Jednak najlepszym detektorem w chromatografii z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym jest spektrometr mas. Połączenie spektrometru mas z tym rodzajem chromatografii jest łatwiejsze niż połączenie z HPLC.

Restryktory

Aby utrzymać fazę ruchomą w stanie nadkrytycznym należy zachować w czasie separacji warunki ciśnienia i temperatury powyżej wartości krytycznych. Utrzymanie właściwej temperatury jest osiągnięte w piecu chromatograficznym, natomiast do uzyskania właściwego ciśnienia stosuje się urządzenia zwane restryktorami. Restryktor znajduje się przed detektorem, jak w przypadku detektorów stosowanych w chromatografii gazowej, np. FID lub za detektorem, jak w przypadku detektorów stosowanych w chromatografii cieczowej, np. detektora UV. Najprostszym restryktorem, o stałych parametrach pracy jest przewężenie w postaci krótkiego odcinka kapilary na drodze przepływu fazy ruchomej, jest to restryktor liniowy o długości zwykle 10–15 cm i średnicy do kilkunastu

mikrometrów. W cienkiej kapilarze płyn płynie szybciej niż przez przewód o większej średnicy przed kapilarą, co pociąga za sobą spadek ciśnienia w kapilarze (równanie Bernoulliego). Ważne, by spadek ciśnienia następował na bardzo krótkim odcinku restryktora, co zapobiega kondensacji analitów. Restryktory liniowe wykonane są ze szkła, kwarcu lub stali nierdzewnej. Zmianę warunków pracy restryktora liniowego można osiągnąć przez programowanie jego temperatury. Restryktory mechaniczne lub elektryczne są lepsze od restryktorów liniowych, umożliwiając płynną regulację ciśnienia, ale są bardzo skomplikowanymi urządzeniami.



Rysunek 54. Schemat detektora płomieniowo-jonizacyjnego (FID) stosowanego w chromatografii z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym [na podstawie *Podstawy chromatografii*, Witkiewicz Z., WNT, Warszawa, 2000]

5.5. Zastosowanie chromatografii z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym

Chromatografię z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym można stosować w różnych układach połączeń: z chromatografią gazową, cieczową lub ekstrakcją płynem w stanie nadkrytycznym. Ten rodzaj chromatografii ma zastosowanie do rozdzielania substancji nielotnych lub nietrwałych termicznie. Przykładami zastosowania chromatografii z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym są oznaczanie leków i substancji biologicznie czynnych, pestycydów i herbicydów, mieszanin węglowodorów nasyconych, nienasyconych i aromatycznych w mieszaninach, nitropochodnych i hydroksynitropochodnych węglowodorów policyklicznych, wolnych kwasów tłuszczowych, amin, materiałów wybuchowych, oligomerów, oznaczanie związków chiralnych i wielu innych związków chemicznych.

6. Literatura

1. Ahuja, S. *Chromatography and separation science*; Academic Press: 2003.
2. Beesley, T. E.; Buglio, B.; Scott, R. P. W. *Quantitative Chromatographic Analysis*; Marcel Dekker: New York, 2000; *e-książki*.
3. Cazes, J.; Scott, R. P. W. *Chromatography theory*; Marcel Dekker: New York, 2002.
4. de Hoffmann, E.; Charette, J.; Stroobant, V. *Spektrometria mas*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne: Warszawa, 1998.
5. Deyl, Z.; Macek, K.; Janák, J. *Liquid column chromatography: a survey of modern techniques and applications*; Elsevier: Amsterdam, 1975.
6. Downard, K. *Mass spectrometry: a foundation course*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2004.
7. Etre, L. S. *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65, 819-872,
<http://www.iupac.org/publications/pac/65/4/0819/>
8. Fried, B.; Sherma, J. *Thin-Layer Chromatography*, Marcel Dekker: New York, 1999; *e-książki*.
9. Hahn-Deinstrop, E. *Applied Thin-Layer Chromatography: Best Practice and Avoidance of Mistakes*; Wiley-VCH: Weinheim, 2007.
10. Katz, E.; Eksteen, R.; Schoenmakers, P.; Miller, N. (red) *Handbook of HPLC*; Marcel Dekker: New York, 1998.
11. Kocjan, R. (red.) *Chemia analityczna. Podręcznik dla studentów*; Wydawnictwo Lekarskie PZWL: Warszawa, 2000; Tom 2.
12. Lindsay, S. *High performance liquid chromatography*; Analytical Chemistry by Open Learning; John Wiley & Sons Inc.: New York, 1997.
13. Michalski, R. *Chromatografia jonowa: podstawy i zastosowania*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne: Warszawa, 2005.
14. Patnaik, P. *Dean's Analytical Chemistry Handbook*; McGraw-Hill: New York, 2004; *e-książki*.
15. Sadek, P. C. *Illustrated pocket dictionary of chromatography*; John Wiley & Sons Inc.: New York, 2004.
16. Scott, R. P. W. *Techniques and practice of chromatography*; Chromatographic Science Series; Marcel Dekker: New York, 1995.
17. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J. *Introduction to modern liquid chromatography*; John Wiley & Sons Inc.: New York, 1979.
18. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L. *Practical HPLC method development*; John Wiley & Sons Inc.: New York, 1997.
19. Szczepaniak, W. *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 1996.
20. Talamona, A. *Laboratory Chromatography Guide*; Büchi Labortechnik AG: Flawil, Switzerland, 2005.
21. Viehweger, K. H. (red.) *Praktyczna chromatografia jonowa*; Metrom: Herisau, Szwajcaria, 2010.
22. Willard, H. H.; Merritt, L. J.; Dean, J. A.; Settle, F. A. *Instrumental Methods of Analysis*; Wadsworth Publishing Company: Belmont, USA, 1988.
23. Witkiewicz, Z.; Hepter, J. *Chromatografia gazowa*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne: Warszawa, 2001.
24. Witkiewicz, Z. *Podstawy chromatografii*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne: Warszawa, 1992.
25. Witkiewicz, Z. (red.); Soczewiński, E. (red.); Suprynowicz, Z. (red.) *Nomenklatura*

- chromatograficzna*; Polskie Towarzystwo Chemiczne: Warszawa, 1996.
26. Zieliński, W.; Rajca, A.; *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne: Warszawa, 1995.

IV. Techniki elektromigracyjne

1. Wstęp

Przyłożenie pola elektrycznego do wodnego roztworu elektrolitu zawsze powoduje ruch jonów w kierunku elektrod o przeciwnym znaku ładunku elektrycznego. Jeśli w roztworze elektrolitu znajdują się makrocząsteczki obdarzone niezerównoważonym ładunkiem elektrycznym (makrojon), będą się one również przemieszczały w kierunku elektrod, ale z inną prędkością. Różnice w prędkości poruszania się jonów w polu elektrycznym są podstawą rozdzielania za pomocą technik elektromigracyjnych.

Migracji jonów i makrojonów towarzyszą zjawiska fizyczne określane mianem elektrolizy oraz elektroforezy.

Elektroliza - proces zachodzący przy powierzchni elektrod, polegający na odkładaniu się substancji, pochodzących z elektrolitu, na elektrodach pod wpływem przepływającego prądu (reakcje utleniania i redukcji). Procesy te opisywane są ilościowo prawami elektrolizy Faraday'a.

Elektroforeza (grecki: elektron – elektryczność + phoresis – przenoszenie) jest zjawiskiem elektrokinetycznym, zachodzącym w objętości elektrolitu, w którym makrocząsteczki obdarzone niezerównoważonym ładunkiem elektrycznym przemieszczają się pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego w kierunku elektrody o przeciwnym ładunku.

Jony w środowisku wodnym posiadają otoczkę hydratacyjną, czyli układ dipoli wodnych, związanych z jonem dość słabymi siłami oddziaływania elektrostatycznego. Zarówno obecność otoczki hydratacyjnej, jak i jej wielkość w istotny sposób wpływają na możliwość ruchu jonów i makrojonów w otaczającym je środowisku. Właściwości otoczki hydratacyjnej zależą od rozmiaru jonu i zgromadzonego na nim niezerównoważonego ładunku elektrycznego oraz od właściwości elektrolitu, tj. jego siły jonowej oraz wartości pH. O ile rozmiar jonu i zgromadzony na nim ładunek już nie mogą być zmieniane, to właściwości elektrolitu mogą być łatwo modyfikowane dla uzyskania lepszej rozdzielczości.

Siła jonowa (μ) - jest funkcją stężenia jonów elektrolitu (buforu) i równa jest połowie sumy iloczynów stężeń molowych i kwadratów ładunków wszystkich jonów znajdujących się w roztworze:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (1)$$

gdzie:

- n – liczba rodzajów jonów,
- c_i – stężenie i -tego jonu [mol/dm³],
- z_i – ładunek i -tego jonu.

Dla elektrolitów o niewielkim stężeniu, gdy odległości pomiędzy jonami, a ściślej pomiędzy otoczkami jonów są duże, wzrost wartości siły jonowej powoduje wzrost wartości przewodności jonowej elektrolitu, spowodowany wzrostem liczby nośników ładunku elektrycznego. Dalszy wzrost wartości siły jonowej powoduje zagęszczenia jonów i ich otoczki hydratacyjnych. Pojawiające się tarcie pomiędzy otoczkami zaczyna odgrywać decydującą rolę w ich ruchu w polu elektrycznym, w związku z tym przewodnictwo elektryczne elektrolitu znacząco spada. Wpływ wartości siły jonowej na zachowanie jonów w polu elektrycznym należy uwzględnić przy doborze składu elektrolitów

przeznaczonych do elektroforezy Biorąc pod uwagę wpływ wartości siły jonowej na zachowanie jonów w polu elektrycznym należy podkreślić wagę doboru składu elektrolitów przeznaczonych do elektroforezy. Istotne jest zachowanie rozsądnego stosunku liczby jonów do liczby makrojonów tak, aby przenoszony przez elektrolit ładunek elektryczny rozkładał się korzystnie na wszystkie obecne tam jony. Zbyt wysokie stężenie jonów powoduje ograniczenie ich ruchliwości, natomiast zbyt niskie, wpływa na niedobór nośników ładunku elektrycznego. Wzrost oporności elektrycznej roztworu spowodowany niedoborem nośników ładunku elektrycznego, podczas elektroforezy przeprowadzanej w warunkach stałego natężenia prądu, wymusza wzrost napięcia niezbędnego dla przepływu prądu. To z kolei powoduje zwiększenie ilości ciepła wydzielanego w obrębie elektrolitu, która może mieć istotny wpływ na rozdzielczość.

Wartość pH, czyli miara stężenia jonów wodorowych (hydroniowych) w elektrolicie, ma szczególnie istotne znaczenie w odniesieniu do separacji białek i peptydów. Związki te posiadają własności amfoteryczne, czyli są obdarzone wypadkowym ładunkiem elektrycznym dodatnim albo ujemnym, w zależności od warunków środowiskowych. Ładunek elektryczny białek pochodzi z, zależnej od wartości pH, jonizacji bocznych łańcuchów grup karboksylowych oraz grup aminowych:



Wypadkowy ładunek elektryczny cząsteczki peptydu lub białka zależy od wartości pH roztworu i jest równy zero przy wartości pH, charakterystycznej dla danego białka lub peptydu, zw. punktem izoelektrycznym (pI). W środowisku o wartości pH < pI białko obdarzone jest ładunkiem dodatnim, więc migruje w kierunku elektrody ujemnej. W celu uzyskania odpowiedniej separacji amfoterycznych składników mieszaniny, konieczne jest utrzymywanie stałej wartości pH elektrolitu. W trakcie rozdzielania elektroforetycznego wartość pH elektrolitu zmienia się na skutek zachodzącej elektrolizy wody, w której wyniku na katodzie generowane są jony H^+ , natomiast na anodzie - OH^- . Dlatego stałą wartość pH podczas rozdzieleń elektroforetycznych osiąga się poprzez buforowanie stosowanych elektrolitów.

Zachowanie się makrojonu w polu elektrycznym zależy od jego parametrów. Na makrojon działa siła F , która jest proporcjonalna do natężenia wytworzonego pola elektrycznego oraz ładunku zgromadzonego na moleku

$$F = Eq \quad (2)$$

gdzie:

q – ładunek zgromadzony na makrojonie [C],
 E - natężenia pola elektrycznego [V/cm].

Natężenie wytworzonego pola elektrycznego E jest proporcjonalne do przyłożonego napięcia U oraz odwrotnie proporcjonalne do odległości pomiędzy elektrodami:

$$E = \frac{U}{l} \quad (3)$$

gdzie:

U – przyłożone napięcie elektryczne (różnica potencjałów),
 l - odległość pomiędzy elektrodami (przyłożonymi potencjałami).

Połączenie obu powyższych równań daje wyrażenie na siłę F działającą na makrojon o ładunku q umieszczony w układzie, do którego przyłożone jest napięcie U :

$$F = \frac{qU}{l} \quad (4)$$

Z powyższego wzoru wynika, że wzrost wartości przyłożonego napięcia U powoduje zwiększenie natężenia wytworzonego pola F , a więc zwiększenie siły działającej na makrojon, co powoduje szybszą jego migrację. Natomiast zwiększenie odległości l pomiędzy elektrodami wpływa na zmniejszenie natężenia wytworzonego pola elektrycznego, czyli spowalnia migrację makrocząsteczki. Makrojon osiąga prędkość graniczną, która jest wypadkową oporu środowiska i wytworzonego pola elektrycznego. Dla makrojonu o kształcie kulistym (zgodnie z prawem Stokesa) można zapisać następującą zależność:

$$Eq = 6\pi\eta rv \quad (5)$$

gdzie:

- η - lepkość środowiska, w którym migruje jon,
- r - promień makrojonu,
- v - prędkość ruchu makrojonu.

Podstawą rozdziałów elektroforetycznych jest różnica w prędkościach migracji cząstek obdarzonych ładunkiem w polu elektrycznym o stałym natężeniu.

Prędkość migracji v [$\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$] w kierunku elektrod jest różna dla różnych cząsteczek i zależy od natężenia pola elektrycznego E [V/cm] oraz ruchliwości elektroforetycznej danej cząsteczki μ_{ef} :

$$v = \mu_{ef} E \quad (6)$$

Prędkość przemieszczania się naładowanych elektrycznie makrocząsteczek zależy od ich ładunku, rozmiaru, kształtu oraz oporów ruchu środowiska. Dana molekula będzie poruszać się ze stałą prędkością, jeżeli w trakcie analizy następujące parametry nie ulegną zmianie:

- różnica potencjałów,
- natężenie prądu,
- pH środowiska,
- temperatura roztworu,
- przewodność roztworu,
- lepkość roztworu.

Ruchliwość elektroforetyczna μ_{ef} [$\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$] jest wielkością charakterystyczną dla makrojonu w danym ośrodku. Jest ona proporcjonalna do wartości ładunku cząsteczki q [C], natomiast odwrotnie

proporcjonalna do lepkości środowiska η [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$] i promienia cząstki r [cm] (mniejsze cząsteczki obdarzone większym ładunkiem wykazują szybszą migrację):

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (7)$$

Czynniki wpływające na ruchliwość elektroforetyczną makrojonu, to:

- rodzaj i stężenie buforu,
- pH buforu,
- temperatura,
- natężenie pola elektrycznego,
- właściwości i rodzaj rozdzielanego materiału.

Przy rozważaniu procesów zachodzących w technikach elektromigracyjnych należy pamiętać o oporze elektrycznym elektrolitu, opisywanym prawem Ohma. Prawo to przedstawia zależność pomiędzy przyłożonym napięciem U , a płynącym w wyniku tego prądem I [A] oraz oporem elektrycznym (rezystancją) R [Ω] elektrolitu:

$$U = IR \quad (8)$$

Podczas przepływu prądu elektrycznego, w wyniku wykonywania pracy przesunięcia ładunku elektrycznego przez pole, na opornościach obwodu tracona jest moc P [W]. Pracy tej towarzyszy wydzielanie się ciepła, zwanego ciepłem Joule'a. Ilość wydzielonego ciepła Q_J [J] opisuje równanie:

$$Q_J = UI t \quad (9)$$

W czasie trwania elektroforezy następuje wzrost temperatury elektrolitu na skutek wydzielania ciepła Joule'a. Zwykle ze wzrostem temperatury obniża się oporność elektrolitu, co powoduje wzrost prędkości migracji makrojonów, dlatego utrzymywanie stałej temperatury w czasie separacji jest konieczne dla osiągnięcia zadowalających i powtarzalnych rezultatów elektroforetycznej separacji. Zmienna temperatura podczas separacji elektroforetycznych wpływa na jakość uzyskanych wyników:

- powoduje znaczne poszerzenie pasma migrującej substancji, co obniża rozdzielczość procesu separacji,
- powoduje nierównomierne przemieszczanie się frontu elektroforezy; makrojonu w centralnej części nośnika, gdzie może być wyższa temperatura niż przy bocznych jego krawędziach, migrują znacznie szybciej z powodu niższego oporu niż ich odpowiedniki znajdujące się poza centrum nośnika.

Zbyt wysoka temperatura może powodować tzw. przegrzanie układu, co może być „szkodliwe” zarówno dla rozdzielanych substancji jak i samego sprzętu:

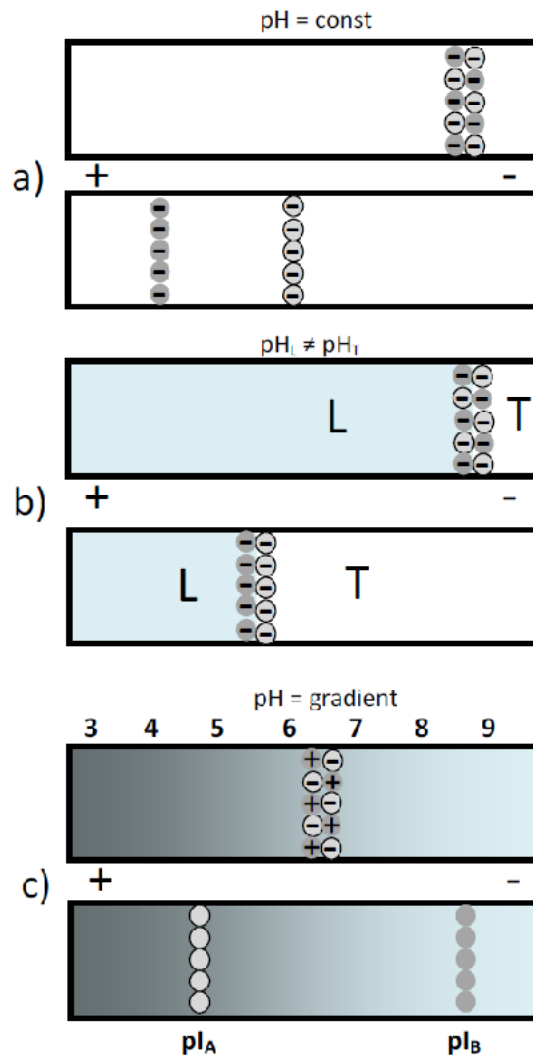
- może nastąpić strata analitów, np. na skutek ich denaturacji i inaktywacji w podwyższonej temperaturze,
- może nastąpić uszkodzenie zestawu do elektroforezy, na skutek termicznych odkształceń lub nawet pęknięć niektórych jego elementów.

Dobrej jakości aparaty do elektroforezy mają możliwość odprowadzania lub rozpraszania nadmiaru ciepła z układu, w celu zapobieżenia ewentualnym zniszczeniom.

2. Podział technik elektroforetycznych

Ze względu na sposób prowadzenia separacji stosowane w praktyce metody elektroforetyczne są pochodnymi lub kombinacjami trzech podstawowych rodzajów separacji (Rysunek 1):

- elektroforeza strefowa (ZE - *zone electrophoresis*),
- izotachoforeza (ITP - *isotachphoresis*),
- ogniskowanie izoelektryczne (IEF - *isoelectric focusing*).



Rysunek 1. Zasady rozdzielenia: a) - elektroforeza strefowa, b) – izotachoforeza, c) - ogniskowanie izoelektryczne

Elektroforeza strefowa - rozdzielanie makrojonów odbywa się na podstawie różnic w ich ruchliwości przy stałej wartości pH (stały układ buforów) i przy stałym natężeniu pola elektrycznego.

Izotachoforeza - rozdzielanie prowadzone jest w nieciągłym systemie buforów. Zjonizowana próbka wędruje pomiędzy „szybkim” elektrolitem wiodącym a „wolnym” elektrolitem kończącym. Makroiony o najwyższej ruchliwości elektroforetycznej poruszają się tuż za jonami elektrolitu

wiodącego, a te o najmniejszej ruchliwości elektroforetycznej wędrują bezpośrednio przed jonami elektrolitu kończącego.

Ogniskowanie izoelektryczne - metoda stosowana do rozdzielania substancji amfoterycznych np. białek i peptydów, których ładunek elektryczny zależy od wartości pH. Rozdzielanie prowadzone jest w gradiencie pH. Przy pH powyżej i poniżej wartości punktu izoelektrycznego cząstka jest obdarzona ładunkiem, więc przesuwa się w kierunku anody lub katody do momentu dotarcia do punktu, w którym wartość pH odpowiada właściwemu jej punktowi izoelektrycznemu. W punkcie tym sumaryczny ładunek cząstki substancji amfoterycznej wynosi zero, więc jest cząstką obojętną i zatrzymuje się (ogniskuje w jednym miejscu).

Ze względu na „środowisko”, w którym poruszają się jony wyróżnia się:

- **elektroforezę swobodną** - bezpośrednio w roztworze elektrolitu (np. elektroforeza kapilarna),
- **elektroforezę w nośniku elektroforetycznym** (bibuła, azotan celulozy, agarosa, poliakryloamid i innych), wypełnionym odpowiednim elektrolitem.

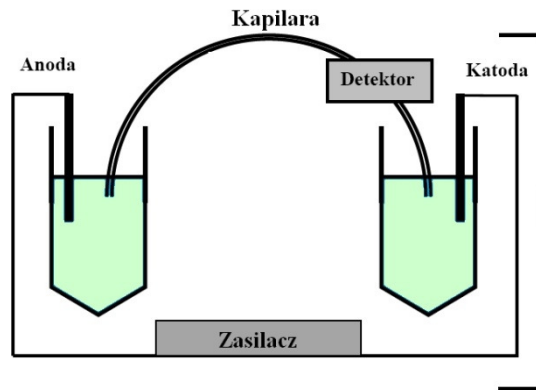
Elektroforeza swobodna, nie licząc elektroforezy kapilarnej, jest rzadko używana, ze względu na dyfuzję termiczną oraz konwekcję rozdzielanych cząstek. Skutkiem tego jest rozmycie próbki jeszcze przed rozpoczęciem właściwego procesu separacji, w związku z tym uzyskuje się bardzo słabą jakość rozdzielania analizowanych substancji. Problem ten został rozwiązany przez zastosowanie nośnika, np. żelu lub bibuły, stabilizującego elektrolit, ale również wpływającego na lepszą separację makrocząsteczek przez ich dodatkowe frakcjonowanie na zasadzie chromatografii wykluczania. Spośród wymienionych powyżej nośników najpowszechniej wykorzystywany jest obecnie żel poliakrylamidowy (ze względu na jego właściwości), który został szczegółowo omówiony w podrozdziale 2.2.1.

Ze względu na geometrię nośnika elektroforetycznego (przestrzeń, w której umieszczony jest nośnik nazywa się komorą elektroforetyczną) można wyróżnić:

- **elektroforezę kapilarną** (ang. *capillary electrophoresis*),
- **elektroforezę żelową na płaszczyźnie**: pionową (ang. *vertical electrophoresis*) oraz poziomą (ang. *horizontal electrophoresis*).

2.1. Elektroforeza kapilarna

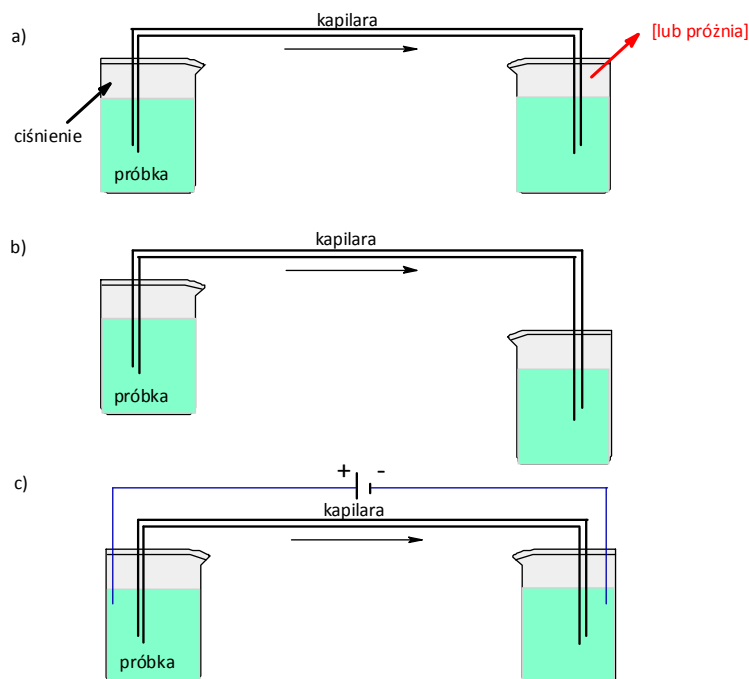
Początki elektroforezy kapilarnej sięgają lat 30 ubiegłego wieku, kiedy to szwedzki uczoney Tiselius zbudował zestaw składający się z rurki w kształcie litery U, do której końców przyłączył źródło zasilania prądem elektrycznym a w środku umieścił mieszaninę białek. W wyniku tego eksperymentu zaobserwował, że białka migrują do końców elektrod z różnymi prędkościami. Uzyskiwane przez niego rozdzielania nie były zbyt udane na skutek małej rozdzielczości, wynikającej z dyfuzji termicznej oraz konwekcji rozdzielanych cząsteczek. Z powodu tych ograniczeń, przez następne lata rozwój tej techniki dotyczył tylko elektroforezy, w której elektrolit umieszczany był we wspomnianych już wcześniej nośnikach. Dopiero w latach 70 ubiegłego wieku, po zastosowaniu kapilar o bardzo małej średnicy, rozpoczął się szybki rozwój elektroforezy kapilarnej. Schemat zestawu do elektroforezy kapilarnej przedstawiony jest na rysunku 2. Aparat składa się z dwóch zbiorników z elektrolitem podstawowym, w którym zanurzone są końce kapilary oraz dwie elektrody platynowe z podłączonym napięciem prądu elektrycznego.



Rysunek 2. Schemat zestawu do elektroforezy kapilarnej

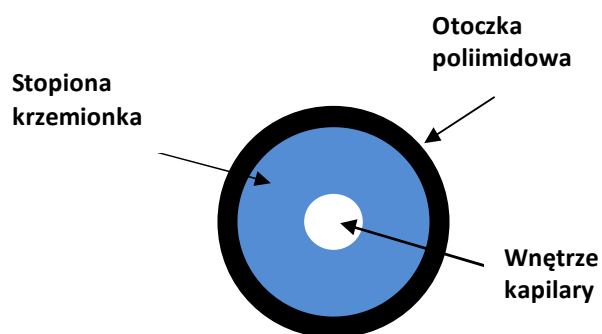
Niewielka ilość analizowanego materiału, rzędu kilku nanogramów, zawarta w roztworze próbki o objętości 10-100 nL, dozowana jest do anodowego końca kapilary. Do dozowania tak małych objętości próbki, najczęściej wykorzystywany jest jeden z trzech podstawowych sposobów (rysunek 3):

- **hydrodynamiczno-grawitacyjny** (najczęściej stosowany), polega na umieszczeniu anodowego końca kapilary w naczyniu z roztworem próbki, znajdującym się wyżej względem katodowego końca kapilary,
- **hydrodynamiczno-ciśnieniowy**, polega na umieszczeniu wlotu kapilary w szczelnym zbiorniku z próbką i zastosowaniu wysokiego ciśnienia, lub umieszczenie wylotu kapilary w szczelnym zbiorniku, w którym wytworzone jest podciśnienie,
- **elektrokinetyczny**, polega na umieszczeniu anody w naczyniu z próbką i przyłożeniu do końców kapilary napięcia rzędu 5 kV - rozdzielana mieszanina zostaje wprowadzona do kapilary dzięki przepływowi elektroosmotycznemu.



Rysunek 3. Sposoby dozowania próbek do kapilary: a) hydrodynamiczno-ciśnieniowy; b) hydrodynamiczno-grawitacyjny; c) elektrokinetyczny

W elektroforezie kapilarnej powszechnie wykorzystuje się kapilary ze szkła krzemowego o wewnętrznej średnicy 20-100 μm i długości 20-100 cm (rysunek 4). W zależności od rodzaju elektroforezy, stosuje się kapilary z wypełnieniem (żel) lub bez wypełnienia. Wewnętrzna powierzchnia kapilar, w zależności od potrzeb, może być pozostawiona bez obróbki lub pokryta substancjami chemicznymi (polimetylosiloksanem, glikolem polietylenowym, polietylenem, amidem poliakrylowym, metylocelulozą i in.). Właściwości rozdzielcze kolumny zależą od użytej substancji, np. użycie polimetylosiloksanu zwiększa przepływ elektroosmotyczny, natomiast użycie glikolu polietylenowego przepływ ten zmniejsza.



Rysunek 4. Przekrój poprzeczny kolumny kapilarnej

Do obu końców kapilary zanurzonych w pojemnikach z odpowiednimi elektrolitami (buforami) przykładane jest wysokie napięcie (do 30 kV i 10 mA), co powoduje powstanie we wnętrzu kapilary pola elektrycznego o wartości do 500 V/cm.

W związku z małą wewnętrzną objętością kapilary, która limituje ilość wprowadzanych analitów, elektroforeza kapilarna wymaga ekstremalnie czułego detektora. Detekcja prowadzona jest u wylotu kapilary przy pomocy detektorów o konstrukcji zbliżonej do przepływowych detektorów stosowanych w chromatografii cieczowej. Oczywiście, w związku z małą ilością wprowadzonych analitów, wykrywalność ich jest znacząco mniejsza w porównaniu do klasycznej chromatografii cieczowej. Zestawienie sposobów detekcji wykorzystywanych w elektroforezie kapilarnej przedstawione jest w tab. 1. Czas analizy jednej próbki wynosi około 10-20 minut. Proces separacji jest sterowany a dane zbierane za pomocą komputera.

Tabela. 1. Zestawienie najczęściej stosowanych detektorów w elektroforezie kapilarnej

Detektor	Wymagania	Identyfikacja	granica oznaczalności [mol]
UV/Vis	Obecność chromoforów	Tak/nie	10^{-5} - 10^{-7}
Z laserowym wzbudzeniem fluorescencji	Obecność fluoroforów (derywatyzacja)	Nie	10^{-13} - 10^{-16}
MS	-	Tak	10^{-8} - 10^{-10}
Amperometryczny	-	Nie	10^{-7} - 10^{-10}
Konduktometryczny	ładunek	Nie	10^{-7} - 10^{-9}

Kapilarne techniki elektroforetyczne są stosunkowo blisko spokrewnione z chromatografią cieczową. Posiadają szereg zalet w porównaniu z HPLC, np. wysoką sprawność i szybkość rozdzielania, trwałe i uniwersalne kapilary, możliwość separacji bardzo małych ilości substancji i w związku z tym, niewielkie zużycie rozpuszczalników. Wadą kapilarnych metod elektroforetycznych jest mała czułość, wynikająca ze wspomnianych wcześniej niewielkich stężeń analizowanych substancji i małej objętości próbki wprowadzanej do detektora, zamontowanego u wylotu kapilary. Szacuje się, że czułość elektroforezy kapilarnej jest 10-100 razy mniejsza od HPLC.

W elektroforezie kapilarnej, podobnie jak w chromatografii gazowej lub cieczowej, sprawność elektroforezy można wyrazić liczbą póltek teoretycznych, która może być wyliczona z wyrażenia:

$$N = \frac{\mu_{ef} V}{2D} \quad (10)$$

gdzie:

D - współczynnik dyfuzji.

Z równania wynika, że liczba póltek jest proporcjonalna do przyłożonego napięcia, jednak należy pamiętać, że przyłożenie wysokiego napięcia powoduje wydzielanie dużej ilości ciepła co znacznie obniża sprawność układu. W HPLC liczba póltek teoretycznych wynosi najczęściej do 10 000, natomiast w elektroforezie nawet do 250 000.

Sprawność można również wyliczyć bezpośrednio z zarejestrowanego elektroforegramu wykorzystując zależności znane z chromatografii:

$$N = 5,545 \left(\frac{t_m}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{lub} \quad N = 16 \left(\frac{t_m}{W_b} \right)^2 \quad (11)$$

gdzie:

t_m - czas migracji,

$W_{1/2}$ - szerokość piku w połowie wysokości,

W_b - szerokość piku w podstawie.

Rozdzielczość R_s dwóch sygnałów może być obliczona ze wzoru:

$$R_s = 1/4 \frac{\Delta\mu_{ef}}{\bar{\mu}_{ef}} \sqrt{N} \quad (12)$$

gdzie:

$\Delta\mu_{ef}$ - różnica w ruchliwości elektroforetycznej dwóch rozdzielanych substancji,

$\bar{\mu}_{ef}$ - średnia ruchliwość elektroforetyczna dwóch rozdzielanych substancji.

który po uwzględnieniu równania 10 może być przedstawiony w postaci:

$$R_s = (0,177) \frac{\mu_{ef} \sqrt{V}}{\bar{\mu}_{ef} \sqrt{D}} \quad (13)$$

Selektywność α w elektroforezie kapilarnej można wyznaczyć z zależności:

$$\alpha = \frac{t_{m2} - t_0}{t_{m1} - t_0} \quad (14)$$

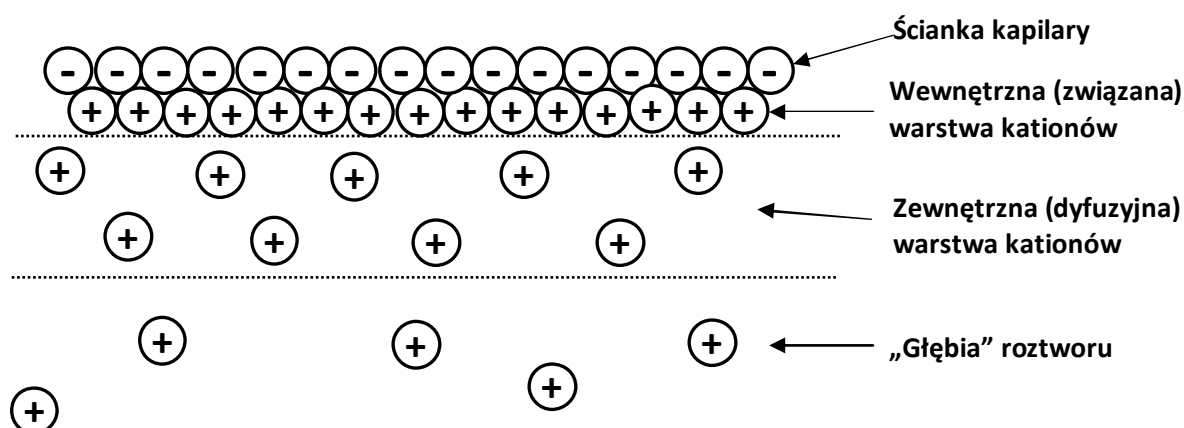
gdzie:

t_{m1} i t_{m2} – czasy migracji sąsiednich pików,

t_0 – czas migracji substancji, której cząsteczki nie mają ładunków.

Zjawisko elektroosmozy

W elektroforezie kapilarnej na szybkość migracji analitów w kapilarze, oprócz wspomnianej wcześniej ruchliwości elektroforetycznej, decydujący wpływ ma zjawisko osmozy i związana z nim ruchliwość elektroosmotyczna μ_{eo} . Wysokie napięcie przyłożone do końców kapilary wypełnionej roztworem elektrolitu, powoduje tzw. przepływ elektroosmotyczny, czyli przemieszczanie się całej masy elektrolitu w kierunku jednej z elektrod. Przepływ elektroosmotyczny zależy od ładunków rozmieszczonych na powierzchni kapilary. Obecność tych ładunków a także ich rodzaj i ilość związana jest z jonizacją ścianki kapilary lub adsorpcją jonów buforu. Wewnętrzna ścianka kapilary wykonana ze stopionej krzemionki i przy $\text{pH} > 3$ posiada ładunek ujemny, z powodu dysocjacji grup silanolowych SiOH (przy niższej wartości pH jonizacja nie jest całkowita). Kationy elektrolitu podstawowego przyciągane są przez ładunki ujemne na ściankach kapilary (SiO^-), w wyniku czego na granicy faz roztwór/kapilara powstaje wewnętrzna (związana) oraz zewnętrzna (dyfuzyjna) warstwa kationów, tworząca podwójną warstwę elektryczną (rysunek 5). Kationy warstwy zewnętrznej przyciągane są przez ujemną katodę, a ponieważ kationy te są solwatowane przez cząsteczki rozpuszczalnika „porywają” one razem ze sobą „całą masę roztworu” znajdującego się w kapilarze.



Rysunek 5. Schematyczne przedstawienie podwójnej warstwy elektrycznej w kapilarze elektroforetycznej

Pomiędzy warstwami wytwarza się tzw. potencjał zeta (ζ), którego wartość można wyliczyć z zależności:

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e}{\epsilon} \quad (15)$$

gdzie:

e – ładunek jednostki powierzchni,

δ – grubość dyfuzyjnej warstwy podwójnej,

ϵ – stała dielektryczna.

Natomiast szybkość przepływu elektroosmotycznego z uwzględnieniem potencjału ζ można wyrazić wzorem:

$$v_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta E}{4\pi\eta} \quad (16)$$

Szybkość przepływu elektroosmotycznego jest zazwyczaj większa od szybkości elektroforetycznych poszczególnych jonów, co powoduje, że zarówno kationy, cząstki obojętne jak i aniony poruszają się w kierunku katody. Szybkość, z jaką dany jon porusza się w kierunku katody v_{obs} [cm/s] (szybkość obserwowana) jest wypadkową ruchliwości elektroforetycznej oraz elektroosmotycznej i jest opisywana następującą zależnością:

$$v_{obs} = (\mu_{ef} + \mu_{eo})E \quad (17)$$

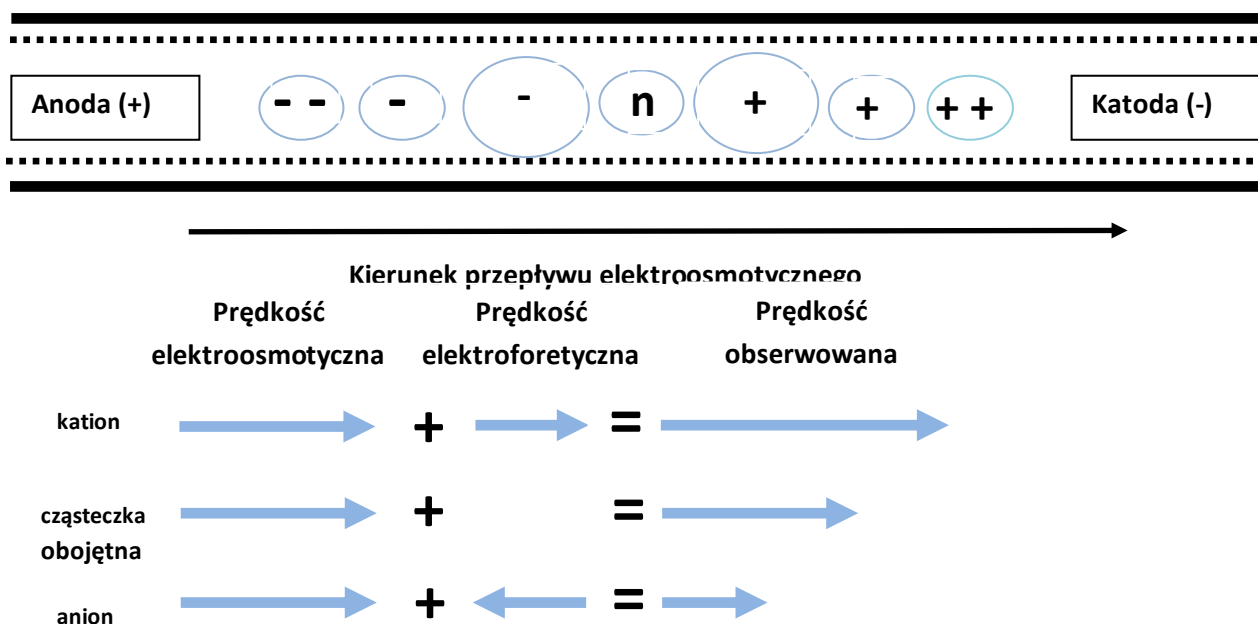
gdzie:

μ_{eo} – ruchliwość elektroosmotyczna,

μ_{ef} – ruchliwość elektroforetyczna.

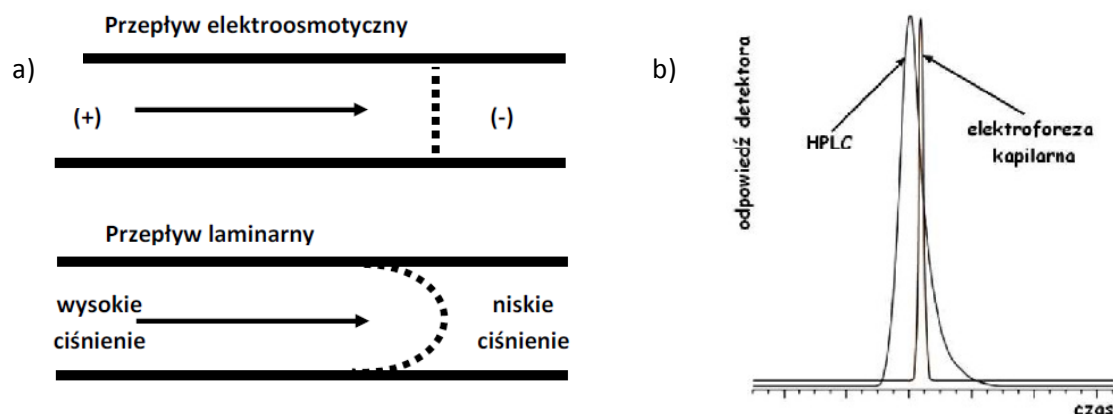
W „klasycznej elektroforezie” ruchliwość elektroforetyczna anionów μ_{ef} przyjmuje wartości ujemne (aniony wędrują w kierunku anody, a kationy w kierunku katody). W elektroforezie kapilarnej, w wyniku istnienia przepływu elektroosmotycznego oraz faktu, że w większości przypadków ruchliwość elektroosmotyczna przyjmuje większą wartość od ruchliwości elektroforetycznej, w detektorze na końcu kapilary pojawiają się kolejno wszystkie cząsteczki analitu, niezależnie od zgromadzonego na nich ładunku (rysunek 6). I tak kolejność, w jakiej rozdzielane cząsteczki docierają do katodowego końca kapilary przedstawia się następująco:

- małe obdarzone dużym ładunkiem kationy,
- większe kationy o mniejszym ładunku,
- nierozdzielone cząsteczki obojętne,
- duże aniony o małym ładunku,
- małe aniony posiadające duży ładunek elektryczny.



Rysunek 6. Kolejność cząsteczek docierających do katody w elektroforezie kapilarnej

Przepływ elektroosmotyczny jest generowany przy ściankach kapilary na całej jej długości, dlatego też charakteryzuje się on stałą szybkością przepływu w całym jego przekroju. Płaski profil przepływu elektroosmotycznego jest bardziej korzystny od przepływu laminarnego, spotykanego, np. w technikach chromatograficznych (rysunek 7). W przepływie laminarnym, który jest wymuszany przez zastosowanie ciśnienia na jednym z końców kapilary, roztwór znajdujący się w środku porusza się szybciej niż roztwór będący bliżej ścianek, co powoduje poszerzenie strefy zajmowanej przez próbkę w kapilarze i co za tym idzie również poszerzenie sygnałów z detektora.



Rysunek 7. Porównanie HPLC i CE; a) - porównanie przepływu elektroosmotycznego (CE) i laminarnego (HPLC), b) – porównanie uzyskiwanych rozdzielczości

Analiza ilościowa i jakościowa

W elektroforezie kapilarnej analiza ilościowa i jakościowa wykonywana jest w podobny sposób jak w chromatografii gazowej czy cieczowej. Identyfikacji dokonuje się poprzez porównanie czasów migracji oznaczanych substancji z czasami migracji odpowiednich wzorców lub poprzez połączenia z detektorami takimi jak spektrometr mas lub spektrofotometr UV-Vis. Analizę ilościową wykonuje się wykorzystując metodę krzywej kalibracyjnej, metodę wzorca wewnętrznego lub metodę wzorca zewnętrznego opisanych w rozdziale III. Techniki chromatograficzne.

Zalety elektroforezy kapilarnej

Kapilarne techniki elektromigracyjne, które są blisko spokrewnione z HPLC, posiadają szereg istotnych zalet, z których na podkreślenie zasługują:

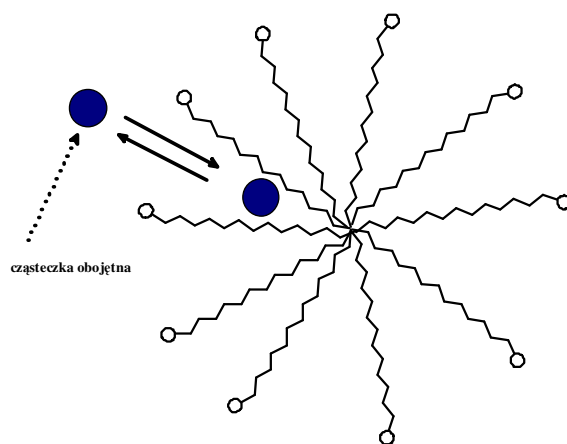
- możliwość analizowania związków zarówno o dużej jak i o małej masie cząsteczkowej, obdarzonych ładunkiem lub obojętnych,
- duża czułość metody (przy wykorzystaniu odpowiednich detektorów) umożliwiająca analizowanie bardzo małych ilości substancji,
- stosunkowo duża niezawodność, wysoka sprawność i selektywność,
- łatwość przygotowania próbek (często wystarczy odpowiednie rozcieńczenie),
- krótki czas analizy i możliwość automatyzacji rozdzielenia,
- niewielka ilość odczynników potrzebna do analizy,
- trwałe i długo przydatne do analizy kapilary.

2.1.1. Strefowa elektroforeza kapilarna

Strefowa elektroforeza kapilarna (ang. *capillary zone electrophoresis, CZE*) - podstawowa i najczęściej wykorzystywana odmiana elektroforezy kapilarnej, która została omówiona na początku tego podrozdziału (Elektroforeza kapilarna). Separacja polega na wykorzystaniu różnicy w szybkościach migracji poszczególnych jonów. Technika ta ma zastosowanie do rozdzielania substancji posiadających ładunek. Niemożliwe jest jej wykorzystanie do rozdzielania substancji elektrycznie obojętnych.

2.1.2. Micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna

Micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna (ang. *micellar electrokinetic capillary chromatography, MEKC*) - odmiana elektroforezy kapilarnej pozwalająca na separację cząsteczek obojętnych, aczkolwiek może być również wykorzystywana do cząstek obdarzonych ładunkiem. Stosowane są jonowe związki powierzchniowo czynne (surfaktanty), które w stężeniu przekraczającym krytyczne stężenie micelarne tworzą micelle. Gdy w roztworze brak jest surfaktanta, lub jego stężenie nie jest wystarczające, aby powstały micelle, cząstki obojętne poruszają się w kierunku katody z szybkością równą szybkości przepływu elektroosmotycznego. W przypadku obecności miceli, rozdzielana substancja elektrycznie obojętna ulega podziałowi między roztwór elektrolitu, a niepolarną wewnątrz miceli (separacja dokonuje się na podstawie różnic stałych podziału analitów elektrolit/hydrofobowa faza wewnątrz miceli (rysunek 8). Substancje hydrofobowe przemieszczają się wewnątrz miceli z prędkością inną niż znajdujące się w roztworze substancje hydrofilowe. Polarność elektrolitu (faza wodna) może być zmieniana w zależności od potrzeb przy wykorzystaniu różnych modyfikatorów organicznych np. metanol lub acetonitryl. Również właściwości fazy micelarnej mogą być modyfikowane przez dobór odpowiednich detergentów, np. dodecylosulfonian sodu (SDS), sole kwasów żółciowych, sole amoniowe z łańcuchem węglowodorowym. Przy najczęściej stosowanym surfaktancie anionowym SDS, micelle posiadają sumaryczny ładunek ujemny, co powoduje, że cząsteczka niepolarna, znajdująca się we wnętrzu takiej miceli porusza się wolniej od przepływu elektroosmotycznego. Wynika to z faktu, iż kierunek migracji miceli i przepływu elektroosmotycznego są przeciwne. Jednak przepływ elektroosmotyczny jest większy od ruchliwości miceli i przenosi je wraz z „zawartymi” analitami w kierunku katody.



Rysunek 8. Schemat tworzenia miceli z cząsteczek surfaktanta

Rozdzielczość w MEKC może być przedstawiona za pomocą równania:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1+k_2} \right) \left(\frac{1 - \left(\frac{t_0}{t_{mc}} \right)}{1 + \left(\frac{t_0}{t_{mc}} \right)^{k_1}} \right) \quad (18)$$

gdzie:

t_0 – czas migracji markera przepływu elektroosmotycznego, najczęściej metanolu,
 t_{mc} – czas migracji miceli.

2.1.3. Kapilarna elektroforeza żelowa

Kapilarna elektroforeza żelowa (ang. *capillary gel electrophoresis, CGE*) - wypełnienie kapilary stanowi żel, który działa jak sito molekularne. Najczęściej stosowany jest omawiany już wcześniej żel poliakryloamidowy, którego usieciowanie dobiera się na podstawie wielkości rozdzielanych molekuł. Składniki próbki migrują wzdłuż kapilary z szybkością zależną od ich wielkości (mniejsze migrują szybciej). Separacja składników mieszanin odbywa się najczęściej w wyniku mechanizmu mieszanego, tzn. rozdzielania w elektroforezie kapilarnej związanego z obecnością ładunku na molekułach oraz efektu wykluczania, związanego z obecnością porowatego żelu w kapilarze.

2.1.4. Ogniskowanie izoelektryczne

Ogniskowanie izoelektryczne (ang. *capillary isoelectric focusing, CIEF*) - modyfikacja elektroforezy wykorzystywana jest do separacji cząsteczek amfiprotycznych (posiadających zarówno ładunki dodatnie jak i ujemne, jak aminokwasy, peptydy, białka). Przy pewnej charakterystycznej wartości pH (punkt izoelektryczny pI , charakterystyczny dla każdego białka lub peptydu), ładunek dodatni cząsteczki jest równy ładunkowi ujemnemu, w związku z tym elektrycznie obojętna molekula nie migruje w polu elektrycznym. W metodzie tej kapilara wypełniona jest roztworem buforowym o różnej wartości pH (gradient pH we wnętrzu kapilary pozostaje stały w czasie analizy). Próbka wprowadzana jest do końca kapilary o niższej wartości pH, składniki mieszaniny posiadające ładunek dodatni wędrują w kierunku katody i detektora. Dany składnik mieszaniny zatrzymuje się, gdy dotrze do tej części kapilary, gdzie wartość pH odpowiada jego punktowi izoelektrycznemu. Jeżeli cząsteczki w wyniku dyfuzji przejdą do sąsiedniej strefy, to w wyniku zmiany pH, uzyskają ładunek i ponownie migrują do strefy izoelektrycznej. W wyniku ogniskowania anality skupiane są w wąskich strefach w kapilarze, skąd mogą być łatwo usuwane za pomocą pneumatycznej pompy. Proces monitorowania „uzyskanych stref” odbywa się w detektorze umieszczonym na końcu kapilary.

Rozdzielczość CIEF może być przedstawiona za pomocą wyrażenia:

$$\Delta pI = 3 \sqrt{\frac{D(dpH / dx)}{E(-d\mu / dpH)}} \quad (19)$$

gdzie:

ΔpI - różnica pI pomiędzy dwoma sąsiednimi pasmami amfolitów,
 D - współczynnik dyfuzji amfolitu,
 E - natężenie pola elektrycznego,
 dpH / dx - gradient pH ,
 $-d\mu / dpH$ - spadek mobilności.

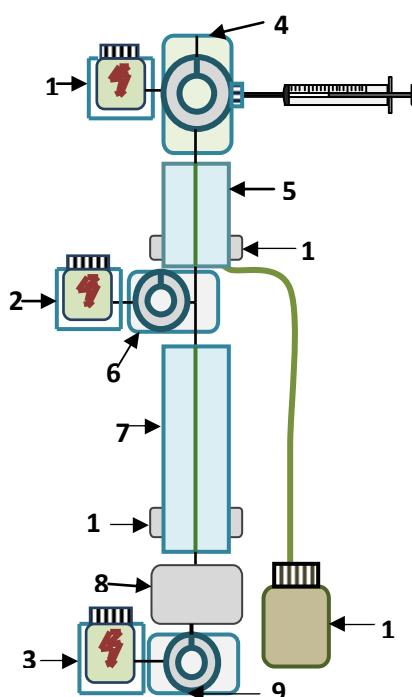
Z powyższego równania wynika, że rozdzielczość tej techniki może być poprawiona poprzez zwiększenie natężenie pola elektrycznego, obniżenie współczynnika dyfuzji, wąski gradient pH oraz wysoki spadek mobilności.

2.1.5. Izotachoforeza kapilarna

W **izotachoforezie kapilarnej** (ang. *capillary isotachopheresis, CITP*) wykorzystuje się dwa różne układy buforowe. Próbkę umieszcza się pomiędzy elektrolitem wiodącym, o większej ruchliwości od jonów próbki a terminującym, o mniejszej ruchliwości od jonów próbki. Podczas jednorazowej analizy techniką izotachoforezy mogą być rozdzielane tylko jony o tym samym znaku. Elektrolit podstawowy dobiera się w taki sposób, aby kation lub anion elektrolitu wiodącego (ang. *Leading Electrolyte, LE*) i terminującego (ang. *Terminating Electrolyte, TE*) miał odpowiednio najwyższą i najniższą ruchliwość (μ) w stosunku do oznaczanych analitów, co oznacza, że warunkiem rozdzielania metodą izotachoforezy jest następująca zależność

$$\mu_{LE} > \mu_{analitu} > \mu_{TE}$$

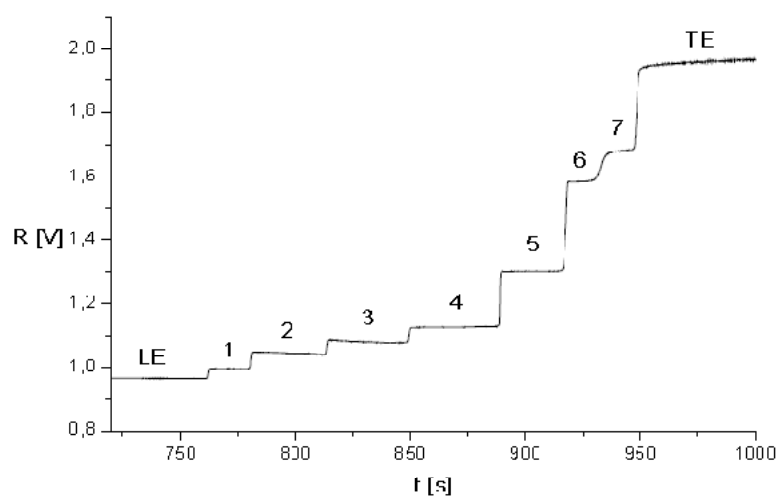
Składniki próbki rozdzielają się zgodnie ze swoją ruchliwością w formie odrębnych stref. W wyniku przeprowadzonego rozdzielania otrzymuje się izotachofrogram schodkowy. Wysokość schodka, mierzona od podstawy, czyli sygnału (schodka) elektrolitu wiodącego jest charakterystyczna dla danego jonu i na podstawie jej porównania z wysokością wzorca można zidentyfikować badaną substancję. Szerokość danego schodka jest proporcjonalna do ilości analitu i jest wykorzystywana do oznaczeń ilościowych. Schemat aparatu to przeprowadzania izotachoforezy kapilarnej przedstawiono na rysunku 9.



Rysunek 9. Analizator elektroforetyczny ItaChrom EA 101 (Merck): 1 – zbiornik elektrolitu terminującego, 2, 3 – zbiorniki elektrolitu wiodącego, 4 - zawór dozujący z pętlą, 5 – kolumna wstępnego rozdzielania (przedkolumna) w obudowie, 6 – blok rozgałęziający z zaworem, 7 – kolumna analityczna w obudowie, 8 – detektor spektrofotometryczny, 9 – blok rozdzielający z zaworem, 10 – detektor konduktometryczny przedkolumny, 11 – detektor konduktometryczny kolumny analitycznej, 12 – zbiornik na zlewki

Izotachoforeza, jako jedna z najszybciej rozwijających się technik elektromigracyjnych, znajduje zastosowanie w wielu dziedzinach, m.in. w oznaczeniach zanieczyszczeń środowiska oraz analizie żywności, które z punktu widzenia chemii analitycznej zajmują się analizą niejednorodnych próbek zawierających trudne do usunięcia matryce.

Przykładowy izotachoferogram z separacji mieszaniny anionów jest przedstawiony na rysunku 10. Szerokość schodka (L) oznacza długość kroku odpowiadająca jednemu analitowi i jest proporcjonalna do jego zawartości w próbce badanej. Do oznaczeń jakościowych wykorzystuje się wysokość sygnału danego analitu (h - wysokość mierzona od podstawy elektrolitu wiodącego) oraz wysokość całkowitą mierzoną od podstawy, czyli elektrolitu wiodącego, do maksimum krzywej, czyli elektrolitu terminującego (H - elektrolitu terminującego). W celu zidentyfikowania analitu należy wykonać analizę wzorców oraz oznaczanych analitów, a następnie porównać wartości stosunku h/H (względna wysokość kroku), która jest charakterystyczna dla danego analitu.



Rysunek 10. Izotachoferogram przedstawiający rozdzielanie mieszaniny anionów: 1 – NO_3^- , 2 – ClO_3^- , 3 – PF_6^- , 4 – $[\text{N}(\text{CN})_2]^-$, 5 – $[\text{F}_3\text{CSO}_3]^-$, 6 – HPO_4^{2-} , 7 – $[(\text{F}_3\text{CSO}_2)_2\text{N}]^-$. Układ buforów: LE 10 mM L-histydyna, 10 mM L-histydyny monochlorowodorek; TE 5 mM kwas glutaminowy, 5 mM L-histydyna; detekcja konduktometryczna

2.1.6. Elektrochromatografia kapilarna

Elektrochromatografia kapilarna (ang. capillary electrochromatography, CEC) jest połączeniem elektroforezy kapilarnej (CE) i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Technika ta oferuje połączenie wysokiej sprawności CE z szerokim zakresem parametrów, które mogą być modyfikowane w HPLC, zwłaszcza z możliwością doboru różnych faz stacjonarnych oraz stosowania gradientu fazy ruchomej.

Migracja analitów przez kolumnę odbywa się dzięki przepływowi elektroosmotycznemu, który zależy od natężenia pola elektrycznego, rodzaju wypełnienia kolumny, składu fazy ruchomej oraz pH i siły jonowej zastosowanego buforu. Wykorzystanie przepływu elektroosmotycznego, w odróżnieniu od przepływu hydraulicznego w HPLC, umożliwia stosowanie kolumn z wypełnieniami rzędu $3 \mu\text{m}$, co znacznie polepsza rozdzielczość tej techniki. Wykorzystywane fazy stacjonarne i fazy ruchome są

podobne do RP HPLC (modyfikacje C8 i C18 jako fazy stacjonarne oraz wodne bufony z organicznymi modyfikatorami jako fazy ruchome).

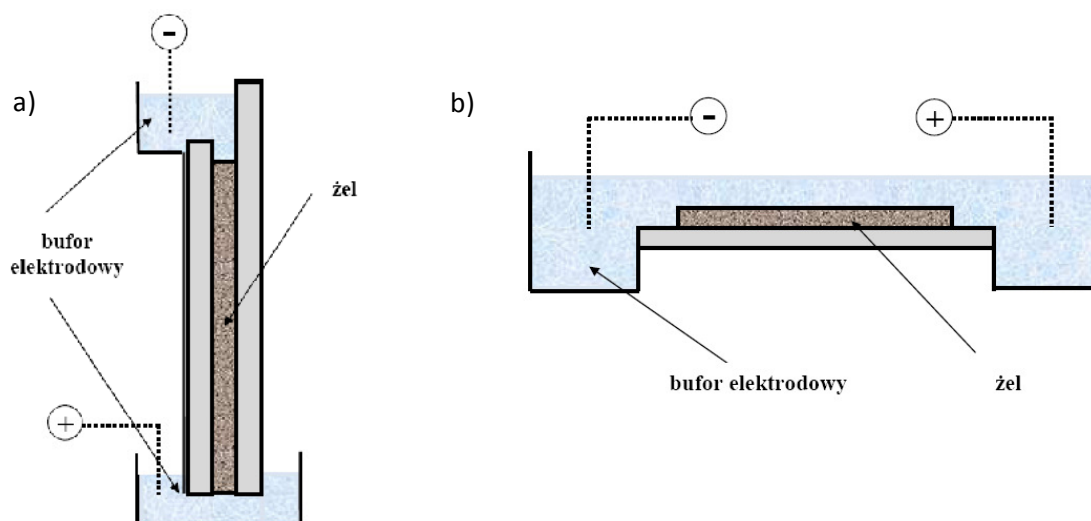
W tabeli 2 przedstawiono zastosowanie omówionych modyfikacji elektroforezy kapilarnej do analizy różnych klas związków chemicznych.

Tabela. 2. Zastosowanie odmian elektroforezy kapilarnej do analizy różnych klas związków chemicznych

Elektroforeza strefowa (CZE)	Ogniskowanie izoelektryczne (CIEF)	Kapilarna elektroforeza żelowa (CGE)	Micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna (MEKC)	Elektrochromatografia kapilarna (CEC)	Izotachoforeza kapilarna (CITP)
Jony	Peptydy	Kwasy nukleinowe	Małe cząsteczki	Małe molekuły	Jony
Małe molekuły	Białka		Peptydy	Peptydy	Małe molekuły
Peptydy				Białka	Peptydy
Białka				Węglowodany	Białka
Węglowodany					

2.2. Elektroforeza żelowa na płaszczyźnie

Elektroforeza żelowa na płaszczyźnie (elektroforeza płytowa) – jest najpopularniejszą odmianą elektroforezy ze względu na stosunkowo niewielki koszt aparatury i szeroki wachlarz zastosowań. Podstawą tej techniki jest obecność nośnika (żel poliakryloamidowy, żel agarozowy, bibuła, azotan celulozy) „wypełnionego elektrolitem”. Najczęściej, jako nośnik wykorzystuje się żele poliakryloamidowe lub agarozowe w postaci płyt umieszczonych pomiędzy płytkami szklanymi. W zależności od ułożenia płyt wyróżniamy elektroforezę żelową pionową lub poziomą (rys. 11).



Rysunek 11. Elektroforeza płytowa; a) – pionowa, b) – pozioma

W wyniku rozdzielania substancje występują w postaci prążków (pasm) na płytach nośnika (rysunek 12).



Rysunek 12. Przykładowe rozdzielanie elektroforetyczne

Rozdzielenie elektroforetyczne z wykorzystaniem żeli składa się z kilku etapów:

- przygotowanie żelu o odpowiednim usieciowaniu,
- zanurzenie żelu w elektrolicie.
- wprowadzenie analizowanych próbek do wąskich studzienek na czole żelu,
- podłączenie elektrod – przeprowadzenie rozdzielania,
- wyłączenie zasilania,
- wizualizacja rozdzieleń.

2.2.1. Żele stosowane w elektroforezie

Żele agarozowe i poliakrylamidowe mają postać przestrzennie usieciowanych struktur, zajmujących zaledwie około 0,5÷1,0 % objętości komory rozdzielczej układu do elektroforezy. Pozostała przestrzeń wypełniona jest przez elektrolit. Rozmiary porów mogą być modyfikowane na etapie przygotowania żeli a ich wielkość powinna być porównywalna z rozmiarami rozdzielanych jonów czy molekuł (większe cząstki doznają większych oporów ruchu w polu elektrycznym, co znacząco poprawia separację analizowanych substancji). Powszechnie wykorzystuje się żele poliakrylamidowe oraz żele agarozowe. Żele akrylamidowe umożliwiają przygotowania nośników o bardzo gęstym usieciowaniu i niewielkich porach, co umożliwia separację makrocząsteczek białkowych o masach rzędu 5 kD - 300 kD lub polinukleotydów o wielkości 5-2000 par zasad. Nośniki agarozowe wykazują mniejsze usieciowanie i większe pory niż żele poliakrylamidowe, dlatego mogą być wykorzystywane do rozdzielania większych cząsteczek.

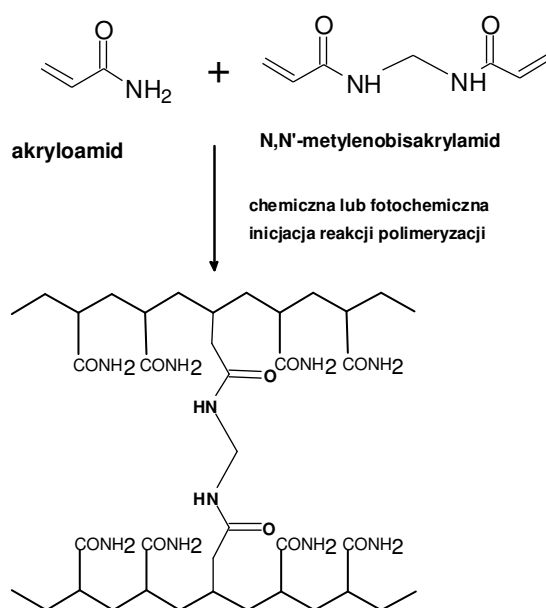
Żele agarozowe przygotowywane są z agarozy, liniowego polisacharydu zbudowanego z 3,6-anhydro-D-galaktozy i L-galaktozy, izolowanej z agaru (substancja wyodrębniana z krasnorostów). Agarozę w postaci handlowej jest białym lub lekko żółtawym proszkiem, łatwo rozpuszczającym się we wrzącej wodzie. W temperaturze poniżej 40°C została się w postaci porowatego żelu. Po zestaleniu ulega ponownemu topnieniu w temperaturze wrzącej wody. Rozmiary porowatości można regulować

wykorzystując roztwory agarozy o różnych stężeniach. Większe stężenie agarozy powoduje powstanie żeli bardziej usieciowanych i o drobniejszych porach, czyli nadających się do rozdzielania molekuł o odpowiednio mniejszych masach cząsteczkowych. Zwykle przygotowuje się żele o stężeniach agarozy od 0,4 do 4,0 %. Zaletami żeli agarozowych jest łatwość i szybkość przygotowania oraz możliwość separacji dużych makrocząsteczek. Do wad zalicza się słabą wytrzymałość mechaniczną oraz trudność ich utrwalania po rozdzieleniu (wyschnięte żele rozsypują się pod wpływem bardzo niewielkich sił).

Żele poliakrylamidowe są obecnie najczęściej wykorzystywanymi żelami ze względu na bardzo dobre właściwości fizykochemiczne. Po raz pierwszy taki żel został zrobiony przez Raymonda i Weitrauba w 1959. Żele poliakrylamidowe przygotowuje się z roztworu monomerów akryloamidu i substancji sieciujących (*ang. cross-linkers*) (rys. 13). Najczęściej, jako substancji sieciującej używa się N,N'-metylenobisakryloamidu (bis-akryloamid).

Przy przygotowaniu żelu należy zawsze pamiętać, że akryloamid w postaci monomerycznej jest bardzo silną neurotoksyną i nawet po procesie polimeryzacji stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia ze względu na pozostałości swobodnych monomerów w objętości żelu.

Reakcja polimeryzacji inicjowana jest chemicznie (nadsiarczan amonu w obecności katalizatora N,N,N,N-tetrametyloetylenodiaminy - TEMED) lub fotochemicznie (naświetlanie promieniowaniem UV w obecności ryboflawiny, również w obecności katalizatora - TEMED).



Rysunek 13. Schemat powstawania żeli poliakryloamidowych

Gęstość usieciowania oraz rozmiary porów regulowane są poprzez odpowiedni dobór stężenia akryloamidu i bisakryloamidu. Właściwości te opisywane są za pomocą całkowitego stężenia akryloamidu – T (*ang. total*), oraz dopełniającego parametru, którym jest wagowy stosunek ilości substancji sieciującej do sumy akryloamidu i substancji sieciującej:

- $T [\%] = ((\text{akryloamid} + \text{bis-akryloamid}) [\text{g}] / \text{objętość} [\text{ml}]) \times 100$
- $C [\%] = (\text{bis-akryloamid} [\text{g}] / (\text{akryloamid} + \text{bis-akryloamid}) [\text{g}]) \times 100$

Wybór parametrów żelu uzależniony jest od mas cząsteczkowych analizowanych substancji. Do analizy substancji wielkocząsteczkowych przygotowuje się żele o mniejszym usieciowaniu (mniejszej gęstości) natomiast do analizy substancji o małych masach cząsteczkowych przygotowuje się żele bardziej usieciowane.

Najczęściej żel poliakryloamidowy wykorzystywany w rozdzieleniach elektroforetycznych składa się z opisanego powyżej żelu rozdzielającego oraz umieszczonej na nim cienkiej warstwy żelu zagęszczającego. Warstwa żelu zagęszczającego jest mniej usieciowana, co umożliwia szybkie wnikiwanie naniesionych próbek w żel, a co za tym idzie uzyskiwanie wąskich pasm analizowanych związków.

2.2.2. Przygotowanie próbek

Przygotowanie próbek jest równie ważne jak właściwa polimeryzacja żelu oraz sporządzenie elektrolitów. Separowana próbka nie może zawierać zbyt dużej ilości soli, które w postaci zjonizowanej powodują zakłócenie migracji makrojonów (powstawanie smug i niejednorodności prążków). Niezmiernie ważne jest również naniesienie odpowiedniej ilości rozdzielanych substancji. Zbyt mała ilość makrojonów w próbce utrudnia detekcję, natomiast zbyt duża pogarsza warunki separacji (rozległe i nakładające się prążki).

2.2.3. Rozdzielenie

Przygotowane płytki z żelem umieszcza się w odpowiednich aparatach do elektroforezy, w których elektrody zanurzone są w zbiornikach wypełnionych buforami o odpowiednim pH. Po naniesieniu rozdzielanych próbek elektrody podłącza się do źródła zasilania. Często nanosi się niewielką ilość barwnika, który wędruje wraz z buforem wzdłuż żelu i pozwala określić moment zakończenia analizy.

Jedna z reguł mówi, że ilość makrocząsteczek przypadających na jeden prążek powinna znajdować się w przedziale 1-10 µg.

Po zakończeniu analizy żel wyjmuje się ostrożnie z aparatu i poddaje obróbce w celu wizualizacji rozdzielonych substancji.

2.2.4. Wizualizacja

Większość białek i kwasów nukleinowych, które są najczęściej separowane za pomocą elektroforezy żelowej, nie jest widoczna w świetle widzialnym. W związku z tym, prążki substancji uzyskane po rozdzieleniu na żelach czy membranach należy wybarwić (wizualizować), w celu uzyskania informacji o dystansie ich migracji oraz ich ilości. Do wizualizacji może być wykorzystywane barwienie za pomocą tzw. barwników naturalnych, fluoroforów, a także barwienie enzymatyczne, immunobarwienie oraz znakowanie radioizotopowe.

Naturalne barwniki, takie jak błękit kumassi (ang. *coomassie brilliant blue*) czy czerń amidowa, pozwalają wykryć 1 µg białka w prążku, natomiast metodą barwienia srebrem - nawet 10 ng białka w prążku.

Fluorofory, jak np. tradycyjnie stosowany bromek etydydy. Barwnik ten wykazuje właściwości fluorescencyjne, co pozwala na obserwację sygnałów w świetle UV (przy λ około 300 nm).

Barwienie enzymatyczne dotyczy wizualizacji białek enzymatycznych. Jest to barwienie przez przeprowadzenie specyficznego reakcji katalitycznej, w której w wyniku enzym staje się barwny.

Znakowanie radioizotopowe charakteryzuje się bardzo wysoką czułością detekcji. Znakowanie makrocząsteczek radioizotopami odbywa się zawsze przed procesem separacji elektroforetycznej, często na etapie ich syntezy. Białka i peptydy zwykle znakuje się izotopami jodu ^{125}I lub ^{131}I , rzadziej izotopami węgla ^{14}C , wodoru ^3H lub siarki ^{35}S . Oligonukleotydy najczęściej znakowane są izotopem fosforu ^{32}P lub siarki ^{35}S .

Immunobarwienie jest wysoce selektywnym barwieniem białek i peptydów na membranach, przy zastosowaniu specyficznych przeciwciał, znakowanych fluorescencyjnie, enzymatycznie lub radioizotopowo (odpowiednie wykrywanie to detekcja: immunofluorescencyjna, immunoenzymatyczna lub radioimmunologiczna).

2.2.5. Dokumentacja rozdzieleń

Bardzo istotna jest dokumentacja uzyskanych rezultatów oraz przechowywanie otrzymanych „żeli”. Żele poliakrylamidowe, po ich wysuszeniu, można przechowywać dowolnie długo bez widocznego uszczerbku pomiędzy warstwą bibuły i celofanu lub pomiędzy dwoma warstwami celofanu. Żele agarozowe nie mogą być przechowywane, ponieważ ulegają zniszczeniu już na etapie ich suszenia. W obu przypadkach najlepszym sposobem dokumentacji uzyskanych separacji jest wykonanie fotografii lub zeskanowanie.

3. Wykorzystanie technik elektromigracyjnych

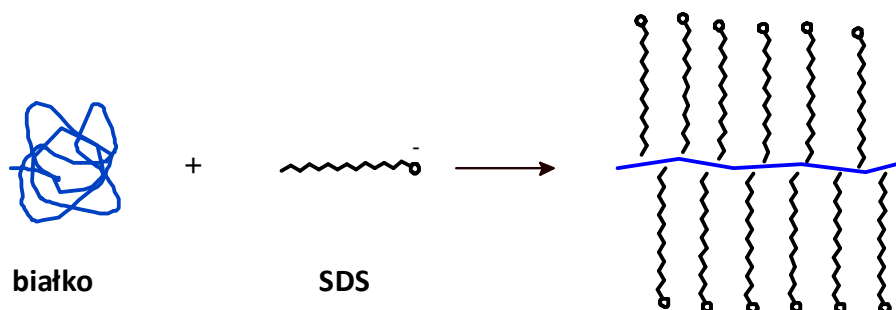
Elektroforeza jest wykorzystywana do analizowania wielu indywidualów, poczynając od całych komórek i cząstek poprzez kwasy nukleinowe, białka, peptydy, aminokwasy, organiczne kwasy i zasady, aż po narkotyki, pestycydy, nieorganiczne kationy i aniony. Zastosowanie elektroforezy obejmuje m.in.:

- preparatywne i ilościowe wydzielenie czystych frakcji z badanych mieszanin,
- określanie czystości i jednorodności badanych substancji,
- oznaczanie punktu izoelektrycznego badanych substancji,
- oznaczanie masy cząsteczkowej badanych substancji,
- zastosowanie do celów diagnostycznych i badawczych.

Białka, spośród wielu klas związków wymienionych powyżej, są najczęściej rozdzielanymi substancjami za pomocą elektroforezy żelowej. Separację prowadzi się przy zastosowaniu tzw. elektroforezy natywnej albo elektroforezy w obecności SDS.

Elektroforeza natywna jest to rodzaj elektroforezy prowadzony zwykle w żelu poliakryloamidowym w warunkach, w których makrocząsteczki pozostają niezdenaturowane. Zaletą tej techniki jest możliwość odzyskania cząsteczek białkowych w stanie pełnej aktywności biologicznej, wadą natomiast stosunkowo słaba rozdzielczość metody.

Elektroforeza w obecności siarczanu dodecylu sodu jest najczęściej stosowaną metodą elektroforetyczną do separacji białek. Zastosowanie substancji powierzchniowo czynnej SDS, prowadzi do powstania kompleksów białko-SDS o ustalonym stosunku ładunku elektrycznego do masy (rysunek 14). SDS skutecznie maskuje oryginalny ładunek białka, co umożliwia łatwe i dokładne oznaczenie mas cząsteczkowych rozdzielonych białek (1 g białka wiąże 1,4 g SDS).



Rysunek 14. Tworzenie kompleksów białko-SDS

4. Literatura

1. Everaerts, F. M.; Beckers, J. L.; Verheggen, T. P. E. M. *Isotachopheresis: Theory, Instrumentation and Applications*; Elsevier: Amsterdam, 1976.
2. Kocjan, R. (red.) *Chemia analityczna. Podręcznik dla studentów*; Wydawnictwo Lekarskie PZWL: Warszawa, 2000; Tom 2.
3. Landers, J. P. *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*; CRC Press: Boca Raton, London, New York, 2008.
4. Righetti, P. G. *Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications*; Elsevier Biomedical Press: New York, 1983.
5. Weinberger, R. *Practical Capillary Electrophoresis*; Academic Press: New York, 2000.
6. Westemeier, R. *Electrophoresis in Practice*, John Wiley & Sons Inc.: New York, 1997.
7. Witkiewicz, Z. *Podstawy chromatografii*; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne: Warszawa, 2005.
8. Witkiewicz, Z.; Hepter, J. *Słownik chromatografii i elektroforezy*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 2004.
9. Rilbe, H. *Electrophoresis* **1995**, 16, 1354–1359.
10. Tiselius, A. *Trans. Faraday Soc.* **1937**, 33, 524-531.
11. Piotr Diakowski; <http://chemfan.pg.gda.pl/Badania/ce.html>
12. Walkowiak, B.; Kochmańska, V. (red.) *Elektroforeza: przykłady zastosowań*; <http://www.biofizyka.p.lodz.pl/elektroforeza.pdf>

Na stronie internetowej www.chem.univ.gda.pl/analiza

w sposób ciągle aktualizowane są instrukcje do ćwiczeń laboratoryjnych oraz zadań rachunkowych z technik separacyjnych – Zapraszamy do korzystania z tych materiałów

Autorzy