

**Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie**



Paweł Wojciech Płocharz

**Teoretyczne i praktyczne aspekty efektywności
rozdzielenia elektrochromatografii planarnej
ciśnieniowej**

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Chemii Fizycznej Katedry Chemii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
pod kierunkiem dr hab. Tadeusza H. Dzido, prof. UM

Lublin 2011

*Panu dr hab. Tadeuszowi Dzido, prof. UM –
Promotorowi mojej pracy doktorskiej
oraz
Koleżankom i Kolegom
z Zakładu Chemii Fizycznej UM w Lublinie
za wszelką okazaną pomoc, życzliwość oraz wsparcie
składam serdeczne podziękowanie*

Spis treści

Wstęp	11
1. Część teoretyczna	13
1.1. Przegląd metod chromatograficznych w układach ciecz – ciało stałe.....	13
1.1.1. Wysokosprawna chromatografia cieczowa.....	13
1.1.1.1. Rozwój metody	13
1.1.1.2. Aparatura	14
1.1.1.3. Wypełnienie kolumn.....	15
1.1.1.4. Zalety i wady HPLC	18
1.1.2. Chromatografia cienkowarstwowa	19
1.1.2.1. Wiadomości ogólne.....	19
1.1.2.2. Nanoszenie próbki na płytkę chromatograficzną	20
1.1.2.3. Komory chromatograficzne	20
1.1.2.4. Wielokierunkowa chromatografia TLC oraz inne metody rozwijania chromatogramów cienkowarstwowych	21
1.1.2.5. Faza stacjonarna	22
1.1.2.6. Detekcja	25
1.1.2.7. Zalety i wady chromatografii planarnej	26
1.1.3. Ciśnieniowa chromatografia planarna (OPLC)	27
1.1.3.1. Wiadomości ogólne.....	27
1.1.3.2. Metody rozwijania chromatogramów OPLC	28
1.1.3.3. Zalety i wady chromatografii OPLC	30
1.1.4. Elektrochromatografia kapilarna.....	31
1.1.4.1. Rozwój metody	32
1.1.4.2. Aparatura	32
1.1.4.2.1. Zasilacz wysokonapięciowy	32
1.1.4.2.2. Kolumna kapilarna	33

1.1.4.2.3. Metody wprowadzania próbek	33
1.1.4.2.4. Wypełnienie kapilary	34
1.1.4.2.5. Detektory	36
1.1.4.3. Charakterystyka przepływu elektroosmotycznego	36
1.1.4.3.1. Efekt elektroosmotyczny w kapilarach pakowanych	39
1.1.4.4. Zmiany temperatury w kapilarze	39
1.1.4.5. Zastosowanie elektrochromatografii kapilarnej	40
1.1.4.6. Zalety i wady elektrochromatografii kapilarnej	41
1.1.5. Elektroforeza kapilarna	41
1.1.5.1. Rozwój metody	42
1.1.5.2. Aparatura	43
1.1.5.3. Podstawy teoretyczne elektroforezy kapilarnej	43
1.1.5.4. Przegląd elektroforetycznych metod separacji.....	44
1.1.5.4.1. Kapilarna elektroforeza strefowa	44
1.1.5.4.2. Micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna	45
1.1.5.4.3. Kapilarna elektroforeza żelowa	46
1.1.5.4.4. Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne	46
1.1.5.4.5. Kapilarna izotachoforeza	47
1.1.6. Elektrochromatografia planarna w układzie otwartym	48
1.1.6.1. Rozwój metody	48
1.1.6.2. Chromatografia planarna w zewnętrznym polu elektrycznym	52
1.1.7. Elektrochromatografia planarna	53
1.1.7.1. Rozwój metody	55
1.2. Podstawowe parametry chromatograficzne	59
1.2.1. Retencja	59
1.2.2. Selektywność	60
1.2.3. Sprawność	60

1.3.	Czynniki wpływające na rozdzielczość w chromatografii TLC i HPLC.....	62
1.3.1.	Wybór optymalnych warunków prowadzenia procesu separacji metodą chromatografii ciekowej kolumnowej i cienkowarstwowej	62
1.3.1.1.	Optymalizacja warunków prowadzenia procesu rozdzielania w HPLC	63
1.3.1.2.	Wybór warunków prowadzenia procesu chromatografii cienkowarstwowej	65
1.4.	Elektrochromatografia jako wysokosprawna metoda rozdzielania substancji	67
1.4.1.	Elektrochromatografia kapilarna	67
1.4.1.1.	Polaryzacja elektrod.....	68
1.4.1.2.	Napięcie polaryzujące.....	68
1.4.1.3.	Temperatura kapilary	69
1.4.1.4.	Bufor – rodzaj, stężenie, wartość pH	69
1.4.1.5.	Dodatek modyfikatorów	71
1.4.1.6.	Wymiary kapilary	71
1.4.2.	Elektrochromatografia planarna	72
1.4.2.1.	Wpływ fazy stacjonarnej.....	72
1.4.2.2.	Wpływ fazy ruchomej	74
1.4.2.3.	Ciśnienie wywierane na płytkę.....	75
1.4.2.4.	Wpływ pola elektrycznego	76
1.4.2.5.	Sprawność układów PPEC.....	77
2.	Cel pracy	81
3.	Część eksperymentalna	83
3.1.	Materiały	83
3.2.	Aparatura i sprzęt laboratoryjny	83
3.3.	Chemikalia.....	84
3.4.	Substancje testowe.....	85
3.5.	Urządzenia i aparatura	86
3.5.1.	Komora do przemywania warstwy adsorbentu płytek chromatograficznych	86

3.5.2.	Wykonanie marginesów uszczelniających w warstwie adsorbentu płytki chromatograficznej	87
3.5.3.	Rozwijanie chromatogramów cienkowarstwowych	88
3.5.4.	Naczynie do zwilżania płytek chromatograficznych roztworem fazy ruchomej – wersja podstawowa.....	88
3.5.5.	Naczynie do zwilżania warstwy adsorbentu płytek chromatograficznych roztworem fazy ruchomej – wariant zwilżania warstwy adsorbentu z naniesioną próbką substancji.....	90
3.5.6.	Nanoszenie próbek substancji na płytkę chromatograficzną.....	91
3.5.6.1.	Na zwilżoną warstwę adsorbentu za pomocą mikrostrzykawki	91
3.5.6.2.	Na moką płytkę z wykorzystaniem fragmentu warstwy adsorbentu	92
3.5.6.3.	Na suchą płytkę za pomocą dozownika aerozolowego	93
3.6.	Urządzenie do ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej	93
3.6.1.	Zasada działania.....	93
3.6.2.	Konstrukcja komory do PPEC	94
3.6.3.	Metodyka rozwijania elektrochromatogramów	95
3.7.	Wyznaczanie dystansu migracji substancji nie zatrzymywanej w układzie PPEC	97
3.8.	Rejestracja chromatogramów i elektrochromatogramów	98
4.	Wyniki i dyskusja.....	99
4.1.	Czynniki wpływające na przepływ elektroosmotyczny w układach PPEC ...	99
4.1.1.	Napięcie polaryzujące	99
4.1.2.	Zwilżenie warstwy adsorbentu	105
4.1.3.	Faza ruchoma	107
4.1.3.1.	Rodzaj i stężenie składnika organicznego fazy ruchomej	107
4.1.3.2.	Rodzaj i stężenie buforu w fazie ruchomej.....	111
4.1.3.3.	pH buforu	117
4.1.3.4.	Dodatek odczynnika jonowo-asocjacyjnego	120
4.1.4.	Faza stacjonarna	125
4.1.5.	Ciśnienie wywierane na warstwę adsorbentu.....	127

4.1.6.	Powtarzalność dystansu migracji substancji w układach PPEC	129
4.2.	Czynniki wpływające na sprawność układów PPEC.....	130
4.2.1.	Faza stacjonarna	130
4.2.2.	Metoda dozowania próbki i zwilżania fazy stacjonarnej	133
4.2.3.	Wpływ szerokość strefy startowej na sprawność układu PPEC	138
4.2.4.	Dystans migracji.....	139
4.2.5.	Prędkość przepływu fazy ruchomej.....	141
4.2.5.1.	Porównanie sprawność układów TLC, HPLC i PPEC.....	142
4.3.	Przykłady rozdzielania mieszanin substancji metodą PPEC	146
4.3.1.	Separacja mieszaniny sterydów. Porównanie rozdzielania technikami PPEC, HPTLC i HPLC	146
4.3.2.	Rozdzielanie składników mieszaniny wybranych pochodnych kofeiny	149
4.3.3.	Wykorzystanie techniki PPEC do wyznaczania zależności retencja – skład ilościowy fazy ruchomej.....	150
5.	Wnioski	155
6.	Literatura	159

Wstęp

Chromatografia jest powszechnie znaną, instrumentalną metodą analityczną, która pozwala na rozdzielenie niemalże dowolnej mieszaniny składników, określenie jej składu jakościowego i ilościowego. Takie możliwości analityczne zawdzięcza wysokiemu poziomowi rozwoju, zarówno technicznego aparatury i sprzętu, jak i teorii procesu separacji. W procesie chromatograficznego rozdzielania mieszanin substancji wykorzystuje się zróżnicowane właściwości fizyczne, chemiczne i fizykochemiczne składników. Rozwój chromatografii przebiega od ponad 100 lat. W tym czasie powstało wiele technik i metod chromatograficznych, które znalazły zastosowanie nie tylko w laboratoriach naukowych, ale, przede wszystkim, w wielu gałęziach przemysłu np. przemyśle chemicznym, farmaceutycznym, spożywczym, petrochemicznym i w analizie środowiska. Największe praktyczne zastosowanie, w wymienionych aspektach, znalazła wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), szczególnie ze względu na wielorakie możliwości separacyjne metody. Również chromatografia cienkowarstwowa (planarna, ang. *Thin-Layer Chromatography*, TLC) znalazła szerokie zastosowanie w praktyce laboratoryjnej, głównie ze względu na jej zalety związane z kosztami realizowania procesu separacji. Tą metodą można prowadzić proces separacji i analizy zarówno przy wykorzystaniu skomplikowanej aparatury, jak i bardzo prostego sprzętu laboratoryjnego. Jednak każda ze znanych metod chromatograficznych posiada ograniczenia i wady. Związane jest to m.in. z następującymi aspektami:

- niezadowalającą separacją skomplikowanych próbek,
- dużym zużyciem materiałów i odczynników chemicznych,
- wysokim kosztem aparatury,
- czasochłonnością (przekłada się na koszt analizy próbki).

Ciągły i intensywny rozwój chromatografii sprawia, że znane techniki chromatograficzne są udoskonalane oraz powstają nowe, wcześniej nieznanne metody chromatografowania. Jedną z dróg innowacji metod chromatograficznych jest łączenie ich ze sobą. Taki zabieg pozwala na osiągnięcie znacznie lepszego rozdzielania składników mieszanin, skrócenie czasu separacji oraz poprawienie granicy wykrywalności. Efektem rozwoju metod chromatograficznych jest elektrochromatografia planarna (ang. *Planar Electrochromatography*, PEC),

a szczególnie jej wariant realizowany w układzie zamkniętym tj. elektrochromatografia planarna ciśnieniowa (ang. *Pressurized Planar Electrochromatography*, PPEC). PPEC jest metodą bardzo młodą, w której wykorzystuje się zalety technik, znane z elektrochromatografii kapilarnej (ang. *Capillary Electrochromatography*, CEC) oraz TLC. CEC, podobnie jak inne techniki elektromigracyjne, charakteryzuje się, niespotykaną w innych metodach rozdzielczych, bardzo wysoką sprawnością, dzięki której można stosunkowo łatwo uzyskać jednoczesne rozdzielenie kilkudziesięciu składników pojedynczej próbki. W metodach PPEC i CEC przepływ fazy ruchomej zachodzi dzięki zjawisku elektroosmozy, którego cechami charakterystycznymi są niezależność od średnicy ziaren fazy stacjonarnej oraz płaski profil. Ponadto w przypadku rozdzielania analitów, których cząsteczki ulegają dysocjacji, należy oczekiwać zmian selektywności rozdzielania w układach PPEC i CEC w porównaniu do układów chromatografii cieczowej. Te cechy stanowią o istotnych zaletach metod PPEC i CEC w stosunku do HPLC i TLC. Możliwość rozdzielania nawet złożonych próbek analitycznych, bez stosowania bardzo skomplikowanej aparatury, jest dodatkowym atutem metody PPEC. W obecnej formie, PPEC jest na etapie rozwoju zarówno pod względem teoretycznego opisu rozdzielania jak i konstrukcji urządzeń przeznaczonych do tej metody.

1. Część teoretyczna

1.1. Przegląd metod chromatograficznych w układach ciecz – ciało stałe

1.1.1. Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Wysokosprawna chromatografia cieczowa kolumnowa obok chromatografii planarnej jest najczęściej stosowaną techniką w praktyce laboratoryjnej. Jest to zarówno metoda analityczna jak i preparatywna, służąca do izolowania, oczyszczania, oznaczania ilościowego i identyfikacji substancji chemicznych. Metoda ta znalazła zastosowanie szczególnie w analizie farmaceutycznej, biomedycznej, ochronie środowiska itp.

HPLC jest rodzajem cieczowej chromatografii kolumnowej, gdzie analizowana próbka, jest rozpuszczana w rozpuszczalniku transportującym, tzw. eluencie, i w tej formie jest kierowana do kolumny, która wypełniona jest specjalnym porowatym złożem. Fazę ruchomą stanowi roztwór ciekły o różnym stopniu polarności. Na skutek oddziaływań międzycząsteczkowych substancji chemicznych, wchodzących w skład analizowanej próbki, z fazą ruchomą i stacjonarną, następuje ich rozdzielenie.

1.1.1.1. Rozwój metody

Technika HPLC powstała na bazie chromatografii cieczowej klasycznej, w wyniku wyteżonych badań w latach sześćdziesiątych XX wieku. Przyjmuje się, że ten rodzaj chromatografii powstał w 1968 roku w Las Vegas, USA [1,2,3]. Jednakże już w latach 1962 – 64 powstał pierwszy chromatograf cieczowy, opracowany przez zespół Prof. Kowalczyka [4]. Praktyczne zastosowanie HPLC zapoczątkowano w pierwszej połowie lat siedemdziesiątych. Rozwój metody związany był z udoskonalaniem aparatury badawczej tj. pomp, kolumn, detektorów, a także opracowywaniem podstaw teoretycznych procesu rozdzielania mieszanin substancji. W latach siedemdziesiątych wprowadzono adsorbenty niepolarne, stosowane w odwróconym układzie faz tzw. RP (ang. *reversed-phase*) chromatografii cieczowej. Zastosowanie wypełnień tego typu pozwoliło w dużym stopniu poszerzyć liczbę substancji chemicznych, które mogły być rozdzielane za pomocą HPLC. Dalszy istotny postęp rozwoju nastąpił dziesięć lat później – opracowano nowe wypełnienia kolumn, wprowadzono bardziej czułe

detektory. Zastosowanie coraz bardziej zaawansowanych metod numerycznych pozwoliło na połączenie wszystkich elementów chromatografu w zintegrowany system sterowany elektronicznie. To spowodowało wzrost szybkości opracowywania wyników i poprawę dokładności ich uzyskiwania. Ponadto zostały wprowadzone detektory z matrycą fotodiodową, które umożliwiały rejestrowanie widma UV – VIS eluowanych z kolumny stref substancji bez zatrzymywania przepływu eluentu. W latach pięćdziesiątych udoskonalano wypełnienia kolumn, otrzymując ziarno adsorbentu o coraz mniejszych rozmiarach. Należy odnotować pojawienie się również po raz pierwszy tak zwanego wypełnienia monolitycznego kolumn. W ostatnich latach wprowadzone zostały do praktyki laboratoryjnej kolumny chromatograficzne, z wypełnieniem o średnicy ziarna poniżej 2 μm , które umożliwiają uzyskanie bardzo wysokiej sprawności i krótkiego czasu separacji. Detektory stawały się coraz bardziej czułe, a granica wykrywalności pozwalała na oznaczanie zawartości śladowych substancji. Zaczęto łączyć chromatografię ze spektroskopowymi metodami wykrywania substancji między innymi spektrometrią mas, spektrometrią w podczerwieni. Opracowano zintegrowane systemy przygotowania próbek z automatycznymi dozownikami HPLC. Ponadto powstała grupa specjalistycznego oprogramowania komputerowego, nie tylko do opracowywania wyników, ale także do przewidywania retencji poszczególnych składników analizowanych substancji oraz symulacji procesu chromatograficznego.

1.1.1.2. Aparatura

Aparatura do chromatografii HPLC składa się z następujących elementów (rys. 1): zbiornika lub zbiorników na fazę ruchomą (1), systemu odgazowywania fazy ruchomej (2), pompy (3), dozownika (4), kolumny (lub zestaw kilku kolumn) (5), detektora (6), połączonego z rejestratorem, którym obecnie jest komputer. Każdy z wymienionych elementów chromatografu cieczowego ma dopracowaną konstrukcję, ponieważ ma istotny wpływ na jakość analizy.



Rys. 1. Widok współczesnego chromatografu cieczowego, HPLC, Agilent 1260 (Agilent, Palo Alto, USA) [5]. Zbiornik z fazą ruchomą (1), system odgazowywania fazy ruchomej (2), pompa (3), dozownik (4), kolumna (lub zestaw kilku kolumn) termostatowanych (5), detektor (6), komputer (7).

1.1.1.3. Wypełnienie kolumn

W wysokosprawnej chromatografii cieczowej stosuje się najczęściej drobnoziarniste wypełnienia. Wypełnienia takie zapewniają krótką drogę dyfuzji cząsteczek substancji chromatografowanych do wnętrza ziaren i z powrotem. Dzięki temu, przy względnie dużych prędkościach fazy ruchomej, uzyskuje się wysokie sprawności kolumn. Właściwości kinetyczne sorbentu są tym lepsze, im mniejsza jest średnica ziaren. Powszechnie używane są sorbenty porowate w całej objętości ich ziarna. Wprawdzie stawiają one dość duży opór przepływowi fazy ruchomej, ale przy zastosowaniu odpowiedniej pompy, nie stanowi to większego problemu. Wypełnienie kolumny tymi sorbentami zapewnia wysoką sprawność i dużą pojemność sorpcyjną fazy stacjonarnej. Takie adsorbenty nadają się też do zastosowania jako wypełnienia kolumn do rozdzielania preparatywnego.

W chromatografii adsorpcyjnej, prowadzonej w normalnym układzie faz, jako wypełnienie kolumn stosuje się przede wszystkim żel krzemionkowy [6]. W praktyce laboratoryjnej HPLC obserwuje się spadek zainteresowania czystym żelem krzemionkowym, większe znaczenie ma modyfikowana krzemionka. Otrzymane fazy, w wyniku reakcji żelu krzemionkowego z chlorosilanami,

nazywa się w skrócie fazami związanymi. Wytwarzane dotychczas fazy stacjonarne można zaszeregować do sześciu podstawowych grup tj. fazy o strukturze monowarstwy – „monomer”, poliwarstwy – „polimer”, strukturze kanapkowej, wypełnienia z tzw. barierą dyfuzyjną oraz różnego rodzaju fazy mieszane.

Spośród tych faz największe znaczenie mają fazy otrzymywane w wyniku modyfikacji żelu krzemionkowego. W literaturze dominują dwa sposoby chemicznej modyfikacji powierzchni. Jeden polega na hydrosililacji atomów krzemu, zlokalizowanych w wiązaniach siloksanowych $\equiv Si-O-Si \equiv$ [7], zaś drugi polega na chemicznym wiązaniu z powierzchnią nośnika różnego rodzaju organosilanów zawierających aktywne grupy: chloro-, metoksy-, etoksy-, amino- [8]. Polarność zmodyfikowanej powierzchni żelu zależy od długości i ilości związanych łańcuchów. Najpopularniejszą fazą niepolarną jest faza oktadecylosilanowa o 18 atomach węgla w łańcuchu (C18). Wykorzystywana jest ona do rozdzielania różnych związków, zarówno niepolarnych jak i polarnych. Rzadziej stosowane są fazy zawierające w łańcuchu alkilowym 8 (C8) lub 2 (C2) atomy węgla, a jeszcze rzadziej 22 (C22), czy 30 (C30) [9]. Łańcuch alkilowy może być zakończony np. grupą fenylową $-C_6H_5$ lub difenylową $-C_{12}H_9$. Fazy związane hydrofobowe są podstawowymi wypełnieniami stosowanymi w chromatografii cieczerwowej w odwróconym układzie faz. Stosowane są do rozdzielania substancji nierozpuszczalnych lub słabo rozpuszczalnych w wodzie, takich jak: węglowodory aromatyczne zawarte w paliwach [10], polimery [11], steroidy [12] oraz alkaloidy [13,14]. Inną grupę faz związanych stanowią fazy stacjonarne o pośredniej polarności. Do takich faz należy żel krzemionkowy, który został zmodyfikowany poprzez wiązanie grup funkcyjnych takich jak: $-NH_2$, $-NO_2$, $-CN$, $-aryl$ [15]. Adsorbenty te mogą być stosowane do chromatografii cieczerwowej w normalnym, jak i odwróconym układzie faz.

Dużą grupę wypełnień stanowią fazy do rozdzielania i preparatywnego wyodrębniania związków optycznie czynnych (chiralnych), które są wykorzystywane nie tylko w HPLC, ale też w innych technikach separacyjnych. Obecnie, wyróżnia się sześć klas chiralnych faz stacjonarnych tj. fazy Pirkla, LEC (ang. *ligand exchange chromatography*), inkluzyjne, węglowodanowe, białkowe i antybiotykowe. Najpopularniejsze to fazy typu „szczotki”, wprowadzone przez Pirkla, w których dominującymi oddziaływaniami są donorowo-akceptorowe $\pi - \pi$, oraz fazy cyklodekstrynowe [16].

Te ostatnie szczególnie dobrze sprawdziły się w chromatografii enancjomerów i obecnie, zyskując miano chiralnych faz stacjonarnych, zdominowały analizę izomerów optycznych. Ich skuteczność wynika ze specyficznej zdolności stereoselektywnego inkludowania cząsteczek lub jonów, tworząc kompleksy typu „gospodarz – gość”.

Podobne właściwości, do kompleksów typu „gospodarz – gość”, wykazują etery koronowe, które znalazły zastosowanie w chromatografii. Powodzenie faz cyklodekstrynowych oraz eterów koronowych, jako faz stacjonarnych, wzbudziło zainteresowanie kaliksarenami i podobnymi im rezorcarenami – związkami, które także mają „wnękową” budowę [17]. Charakterystyczna struktura, w kształcie wazy, sprawia, że rezorcareny, podobnie jak cyklodekstryny i etery koronowe, wykazują zdolność do tworzenia kompleksów inkluzyjnych z szeroką gamą analitów [18].

Fazy ze związanymi ciekłymi kryształami zostały z powodzeniem zastosowane do rozdzielania mieszanin płaskich molekuł, jakimi są anality z grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych [19,20]. Uzyskane wyniki wskazują, iż przy wykorzystaniu tych materiałów ma miejsce lepsze „rozdzielanie” planarności i kształtu, niż przy stosowaniu typowych fazach oktadecylowych.

Do rozdzielania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych zaproponowano szeroką gamę wypełnień, gdzie dominującymi były oddziaływania π - π . Prace te zapoczątkowały badania nad preparatyką wypełnień ze związanymi fulerenami [21].

W 1989 roku po raz pierwszy zaproponowano nową generację wypełnień, typu immobilizowanej sztucznej membrany (ang. *immobilized artificial membrane*, IAM), w których cząsteczki fosfolipidów zostały kowalencyjnie przyłączone do powierzchni krzemionkowego nośnika [22]. Fazy te z powodzeniem zostały do rozdzielania szerokiej gamy indywiduów o zróżnicowanej budowie i polarności, należących do różnych grup związków, m.in. leki, aminokwasy, białka, sterydy, węglowodory, aminy. Inne wypełnienia tego typu, zawierają, obok resztkowych silanoli, również ugrupowania N-amidowe, wbudowane w hydrofobowy łańcuch C16 lub molekuly cholesterolu [23,24].

Prowadzone są badania nad wykorzystaniem faz, które nie są oparte na żelu krzemionkowym. Duże nadzieje wiąże się przede wszystkim z badaniami nad wykorzystaniem do tego celu tlenków metali takich jak ZrO₂, TiO₂, Al₂O₃

i w mniejszym stopniu ThO_2 oraz CeO_2 [25,26,27,28]. Główną przyczyną zainteresowania tymi materiałami jest dużo większa ich trwałość termiczna i mechaniczna w stosunku do krzemionki, a także zróżnicowane właściwości chemiczne.

W literaturze znane są fazy o tak zwanej inteligentnej powierzchni. Według zamysłu autorów miały stanowić alternatywne układy do separacji związków optycznie-czynnych. Jednak, jak do tej pory, pomimo spełnienia wszelkich teoretycznych założeń, bariera techniczna uniemożliwia uzyskanie powtarzalnych wypełnień. Fazy te, zawierające w swojej strukturze białka, takie jak albumina osocza bydłowego (ang. *bovine serum albumin*, BSA), lub albumina osocza ludzkiego (ang. *human serum albumin* HSA), czy keratyna, miały umożliwić dogodne przejście do modelowania naturalnych układów biologicznych [29,30].

W trakcie rozwoju HPLC powstało szereg testów pozwalających w łatwy, bądź też bardziej skomplikowany, sposób ocenić ich jakość oraz przydatność do rozdzielania określonej grupy substancji [31,32,33,34,35].

1.1.1.4. Zalety i wady HPLC

Na obecnym etapie rozwoju metoda HPLC jest najczęściej wykorzystywaną instrumentalną metodą analityczną. Tak duże praktyczne zastosowanie związane jest z jej zaletami. Szeroki zakres zastosowań, bardzo dobrze poznane podstawy teoretyczne mechanizmu separacji, wysoka efektywność rozdzielania, bogaty wybór faz stacjonarnych (dedykowanych do określonych analiz, ok. 400), automatyzacja aparatury oraz możliwość cyfrowego przetwarzania danych są głównymi zaletami HPLC. Podstawowymi wadami są koszty aparatury i odczynników chemicznych, znaczne zużycie chemikaliów i w niektórych przypadkach długi czas pojedynczej analizy.

W ostatnich latach firma *Waters Corporation* wprowadziła ulepszoną metodę HPLC, którą nazwano ultrasprawną chromatografią cieczową (ang. *ultra performance liquid chromatography*, UPLC). Zastosowanie mniejszego ziarna wypełnienia tj. o średnicy 1,7 μm , spowodowało znaczne skrócenie czasu pojedynczego rozdzielania. Zwiększenie rozdzielczości, czułości oraz prędkości przepływu zwiększyło wydajność oraz pozwoliło na uzyskanie znacznie więcej informacji o pojedynczym przebiegu procesu [36].

1.1.2. Chromatografia cienkowarstwowa

1.1.2.1. Wiadomości ogólne

Charakterystycznym wyróżnikiem chromatografii cienkowarstwowej i wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej jest to, że faza ruchoma migruje względem fazy stacjonarnej, uformowanej w postaci cienkiej warstwy. Pośród planarnych metod rozdzielania wyróżnia się chromatografię cienkowarstwową i bibułową (ang. *paper chromatography*, PC). W chromatografii bibułowej fazę stacjonarną stanowi bibuła lub roztwór ciekły unieruchomiony na bibule, zaś w chromatografii cienkowarstwowej tą fazą jest cienka warstwa adsorbentu, umieszczona zwykle na podłożu szklanym, aluminiowym lub plastikowym. Chromatografia cienkowarstwowa pod względem metodycznym nie jest skomplikowaną techniką, gdyż może być wykonywana w „warunkach domowych”, albo jak to bywa obecnie – może być w pełni zinstrumentalizowana.

Po raz pierwszy chromatografię cienkowarstwową zastosowano w 1938 roku do wykrywania zanieczyszczeń preparatów farmaceutycznych [37] i od tego czasu do dnia dzisiejszego jest to metoda powszechnie stosowana, praktycznie we wszystkich rodzajach laboratoriów (przemysłowe, farmaceutyczne, kliniczne i inne). Metoda ta stała się szczególnie popularna od 1956 roku, gdy do przygotowania cienkich warstw chromatograficznych na płytkach szklanych zastosowano specjalne urządzenie [38,39]. Od nazwiska twórcy tego urządzenia, nazywane powlekaaczem Stahl’a. Stahl był również twórcą podstaw teoretycznych i metodycznych chromatografii cienkowarstwowej. Burzliwy rozwój wysokosprawnej chromatografii kolumnowej, w latach siedemdziesiątych, zmniejszył zainteresowanie techniką cienkowarstwową, szczególnie z powodu braku możliwości rejestracji i przechowywania wyników rozdzielania. O ponownym wzroście zainteresowania tą techniką w ostatnich latach zadecydowało zwiększenie jej możliwości rozdzielczych, dzięki wprowadzeniu tzw. wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej [40] oraz nowej aparatury [41]. Ogromnym postępem w rozwoju tej techniki była instrumentalizacja poprzez wprowadzenie skanerów płytek chromatograficznych – densytometrów (detektor), urządzeń do automatycznego dozowania próbki (dozowniki aerozolowe) oraz komputerowego

opracowania wyników [42]. Kolejnym impulsem do zwiększenia zainteresowania tą techniką wydają się być prace na temat połączenia TLC ze spektrometrią mas, w których substancja jest przeniesiona z płytki chromatograficznej do detektora MS poprzez elucję lub desorpcję [43,44,45,46,47].

1.1.2.2. Nanoszenie próbki na płytkę chromatograficzną

Na warstwę złoza sorbentu nanosi się próbkę substancji za pomocą kapilary, mikrostrzykawki lub za pomocą automatycznego dozownika (aplikatora) aerozolowego. Najdokładniejszą i zarazem najwygodniejszą metodą nanoszenia substancji na płytkę chromatograficzną jest ta ostatnia. Dzięki temu urządzeniu, objętość naniesionej próbki może wynosić od kilkudziesięciu nanolitrów do kilkuset mikrolitrów, przy zachowaniu strefy próbki w postaci wąskiego pasma lub bardzo małej plamki, o średnicy ok. 1 mm na płytce chromatograficznej.

1.1.2.3. Komory chromatograficzne

W najprostszym wariacie komorę stanowi cylindryczny lub prostopadłościenny pojemnik szklany przykrywany szczelną pokrywą. W komorach pionowych faza ruchoma, dzięki siłom kapilarnym, migruje wzdłuż warstwy sorbentu (fazy stacjonarnej) i, w zależności od energii oddziaływań substancji z fazą stacjonarną, powoduje zróżnicowanie prędkości migracji rozdzielanych składników mieszaniny. Rozwijanie chromatogramów w komorach pionowych może być prowadzone metodą wstępującą, tzn. od strony dna zbiornika w kierunku pokrywy. Drugim sposobem jest metoda zstępująca, w której faza ruchoma jest kierowana od góry do dolnej części płytki chromatograficznej. Wtedy migracja fazy ruchomej zachodzi nie tylko dzięki siłom kapilarnym, ale również siłom grawitacji.

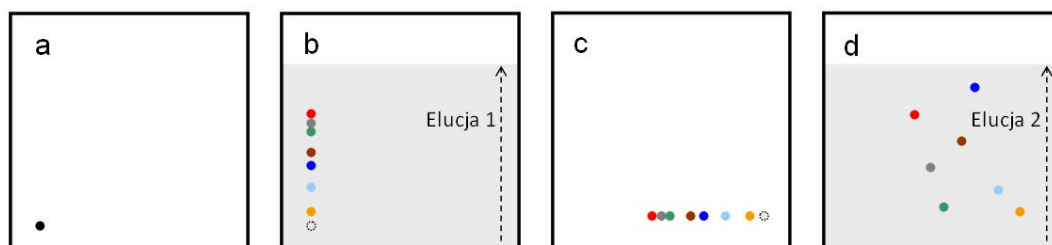
Innym rodzajem komór do chromatografii są komory typu „sandwicz” [48]. Budowa takich komór jest bardzo podobna do komór pionowych, ale odległość pomiędzy ścianką komory a warstwą adsorbentu płytki chromatograficznej nie przekraczają 3 mm. Zmniejszona wolna przestrzeń fazy gazowej miała na celu ograniczenie niekorzystnego efektu „preadsorpcji” par fazy ruchomej.

Coraz większe znaczenie zyskują komory poziome. W komorach tych płytka chromatograficzna znajduje się w pozycji poziomej. Obecnie są popularność

zdoły komory poziome DS, opracowane w 1990r. w Uniwersytecie Medycznym w Lublinie (wtedy Akademii Medycznej) [49,50,51,52]. Komory poziome DS pozwalają na osiągnięcie bardzo powtarzalnych wyników. Ich nieskomplikowana budowa pozwala na łatwą i bezproblemową obsługę nawet niedoświadczonym analitykom. W komorach tych możliwe jest rozwijanie chromatogramów na płytkach prostokątnych lub kwadratowych z obu przeciwnych stron jednocześnie, co podwaja liczbę rozdzielanych próbek. Różne możliwości metodyczne komór DS zostały opisane w literaturze fachowej [53,54,55,56,57].

1.1.2.4. Wielokierunkowa chromatografia TLC oraz inne metody rozwijania chromatogramów cienkowarstwowych

Wielokierunkowe rozwijanie chromatogramu stosuje się w przypadku analizy próbek wieloskładnikowych, których separacja po jednokrotnym rozwinięciu nie jest zadowalająca. Pierwsze rozwinięcie chromatogramu pozwala na wstępne rozdzielanie składników na kilka głównych frakcji. Drugie i kolejne, zazwyczaj inną fazą ruchomą, prowadzą do separacji głównych frakcji na pojedyncze strefy substancji – rys. 4. Pomędzy kolejnymi etapami rozwijania, faza ruchoma musi zostać odparowana z powierzchni sorbentu.



Rys. 4. Zasada rozwijania dwukierunkowego w chromatografii cienkowarstwowej; naniesienie plamki mieszaniny substancji (a), rozwijanie chromatogramu fazą ruchomą 1 (b), suszenie i obrót płytki o 90° (c), rozwijanie chromatogramu fazą ruchomą 2 (d).

Wielowymiarowe rozwijanie chromatogramu można również przeprowadzić w komorze AMD, do automatycznego rozwijania [58]. Niewątpliwie zaletami takiej komory są zautomatyzowane etapy wymiany fazy ruchomej oraz wysuszenia warstwy adsorbentu przed kolejnym procesem rozwijania. Zautomatyzowaną wersją

rozwijania wielokrotnego można przeprowadzić w komorze PMD (programowane wielokrotne rozwijanie, ang. *Programmed Multiple Development*). W tym przypadku rozwijanie chromatogramu może składać się nawet z 20 – 25 cykli: wszystkie są w tym samym kierunku, ale przy coraz dłuższych drogach migracji czoła fazy ruchomej (wzrost o 1 – 5 mm). W kolejnych cyklach stosuje się fazę ruchomą o coraz mniejszej sile elucyjnej. Zadaniem pierwszego cyklu jest zawężenie pasma. W późniejszych cyklach, kolejne składniki zostają unieruchomione (mała siła elucyjna) i zajmują ustalone pozycje na płytce. Szerokości pasm wszystkich składników są prawie jednakowe, co jest dużą zaletą w przypadku oznaczeń ilościowych.

Poza wyżej wymienionymi metodami prowadzenia chromatografowania znane są inne techniki, m.in. radialne rozwijanie, w którym przepływ fazy ruchomej zachodzi od zewnątrz do środka płytki (metoda antycyркуlarna, dośrodkowa) lub od środka do zewnętrznych części płytki (metoda krążkowa). Rozdzielone substancje tworzą charakterystyczne okręgi, lub łuki, wokół miejsca naniesienia – chromatogramy krążkowe. Plamki zmniejszające swoją szerokość, w czasie chromatografowania, uzyskuje się metodą dośrodkowego rozwijania. W praktyce laboratoryjnej rozwijanie tą techniką wykorzystuje się na płytkach w kształcie trójkąta.

1.1.2.5. Faza stacjonarna

Sorbenty, które stosuje się w chromatografii cienkowarstwowej są w zasadzie takie same jak w chromatografii kolumnowej cieczowej. W chromatografii cienkowarstwowej największe znaczenie ma rozdzielanie w normalnym układzie faz. W około 90 % wszystkich prowadzonych analiz, jako fazę stacjonarną stosuje się żel krzemionkowy [59].

Na powierzchni żelu krzemionkowego znajdują się polarne grupy hydroksylowe. Wyróżnia się cztery rodzaje grup $-OH$, które odpowiadają za charakterystyczne właściwości adsorbentu. Właściwości rozdzielcze sorbentu charakteryzuje liczba wolnych grup hydroksylowych. Największą aktywność żel osiąga po osunięciu wody (wygrzanie płytki chromatograficznej w temperaturze 150 °C). Badania międzylaboratoryjne wykazały, że mogą występować znaczne różnice parametrów retencji, otrzymane dla różnych sorbentów, nawet w obrębie danej szarży produkcyjnej. Wynika to z faktu, że proces technologiczny

otrzymywania sorbentów jest skomplikowany i zależny od wielu parametrów. Stąd uzyskiwanie powtarzalnych właściwości chromatograficznych jest wciąż trudne do osiągnięcia.

Żel krzemionkowy stosuje się również w postaci zaimpregnowanej, np. solami jonów metali: Ag^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , olejem parafinowym, glikolem etylenowym, kwasem borowym, kofeiną i innymi [60,61,62,63,64,65,66]. Naniesienie modyfikatora na powierzchnię sorbentu ma na celu zwiększenie efektywności separacji i zmianę selektywności rozdzielania substancji. Ponadto, podobnie jak w HPLC, coraz większe znaczenie mają fazy stacjonarne z chemicznie modyfikowanym żelem krzemionkowym np. RP-18, RP-8, RP-2. W zależności od gęstości pokrycia powierzchni żelu łańcuchami alkilowymi, wyróżnia się sorbenty zwilżalne przez wodno organiczną fazę ruchomą w całym zakresie stężenia wody tj. 0 – 100 % oraz nie zwilżalne przez eluentu, w którym stężenie wody jest większe niż 50 %.

Drugim po żelu krzemionkowym, najczęściej stosowanym adsorbentem w chromatografii cienkowarstwowej, jest tlenek glinu [67]. Warstwy tego adsorbentu z powodzeniem stosuje się do rozdzielania terpenów, fenoli, kwasów organicznych, steroidów i innych związków. Inne sorbenty stosowane w TLC to florisil, poliamidy, celuloza. Florisil to krzemian magnezu, którego polarność mieści się pomiędzy polarnością żelu krzemionkowego i tlenku glinu [68]. Znalazł on zastosowanie m.in. w analizie kwasów aromatycznych, flawonoidów, kumaryn, steroidów [69,70,71]. Poliamidy i celuloza są sorbentami organicznymi. Poliamid może być stosowany w normalnym, jak i odwróconym układzie faz. Wykorzystywany jest w analizie pestycydów, kwasów karboksylowych, fenoli, także flawonoidów, antoksyantyn i innych [72,73,74]. Podstawową wadą tego sorbentu jest rozpuszczalność w niektórych rozpuszczalnikach, oraz reaktywność z substancjami do wywoływania chromatogramów. Celuloza wykorzystywana jest w postaci włóknistej, o krótkich łańcuchach, oraz mikrokrystalicznej. Najczęściej na tych sorbentach rozdziela się substancje polarne takie jak: alkohole, barwniki, cukry, aminokwasy [75,76,77]. Ponadto w chromatografii cienkowarstwowej znalazła zastosowanie celuloza acetylowana. Takie sorbenty stosowane są w odwróconym układzie faz do oznaczeń substancji lipofilowych. W celu poprawy selektywności rozdzielania stosuje się impregnację poliamidu, przeważnie solami metali. Inny, rzadziej stosowany adsorbent, to ziemia

okrzemkowa zwana Kieselguhrem, albo ziemią damasceńską [78], która najczęściej jest wykorzystywana jako nośnik fazy stacjonarnej w układach podziałowych. Osadzając na powierzchni skwaleń, parafinę, olej silikonowy, bądź inne związki chemiczne, uzyskuje się fazy przydatne do rozdzielania w układzie ciecz – ciecz. Z nieorganicznych adsorbentów stosowanych w chromatografii cienkowarstwowej można wymienić szkło sproszkowane, krzemian wapnia, apatyt, hydroksyapatyt, siarczan wapnia, tlenek cyrkonu, tlenek tytanu, a nawet tlenek żelaza [79,80]. W chromatografii cienkowarstwowej znalazły zastosowanie mieszane fazy stacjonarne, które najczęściej składają się z dwóch składników, np. żelu krzemionkowego i tlenku glinu. Fazy te wykorzystuje się do specjalnych celów.

Tabela 1. Porównanie właściwości dostępnych komercyjnie płytek stosowanych w klasycznej chromatografii cienkowarstwowej .

Właściwości	TLC	HPTLC	UTLC
Postać sorbentu	Nieregularne ziarno	Nieregularne ziarno	Warstwa monolityczna
Mezopory	6 nm	6 nm	3 – 4 nm
Główny rozmiar ziarna	10 – 15 μm	5 – 7 μm	monolit
Rozkład ziarna	szeroki	wąski	–
Grubość warstwy	0,20; 0,25 mm	0,05; 0,10; 0,20 mm	ok. 0,01 mm
Ilość plamek na płytce	do 12 (20x10 cm)	36 – 72 (20x10 cm)	do 12 (6x3,6 cm)
Dystans rozwijania	100 – 150 mm	30 – 70 mm	10 – 30 mm
Czas rozwijania	15 – 200 min	5 – 30 min	1 – 6 min
Objętość fazy ruchomej	50 – 100 ml	5 – 20 ml	1 – 4 ml
Limit detekcji:			
Absorpcja (UV-VIS)	100 – 1000 ng	10 – 100 ng	1 – 10 ng
Fluorosencyja	1 – 100 ng	0,1 – 10 ng	0,01 – 0,1 ng

Metodą chromatografii cienkowarstwowej można prowadzić rozdzielanie do celów analitycznych i preparatywnych. Płytki różnią się między sobą grubością warstwy sorbentu i średnicą ziarna sorbentu. Płytki do rozdzielania analitycznego mają grubość warstwy 0,1 – 0,25 mm, a płytki do rozdzielania preparatywnego (ang. *Preparative Layer Chromatography*, PLC) 0,5 – 2 mm. Płytki do celów analitycznych mogą być „zwykłe” (do TLC) i wysokosprawne (do HPTLC), typu LiChrospher oraz monolityczne warstwy (do chromatografii ultracienkowarstwowej). Różnice pomiędzy tymi płytkami są związane ze średnicą ziarna, zakresem rozkładu porów ziarna sorbentu, maksymalną liczbą rozdzielanych próbek, dystansem rozwijania, czasem rozwijania, objętością fazy ruchomej oraz limitem detekcji. Szczegółowe parametry zestawiono w tabeli 1.

1.1.2.6. Detekcja

Pełna analiza uzyskanego chromatogramu cienkowarstwowego polega na zlokalizowaniu położenia (dystansu migracji) strefy rozdzielonych składników mieszaniny, zidentyfikowaniu tych składników i określeniu zawartości substancji w każdej lub wybranej plamce. Lokalizację substancji na warstwie chromatograficznej oraz intensywności plamki można wykonać za pomocą metod fizycznych, chemicznych albo biologiczno – fizjologicznych.

Do metod fizycznych zalicza się fotometrię absorpcyjną, fluorescencję, fosforescencję, a w przypadku substancji znakowanych izotopami promieniotwórczymi, metody radiometryczne. W/w metody należą do metod niedestrukcyjnych i są szczególnie przydatne, gdy stosuje się chromatografię cienkowarstwową dla celów preparatywnych. Najbardziej popularny sposób określania położenia stref substancji to stosowanie lampy UV, ponieważ większość związków organicznych wykazuje absorpcję promieniowania w tym zakresie długości fali i mogą być widoczne na płytce dzięki własnej fluorescencji, albo dzięki wygaszaniu fluorescencji tła (warstwa adsorbentu jest często impregnowana odpowiednim „wywoływaczem”). Detekcja chemiczna polega na przeprowadzeniu rozdzielanych substancji w substancje barwne za pomocą reagentów chemicznych, które reagują z wybranymi grupami funkcyjnymi substancji oznaczanej. Detekcja biologiczno-fizjologiczna wykorzystuje specyficzną aktywność biologiczną rozdzielanych substancji. Nieaktywne biologicznie substancje w ogóle nie interferują

z pozostałymi składnikami, dzięki czemu wstępne oczyszczanie próbki można często zupełnie pominąć.

Ocena ilościowa chromatogramu jest możliwa dzięki wprowadzeniu niezwykle kosztownej aparatury. Pomiary ilościowe przeprowadza się z zastosowaniem densytometrów rejestrujących w sposób ilościowy zależność absorbancji lub fluorescencji w zakresie promieniowania UV-VIS. Granice oznaczalności, w przypadku densytometrii, są porównywalne z uzyskiwanymi w HPLC. Zastosowanie w densytometrach matrycy fotodiodowej umożliwia uzyskanie widma w szerokim zakresie długości fali. Pozwala to na bezpośredni odczyt wyniku rozdzielania oraz umożliwia wyznaczenie parametrów chromatograficznych, a także pozwala na szybkie porównanie różnych chromatogramów.

1.1.2.7. Zalety i wady chromatografii planarnej

Chromatografia cienkowarstwowa jest metodą komplementarną w stosunku do wysokosprawnej chromatografii kolumnowej. Zważywszy na możliwości instrumentalizacji i pełnej komputeryzacji, można za jej pomocą rozwiązać wiele problemów analitycznych. Podstawowe jej zalety to:

- stosowanie do wstępnego doboru faz, zarówno stacjonarnej jak i ruchomej, dla układów kolumnowych,
- można równocześnie rozdzielać wiele (nawet kilkadziesiąt) różnych próbek,
- proces rozdzielania może być w każdej chwili zatrzymany,
- można łatwo stosować elucję gradientową stopniową i ciągłą,
- można łatwo zastosować wielowymiarowe rozwijanie chromatogramu,
- rozdzielane próbki nie muszą być wstępnie oczyszczane,
- można ją zastosować jako metodę pilotażową (w analizie przesiewowej),
- istnieje możliwość rozdzielania nawet złożonych próbek analitycznych bez stosowania bardzo skomplikowanej aparatury,
- można wykorzystać różne, selektywne sposoby wizualizacji plamek oraz skanery i densytometry,
- do rejestracji chromatogramu cienkowarstwowego można zastosować nowoczesne metody, takie jak spektrometrię mas, czy spektroskopię w podczerwieni,

- metoda jest mało pracochłonna i mało czasochłonna, w porównaniu z innymi metodami analitycznymi, obniża to koszty analizy około 30 %,
- rozdzielone składniki pozostają na płytce chromatograficznej, którą można poddać analizie w dowolnym czasie i miejscu.

Niewątpliwie, zalety wymienione powyżej kwalifikują chromatografię cienkowarstwową do metod uniwersalnych, jednakże TLC charakteryzuje się kilkoma wadami, m.in.:

- prędkość przepływu fazy ruchomej w trakcie chromatografowania nie jest stała,
- ograniczony dystans rozwijania chromatogramu czasem nie pozwala na całkowite rozdzielenie składników analizowanej próbki,
- wysoka wartość granicy wykrywalności w stosunku do układów kolumnowych,
- niekiedy problematyczna analiza ilościowa.

1.1.3. Ciśnieniowa chromatografia planarna (OPLC)

1.1.3.1. Wiadomości ogólne

W metodzie tej przepływ fazy ruchomej względem warstwy złoża płytki chromatograficznej jest wymuszony przez pompę wysokociśnieniową. Pompa tłoczy eluent pod ciśnieniem, podobnie jak w HPLC. Do warstwy sorbentu jest dociskana specjalna płaska płytka lub elastyczna folia pod zewnętrznym ciśnieniem, wywieranym przez gaz lub ciecz. W ten sposób otrzymuje się płaską kolumnę. Próbkę zwykle nanosi się na warstwę sorbentu płytki chromatograficznej przed umieszczeniem jej w komorze. Ciśnieniowa chromatografia planarna jest techniką chromatografii ciekowej, łączącą prostotę klasycznej chromatografii cienkowarstwowej ze skomplikowaną technicznie wysokosprawną kolumnową chromatografią ciekową. W OPLC wyeliminowano niekorzystne czynniki znane w TLC, tj. układ jest całkowicie odizolowany od otoczenia, co nie powoduje parowania rozpuszczalników z powierzchni płytki i wyeliminowany jest efekt „preadsorpcji” par. Tłoczenie eluentu za pomocą pompy pozwala na stabilny przepływ fazy ruchomej, tak jak w HPLC. To z kolei pozwala na wybranie takiej jego wartości, która umożliwi uzyskanie optymalnej sprawności układu separacyjnego. Z tego powodu regułą jest, że w ciśnieniowej chromatografii

planarnej uzyskuje się lepszą sprawność układu rozdzielczego w stosunku do klasycznej metody TLC.



Rys. 5. Zestaw do OPLC firmy MicroSolv – Personal, OPLC 50 (MicroSolv Technology Corporation, Eatontown,USA) [81]

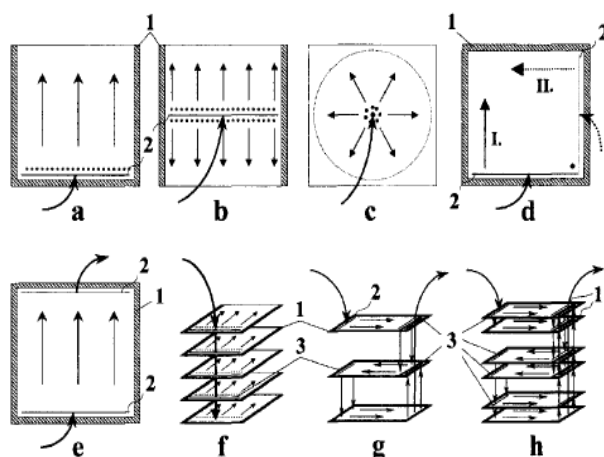
Pierwsze doniesienia dotyczące zastosowania wymuszonego przepływu eluentu w chromatografii cienkowarstwowej pojawiły się w 1979 w pracy węgierskich naukowców: Tyihaka, Mincsovicsa i Kalasza [82,83]. W późniejszym czasie metoda ta była rozwijana w bardzo ograniczonej liczbie ośrodków naukowych między innymi przez Witkiewicza [84], Kaiser'a i Rieder'a [85,86]. Proces rozwijania chromatogramów metodą OPLC prowadzi się w specjalnych komorach chromatograficznych. Wyróżnia się metody OPLC ze względu na ciśnienie wejściowe tłoczonyj fazy ruchomej: niskociśnieniowa (2 – 5 bar), średniociśnieniowa (10 – 30 bar) oraz wysokociśnieniowa (50 – 100 bar lub więcej) [87].

1.1.3.2. Metody rozwijania chromatogramów OPLC

W trakcie rozwoju metody OPLC wykształciły się dwie podstawowe metody rozwijania chromatografów: techniki „off – line” i „on – line” [88]. Znane są także inne metody, które powstały w wyniku modyfikacji i łączenia wcześniej wspomnianych. W metodzie off – line wszystkie operacje związane z procesem chromatograficznym są prowadzone niezależnie, tj. naniesienie próbki, rozwijanie chromatogramu i rejestracja chromatogramu. Zaletą tej metody jest możliwość prowadzenia rozdzielania wielu próbek równoległe (jednocześnie). Plamki analitów

mogą być bezpośrednio oszacowane wizualnie, zaś ilościowa zawartość substancji może być wyznaczona na podstawie innych parametrów. W metodzie on-line cały układ chromatograficzny pracuje „na bieżąco” w podobnym trybie jak w HPLC, tj. pętla dozująca jest połączona z wlotem strumienia fazy ruchomej do komory, a wylot jest bezpośrednio połączony z detektorem np. spektrofotometrycznym UV – VIS. Roztwór wycieku może być na bieżąco frakcjonowany i zbierany.

Układy OPLC wyposażone w aplikator i detektor pozwalają na wieloraką ich konfigurację. Techniki off-line i on-line można ze sobą łączyć w jeden system [89] tzn. część rozdzielanych substancji próbki może być identyfikowana „na bieżąco” – on-line, tak jak w HPLC, a pozostałe, mogą być oznaczone po zakończeniu procesu chromatografowania np. densytometrycznie – off-line, tak jak w TLC. Taki układ zwiększa efektywność analizy próbek, zwłaszcza skomplikowanych, o dużej liczbie składników. Dzięki takiemu zabiegowi wzrasta efektywność rozdzielania i szacuje się, że liczba rozdzielanych substancji w jednym procesie może być wtedy dwa razy większa [87].

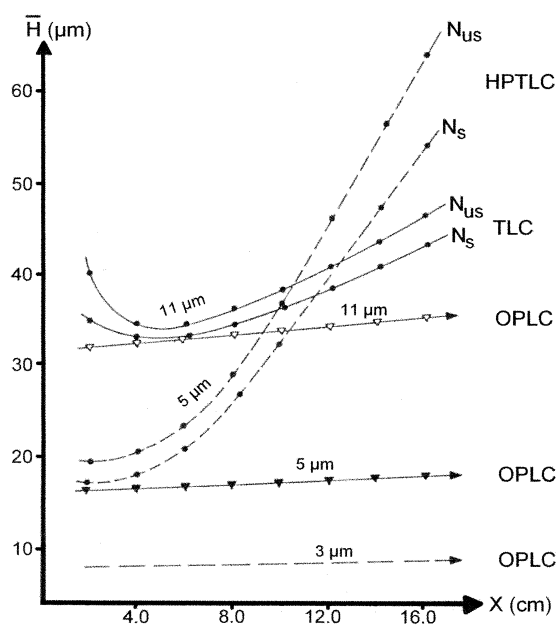


Rys. 6. Rozwijanie chromatogramów OPLC: jednokierunkowe (a), w dwóch przeciwnych kierunkach (b), radialne (c), dwuwymiarowe (d), on – line (e), równoległe wielowarstwowe OPLMC (f), szeregowe długodystansowe (g), szeregowo - równoległe wielowarstwowe (h) [90]

Poza wcześniej wymienionymi sposobami rozwijania chromatogramów metodą OPLC znane są inne, w których charakterystyczną cechą jest wykorzystanie kilku płytek chromatograficznych jednocześnie [91,92]. Przy równoległym ustawieniu płytek eluent może płynąć w ich warstwach adsorbentu w jednym

kierunku – rozwijanie równoległe (ang. *parallel coupled multilayer OPLC*, OPLMC), w przeciwnym kierunku w warstwach kolejnych płytek – rozwijanie szeregowo (ang. *serial coupled multilayer OPLC*, SCMS) lub kombinacja OPLMC i SCMS – rozwijanie szeregowo-równoległe (PSCMS). Metody te dają unikalne możliwości, które nie są osiągalne dla układów kolumnowych – rys. 6.

Stwierdzono, że metodą OPLC uzyskuje się większą efektywność rozdzielania niż TLC, ponieważ sprawność układu separacyjnego jest większa, nawet gdy wzrasta prędkość przepływu tłoczonyj fazy ruchomej. Podobnie jak w innych metodach chromatograficznych, wielkość ziarna sorbentu ma duży wpływ na sprawność układu, tj. im mniejsze rozmiary ziarna, tym sprawność jest większa. Ciekawą zależnością jest to, że w układach OPLC wraz ze wzrostem dystansu migracji substancji wysokość półki praktycznie nie ulega zmianie, w przeciwieństwie do TLC (rys. 7).



Rys. 7. Porównanie sprawności układów TLC/HPTLC i OPLC przy wykorzystaniu zależności wysokości półki, H , od dystansu rozwijania chromatogramu, z uwzględnieniem rozmiaru ziarna adsorbentu oraz nasycania (N_s) lub nie nasycania (N_{us}) parami fazy ruchomej złoża adsorbentu [93]

1.1.3.3. Zalety i wady chromatografii OPLC

OPLC posiada wiele zalet w stosunku do klasycznej chromatografii cienkowarstwowej. Jest metodą wiążącą dwie techniki chromatografii ciekowej – TLC i HPLC. Można ją prowadzić techniką, w której poszczególne etapy

rozdzielenia prowadzi się niezależnie od siebie (off-line) – tak jak klasyczną chromatografię cienkowarstwową lub techniką on-line – podobnie jak HPLC, bądź w systemie połączonych technik off- i on-line. W OPLC efektywność rozdzielenia i liczba rozdzielanych stref substancji może być znacznie większa niż w TLC. Sprzyja temu możliwość doboru prędkości przepływu fazy ruchomej (ciśnienie tłoczenia eluentu), metody rozwijania chromatogramu, dogodnego dystansu rozwijania, liczby i rodzaju stosowanych płytek w metodach łączonych, jedno i wielowymiarowych. W metodzie OPLMC, do celów preparatywnych jak i analitycznych, możliwe jest zastosowanie wszystkich identycznych płytek, jak również z różnymi fazami stacjonarnymi. Wybrany skład fazy ruchomej dla układu analitycznego TLC może zostać zastosowany w analitycznym układzie OPLC, a następnie w analitycznym układzie HPLC. OPLC można połączyć z innymi metodami kolumnowymi takimi jak szybką chromatografią preparatywną (ang. *Flash Chromatography*, FC), niskociśnieniową chromatografią cieczową (ang. *Low Pressure Liquid Chromatography*, LPLC), średniociśnieniową chromatografią cieczową (ang. *Medium Pressure Liquid Chromatographic*, MPLC), półpreparatywną HPLC. W przypadku analizy bardzo skomplikowanych – wieloskładnikowych próbek biologicznych nie ma konieczność oczyszczenia złoża sorbentu jak w HPLC.

Jednakże metoda OPLC jest bardziej czasochłonna niż klasyczna TLC, ponieważ płytkę chromatograficzną przed eksperymentem (w zależności od techniki) należy odpowiednio przygotować, m.in. nanieść warstwę uszczelniającą jej brzegi. Proces chromatografowania metodą OPLC jest prowadzony w specjalnej komorze. Skomplikowana budowa aparatury wiąże się z jej zakupem, co podwyższa koszt analizy.

1.1.4. Elektrochromatografia kapilarna

Metoda elektrochromatografii kapilarnej jest metodą rozdzielania jednorodnych mieszanin na składniki, w wyniku ich zróżnicowanego podziału pomiędzy fazę stacjonarną i ruchomą oraz w przypadku analitów obdarzonych ładunkiem, również pod wpływem ich różnej ruchliwości w polu elektrycznym. CEC łączy ze sobą dwie metody: chromatografię cieczową kolumnową i elektroforezę kapilarną. W elektrochromatografii kapilarnej przepływ fazy ruchomej jest wynikiem zjawiska elektroosmozy. Przepływ elektroosmotyczny (ang. *electroosmotic flow*,

EOF) jest ukierunkowanym ruchem roztworu w kapilarze pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego.

1.1.4.1. Rozwój metody

Pierwsze doniesienia na temat tej metody pojawiły się prawie 90 lat temu w pracach Strain'a [94]. Doświadczenia, jakie zostały przeprowadzone, polegały na umieszczeniu kolumny wypełnionej adsorbentem w polu elektrycznym. Badacze zanotowali wysoką selektywność rozdzielania substancji [95]. W 1974 Pretorius i współautorzy zaproponowali alternatywną metodę tłoczenia cieczy przez kolumnę, wykorzystując do tego „pompę elektroosmotyczną” [96]. Lata 70 XX wieku przypadają na szybki rozwój HPLC, a zainteresowanie CEC było niewielkie. W 1981 roku ukazała się praca Jorgenson'a i Lukacs'a [97], którzy przedstawili przydatność tej techniki do celów analitycznych z wykorzystaniem kolumn pakowanych. Pracę kontynuowali Grant i Knox [98,99], którzy zaprezentowali więcej szczegółów dotyczących wykorzystania kolumn chromatograficznych do CEC. Głównym powodem zainteresowania tą techniką był mieszany mechanizm rozdzielania składników mieszaniny, który obejmował mechanizmy znane w HPLC i kapilarnej elektroforezie strefowej (ang. *capillary zone electrophoresis*, CZE). Znana jest metoda elektrochromatografii kapilarnej, w której elektroosmotyczny przepływ fazy ruchomej jest wspomagany przez pompę tłoczącą fazę ciekłą do kapilary. Metoda taka zwana jest elektro – HPLC [100].

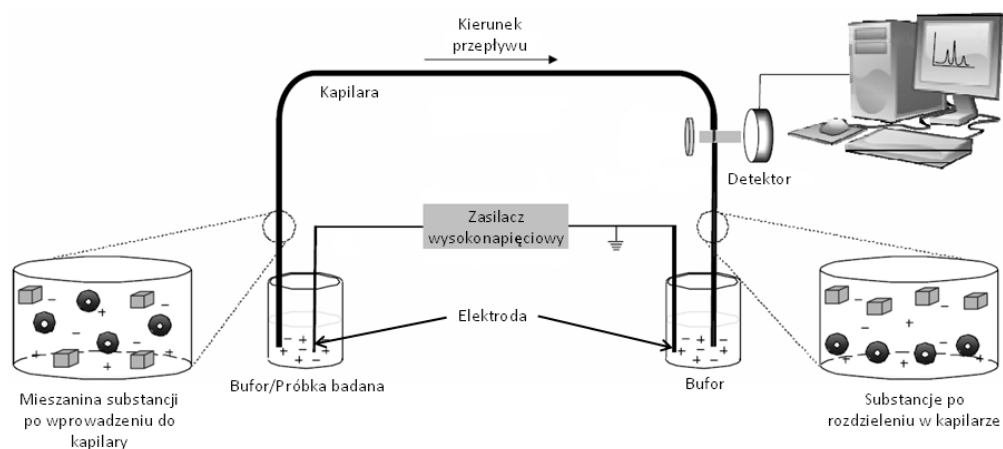
1.1.4.2. Aparatura

Urządzenie do kapilarnej elektrochromatografii składa się z kapilary wypełnionej fazą stacjonarną, zasilacza wysokonapięciowego, układu dostarczającego roztwór fazy ruchomej i badaną próbkę do kapilary, termostatu oraz detektora – rys. 8 [101].

1.1.4.2.1. Zasilacz wysokonapięciowy

Zasilacz wysokonapięciowy jest źródłem różnicy potencjałów pomiędzy elektrodami. Przykładane napięcie polaryzujące wynosi do 30 kV, a natężenie prądu przepływającego przez układ do 300 μ A. Optymalne i zarazem najbardziej stabilne warunki prądowe obserwuje się, kiedy natężenie prądu w kapilarze jest niskie i waha

się w granicach 1 – 30 μA . Znane są próby zastosowania wyższego napięcia polaryzującego niż 30 kV m.in. 60, 90 lub 120 kV [102,103,104].



Rys. 8. Schemat elektrochromatografu kapilarnego [105]

1.1.4.2.2. Kolumna kapilarna

Proces separacji mieszaniny substancji zachodzi w kapilarze. Kapilara stosowana w CEC jest zwykle wykonana ze stopionej krzemionki. Typowe wymiary kapilary pakowanej to 20 – 200 μm średnica wewnętrzna i 5 – 50 cm długość. Zewnętrzna powierzchnia kapilary jest pokryta ochronną warstwą polimeru, najczęściej poliamidu. Grubość tej warstwy wynosi 5 – 20 μm . Wypełnienie kapilary stanowi ziarno sorbentu o średnicy 3 – 5 μm . Końce kapilary są zanurzone do zbiorników z fazą ruchomą, którą stanowi roztwór buforu z rozpuszczalnikiem organicznym. W zbiornikach tych znajdują się również elektrody.

1.1.4.2.3. Metody wprowadzania próbek

W CEC wprowadzenie próbki do kapilary nie jest możliwe technikami stosowanymi w chromatografii HPLC lub TLC, ponieważ rozmiary kapilar są bardzo małe i wprowadzenie roztworu o objętości rzędu kilku lub kilkudziesięciu nL jest bardzo utrudnione. Dozowanie w CEC odbywa się dwiema metodami: hydrodynamiczną lub elektrokinetyczną [71]. W metodzie hydrodynamicznej wykorzystuje się różnicę ciśnienia między końcami kapilary. Wlot kapilary umieszczany jest w pojemniku z próbką. Następnie pod wpływem przyłożonego ciśnienia u wlotu kapilary, lub próżni u jej wylotu, zostaje do niej wprowadzona

próbka o objętości zależnej od czasu i różnicy ciśnienia. Ilość wprowadzanej substancji metodą hydrodynamiczną jest funkcją ciśnienia wytwarzanego przez pompę. Przy wprowadzaniu elektrokinetycznym w pojemniku z próbką, oprócz kapilary, umieszczana jest dodatkowa para elektrod. Po przyłożeniu stosunkowo niewielkiego napięcia (5 – 10 kV) składniki próbki migrują do kapilary dzięki swojej ruchliwości elektroforetycznej i przepływowi elektroosmotycznemu. Dozowanie elektrokinetyczne ma ograniczenia ze względu na ciśnienie wsteczne, które powstaje podczas wprowadzania próbki do kapilary pakowanej. Długość strefy próbki w kapilarze nie może być większa niż 1 – 2 % całkowitej długości kapilary. W przeciwnym wypadku istnieje duże prawdopodobieństwo przeładowania układu separacyjnego. Zarówno w elektrokinetycznym jak i hydrodynamicznym sposobie dozowania, wprowadzoną ilość próbki można przedstawić jako funkcję czasu dozowania, liniowej prędkości roztworu dozowanego, stężenia próbki i średnicy kapilary [106]. W przypadku wprowadzania próbki metodą elektrokinetyczną należy uwzględnić ruchliwość składników, prędkość przepływu elektroosmotycznego i napięcie polaryzujące [107].

1.1.4.2.4. Wypełnienie kapilary

Pierwszą grupę stanowią wypełnienia oparte na nie modyfikowanym żelu krzemionkowym [108]. Mechanizm migracji stref substancji w układzie z tym adsorbentem jest złożony. Jest on związany z elektroforetyczną ruchliwością analitów jonowych i oddziaływaniami międzycząsteczkowymi składników próbki z wypełnieniem i fazą ruchomą [109,110]. Oddziaływania obejmują głównie wymianę jonową, adsorpcję oraz w mniejszym stopniu efekt hydrofobowy. Jonowymienne właściwości krzemionki są czynnikiem, który często decyduje o mechanizmie migracji. Na przykład w krzemionce typu „HyPurity” oddziaływania z powierzchnią żelu są słabe, z powodu zmniejszenia pojemności jonowymiennej tak, że ruchliwość elektroforetyczna analitów jest czynnikiem zdecydowanie najsilniejszym i to w największym stopniu określa wielkość migracji stref substancji. Gdy ruchliwość elektroforetyczna jest czynnikiem najsilniejszym, wtedy zazwyczaj obserwuje się bardzo szybką migrację substancji w kapilarze (słaba retencja substancji). Natomiast w układach z krzemionką typu „Hypersil”

dominuje wymiana jonowa, prowadząc do wzrostu zatrzymywania substancji i innej selektywności rozdzielania.

Największą grupę wypełnień kapilar stosowanych w CEC stanowią modyfikowane żele krzemionkowe typu RP-18, RP-8, fenyl, wymiennicze jonowe i inne [111,112,113,114,115,116,117]. Sorbenty te pod względem właściwości fizykochemicznych są podobne do faz spotykanych w układach chromatografii planarnej i kolumnowej. W ostatnich latach zostały wyprodukowane kapilary pakowane krzemionką nowej generacji o wysokiej czystości, o niższej zawartości jonów metali. Aby rozciągnąć roboczy zakres pH, stosuje się fazy stacjonarne zawierające dysocjujące grupy funkcyjne. Taką grupę wypełnień stanowią wymiennicze jonowe typu SAX [118,119], SCX [120] i mieszane. Silnie kationowe wymiennicze jonowe typu SCX, zawierające sulfonowe grupy, wykazują ujemny ładunek powierzchni w zakresie pH od 2 do 9. W skutek tego przepływ elektroosmotyczny (EOF) jest utrzymywany praktycznie w całym zakresie pH fazy ruchomej. Podstawową zaletą takich układów jest wysoka sprawność, zaś ich wadą jest słaba odtwarzalność właściwości kwasowych przy ich otrzymywaniu, oraz słaby charakter hydrofobowy nie jest zadawalająco wybiórczy przy rozdzielaniu substancji o cząsteczkach obojętnych. W przypadku fazy o silnych właściwościach anionowymiennych typu SAX, które zwykle zawierają czwartorzędowe aminy, obserwuje się odwrócenie kierunku EOF. Jonowymienny mechanizm, z ujemnym ładunkiem powierzchni, daje zróżnicowane rezultaty rozdzielania składników.

Mieszane wypełnienia kapilar najczęściej składają się z fizycznie różnych cząstek, które posiadają zróżnicowane właściwości lipofilowe lub jonowymiennie [121], albo cząstek posiadających właściwości lipofilowe i wymiennicza jonowego [122]. Kolumny pakowane (napelnione) naturalnymi i syntetycznymi polimerami, takim jak poliakrylamid, dekstran, politlenek etylenu, poliglikol etylenu, polimetakrylan metylu, agaroz, celuloza i jej pochodne [123,124], są szeroko stosowane i scharakteryzowane w wielu aplikacjach. Duży zakres zastosowania polimerów związany jest z ich różnicami właściwości fizyko-chemicznych, które pozwalają na separację zróżnicowanych molekuł i biopolimerów. W literaturze można znaleźć grupę faz, w których do powierzchni wewnętrznej ścianki kapilary krzemionkowej są kowalencyjnie związane polimery lub mimetyczne żele (ang. *mimetic gels*).

Do CEC zaadaptowano także fazy chiralne, które wykorzystywano w chromatografii cieczowej m.in. cyklodekstryny, selektory proteinowe ludzkiej surowicy lub albuminę surowicy krwi i inne [125,126]. Inne znane fazy stosowane w CEC to selektory enancjomerów, które są chemicznie związane lub adhezyjnie połączone z żelazem krzemionkowym, zawierające np. antybiotyki, słabe anionowe chiralne wymiennicze jonowe. W elektrochromatografii kapilarnej podjęto kroki zastosowania kapilar tzw. monolitycznych, podobnych do tych stosowanych w kapilarnej elektroforezie żelowej [127].

1.1.4.2.5. Detektory

Najczęściej stosowana jest detekcja spektrofotometryczna w zakresie UV – VIS. Wynika to z dużej uniwersalności tej metody, jak również ze względów technicznych. Kapilara, po usunięciu warstwy ochronnej, jest bezpośrednio umieszczona w celce pomiarowej detektora. Przy wykorzystaniu kolumn pakowanych detekcję prowadzi się w obszarze pozbawionym ziarna wypełnienia, za spiekami oddzielającym obszar wypełniony od pustego (OCPD). W literaturze znane są przykłady stosowania kolumnowej detekcji fotometrycznej, w której ziarna wypełnienia kolumny nie są usuwane (ICPD) [128]. Z przeprowadzonych badań wynika, że powtarzalność i odtwarzalność otrzymywanych wyników jest mniejsza, niż za pomocą detekcji OCPD. Inne metody detekcji stosowane w CEC, to fluorescencja [129], jądrowy rezonans magnetyczny (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) [130,131] lub spektrometria mas [132].

1.1.4.3. Charakterystyka przepływu elektroosmotycznego

Przepływ elektroosmotyczny jest wytwarzany przez przyłożenie napięcia polaryzującego do końców kapilary. W kapilarach krzemionkowych, których ścianki wewnętrzne są w bezpośrednim kontakcie z roztworem elektrolitu, następuje jonizacja powierzchniowych grup silanolowych i w konsekwencji na powierzchni wewnętrznej kapilary pojawia się ładunek ujemny. Dodatnio naładowane cząsteczki składników roztworu gromadzą się w pobliżu granicy faz, tworząc, wraz z powierzchnią kapilary, podwójną warstwę elektryczną. Podwójna warstwa elektryczna składa się z części bezpośrednio przylegającej do powierzchni kapilary oraz z części dyfuzyjnej, rozciągającej się w głąb roztworu [133,134,135].

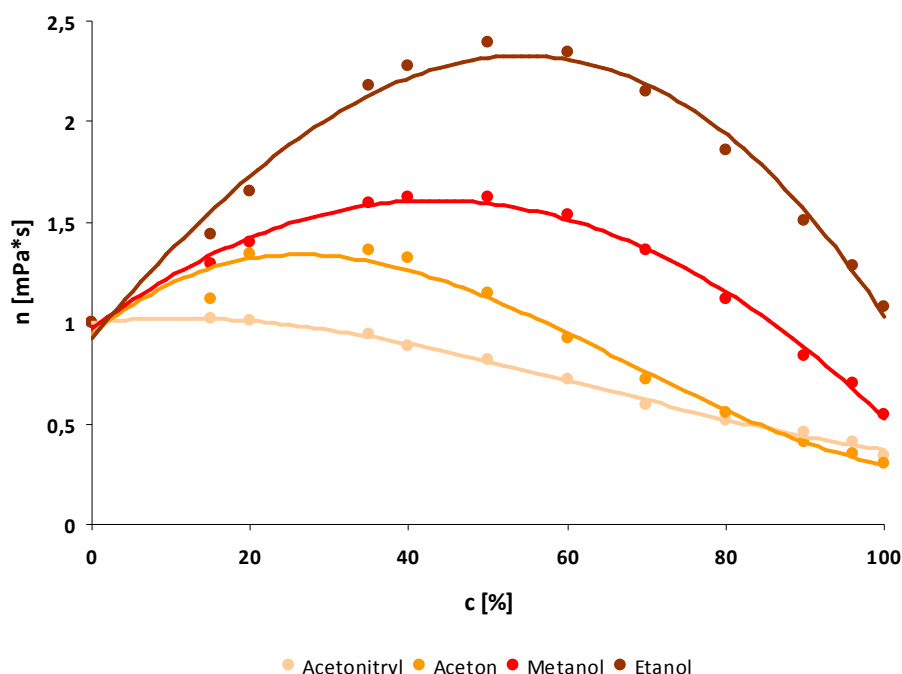
Gdy taki układ umieszczony zostanie w polu elektrycznym, hydratowane kationy z części dyfuzyjnej poruszają się w kierunku katody, powodując przepływ cieczy w kapilarze.

Ruchliwość elektroosmotyczna roztworu jest określana równaniem Smoluchowskiego [136]:

$$\mu_{eo,open} = \frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon \cdot \zeta_w}{\eta} \quad (1)$$

gdzie ε – stała dielektryczna ośrodka, ε_0 – przenikalność elektryczna próżni, ζ_w – potencjał elektrokinetyczny (dzeta lub zeta), η – lepkość.

Stała dielektryczna to wielkość opisująca właściwości ciała dielektrycznego w polu elektrycznym. Wartość stałej dielektrycznej wody i organicznych (polarnych) składników mają charakter addytywny. Natomiast mieszaniny wodno-organiczne wykazują zróżnicowane wartości lepkości, która nie ma addytywnego udziału ich poszczególnych składników. Dla porównania, w tabeli 2 znajdują się wartości ε i η dla czystych cieczy, a na rysunku nr 9 przedstawiono zależności lepkości cieczy wodno-organiczej od stężenia organicznego składnika w mieszaninie.



Rys. 9. Lepkość wybranych mieszanin wodno – organicznych w zależności od stężenia (v/v) organicznego składnika [137]

Tabela 2. Wartości stałej dielektrycznej i lepkości wybranych cieczy

Substancja	ϵ	$\eta (t_{20^{\circ}C})$ [mPa·s]	Substancja	ϵ	$\eta (t_{20^{\circ}C})$ [mPa·s]
Woda	78,4	1,004	Aceton	20,7	0,304
Acetonitryl	37,5	0,345	Formamid	109,5	3,302
Metanol	32,6	0,545	Metyloformamid	182,4	1,652
Etanol	24,6	1,078	N,N-dimetyloformamid	36,7	0,821

Prędkość przepływu elektroosmotyczny można kontrolować i modyfikować poprzez wprowadzanie do roztworu różnych dodatków, tj. rozpuszczalników organicznych, związków powierzchniowo czynnych, a także modyfikatorów ulegających adsorpcji na powierzchni ścianki kapilary. Szybkość przepływu elektroosmotycznego optymalizuje się w celu osiągnięcia odpowiedniej rozdzielczości i krótkiego czasu separacji. Natomiast jego stabilność jest warunkiem koniecznym do uzyskania powtarzalnych wyników. Przy wysokich wartościach pH grupy silanolowe są silnie zdeprotonowane. Tym samym ruchliwość elektroosmotyczna jest większa od ruchliwości elektroforetycznej anionów i kationów, więc wszystkie komponenty mieszaniny migrują w kierunku katody w kolejności: kationy, cząsteczki obojętne, aniony.

Profil przepływu elektroosmotycznego przez kapilarę jest płaski. Charakter ten jest bardziej widoczny, gdy kapilara nie jest wypełniona sorbentem. Właściwość ta ma decydujące znaczenie i wpływ na szerokość stref stężeniowych oznaczanych składników próbki. W detektorze substancje są rejestrowane w postaci wąskich pasm, a na elektrochromatogramie piki są bardzo wąskie i wysokie. Umożliwia to rozdzielanie bardzo dużej liczby substancji w próbce badanej. Porównując profil przepływu fazy ruchomej w HPLC i CEC można spodziewać się znacznie większej sprawności układu elektrochromatograficznego niż chromatograficznego [138,139,140].

1.1.4.3.1. Efekt elektroosmotyczny w kapilarach pakowanych

Przepływ elektroosmotyczny w kapilarach pakowanych jest zmodyfikowany przez znajdujące się w kapilarze wypełnienie. Należy rozpatrzeć dwa przypadki. Pierwszy, gdy powierzchnia cząstek wypełnienia nie posiada ładunku w obecności ośrodka ciekłego i drugi, gdy powierzchnia cząstek wykazuje ładunek. W pierwszym przypadku prędkość przepływu elektroosmotycznego osiąga wartości maksymalne przy ścianie kapilary i szybko maleje we wnętrzu kapilary [141]. Takie zachowanie się przepływu elektroosmotycznego nie powinno być zaskakujące, ponieważ tylko przy powierzchni ścianki kapilary powstaje podwójna warstwa elektryczna. Cząstki wypełniające kapilarę nie generują elektroosmozy cieczy oraz przyczyniają się do wzrostu oporu przepływu fazy ciekłej przez to złoże. W drugim przypadku, gdy powierzchnia ziarna wypełnienia kapilary posiada ładunek, wtedy sorbent generuje przepływ elektroosmotyczny cieczy z nim graniczącej. Gdy potencjał zeta układu ścianka kapilary – roztwór jest taki sam jak potencjał układu upakowane złoże – roztwór, wtedy profil przepływu jest płaski zgodnie z modelem Overbeek'a [142,143]. Natomiast, gdy te potencjały zeta nie są sobie równe, wtedy całkowitą prędkość przepływu można określić przez dodanie do wyrażenia Overbeek'a członu uwzględniającego efekty zróżnicowanego potencjału elektrokinetycznego. Parametrem decydującym o wielkości całkowitego EOF jest stosunek dwóch potencjałów zeta. Podobnie jak w poprzednim przypadku efekty modyfikacji EOF uzależnione są od średnicy ziarna wypełnienia [144,145].

1.1.4.4. Zmiany temperatury w kapilarze

W elektrochromatografii kapilarnej bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na końcowy efekt rozdzielania jest temperatura układu. Podczas elektrochromatograficznego procesu separacyjnego wytwarzana jest energia w postaci ciepła Joule'a [70]. Część tej energii opuszcza układ CEC w wyniku rozproszenia. Pozostała część powoduje wzrost temperatury całego układu w kapilarze. Wzrost temperatury wpływa na parametry fizykochemiczne fazy ruchomej i rozdzielanych substancji, tj. na ruchliwość ośrodka ciekłego, rozpuszczalność składników i jonów w roztworze buforowym, migrację analitów, stałą dielektryczną. Przyjmuje się, że wzrost temperatury o 1 °C powoduje wzrost ruchliwości w przybliżeniu o 2 – 3 %. Jeżeli ubytek ciepła z układu nie jest

dostatecznie duży, może to spowodować lokalny wzrost temperatury. To zjawisko może też przyczynić się do przerwania kontaktu elektrycznego w kapilarze, szczególnie, gdy temperatura osiągnie wartość temperatury wrzenia roztworu. Ponadto przenikanie i rozkład energii cieplnej w kapilarze nie są równomierne, ponieważ przenikalność cieplna powietrza, warstwy ochronnej kapilary, stopionej krzemionki, wypełnienia kapilary oraz samej fazy ciekłej są zróżnicowane. Nie wyrównana temperatura pomiędzy elementami składowymi układu i otoczenia prowadzi do nierównomiernego przepływu eluentu. W konsekwencji sprawność układu jest obniżona [146]. Im większa jest grubość ścianek kapilary tym profil radialnego rozpraszania energii cieplnej jest bardziej niekorzystny, ponieważ wytwarza się gradient temperatury w przekroju poprzecznym kapilary i proces odprowadzania ciepła nie jest dostatecznie wydajny. Takie zachowanie układu prowadzi do jeszcze bardziej nierównomiernego przepływu fazy ruchomej. Wykazano, że wysoka temperatura może również wpływać na dozowanie próbki [147]. Wysoka temperatura wpływa na poszerzanie stref stężeniowych substancji rozdzielanych, podobnie jak w innych metodach chromatograficznych. Średnia ilość wytwarzanego ciepła w kapilarze przypadająca na jednostkę objętości jest ok. 1500 razy większa niż w HPLC [148,149,150].

1.1.4.5. Zastosowanie elektrochromatografii kapilarnej

Elektrochromatografia kapilarna jest analitycznym narzędziem do rozdzielania zróżnicowanych mieszanin substancji chemicznych. Elektroosmotyczny przepływ fazy ruchomej o płaskim profilu oraz wypełnienie kapilary o małej średnicy ziarna pozwalają na rozdzielenie wieloskładnikowej próbki z niebywale wysoką efektywnością. Ze względu na mieszany mechanizm retencji, można tą metodą rozdzielać próbki zawierające obok siebie substancje, których cząsteczki są w postaci zjonizowanej oraz pozbawione ładunku. Gama substancji rozdzielanych tą metodą jest szeroka. Obecnie objęła swym zakresem jony nieorganiczne, węglowodory, węglowodany, kwasy organiczne, polimery, aminy barwniki, farmaceutyki, leki itp., które były domeną HPLC. Metodę CEC można zastosować do rozdzielania hormonów np. z grupy estrogenów np. estriol, estradiol, estron [151], leków antydepresyjnych np. doksepina,

imipramina, amitryptylina, trimipramina, klomipramina [152], nukleotydów [153], węglowodanów [154] i innych.

1.1.4.6. Zalety i wady elektrochromatografii kapilarnej

Elektrochromatografia kapilarna jest metodą, która znalazła duże uznanie w ośrodkach zajmujących się badaniem składu jakościowego i ilościowego próbek pochodzenia naturalnego. Metoda łączy zalety wysokosprawnej chromatografii ciekowej i elektroforezy kapilarnej. Główne zalety to:

- płaski profil przepływu fazy ruchomej,
- wysoka sprawność – 50000-200000 pól/metr kapilary,
- wysoka selektywność – inna niż w HPLC,
- możliwość oznaczania w jednej próbce dużej liczby składników,
- krótki czas analizy,
- mała objętości próbki i rozpuszczalników,
- duży wybór kapilar pakowanych,
- kompatybilność z wieloma typami detektorów, np. MS,
- miniaturyzacja – układy mikroczipowe,
- nieskomplikowana budowa, łatwa obsługa i automatyzacja aparatury,
- komputerowa wizualizacja danych i opracowanie wyników.

Za główne wady elektrochromatografii kapilarnej uważa się słabszą powtarzalność dystansów migracji rozdzielanych substancji niż w innych metodach, np. HPLC. Ponadto na końcach kapilar znajduje się niewielka ilość adsorbentu o innych parametrach niż wewnątrz kapilary.

1.1.5. Elektroforeza kapilarna

Elektroforeza kapilarna należy do grupy analitycznych technik elektromigracyjnych. Nazwa elektroforezy kapilarnej jest bardzo ogólna i obejmuje kilka metod tj. kapilarną elektroforezę strefową, kapilarne ogniskowanie izoelektryczne, żelową elektroforezę kapilarną, micelną elektrochromatografię kapilarną i izotachoforezę kapilarną. Najbardziej rozpowszechniona jest technika

kapilarnej elektroforezy strefowej, która często jest identyfikowana jako elektroforeza kapilarna.

1.1.5.1. Rozwój metody

Zjawisko elektroforezy, czyli migracja cząstek lub cząsteczek obdarzonych ładunkiem w polu elektrycznym w kierunku elektrody o przeciwnym znaku ładunku, znane było już pod koniec XIX wieku. Nazwa elektroforezy została pierwszy raz użyta przez Michaelis'a [155]. W 1938 roku po raz pierwszy zastosowano elektroforezę jako metodę do rozdzielania mieszaniny substancji przez Tiselius'a [156]. W pierwotnej formie elektroforeza miała duże ograniczenia związane z niekompletną separacją, stosunkowo dużą objętością próbki i koniecznością stosowania niskiego pola elektrycznego z powodu silnej konwekcji generowanej przez ciepła Joule'a. Początkowo eksperymenty prowadzone były w roztworach buforów w specjalnych U-rurkach zaopatrzonych w elektrody, a sprawność układu rozdzielczego była niska. W latach 40-tych prace skierowane były w stronę stworzenia stabilnych antykonwekcyjnych warstw [157,158]. Zastosowanie stabilizujących wypełnień, takich jak: agar, żel poliakrylamidowy, celuloza, wata szklana, pozwoliło zmniejszyć niekorzystne efekty konwekcji [159,160,161]. W latach 50-tych Kolin [162] usiłował zastosować kapilarne ogniskowanie izoelektryczne. Praca Hjertan'a [163] zapoczątkowała powstanie kapilarnej elektroforezy, która miała być wykorzystywana do oznaczania rozmaitych analitów, począwszy od małych molekuł (nieograniczonych jonów, nukleotydów), a skończywszy na białkach i wirusach. W latach 60-tych Vesterberg [164] zsyntetyzował amfoteryczne substancje, które umożliwiały zastosowanie stabilnego gradientu pH i charakteryzowały się wysoką efektywnością w rutynowych biochemicznych i biomedycznych analizach. W 1959 opracowano żele akrylamidowe, które pozwalały na kontrolę rozmiarów porów i stabilności tych żeli [165]. W 1964 Ornstein [166] i Davis [167] niezależnie wprowadzili do elektroforezy płytki z żelem. W późniejszych pracach pojawiły się nowe materiały spełniające rolę ośrodka np. agarozą. Jednocześnie drugi kierunek obrany przez naukowców, to użycie cienkich rurek o średnicy 0,2mm. W 1981 roku Jorgenson i Lukacs [168] zdefiniowali elektroforezę w kapilarach i datę tę uznaje się za początek wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej (ang. *High Performance Capillary Electrophoresis*, HPCE).

1.1.5.2. Aparatura

Aparatura do każdej z metod elektroforezy kapilarnej jest niemalże taka sama. Składa się z zasilacza wysokonapięciowego, układu dozującego próbkę do kapilary, detektora połączonego z układami zbierającym i przetwarzającym otrzymane wyniki. Bardziej szczegółowy opis aparatury znajduje się w części dotyczącej elektrochromatografii kapilarnej, rozdział 1.1.4.2. Jest ona praktycznie identyczna z aparaturą do elektrochromatografii kapilarnej z wyjątkiem stosowanej w tej metodzie innej kolumny separacyjnej.

1.1.5.3. Podstawy teoretyczne elektroforezy kapilarnej

Istota rozdzielania składników mieszaniny w elektroforezie opiera się na zróżnicowanej prędkości migracji (ruchliwości) w polu elektrycznym jonów, lub cząstek obdarzonych ładunkiem, w ośrodku ciekłym. Prędkość migracji jest proporcjonalna do ruchliwości elektroforetycznej i pola elektrycznego [169]. Ruch cząsteczki/cząstki w polu elektrycznym określają cztery siły: siła elektryczna wywierana przez pole elektryczne, siła tarcia (zgodnie z prawem Stokes'a), hydrodynamiczna siła hamowania cząstki w polu elektrycznym na skutek polaryzacji miceli i siła związana z efektem relaksacyjnym. Siły hamujące ruch cząsteczki w jednym kierunku są efektem występowania zjawisk retardacji i relaksacji elektroforetycznej. Ładunek wypadkowy w części dyfuzyjnej podwójnej warstwy elektrycznej ma znak przeciwny do ładunku na powierzchni cząstki. Tak, więc jony w warstwie dyfuzyjnej mają tendencję do poruszania się w przeciwnym kierunku niż cząstka. Ponadto jony lub cząstki, które są solwatowane cząsteczkami rozpuszczalnika poruszają się razem. Pojawia się lokalny ruch ośrodka przeciwdziałający ruchowi naładowanej cząstki/cząsteczki. Efekt ten nazywany jest opóźnieniem elektroforetycznym. Efekt relaksacji wynika z asymetrii warstwy dyfuzyjnej, która podczas ruchu cząstki/cząsteczki przemieszcza się z opóźnieniem, prowadząc do powstania siły działającej w przeciwnym kierunku do ruchu cząstki/cząsteczki i w efekcie zmniejsza jej prędkość. Uwzględnienie tych sił w opisie elektroforezy jest skomplikowane i zwykle pomijane, ponieważ udział tych sił w całkowitym bilansie jest bardzo niewielki.

Z porównania sił elektrycznej i tarcia wynika, że prędkość migracji cząstki/cząsteczki obdarzonej ładunkiem może być przedstawiona równaniem:

$$v = \frac{q \cdot E}{6\pi\eta a_e} \quad (2)$$

gdzie q to ładunek, E - pole elektryczne, η - lepkość ośrodka ciekłego, a_e - efektywny promień cząstki/cząsteczki.

Ruchliwość elektroforetyczna jest opisana przez równanie:

$$\mu_{ce} = \frac{\varepsilon_o \cdot \varepsilon \cdot \zeta}{6 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (3)$$

Ruchliwość elektroforetyczna jest wielkością, która ulega zmianie w zależności od rozmiarów i kształtu cząstek/cząsteczek.

W elektroforezie z kapilarami krzemionkowymi na wielkość migracji jonów i cząstek obdarzonych ładunkiem wpływają dwa efekty elektrokinetyczne tj. elektroforeza i elektroosmoza, jeżeli zostaną pominięte oddziaływania substancji ze ścianą kapilary. Zazwyczaj efekt elektroforetyczny jest słabszy niż elektroosmotyczny, dlatego też kierunek migracji wszystkich rozdzielanych substancji w kapilarze krzemionkowej jest ten sam. Zaś szybkość migracji składników jest wypadkową prędkości migracji wywołanej elektroforezą i przepływem elektroosmotycznym ośrodka ciekłego.

1.1.5.4. Przegląd elektroforetycznych metod separacji

1.1.5.4.1. Kapilarna elektroforeza strefowa

Obecnie, ze wszystkich znanych metod elektroforetycznych największe zastosowanie znalazła metoda CZE. Informacje przedstawione powyżej w rozdziałach (1.1.5.1 – 1.1.5.3) dają ogólną charakterystykę tej metody. Proces rozdzielania prowadzony jest w kapilarze wypełnionej w całej objętości tym samym buforem. Po wprowadzeniu badanej próbki do kapilary i przyłożeniu różnicy potencjałów do elektrod, składniki próbki obdarzone ładunkiem poruszają się z różną prędkością w kapilarze. Przy końcu kapilary znajduje się detektor, w którym rozdzielone substancje są wykrywane. Całość układu jest sterowana i kontrolowana za pomocą komputera. Jednak nie jest to uniwersalna metoda i nie w każdym przypadku sprawdza się np. w rozdzielaniu skomplikowanych próbek pochodzenia biologicznego.

1.1.5.4.2. Micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna

Cechą charakterystyczną micelarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej (ang. *Micellar Electrokinetic Chromatography*, MEKC) jest obecność w roztworze buforu, dodatkowej substancji – substancji powierzchniowo czynnej, która wytwarza w fazie ciekłej micide [170]. Micide są agregatami cząsteczek substancji powierzchniowo czynnej o właściwościach amfifilowych. Micide tworzą się powyżej granicznego stężenia surfaktantu, tzw. krytycznego stężenia miceli. Tworzenie miceli nie ogranicza się tylko do środowiska wodnego. Największe zastosowanie znalazły substancje anionoaktywne, np. dodecylsulfat sodu, rzadziej kationoaktywne, np. bromek cetylotrimetyloamoniowy [171]. Mechanizm rozdzielania jest podobny jak w HPLC w odwróconym układzie faz. Ruch elektroosmotyczny w kapilarze odbywa się w kierunku od anody do katody. Micide, które na swojej powierzchni posiadają ujemne ładunki, poruszają się wolniej od ośrodka dyspersyjnego w kierunku katody. Substancje rozdzielane ulegają procesowi elektroforezy i/lub podziału pomiędzy fazę rozpraszającą i rozproszoną – micide. Składniki jonowe charakteryzują się krótszym czasem przebywania w kapilarze, niż te substancje, których cząsteczki nie są zdysocjowane. Te ostatnie podlegają podziałowi pomiędzy fazami rozpraszającą i rozproszoną i dlatego opuszczają kapilarę jako ostatnie. W MEKC, w uzasadnionych przypadkach, do fazy ruchomej dodaje się modyfikatory, np. cyklodekstryny lub substancje kompleksujące. Ma to na celu zróżnicowanie oddziaływań analizowanych substancji z wnętrzem miceli, buforem i modyfikatorem. Micide mogą oddziaływać z cząsteczkami substancji rozpuszczonej, podobnie jak w przypadku procesu chromatograficznego, zarówno w wyniku hydrofobowych, jak i elektrostatycznych oddziaływań. Dlatego micide często nazywane są fazą pseudostacjonarną. Im silniej substancja rozpuszczona oddziałuje z micelą, tym dłuższy jest jej czas migracji, wskutek tego, że micela spowalnia jej transport w kierunku przepływu elektroosmotycznego ośrodka rozpraszającego. Bardziej hydrofobowe substancje silniej oddziałują z micelami i są zatrzymywane dłużej w układzie. Największe zastosowanie MEKC znalazła w oznaczaniu substancji o małych rozmiarach cząsteczek.

1.1.5.4.3. Kapilarna elektroforeza żelowa

Kapilarna elektroforeza żelowa (ang. *Capillary Gel Electrophoresis*, CGE) to metoda, w której rozdzielanie składników próbki jest wynikiem zróżnicowanej migracji cząsteczek substancji, spowodowaną niejednakową ich wielkością, podobnie jak w klasycznej elektroforezie żelowej. Kapilara stosowana w CGE wypełniona jest żelem, najczęściej poliakrylamidem, rzadziej agarozą, dekstranem lub tlenkiem polietylenu. W niektórych przypadkach, w celu uzyskania stabilnych warunków rozdzielania, dodaje się modyfikatory, np. cyklodekstryny. Mechanizm separacji jest najczęściej mieszany. Na całkowite rozdzielanie mają wpływ efekty związane z ruchem cząsteczek obdarzonych ładunkiem w polu elektrycznym i efekt sitowy, który jest wynikiem obecności porów w żelu. Cząsteczki o małych rozmiarach przemieszczają się znacznie szybciej w warstwie żelu, zaś dłuższy czas przebywają w porach wypełnienia kapilary. Bardzo często warunki separacji dobiera się w ten sposób, aby zminimalizować ruch elektroosmotyczny, a rozdzielanie zachodziło dzięki efektowi sitowemu. Metoda znalazła największe zastosowanie do oznaczania substancji, których cząsteczki posiadają ładunki elektryczne i różnią się znacznie rozmiarami, np. fragmenty DNA [172, 173].

1.1.5.4.4. Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne

W kapilarnym ogniskowaniu izoelektrycznym (ang. *Capillary Isoelectric Focusing*, CIEF) wykorzystuje się zróżnicowane wartości punktu izoelektrycznego rozdzielanych substancji. Punkt izoelektryczny (PI) substancji to wartość pH, przy której cała populacja cząsteczek tej substancji, posiadającej grupy funkcyjne, mogące przyjmować dodatni i ujemny ładunek elektryczny (np. aminokwasy), charakteryzuje się całkowitym ładunkiem równym zero. Stężenie jonu obojnego przyjmuje wtedy maksymalną wartość, a stężenia form anionowej i kationowej mają jednakowe, minimalne wartości. Tak, więc, gdy cząsteczka jest „w punkcie izoelektrycznym” nie wykazuje ruchliwości elektroforetycznej w polu elektrycznym. W CIEF kapilara jest napełniona roztworem związków o charakterze amfoterycznym (kwasy poliaminopolikarboksyłowe lub polisulfonowe), które w punkcie izoelektrycznym mają postać neutralną. Zbiornik z zanurzoną katodą zawiera zazwyczaj roztwór zasady sodowej, zaś zbiornik anodowy – kwas fosforowy.

Po przyłożeniu napięcia polaryzującego do elektrod, składniki mieszaniny migrują w kapilarze do momentu osiągnięcia strefy pH równego ich PI. Skupione w ten sposób strefy poszczególnych składników rozdzielanej próbki są wypychane z kapilary, np. za pomocą pompy, a następnie do detektora. Dodatkowo, aby uniknąć migracji rozdzielonych stref substancji, wynikającej z efektu elektroosmotycznego w kapilarze, wewnętrzne ścianki kapilary pokrywa się substancją nie wywołującą powstawania podwójnej warstwy elektrycznej, np. metylocelulozą. Główne zastosowanie metody, to oznaczanie peptydów i białek [174,175].

1.1.5.4.5. Kapilarna izotachoforeza

Izotachoforezą (ang. *Capillary Isotachopheresis*, CITP) nazywamy proces rozdzielania jonów (kationów lub anionów), które w polu elektrycznym, przy zastosowaniu odpowiedniego elektrolitu wiodącego (LE) i kończącego (terminującego, TE), formują się w strefy według ich zmniejszającej się ruchliwości i poruszają z jednakową prędkością [176]. Próbkę umieszcza się pomiędzy elektrolitem wiodącym, o większej ruchliwości od jonów próbki, i terminującym, o mniejszej ruchliwości od jonów próbki. Podczas jednorazowej analizy, metodą izotachoforezy, mogą być rozdzielane tylko jony o tym samym znaku (kationy lub aniony). Elektrolit podstawowy dobiera się w taki sposób, aby kation lub anion elektrolitu wiodącego i terminującego miał odpowiednio najwyższą i najniższą ruchliwość w stosunku do badanych analitów. W przypadku rozdzielania anionów, dobiera się bufor poprzedzający tak, aby jego aniony miały większą ruchliwość, niż aniony w próbce. Aniony buforu następującego mają ruchliwość mniejszą od anionów próbki. Próbkę wprowadza się pomiędzy elektrolit wiodący i elektrolit terminujący. Następnie do elektrod przykłada się odpowiednie pole stałoprądowe (a nie stałonapięciowego, jak w innych metodach CE). Aniony obecne w próbce poruszają się między buforami, jednocześnie rozdzielając się na skutek różnej ruchliwości. Szybkość poruszania się anionów próbki i buforów jest taka sama. Metodę stosuje się do rozdzielania peptydów i białek o tym samym znaku ładunku powierzchniowego [177].

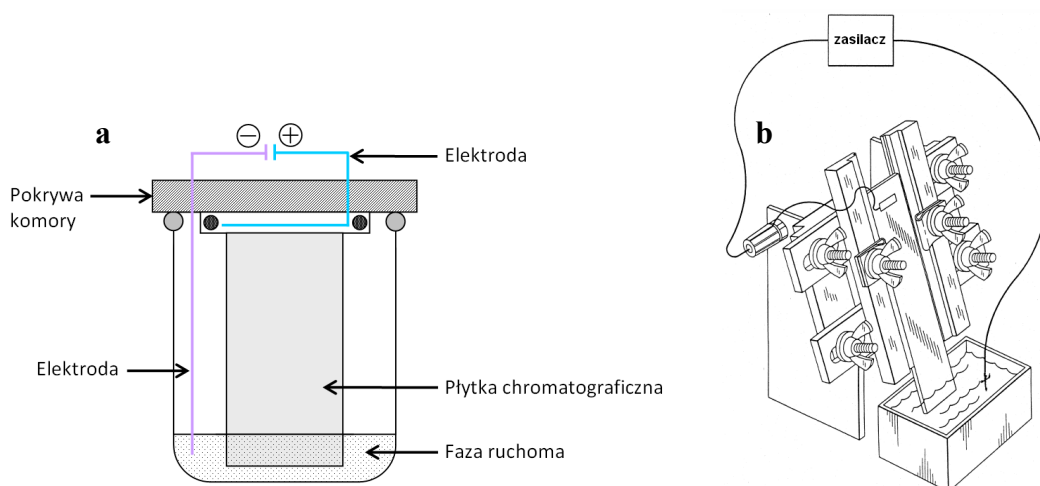
1.1.6. Elektrochromatografia planarna w układzie otwartym

W elektrochromatografii planarnej (ang. *Planar Electrochromatography*, PEC) do transportu fazy ruchomej przez złożę sorbentu płytki chromatograficznej jest wykorzystywany efekt elektroosmotyczny. Generowanie przepływu elektroosmotycznego eluentu jest realizowane poprzez umieszczenie płytki chromatograficznej w polu elektrycznym. Elektrody, do których przyłożone jest z zewnątrz stałe napięcie polaryzujące, są umiejscowione przy przeciwległych końcach płytki chromatograficznej. Fazę ruchomą stanowi mieszanina wodnych roztworów i/lub organicznych rozpuszczalników. W wyniku wytworzenia przepływu elektroosmotycznego eluentu, składniki próbki, znajdujące się w warstwie fazy stacjonarnej, migrują w kierunku zgodnym lub przeciwnym do przepływu fazy ruchomej. Dystans migracji analitów jest uzależniony od ich cząsteczkowej budowy, ładunku oraz od rodzaju fazy ruchomej i stacjonarnej. Oddziaływania międzycząsteczkowe oraz zjawiska elektrokinetyczne bezpośrednio wpływają na separację analizowanej mieszaniny. W elektrochromatografii planarnej, podobnie jak w elektrochromatografii kapilarnej, mechanizm separacji uzależniony jest od dwóch efektów: elektroforetycznego (jeżeli cząsteczki substancji są w postaci jonów) i podziału substancji pomiędzy fazę ruchomą i stacjonarną.

1.1.6.1. Rozwój metody

Pierwsze doniesienie na temat wykorzystania zjawiska elektroosmozy w chromatografii planarnej pojawiło się w roku 1974 w pracy Pretorius'a i wsp. [178]. Wyniki otrzymane przez tych autorów były obiecujące, ponieważ stwierdzono 15-krotne skrócenie czasu rozdzielania składników badanej próbki w stosunku do klasycznej techniki chromatografii cienkowarstwowej. Metodę nazwano jako „bardzo szybka chromatografia cienkowarstwowa” (ang. *High-Speed Thin Layer Chromatography*, HSTLC). Pomimo niewątpliwej zalety, skrócenia czasu analizy, metoda w tej postaci nie znalazła dużego uznania. Dopiero w 1994 roku w pracy Kaiser'a i wsp. [179] zainteresowano się ponownie chromatografią planarną w polu elektrycznym. Autorzy zaproponowali metodę, nazwaną przez nich po raz pierwszy „planarną elektrochromatografią”, w której elektrochromatogramy były rozwijane z obu naprzeciwległych stron początkowo suchej płytki – powstawały dwa fronty, tj. od strony katody i anody. Stwierdzono, że dystans migracji frontu fazy ruchomej

zależał od wartości różnicy potencjałów, przyłożonej do elektrod, oraz od strony, od której był rozwijany chromatogram. Stwierdzono, że od strony anodowej dystans migracji substancji był większy niż od strony katodowej. Migracja rozdzielanych mieszanin była również uzależniona od polarności fazy ruchomej i stacjonarnej oraz ich ruchliwości elektroforetycznej. Howard i wsp. [180,181] oraz Nurok i wsp. [182] podjęli próbę powtórzenia eksperymentów przedstawionych przez Pretoriusa. W tym celu wykorzystali komory, w których płytka chromatograficzna była ustawiona w pozycji pionowej – rys. 10.

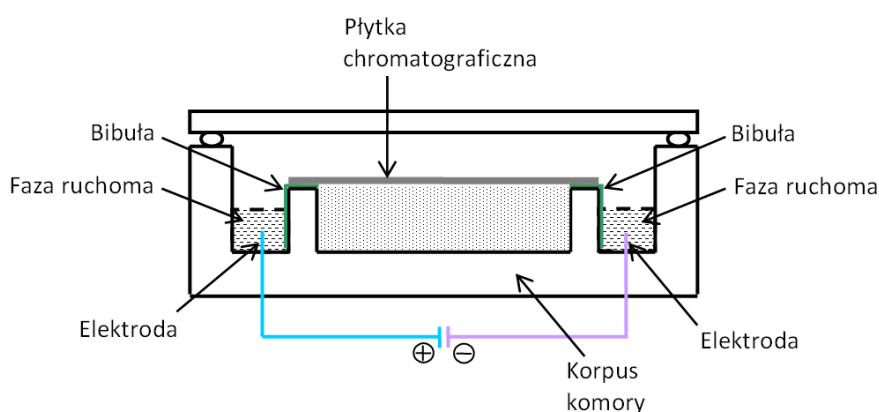


Rys. 10. Komory do elektrochromatografii planarnej, wg. Howard'a i wsp. (a) [180] oraz Nurok'a i wsp. (b) [182]

Wykazali, poza skróceniem czasu rozdzielania, wzrost sprawności układu elektrochromatograficznego 2,5 – 4,5 razy w stosunku do klasycznego układu TLC. Ponadto prędkość wędrówki poszczególnych składników mieszaniny na płycie chromatograficznej nie była stała, tzn. w początkowym etapie rozwijania szybkość migracji była znacznie większa i w trakcie procesu ulegała zmniejszeniu. Autorzy zwrócili uwagę na odparowywanie fazy ruchomej z płytki chromatograficznej, jako główny czynnik hamujący migrację substancji. Stwierdzili, że rozpuszczalniki niepolarne nie generują przepływu elektroosmotycznego, ponieważ w takim układzie nie wytwarza się podwójna warstwa elektryczna na granicy faz ciało stałe – ciecz. Główne niesprzyjające czynniki prowadzenia procesu rozdzielania to odparowanie eluentu z powierzchni fazy stacjonarnej na skutek wytwarzanego ciepła Joule'a oraz wypływanie nadmiaru rozpuszczalnika na powierzchnię warstwy adsorbentu. Nurok i wsp. prowadzili rozwijanie elektrochromatogramów w układzie odwróconych faz, wykorzystując

płytki typu RP-18. Stwierdzili, że prędkość przepływu fazy ruchomej zależy od stężenia elektrolitu w fazie ruchomej [183]. Ponadto zaobserwowali, że odpowiednie stężenie elektrolitu korzystnie wpływa na separację badanej próbki [184].

W późniejszych latach, zaproponowano zmodyfikowane wersje komór, w których ograniczono udział niektórych czynników niekorzystnie wpływających na proces separacji. W komorze Howard'a i wsp. płytka chromatograficzna była umieszczona w pozycji poziomej warstwą adsorbentu ku dołowi – w ten sposób parowanie fazy ruchomej, z warstwy adsorbentu, było zmniejszone – rys. 11. System dostarczania i odbierania fazy ruchomej realizowano za pomocą bibułki, która kontaktowała się z fazą ciekłą w zbiorniku i płytką chromatograficzną.

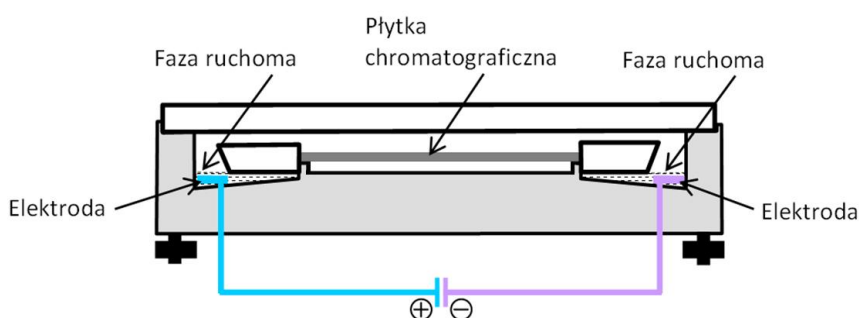


Rys. 11. Przekrój wzdłużny komory do PEC, wg. Howard'a i wsp. [181]

Stwierdzono, że warstwa złoża adsorbentu powinna być przemywana za pomocą dejonizowanej wody, gdyż obecność zanieczyszczeń powodowała znaczne wahania natężenia prądu. Potwierdzono, że prędkość migracji czoła fazy ruchomej wzrasta z przyłożoną różnicą potencjałów do elektrod. Ponadto, prędkość migracji czoła fazy ruchomej zależała od składu fazy ruchomej, np. migracja eluentu zawierającego acetonitryl była w przybliżeniu 5 – 6 razy szybsza, niż gdy zastosowano etanol. Autorzy wskazują na różnice właściwości fizykochemicznych tych rozpuszczalników, tj. stałej dielektrycznej oraz lepkości, które wpływają na ruchliwość elektroosmotyczną fazy ciekłej, zgodnie z równaniem Smoluchowskiego. Porównano rozdzielanie próbki testowej pestycydów metodą TLC i PEC. Rezultaty separacji obiema metodami były podobne, jednakże czas rozdzielania metodą PEC był 12 razy krótszy oraz efekt poszerzania stref substancji

był mniejszy. Wyniki Howerd'a i wsp. były otrzymane w normalnym układzie faz (z żelem krzemionkowym) [180,181].

W pierwszych latach XXI wieku przedstawione zostały nowe rozwiązania konstrukcyjne komór elektrochromatograficznych, w których parowanie eluentu z powierzchni płytki chromatograficznej, podczas rozdzielania, znacznie zminimalizowano [185,186]. Rozważania wzbogacono o kilka aspektów dotyczących podstaw teoretycznych procesu separacji. Zadaptowano komorę poziomą DS poprzez umieszczenie w zbiornikach z fazą ruchomą pary elektrod, zaś płytkę chromatograficzną umieszczono w komorze w pozycji warstwą adsorbentu ku dołowi – rys. 12.



Rys. 12. Przekrój wzdłużny komory poziomej DS zaadaptowanej do PEC [186]

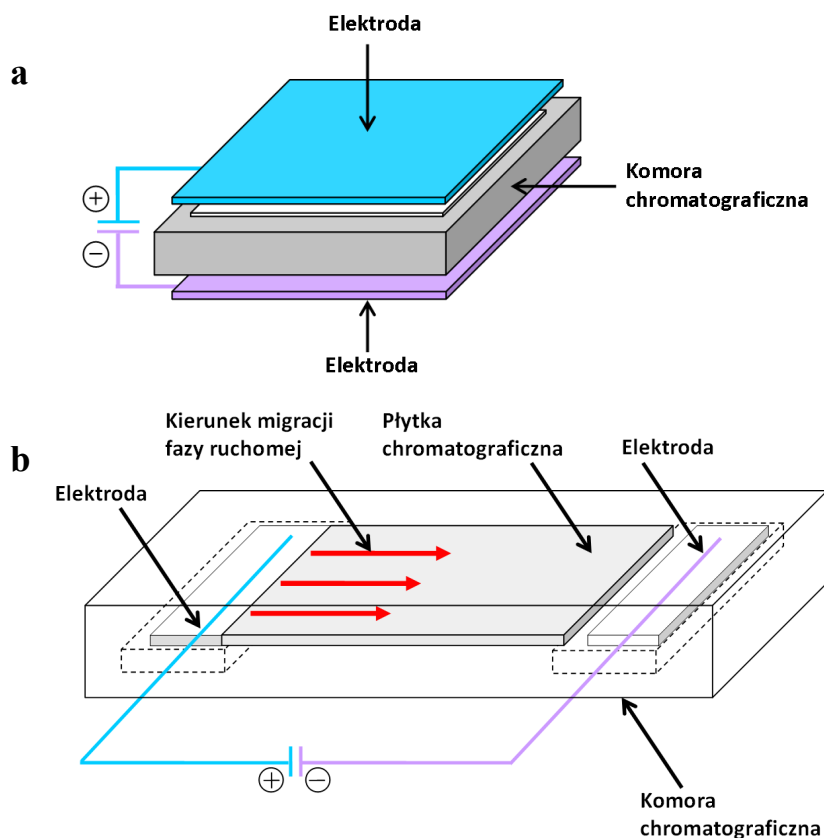
Stwierdzono, że separacja metodą PEC przebiega dwukrotnie szybciej, niż w analogicznych warunkach metodą TLC. Szybkość migracji fazy ruchomej w przybliżeniu jest proporcjonalna do różnicy potencjałów, przyłożonej do elektrod, a odparowywanie eluentu z powierzchni płytki przyspiesza przepływ fazy ruchomej. Efekt odparowywania jest wynikiem generowania ciepła Joule'a i zależy od stężenia buforu w eluencie oraz nasycenia komory parami fazy ruchomej. Parowanie składników fazy ruchomej można ograniczyć poprzez chłodzenie płytki chromatograficznej w komorze. Dzięki takiemu zabiegowi uzyskano bardziej stabilne warunki prądowe [187]. Ponadto stwierdzono, że zwilżenie płytki chromatograficznej fazą ruchomą przed chromatografowaniem wpływa korzystnie na separację składników badanej próbki. Najważniejszą zaletą tej metody był wzrost sprawności w stosunku do metody TLC, tj. 2 – 4 razy większa liczba pól teoretycznych [187].

Elektrochromatografia planarna w układzie otwartym okazała się być interesującą metodą chromatograficzną. Jednak niekorzystne efekty nie pozwalały

na szersze zastosowanie jej w praktyce laboratoryjnej. Zebrane doświadczenia zaowocowały rozwiązaniami konstrukcyjnymi komór do elektrochromatografii planarnej w układzie zamkniętym.

1.1.6.2. Chromatografia planarna w zewnętrznym polu elektrycznym

Ciekawa metoda prowadzenia elektrochromatografii planarnej, z początkowo suchą warstwą adsorbentu na płytce, została przedstawiona przez Malinowską i wsp. [188,189,190,191]. W badaniach tych zastosowano komercyjnie dostępne komory poziome, w których umieszczono parę elektrod, w taki sposób, że kierunek linii sił pola elektrycznego był równoległy lub prostopadły do kierunku migracji eluentu (rys.13). W układzie, w którym kierunek linii sił pola elektrycznego był skierowany prostopadłe do kierunku rozwijania chromatogramu efekt elektroosmotyczny nie występował oraz efekt związany wydzielaniem ciepła Joule'a również był nieobecny. Kiedy linie pola elektrycznego były równoległe do warstwy adsorbentu i kierunku migracji fazy ruchomej, zaobserwowano zróżnicowany kształt pików na chromatogramie. W zależności od położenia przestrzeni katodowej i anodowej, oraz słabszego lub silniejszego pola elektrycznego, efekty zmiany symetrii pików były zróżnicowane dla różnych substancji. Pole elektryczne miało większy wpływ na kształt pików, gdy rozdzielane substancje charakteryzowały się niską retencją. Dodatkowo stwierdzono, że pole elektryczne wpływa na dystans migracji chromatografowanych substancji oraz czas procesu na określonym wcześniej dystansie rozwijania. Wymienione wcześniej zmiany są zależne od fazy ruchomej, np. 10 cm dystans migracji czoła fazy ruchomej heptan – tetrachlorek węgla w polu elektrycznym, w kierunku przestrzeni anodowej, zarówno na żelu krzemionkowym jak i tlenku glinu, był krótszy niż w tym samym układzie, ale bez udziału pola elektrycznego. Ten efekt wpływu pola elektrycznego był większy dla aktywnych składników fazy ruchomej. Takie zjawisko było obserwowane również w kapilarnej elektrochromatografii [192].



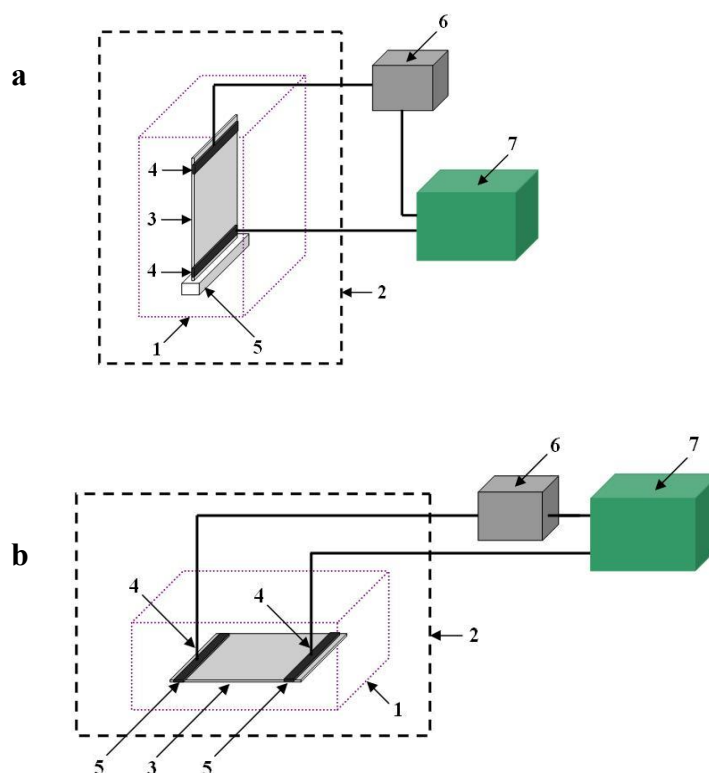
Rys. 13. Schemat komory poziomej w polu elektrycznym, w którym linie sił pola skierowane są pionowo (a) i równoległe (b) do kierunku rozwijania chromatogramu

Stwierdzono, że w układzie elektrochromatograficznym, w którym linie sił pola były skierowane prostopadle do powierzchni warstwy fazy stacjonarnej, generowane pole elektryczne miało wpływ na migrację czoła fazy ruchomej nawet, gdy faza ruchoma składała się z niepolarnych rozpuszczalników organicznych [189,190]. Takie zjawisko zostało zinterpretowane wpływem pola elektrycznego na wolną energię powierzchniową adsorbentu (ang. *Free Surface Energy*, FSE) [193].

1.1.7. Elektrochromatografia planarna

Elektrochromatografia planarna w układzie zamkniętym (inaczej elektrochromatografia planarna ciśnieniowa, ang. *Pressurized Planar Electrochromatography*, PPEC) to metoda chromatografii planarnej, w której faza ruchoma migruje w przestrzeni międzyziarnowej fazy stacjonarnej dzięki zjawisku elektroosmozy, przy wyeliminowaniu obecności fazy gazowej. Układ rozdzielczy jest odseparowany od otoczenia pokrywą, która dociskana jest do warstwy

adsorbentu płytki chromatograficznej. Takie warunki pozwalają na wyeliminowanie lub zminimalizowanie niekorzystnych czynników, znanych z TLC i PEC, które są związane z odparowywaniem fazy ruchomej z płytki chromatograficznej, demiksją i preadsorpcją par. PPEC jest następstwem rozwoju elektrochromatografii planarnej w układzie otwartym. Zasadniczą różnicą pomiędzy tymi metodami jest wyeliminowanie obecności fazy gazowej w układzie PPEC.



Rys. 14. Uproszczony schemat zestawu do rozwijania elektrochromatogramów planarnych w układzie zamkniętym z płytką chromatograficzną ustawioną w pozycji pionowej (a) i poziomej (b); komora do PPEC (1), kabina zabezpieczająca (2), płytkę chromatograficzną (3), elektroda (4), zbiornik fazy ruchomej (5), amperomierz (6), zasilacz wysokonapięciowy (7)

W elektrochromatografii planarnej proces separacji badanej próbki substancji prowadzi się w komorach zaopatrzonych w parę elektrod, do których podłączony jest zasilacz wysokonapięciowy, wytwarzający pole elektryczne w obszarze płytki chromatograficznej. W literaturze znane są dwa warianty komór, w których położenie płytki chromatograficznej w komorze jest w pozycji pionowej lub poziomej – rys. 14.

1.1.7.1. Rozwój metody

Pierwsze badania nad elektrochromatografią planarną w układzie zamkniętym zostały przeprowadzone przez Nurok'a i wsp. [194]. Zaproponowana przez autorów konstrukcja komory posiadała płytkę chromatograficzną ustawioną w pozycji pionowej – rys. 15. Do warstwy adsorbentu płytki chromatograficznej była dociśnięta folia plastikowa. Dolny brzeg płytki był zanurzony w roztworze buforowym w zbiorniku z anodą, a górny był zaopatrzony w katodę (płytkę platynową dociśniętą do warstwy adsorbentu, przykrytej paskiem bibuły). Dzięki takiej konstrukcji, odparowywanie fazy ruchomej podczas procesu separacji było znacznie ograniczone, ale niecałkowicie wyeliminowane – część płytki chromatograficznej wystawała na zewnątrz obszaru zamkniętego.

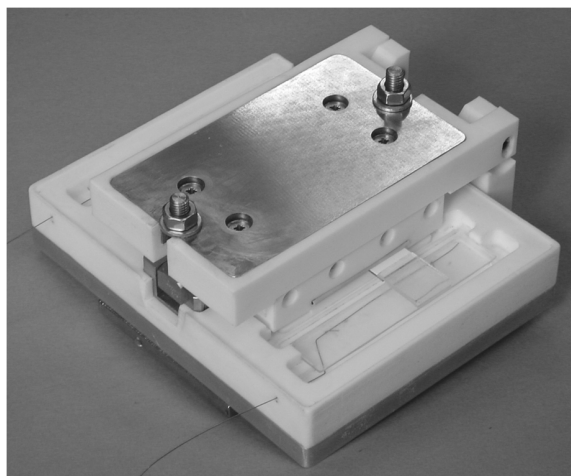


Rys. 15. Doświadczalna aparatura do PPEC wg Nurok'a i wsp. [194]

Wstępne rezultaty badań zostały przedstawione przez autorów w pracach [194,195], z których wynika, że metodą PPEC można przeprowadzić proces rozdzielania w znacznie krótszym czasie niż metodą TLC. Układ separacyjny charakteryzuje się znacznie większą sprawnością od układu TLC i pozwala na osiągnięcie większej powtarzalności wartości dystansów migracji stref substancji niż metodą PEC. Stwierdzono, że, kształt i rozmiary ziaren sorbentu wpływają na sprawność układu separacyjnego. Zwrócono uwagę na wielkość docisku folii plastikowej do warstwy adsorbentu płytki chromatograficznej oraz inne czynniki, wpływające na rozdzielenie mieszaniny substancji, m.in. temperaturę aktywacji warstwy adsorbentu.

Praktycznie równolegle, badania nad PPEC zostały zaprezentowane przez nasz zespół [196]. Jedną z tych prac dotyczyła konstrukcji komory, która opierała się na zaadaptowaniu poziomej komory DS do chromatografii planarnej,

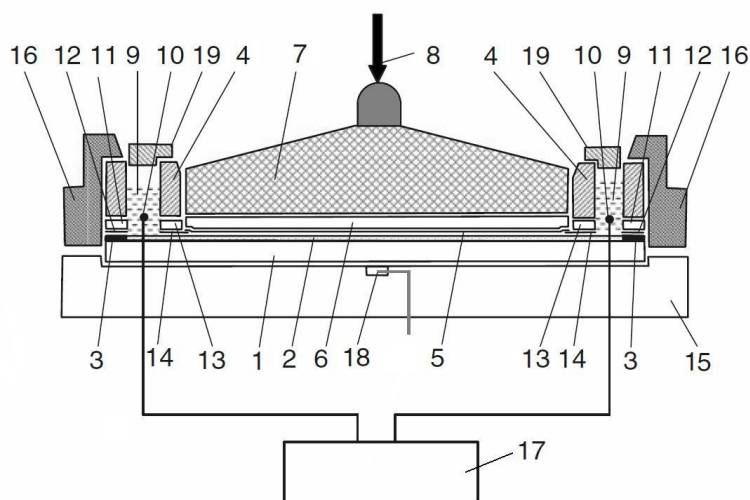
którą zaopatrzone w pokrywę dociskającą płytkę chromatograficzną, rys.16. Kontakt płytki z fazą ruchomą zapewniały dystrybutory szklane, pod którymi znajdowały się elektrody zanurzone w roztworze fazy ruchomej. W trakcie szeregu eksperymentów stwierdzono, że czas równoważenia płytki chromatograficznej fazą ruchomą wpływa na dystans migracji, kształt plamek i powtarzalność eksperymentów. Ponadto zbyt wysoka wartość napięcia polaryzującego, przyłożonego do elektrod, sprzyjała bardziej intensywnemu wydzielaniu się na powierzchni elektrod gazowych produktów. W 2005 roku został skonstruowana komora do PPEC, której płytkę chromatograficzną była całkowicie odseparowana od fazy gazowej. Budowa prototypu zapewniała m.in. pomiar prędkości przepływu fazy ruchomej w trakcie procesu separacji. Prace, które dotyczą tej wersji komory są przedmiotem niniejszej dysertacji i są omówione oddzielnie w dalszej jej części [197,198,199,200].



Rys.16. Fotografia komory do PPEC wg. Dzido i wsp. [196]

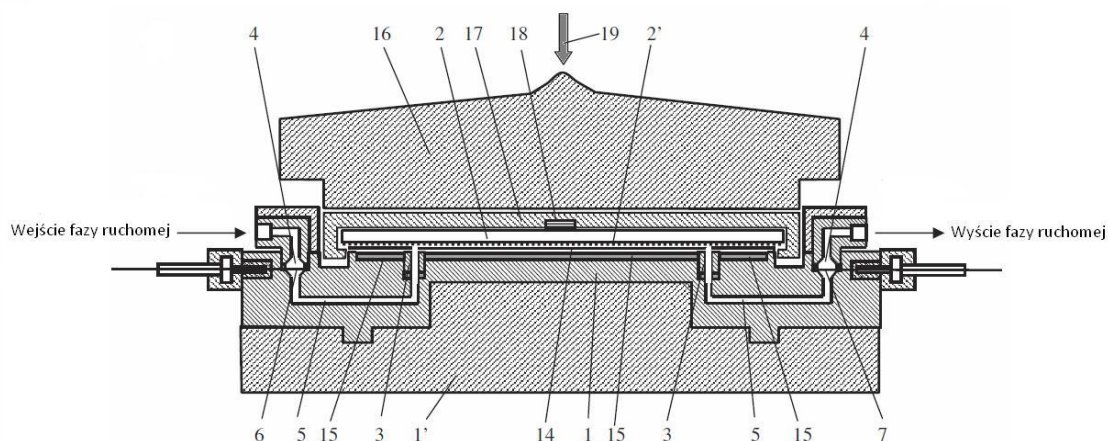
W kolejnych latach badań, konstrukcja komory została zmodyfikowana pod kątem wygodniejszej obsługi oraz rozwijania elektrochromatogramów na płytkach o różnych wymiarach. Na rys. 17 przedstawiony jest schemat komory do PPEC na płytki o wymiarach 5x10 cm. W tej wersji prototypu, docisk pokrywy komory do płytki chromatograficznej jest realizowany z użyciem siłownika hydraulicznego. Komora została zaopatrzona w układ umożliwiający separację kilku próbek jednocześnie [201]. W późniejszym okresie, komorę wyposażono w element termostatujący (chłodzący) płytkę chromatograficzną. Zabieg ten pozwolił prowadzić proces separacji w stabilnych warunkach zwłaszcza w układzie,

w którym wydziela się znaczna porcja ciepła Joule'a [202]. Najnowszy prototyp komory został wyposażony w system dozowania sześciu substancji jednocześnie w strumień przepływającej fazy ruchomej [203].

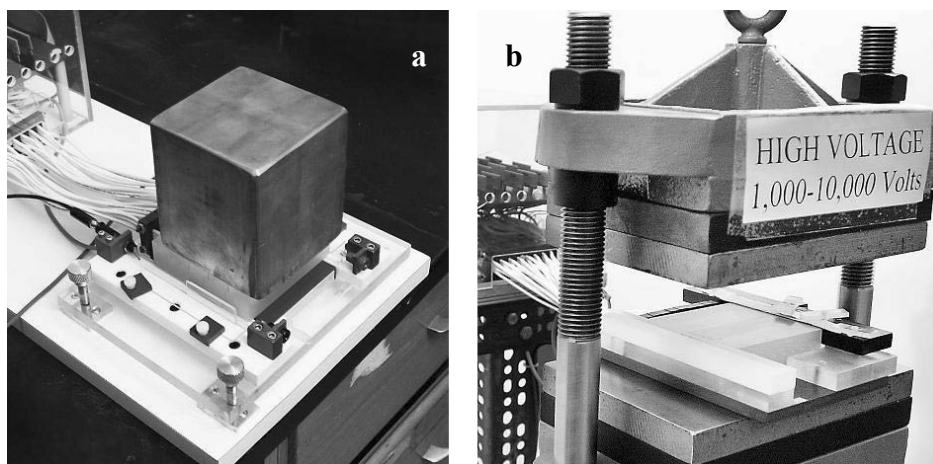


Rys. 17. Schemat komory do PPEC; płytka chromatograficzna (1), warstwa adsorbentu (2), margines silikonowy w warstwie adsorbentu (3), przegroda (4), folia teflonowa (5), uszczelka silikonowa (6), pokrywa (7), docisk (8), zbiornik elektrodowy (9), elektroda (10), uszczelka silikonowa (11), folia teflonowa (12), uszczelka silikonowa (13), folia teflonowa (14), podstawa komory (15), korpus (16), zasilacz wysokonapięciowy (17), czujnik temperatury (18), pokrywa przestrzeni elektrodowej (19) [201]

W 2009 roku zaprezentowano dwuwymiarowy proces rozdzielania w układzie sprzężonym HPTLC – PPEC na płytkach o wymiarach 5x20 cm [204]. Pierwszy etap separacji mieszaniny barwników był przeprowadzony metodą wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej w poprzek płytki chromatograficznej (5 cm) w komorze do TLC. W drugim, proces elektrochromatografii był prowadzony wzdłuż dłuższej krawędzi płytki (20 cm). Konstrukcja komory do PPEC została przystosowana do płytek o żądanych wymiarach oraz udoskonalono m.in. system wprowadzania/usuwania płytki chromatograficznej z aparatu – rys. 18.



Rys. 18. Schemat komory do PPEC wg. Dzido i wsp. Podstawa komory (1), teflonowa podstawa komory (1'), płytka chromatograficzna (2), warstwa adsorbentu, korytka (3), przestrzeń elektrodowa (4), kanał fazy ruchomej (5), anoda (6), katoda (7), folia teflonowa (14), uszczelka silikonowa (15), pokrywa (16), wkładka na płytkę chromatograficzną (17), czujnik temperatury (18), kierunek docisku siłownika hydraulicznego (19) [204]



Rys. 19. Fotografia komory do ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej wg Tate i Dorsey'a, wersja niskociśnieniowa (z lewej) i wysokociśnieniowa (z prawej) [205,206]

W pracy autorstwa Tate'a i Dorsey'a zostało przedstawione urządzenie, w którym zwilżona fazą ruchomą płytka chromatograficzna była umieszczona w podstawie komory i dociskana, poprzez folię teflonową, metalowym klockiem, który wywierał na płytkę chromatograficzną ciśnienie 1 bara [205] – rys. 19a.

W późniejszej wersji komory do wywierania ciśnienia na warstwę adsorbentu płytki chromatograficznej zastosowano siłownik hydrauliczny [206] – rys. 19b. Autorzy wskazują, że ustalanie równowagi, warstwa złoża - roztwór fazy ruchomej, jest decydującym czynnikiem otrzymania stabilnych warunków prowadzenia procesu rozdzielania metodą elektrochromatografii planarnej.

Metoda PPEC jest w trakcie rozwoju. Dotyczy to zarówno konstrukcji komór do elektrochromatografii planarnej jak i opisu teoretycznego. Obecna wiedza na temat tej metody nie pozwala na dokładne scharakteryzowanie wszystkich czynników wpływających na efektywność rozdzielania. Jednak część zależności jest poznana i zostanie przedstawiona w sekcji 1.4.2.

1.2. Podstawowe parametry chromatograficzne

1.2.1. Retencja

W chromatografii kolumnowej retencja eluowanych stref substancji jest często przedstawiana w postaci ich czasu retencji – tj. czasu mierzonego od momentu wprowadzenia analitu do układu chromatograficznego do momentu osiągnięcia wartości jego maksymalnego stężenia przy wyjściu z kolumny chromatograficznej. Innym parametrem retencji jest objętość retencji. Termodynamiczną miarą retencji substancji w określonym układzie chromatograficznym jest współczynnik retencji, k :

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (4)$$

gdzie t_r jest czasem retencji, t_0 jest czasem wymywania z kolumny substancji nie zatrzymywanej.

Podstawowym parametrem retencyjnym w chromatografii cienkowarstwowej jest współczynnik opóźnienia, R_F – stosunek dystansu migracji substancji w warstwie złoża adsorbentu do dystansu migracji fazy ruchomej. Wartość R_F waha się w granicach od 0 do 1 (może być też wyrażona jako $R_F \cdot 100$, wtedy $0 \leq R_F \leq 100$). Parametr R_F można też opisać jako ułamek cząsteczek substancji w fazie ruchomej:

$$R_F = \frac{t_m}{t_m + t_s} = \frac{1}{1+k} \quad (5)$$

gdzie t_s i t_m to odpowiednio czas jaki spędza cząsteczka substancji badanej w fazie stacjonarnej i ruchomej.

Wyznaczanie wartości współczynnika opóźnienia, na podstawie wartości współczynnika retencji, prowadzi często do niedokładnego wyniku i jest rzadko stosowane. Praktyczne zastosowanie znalazło przewidywanie retencji w układach kolumnowych, np. HPLC, na podstawie danych chromatografii cienkowarstwowej [207,208]. Tę operację wykonuje się przez bezpośrednie porównanie retencji układów kolumnowych i cienkowarstwowych. Przewidywane wartości retencji substancji są jednak orientacyjne, ponieważ występują różnice pomiędzy układami chromatografii kolumnowej i cienkowarstwowej.

1.2.2. Selektywność

Pojęcie selektywności układu chromatograficznego może dotyczyć dwóch rozdzielanych substancji jak i całej grupy związków chemicznych. Gdy jest podane określenie „wysoka selektywność”, to świadczy, że strefy rozdzielanych substancji są znacznie rozsunięte i należy oczekiwać dobrego rozdzielania mieszaniny analitów. Wielkością charakteryzującą selektywność jest współczynnik rozdzielania, α , który jest definiowany jako stosunek współczynników retencji dwóch rozpatrywanych stref substancji:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (6)$$

Przy czym wartość współczynnika rozdzielania $\alpha \geq 1$. Wartość współczynnika rozdzielania daje pogląd o zróżnicowaniu oddziaływań międzycząsteczkowych tych substancji z fazą stacjonarną i fazą ruchomą.

1.2.3. Sprawność

Sprawność układu chromatograficznego jest wyrażana liczbą pólek teoretycznych (N) bądź tzw. wartością wysokości równoważnej półce teoretycznej, potocznie: „wysokością półki”, H . Poglądowo wysokość półki teoretycznej można zdefiniować jako teoretyczną długość wypełnienia kolumny, w której ustala się stan równowagi stężenia substancji w fazie stacjonarnej i w fazie ruchomej. Ze względu

na określoną dynamikę rozdzielania, do stanu równowagi nigdy nie dochodzi. W publikacjach można znaleźć szereg teorii i zależności, wg których można określić sprawność kolumny chromatograficznej, uwzględniając wielkość ziaren, strukturę wypełnienia, kinetykę dyfuzji, opory przenoszenia masy, prędkość i profil przepływu cieczy, kinetykę zjawisk sorpcji – desorpcji itp. W praktyce, dla pików o kształcie bardzo zbliżonym do krzywej Gaussa, liczbę pólk teoretycznych można łatwo obliczyć z chromatogramu, korzystając z zależności równoważnych:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2 \quad (7)$$

$$N = 5,545 \left(\frac{t_r}{w_{0,5}} \right)^2 \quad (8)$$

gdzie t_r - odległość retencji zmierzona na chromatogramie, odpowiadająca czasowi od momentu wprowadzenia substancji do kolumny do pojawienia się maksimum piku (czas retencji), w_b - szerokość piku przy podstawie, wyrażona za pomocą tej samej jednostki, co czas retencji, $w_{0,5}$ - szerokość piku w połowie wysokości, wyrażona za pomocą tej samej jednostki, co czas retencji.

Wysokość półki teoretycznej wyznacza się z zależności w postaci:

$$H = \frac{L}{N} \quad (9)$$

gdzie L to długość kolumny, H wysokość półki. Wartość wysokości półki teoretycznej najczęściej podaje się w mikrometrach. Wyżej przedstawione zależności, liczby pólk teoretycznych i wysokości półki teoretycznej, odnoszą się do kolumnowych technik chromatograficznych. W planarnych technikach wartości N i H wyznacza się w podobny sposób:

$$N = 16 \left(\frac{Z_s}{w_b} \right)^2 \quad (10)$$

$$N = 5,545 \left(\frac{Z_s}{w_{0,5}} \right)^2 \quad (11)$$

$$H = \frac{Z_s}{N} \quad (12)$$

gdzie Z_s – dystans migracji substancji.

1.3. Czynniki wpływające na rozdzielczość w chromatografii TLC i HPLC

Efektywność rozdzielenia analizowanej mieszaniny substancji zależy od parametrów fizykochemicznych, określających warunki prowadzenia procesu separacji. Aby uzyskać właściwą rozdzielczość, R_s , należy przeprowadzić analizę czynników (parametrów) wpływających na jej wartość. Dla wszystkich układów chromatograficznych rozdzielczość może być przedstawiona w postaci funkcji następujących wielkości: retencji, selektywności i sprawności układu chromatograficznego. Poniższe równanie Purnell'a przedstawia tę zależność:

$$R_s = 0,25 \cdot \sqrt{N} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) - \quad (13)$$

dla chromatografii kolumnowej, gdzie N – liczba pól teoretycznych, α – współczynnik rozdzielenia, k – współczynnik retencji.

Dla chromatografii cienkowarstwowej równanie to zostało zmodyfikowane przez Syndera [209] do postaci:

$$R_s = 0,25 \cdot \sqrt{\bar{R}_F \cdot N} \cdot (1 - \bar{R}_F) \cdot \left(\frac{k_2}{k_1} - 1 \right) \quad (14)$$

Ponadto równanie Purnell'a umożliwia sformułowanie ważnych wniosków, dotyczących optymalizacji warunków rozdzielania substancji z zastosowaniem eluentu o stałym składzie (warunki izokratyczne), a także umożliwia ich „półilościowe” uogólnienie dla warunków elucji gradientowej.

1.3.1. Wybór optymalnych warunków prowadzenia procesu separacji metodą chromatografii ciekowej kolumnowej i cienkowarstwowej

Aby uzyskać rozdzielenie o wysokiej efektywności, chromatografista musi brać pod uwagę wiele czynników, związanych bezpośrednio, bądź pośrednio, z właściwościami układu chromatograficznego. Czynniki te można podzielić na co najmniej trzy grupy, tj. związane z przygotowaniem próbki, rozdzielaniem chromatograficznym i kosztami separacji. Grupą czynników tematycznie związaną z przedmiotem niniejszej dysertacji jest uzyskiwanie odpowiedniego rozdzielenia mieszanin substancji. Zatem wpływ parametrów, takich jak selektywność, retencja i sprawność układu na ten aspekt procesu chromatograficznego jest poniżej przedstawiony.

1.3.1.1. Optymalizacja warunków prowadzenia procesu rozdzielania w HPLC

Przedmiotem optymalizacji może być pełny proces analityczny lub tylko wybrane etapy tego procesu. W procesie optymalizacji rozpatruje się określoną cechę procedury analitycznej np.: czułość, precyzję, dokładność, rozdzielczość, stosunek sygnału do szumu. Możliwa jest również optymalizacja z uwzględnieniem kilku cech równocześnie. W chromatografii ciekłowej wielkościami takimi mogą być np.: skład jakościowy i ilościowy fazy ruchomej, siła elucyjna, szybkość przepływu fazy ruchomej, temperatura pracy kolumny itp. Najczęściej, optymalizacja ma na celu znalezienie takich warunków prowadzenia procesu, by rozdzielaną mieszaninę można byłoby scharakteryzować pod względem jakościowym i/lub ilościowym. W chromatografii HPLC przebieg optymalizacji rozdzielania można podzielić na trzy etapy. Pierwszym jest uzyskanie jak najkrótszego czasu retencji przy satysfakcjonującym wstępnym rozdzieleniu i zachowaniu wartości współczynnika retencji w zakresie 1 – 10. W tym celu wybiera się wypełnienie kolumny i skład fazy ruchomej tak, aby uzyskać odpowiedni normalny lub odwrócony układ faz. Wyboru składu fazy ruchomej dokonuje się poprzez zastosowanie czystych rozpuszczalników, od małej do dużej mocy elucyjnej, korzystając z trójkąta selektywności rozpuszczalników wg Snyder'a. Ta klasyfikacja opiera się na możliwych różnych oddziaływaniach polarnych, charakteryzujących rozpuszczalnik pod względem właściwości kwasowych, zasadowych lub dipolarnych.

Drugim etapem jest uzyskanie zmiany rozdzielczości układu poprzez zmianę selektywności. Najczęściej poprawę selektywności można uzyskać dzięki zmianie stężenia rozpuszczalnika i/lub poprzez dodanie innego rozpuszczalnika, ewentualnie innych składników – modyfikatorów. W pierwszym przypadku, możliwe zmiany selektywności są ograniczone, jeżeli rozdzielana mieszanina zawiera substancje o podobnych właściwościach. Natomiast, gdy rozdzielane substancje różnią się takimi właściwościami jak liczbą, rozmieszczeniem i rodzajem grup funkcyjnych, zdolnością do oddziaływań dyspersyjnych, wiązania wodorowego itp., wtedy może dochodzić do znaczących zmian selektywności ze zmianą stężenia eluentu. W drugim przypadku, kiedy wprowadza się dodatkowy składnik do fazy ruchomej, selektywność może ulec dużej zmianie, łącznie ze zmianą kolejności elucji

poszczególnych składników rozdzielanej próbki. Silniejszy efekt zmiany selektywności jest bardziej widoczny, gdy dodana substancja charakteryzuje się inną zdolnością do oddziaływań międzycząsteczkowych w fazie ruchomej. Jednakże, gdy rozdzielenie składników mieszaniny nie jest pełne, można zastosować układy trójskładnikowe, w których zmiana składu ilościowego prowadzi do płynnej zmiany retencji i selektywności. W wielu takich przypadkach pojawiają się trudności w wyjaśnieniu zmian selektywności. W literaturze znane są sposoby zmiany selektywności rozdzielania w układach chromatograficznych [210,211,212,213].

W trzecim etapie, po osiągnięciu warunków zapewniających odpowiednią retencję i wysoką selektywność, dalsza optymalizacja warunków rozdzielania jest realizowana poprzez dobór optymalnej prędkości przepływu fazy ruchomej. Zazwyczaj wystarczą trzy etapy, aby osiągnąć wysoką efektywność rozdzielania. W uzasadnionych przypadkach optymalizuje się temperaturę kolumny. Należy jednak pamiętać, że wysoka temperatura nie jest wskazana ze względu na możliwość uszkodzenia fazy stacjonarnej – żel krzemionkowy i modyfikowane żele krzemionkowe w podwyższonej temperaturze ulegają degradacji.

Pomocne w optymalizacji rozdzielania są wielkości charakteryzujące właściwości czystych rozpuszczalników (faz ruchomych) np. stała dielektryczna, współczynnik załamania światła. Jednak wielkości te nie pozwalają w pełni przewidywać zachowania substancji w układzie chromatograficznym. Dużą rolę w optymalizacji selektywności odgrywa parametr rozpuszczalności Hildebranda [214,215]. Znaczący wkład do optymalizacji selektywności wnoszą korelacje parametrów retencji z wielkościami charakteryzującymi właściwości substancji, związane z ich strukturą cząsteczkową, QSRR (ang. *Quantitative Structure – Activity Relationship*) [216]. Innym sposobem optymalizacji jest wykorzystanie zależności związanej z liniowymi zmianami energii solwatacji, LSER (ang. *Linear Solvation Energy Relationship*) przy wykorzystaniu parametrów opisujących zdolności substancji rozdzielanych do oddziaływań międzycząsteczkowych, uzyskanych w wyniku pomiarów spektroskopowych [217]. Podobna metodyka została zastosowana w badaniach liniowych zależności energii swobodnej, LFER (ang. *Linear Free Energy Relationship*), w której parametry charakteryzujące substancje, zdolne do różnych rodzajów oddziaływań cząsteczkowych, zostały wyznaczone na podstawie pomiarów układów równowagowych [218,219] lub obliczeń numerycznych [220].

Inną metodą optymalizacji rozdzielania jest wykorzystanie dostępnego na rynku oprogramowania komputerowego, które pozwala przewidzieć retencję, rozdzielczość oraz dobrać optymalne warunki analizy. Najpopularniejsze programy to ChromSword (Merck, Darmstadt, Niemcy) i DryLab (LC Resources, Walnut Creek, Kalifornia, USA). Inne znane produkty to ICOS (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornia, USA), Turbo LC Plus (PerkinElmer, Norwalk, Connecticut, USA), EluEx (CompuDrug, Budapeszt, Węgry), ACD/LC Simulator (Advanced Chemistry Development, Toronto, Kanada). Współczesne programy do optymalizacji warunków rozdzielania umożliwiają ustalenie składu fazy ruchomej, wyboru pomiędzy elucją izokratyczną i gradientową, ale również pH, stężenia dodatków do fazy ruchomej, wartości siły jonowej, temperatury kolumny [221,222,223]. Symulacja komputerowa umożliwia, między innymi, także dobór wymiarów kolumny chromatograficznej, wielkości cząstek wypełnienia kolumny oraz prędkości przepływu fazy ruchomej [224,225].

1.3.1.2. Wybór warunków prowadzenia procesu chromatografii cienkowarstwowej

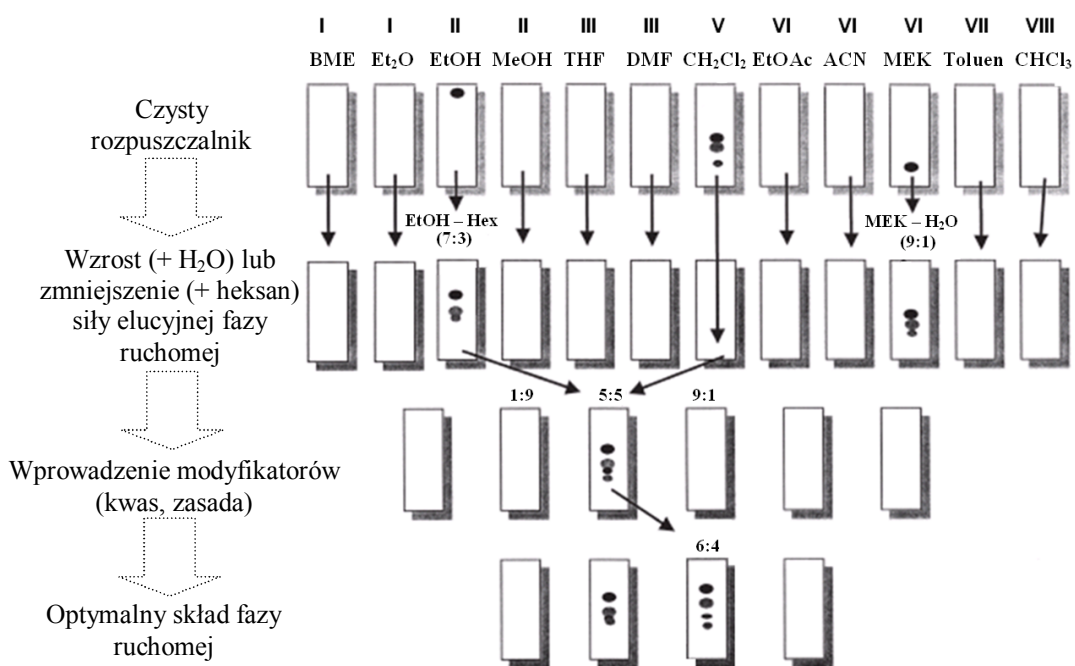
Optymalizacja rozdzielania metodą TLC jest problemem bardzo złożonym, ponieważ liczba czynników wpływająca na efektywność rozdzielania jest stosunkowo duża. Najważniejsze elementy optymalizacji warunków rozdzielania w tych układach to rodzaj fazy stacjonarnej, skład fazy ruchomej, czas rozwijania chromatogramu. Inne czynniki wpływające na rozdzielanie to temperatura, względna wilgotność sorbentu, stopień nasycenia przestrzeni komory parami rozpuszczalnika, dystans rozwijania chromatogramu. W praktyce laboratoryjnej temperatura nie jest czynnikiem wykorzystywanym do optymalizacji rozdzielania, ponieważ w większości przypadków zmiana temperatury pokojowej nie ma znacznego wpływu na czas analizy, retencję i selektywność. Jednakże, w literaturze można znaleźć nieliczne przykłady jej wykorzystania do modyfikacji retencji w układach TLC [226,227]. Innym parametrem jest względna wilgotność atmosfery w komorze chromatograficznej. Kontrolowanie tego parametru umożliwia uzyskiwanie bardzo powtarzalnych wartości retencji stref substancji szczególnie dla układów normalnych. W zwykłych komorach ten parametr nie jest kontrolowany, lecz w zaawansowanych, automatycznych komorach, tak. Ważnym parametrem rozpuszczalników, które mają być stosowane jako eluenty, jest ich lepkość.

W TLC ten parametr ma zasadniczy wpływ na szybkość migracji czoła fazy ruchomej. Eluent o wysokiej wartości lepkości wywołuje powolny przepływ fazy ruchomej wzdłuż płytki chromatograficznej. Podczas optymalizacji warunków prowadzenia procesu TLC należy pamiętać, aby przestrzeń komory była nasycona parami składników fazy ruchomej, w celu uniknięcia efektu „demiksji”. Szybkość adsorpcji par w warstwie adsorbentu zależy od wielu czynników, m.in. rodzaju cieczy, rodzaju i grubości warstwy adsorbentu na płytce chromatograficznej, od pierwotnego nasycenia atmosfery w komorze i innych. Niekorzystną właściwością przepływu fazy ruchomej w chromatografii cienkowarstwowej jest jej malejąca prędkość migracji, u_f , wraz ze wzrostem dystansu migracji czoła eluentu wzdłuż płytki chromatograficznej, zgodnie z równaniem:

$$u_f = \frac{i}{2 \cdot z_f} \quad (15)$$

gdzie i – stała. Ta niedogodność jest podstawową wadą chromatografii cienkowarstwowej, ponieważ uniemożliwia regulację prędkości przepływu eluentu tak, aby uzyskać jak najwyższą sprawność układu. Z przeprowadzonych badań wynika, że najwyższą sprawność uzyskuje się w wąskim zakresie dystansu migracji czoła fazy ruchomej, w zależności od parametrów fazy stacjonarnej, tj. średnicy i porowatości ziarna adsorbentu, grubości warstwy adsorbentu na płytce itp. Ograniczenie to nie pozwala na rozwijanie chromatogramów cienkowarstwowych na dużych dystansach migracji czoła fazy ruchomej, gdyż sprawność jest wtedy niska. Z drugiej zaś strony, krótki dystans rozwijania nie pozwala na pełne rozdzielanie próbki wieloskładnikowej o podobnej retencji składników.

Ogólny schemat procesu wybierania optymalnego składu fazy ruchomej można przeprowadzić w kilku etapach – rys. 20. W pierwszym stosuje się czysty rozpuszczalnik jako eluent. W drugim etapie, jeżeli rozdzielanie badanych substancji nie jest zadawalające, do czystego rozpuszczalnika dodaje się inny, mieszający się z nim składnik, aby zwiększyć lub zmniejszyć jego siłę elucyjną. Jeżeli nadal rozdzielanie składników próbki jest niedostateczne, dodaje się substancji modyfikującej np. kwasu lub zasady – etap trzeci.



Rys. 20. Ogólny schemat postępowania przy wyborze fazy ruchomej w TLC [228]

Intuicyjne podejście do wyboru eluentu, w celu uzyskania optymalnych warunków rozwijania chromatogramu, można zastosować tylko w stosunku do separacji prostych mieszanin, składających się z niewielu komponentów. W innych przypadkach należy zastosować się do znanych w literaturze metod optymalizacji m.in. „Window diagrams” [229,230], metody „Prisma” [231,232,233], „Overlapping Resolution Map Scheme” [234,235] lub taksonomii numerycznej [236,237].

1.4. Elektrochromatografia jako wysokosprawna metoda rozdzielania substancji

1.4.1. Elektrochromatografia kapilarna

Elektrochromatografia kapilarna charakteryzuje się bardzo wysoką sprawnością kinetyczną. Wysoka sprawność w układach elektrochromatograficznych jest wynikiem płaskiego profilu przepływu elektroosmotycznego fazy ruchomej przez kapilary złoża fazy stacjonarnej. Zgodnie z równaniem van Deemetera prędkość przepływu bezpośrednio wpływa na sprawność układu chromatograficznego. Dlatego też ten parametr jest głównym czynnikiem, od którego zależy separacja badanej próbki. Prędkość przepływu elektroosmotycznego zależy od wielu czynników, a zależności pomiędzy tymi

czynnikami są bardzo złożone. Efektywność separacji badanych próbek wymaga doboru odpowiednich warunków rozdzielania, m.in. rodzaju buforu, jego stężenia i pH, różnorodnych dodatków chemicznych np. modyfikatorów organicznych fazy ruchomej, substancji zmieniających charakter chemiczny ścianek kapilary i/lub jej wypełnia, rodzaju i stężenia substancji powierzchniowo czynnej i innych.

1.4.1.1. Polaryzacja elektrod

W elektrochromatografii kapilarnej najczęściej przepływ elektroosmotyczny jest skierowany od anody do katody, jeżeli materiałem kapilary jest szkło lub kwarc, a wypełnieniem faza stacjonarna otrzymana na bazie krzemionki. Kierunek przepływu w pewnych warunkach może być odwrócony tzn. od katody ku anodzie. Te ostatnie układy otrzymano dla kapilar, wypełnionych chemicznie modyfikowaną krzemionką, do powierzchni której zostały przyłączone grupy funkcyjne nadające jej znak ładunku przeciwny niż znak ładunku czystej krzemionki. Odwrócony kierunek przepływu fazy ruchomej stosuje się, gdy anality wykazują ujemny ładunek.

1.4.1.2. Napięcie polaryzujące

Najdogodniejszym sposobem regulacji prędkości przepływu fazy ruchomej w CEC jest dobór odpowiedniej różnicy potencjałów przyłożonej do elektrod. Stwierdzono, że prędkość przepływu elektroosmotycznego w kapilarze jest wprost proporcjonalna do natężenia pola elektrycznego [238]:

$$v_{eof} = \mu_{eof} \cdot E = \mu_{eof} \cdot \frac{V}{L} \quad (16)$$

gdzie V – wartość napięcia polaryzującego, L – długość kapilary, μ_{eof} – ruchliwość elektroosmotyczna fazy ciekłej (zgodnie z równaniem Smoluchowskiego).

Zazwyczaj podczas eksperymentów CEC stosuje się napięcie polaryzujące o wartości w zakresie 10-20 kV. Niższa wartość napięcia znacznie wydłuża czas rozdzielania, zaś wyższa napotyka na ograniczenia związane ze stabilnością warunków prądowych oraz poszerzaniem stref rozdzielonych substancji w kapilarze. Ponadto, jeżeli siła jonowa roztworu próbki jest dużo większa niż siła jonowa roztworu fazy ruchomej, wyższe napięcie wzmacnia niekorzystne efekty. Stwierdzono, że przy wysokim napięciu polaryzującym ilość wytwarzanego ciepła Joule'a bardzo szybko wzrasta. Nieskuteczne odprowadzenie ciepła prowadzi

do znacznych fluktuacji temperatury w kapilarze. Znane są próby zastosowania napięcia o wartości 90 kV [239].

1.4.1.3. Temperatura kapilary

Rozdzielenie w komercyjnie dostępnych kapilarach prowadzi się w warunkach stałej temperatury (termostatowanie). Temperatura kapilar na ogół nie przekracza 60 °C. Zazwyczaj wyższa temperatura, panująca wewnątrz kapilary, niesie ze sobą niekorzystny wpływ na efektywność rozdzielania. Wzrost temperatury w kapilarze powoduje zmniejszenie lepkości fazy ciekłej, a wtedy prędkość przepływu fazy ruchomej rośnie [240]. Wyższa temperatura grozi przeładowaniem kapilary rozdzielaną próbką podczas jej wprowadzania metodą hydrodynamiczną. Niekontrolowany wzrost temperatury wprowadza niepożądane efekty związane z pH buforu, poszerzaniem strefy rozdzielanych analitów oraz ewentualną denaturację rozdzielanych składników lub całej próbki.

1.4.1.4. Bufor – rodzaj, stężenie, wartość pH

Wybór buforu jest krytycznym punktem pomyślnej optymalizacji warunków separacji metodą CEC zwłaszcza dla próbek, w których cząsteczki analitów są obdarzone ładunkiem. Bufor nie może maskować sygnału analitu, nie może przeszkadzać w zapewnieniu rozpuszczalności wszystkich składników próbki, powinien utrzymywać niezmienną pojemność buforową w trakcie analizy. Duża różnorodność dostępnych elektrolitów pozwala na zastosowanie właściwego roztworu buforowego. Ograniczenia, które są spotykane w praktyce laboratoryjnej, są wynikiem absorpcji promieniowania przez składniki elektrolitu w detektorze spektrofotometrycznym UV – VIS. Badania dowiodły, że roztwory buforów pochłaniających część promieniowania, mogą być stosowane w tak niewielkim stężeniu, by poziom absorbancji, pochodzący od składników buforu, był niski. Następujące roztwory buforowe znalazły zastosowanie do sporządzania roztworów fazy ruchomej o niskim pH: octanowy, fosforanowy i cytrynianowy, a w wyższym zakresie pH: Tris (trihydroksyaminometan), Tricine (trihydroksymetyloglicyna), boranowy i CAPS (kwas 3-cykloheksyloaminopropano-1-sulfonowy).

Wartość pH buforu powinna być jak najbardziej zbliżona, lub niższa, do wartości pKa analitów, wtedy połowa ilości tej substancji będzie w postaci

nie zjonizowanej. Jednak spełnienie takiego warunku przy rozdzielaniu mieszaniny wieloskładnikowej nie jest możliwe, ponieważ każda substancja charakteryzuje się inną wartością pKa [241]. Należy pamiętać, że wzrost wartości pH buforu pomiędzy 4 i 9 skutkuje wzrostem prędkości przepływu elektroosmotycznego. Wartość pH buforu może zostać zmieniona przez zewnętrzne czynniki takie jak temperatura lub dodatek organicznego składnika. Ponadto stwierdzono, że wraz ze wzrostem wartości pH buforu rośnie prędkość przepływu elektroosmotycznego fazy ruchomej dla kapilar wypełnionych modyfikowanym żelom krzemionkowym typu C18, C8 i fenyl [218].

Wartość stężenia buforu powinna być dostosowana do wymiarów kapilary, wartości pola elektrycznego oraz wydajności chłodzenia kapilary podczas procesu separacji. Wysokie stężenie elektrolitu, wyższe niż 100 mM, powoduje wydzielanie dużej ilości ciepła Joule'a. Wzrost siły jonowej powoduje wzrost natężenia prądu w kapilarze. Ilość wydzielanego ciepła Joule'a zależy od stężenia elektrolitu i dane jest równaniem:

$$Q = E^2 \cdot \Lambda \cdot c \quad (17)$$

gdzie E – natężenie pola elektrycznego, Λ – przewodność molowa elektrolitu, c – stężenie elektrolitu.

Wyższe stężenie buforu to większa siła jonowa i w związku z tym zmniejszenie grubości podwójnej warstwy elektrycznej, co ma wpływ na wartość prędkości przepływu elektroosmotycznego. Grubość podwójnej warstwy elektrycznej jest przedstawiona równaniem:

$$\delta = \sqrt{\frac{\epsilon_o \cdot \epsilon_r \cdot R \cdot T}{2 \cdot I \cdot F^2}} \quad (18)$$

gdzie I – siła jonowa, F – stała Faraday'a.

Jeżeli istnieje uzasadniona konieczność zastosowania wysokiego stężenia buforu, najłatwiejszą metodą osłabienia generowania ciepła jest zastosowanie niższego napięcia polaryzującego, ewentualnie zastosowanie dłuższej kapilary lub/i zmniejszenie średnicy kapilary. Zaletą zwiększenia siły jonowej jest zwiększenie pojemności buforowej, oraz zmniejszenie siły oddziaływań pomiędzy zjonizowanymi analitami, a powierzchniowymi grupami wypełnienia kapilary.

1.4.1.5. Dodatek modyfikatorów

Poza roztworem buforowym, często stosuje się takie dodatki do fazy ruchomej, jak np. sole nieorganiczne, organiczne rozpuszczalniki, organiczne kwasy i zasady, substancje powierzchniowo czynne, polimery. Dodanie organicznych modyfikatorów do buforu fazy ruchomej układu CEC jest powszechne, ponieważ wpływa to na zróżnicowanie migracji rozdzielanych substancji. W odwróconym układzie faz dodatek składnika organicznego modyfikuje prędkość przepływu elektroosmotycznego z powodu zmian grubości podwójnej warstwy elektrycznej, potencjału zeta i lepkość buforu [242,243]. Dodatek czynnika parotwórczego (jonowo-asocjacyjnego), np. soli kwasu alkilosulfonowego, w sposób dynamiczny modyfikuje ścianki kapilary kwarcowej i krzemionkowego wypełnienia. Obecność w fazie ciekłej organicznych rozpuszczalników, takich jak metanol, aceton, acetonitryl, powoduje zmniejszenie przewodności buforu i wydzielania ciepła Joule'a, oraz zwiększa rozpuszczalność analitów. Odpowiedni dodatek do roztworu może spowodować zmianę charakteru i siły oddziaływań międzycząsteczkowych oraz wartości pH buforu [244].

1.4.1.6. Wymiary kapilary

Na efektywność rozdzielania badanej próbki wpływa nie tylko rodzaj wypełnienia kapilary, ale także wymiary stosowanej kapilary [245,246,247]. Z praktycznego punktu widzenia zastosowanie dłuższej kapilary, niż o rozmiarach standardowych, niesie ograniczenia. Zaletą zastosowania kapilary o większej średnicy wewnętrznej jest zwiększenie czułości detekcji. Natomiast wadą, słabsza wymiana cieplna pomiędzy wnętrzem kapilary a cieczą lub gazem chłodzącym. W konsekwencji powstaje poprzeczny gradient temperatury w kapilarze. Kapilary o większej długości znalazły zastosowanie przy rozdzielaniu składników próbki obdarzonych ładunkiem, o zbliżonej migracji (ruchliwości elektroforetycznej). Wtedy dystans migracji substancji wydłuża się, co prowadzi do zróżnicowania drogi migracji poszczególnych komponentów. Kompromis pomiędzy wzrostem rozdzielczości, a spadkiem czułości detekcji, spowodowanej poszerzaniem strefy analitu, to najczęściej spotykany problem związany z optymalizacją długości kapilary.

1.4.2. Elektrochromatografia planarna

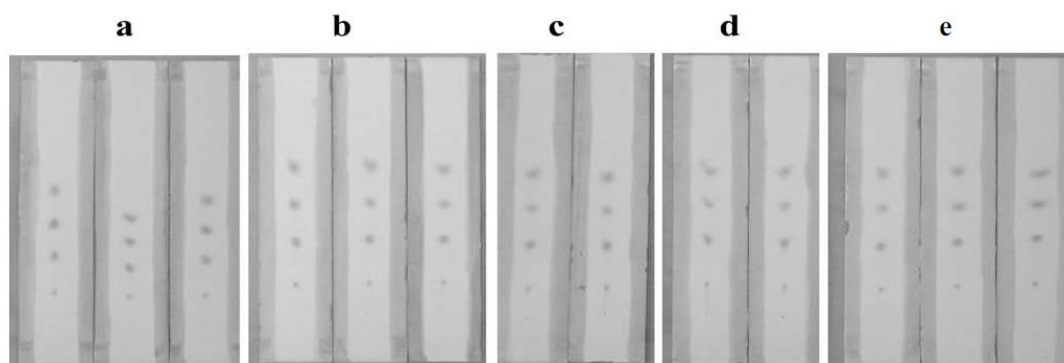
Elektrochromatografia planarna jest metodą, która charakteryzuje się wysoką sprawnością oraz krótkim czasem pojedynczego rozdzielania w stosunku do innych technik planarnej chromatografii. Obecnie najbardziej obiecującą techniką elektrochromatografii planarnej jest elektrochromatografia w układzie zamkniętym, tzw. ciśnieniowa elektrochromatografia planarna. Natomiast metoda elektrochromatografii planarnej w układzie otwartym nie wzbudza obecnie dużego zainteresowania ze względu na wiele niekorzystnych efektów pojawiających się w trakcie eksperymentów. Obecnie elektrochromatografia planarna w układzie zamkniętym jest na etapie umiarkowanego rozwoju. Czynniki wpływające na warunki rozdzielania tą metodą nie są jeszcze dostatecznie poznane/zbadane. Metoda jest stosunkowo nowa, ale bazuje na doświadczeniach zdobytych wcześniej z elektromigracyjnymi technikami CEC i PEC. Podobnie jak w przypadku CEC, na efektywność rozdzielania w elektrochromatografii planarnej wpływa wiele czynników. Znane w literaturze badania koncentrują się, w zasadzie, na wpływie różnych czynników na przepływ elektroosmotyczny fazy ruchomej w PPEC. Co jest uzasadnione, ponieważ inne właściwości układu elektrochromatograficznego są podobne do tych, jakie charakteryzują układy chromatografii cieczowej z wyjątkiem sprawności i selektywności układu, jeżeli rozdzielane substancje ulegają dysocjacji. Dlatego poniżej zostanie omówiony stan badań nad wpływem różnych czynników na przepływ fazy ruchomej w układach PPEC.

1.4.2.1. Wpływ fazy stacjonarnej

W PPEC wykorzystuje się komercyjnie dostępne płytki TLC i HPTLC, najczęściej z warstwą żelu krzemionkowego chemicznie modyfikowaną łańcuchami alkilowymi C18. Typowe płytki chromatograficzne posiadają grubość warstwy od 0,2 do 0,25 mm. Z tego też powodu nie są odpowiednie do metody PPEC – posiadają zbyt grubą warstwę, która jest odpowiedzialna za generowanie dużej ilości ciepła Joule'a. Jednakże na rynku nie ma innych faz stacjonarnych, które można byłoby zastosować do elektrochromatografii planarnej. Występujące na rynku płytki z warstwą monolityczną żelu krzemionkowego o grubości 0,01 mm nie są wytwarzane jako płytki z warstwą typu C18. Na obecnym etapie rozwoju metody elektrochromatografii planarnej w układzie zamkniętym płytki

chromatograficzne z warstwą nie modyfikowanego żelu krzemionkowego nie są przedmiotem badań naukowych. Jednakże płytki te mogą być wykorzystane do badań w metodzie PPEC z uwagi na udokumentowane zainteresowanie zastosowaniem tego adsorbentu do układów elektrochromatografii kapilarnej [248]. Obecnie trwają prace nad uzyskaniem odpowiednich warstw adsorbentu płytek chromatograficznych, ale w obecnym kształcie przedstawiona metoda nie daje powtarzalnych wyników [249].

W metodzie PPEC, przed rozpoczęciem procesu rozdzielania, cała płytka chromatograficzna jest zwilżana roztworem fazy ruchomej. Zatem proces rozdzielania od samego początku jest prowadzony w warunkach zbliżonych do tych, jakie panują w kolumnie chromatograficznej lub kapilarze. Jest to niewątpliwie dużą zaletą metody PPEC w stosunku do innych technik chromatografii planarnej, szczególnie zwykłej chromatografii cienkowarstwowej. Odpowiednie przeprowadzenie procesu zwilżania płytki chromatograficznej wpływa na zwiększenie powtarzalności i odtwarzalności otrzymywanych dystansów migracji substancji w stosunku do tych uzyskanych metodą elektrochromatografii planarnej w układzie otwartym oraz metodą PPEC, jeżeli zwilżanie warstwy adsorbentu zostało przeprowadzone w wyniku zanurzenia płytki w roztworze [196].



Rys. 21. Fotografie płytek chromatograficznych TLC RP-8 (Merck), przedstawiające wpływ czasu zwilżania: 3 s (a), 1 min (b), 5 min (c), 10 min (d), 30 min (e), na dystans migracji substancji: sudan IV (1), 4-(dietyloamino)-azobenzen (2), 1-(3-pyridylazo)-2-naftol (3), 1-(4-chlorofenylazo)-2-naftol (4); płytka, 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym o pH = 7 (mM) [196]

Stwierdzono, że optymalny czas zwilżania płytki chromatograficznej fazą ruchomą powinien wynosić ok. 1 min – rys. 21b [196]. Krótszy czas zwilżania

powoduje, że wartości dystansu migracji substancji są krótsze i nie są powtarzalne – rys. 21a. Dalsze wydłużanie czasu zwilżania płytki nie wpływa w sposób znaczący na zmianę dystansu migracji substancji. Jednakże, długotrwałe zwilżanie warstwy adsorbentu powoduje pogorszenie kształtu plamek – rys. 21d, 21e. Ponadto stwierdzono, że czas równoważenia (zwilżania) płytki chromatograficznej zależy od jej rodzaju tj. dla płytek wysokosprawnych (HPTLC) proces równoważenia zachodzi szybciej niż dla płytek zwykłych (TLC) [195].

1.4.2.2. Wpływ fazy ruchomej

Zgodnie z równaniem Smoluchowskiego prędkość przepływu elektroosmotycznego cieczy jest wprost proporcjonalna do stałej dielektrycznej ośrodka, natężenia pola elektrycznego i potencjału zeta, a odwrotnie proporcjonalna do lepkości eluentu. Lepkość cieczy waha się w szerokich granicach. Najczęściej wykorzystywanymi fazami ruchomymi są mieszaniny wodnych roztworów buforowych i organicznych rozpuszczalników takich jak acetonitryl, metanol, aceton. Na podstawie wyżej wspomnianego równania Smoluchowskiego można stwierdzić, że prędkość przepływu elektroosmotycznego rośnie ze wzrostem stałej dielektrycznej ośrodka ciekłego. Z analizy danych literaturowych [250] wynika, że stała dielektrycznej mieszanin wodno organicznych jest w przybliżeniu wielkością addytywną. Niewielki dodatek elektrolitu nie wpływa znacząco na stałą dielektryczną roztworu.

W układach PPEC z fazą stacjonarną typu C18 i wodno organiczną fazą ruchomą prędkość przepływu elektroosmotycznego jest niska. Polarność tych faz jest w dużym stopniu zredukowana, w wyniku czego zjawisko elektroosmozy zachodzi dzięki obecności „reszkowych” grup silanolowych, które nie uległy modyfikacji. Stwierdzono, że niewielki dodatek buforu powoduje wzrost prędkości tego przepływu. W zależności od rodzaju buforu, jego stężenia oraz pH w fazie ruchomej, zmiany przepływu są zróżnicowane. Wyższe stężenie elektrolitu w eluencie generuje większy przepływ elektroosmotyczny, tym samym dystans migracji analizowanych substancji jest zwiększony. Stwierdzono, że w układzie separacyjnym z płytkami typu RP18, dystans migracji badanych substancji jest proporcjonalny do stężenia buforu [195]. Interpretacja teoretyczna takiego zachowania jest skomplikowana, ponieważ stężenie elektrolitu wpływa na grubość podwójnej warstwy elektrycznej (równanie 18) i wartości potencjału elektrokinetycznego zgodnie z równaniem:

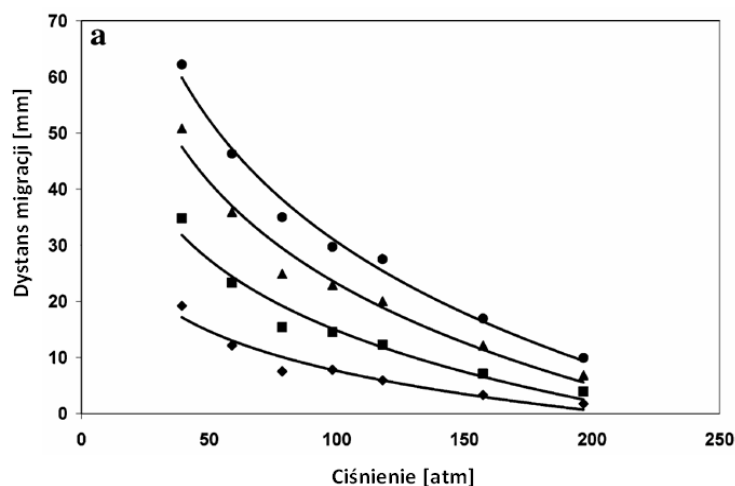
$$\zeta = \frac{\sigma \cdot \delta}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r} \quad (19)$$

gdzie σ – powierzchniowa gęstość ładunku, δ – grubość podwójnej warstwy elektrycznej.

Nakładanie się podwójnych warstw elektrycznych prowadzi do zmniejszenia przepływu elektroosmotycznego. Z powyższych rozważań wynika, że wybór składu fazy ruchomej dla procesu PPEC jest znacznie bardziej skomplikowanym wyzwaniem aniżeli dla układów chromatografii cieczowej. Dlatego dokładne poznanie właściwości fazy ruchomej, wpływających na rozdzielczość i sprawność układów ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej może przyczynić się do łatwiejszego wyboru optymalnych warunków prowadzenia procesu rozdzielania.

1.4.2.3. Ciśnienie wywierane na płytkę

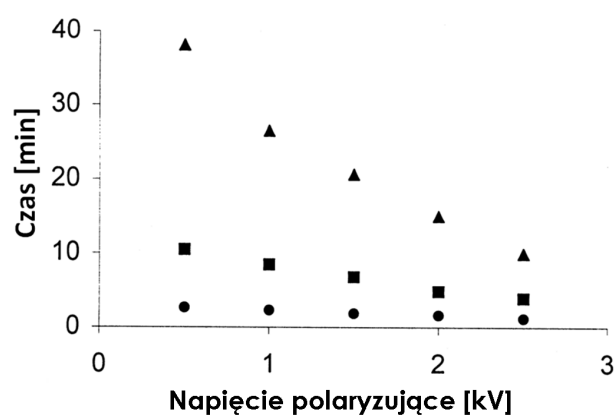
Ciśnienie wywierane na warstwę adsorbentu płytki chromatograficznej, poprzez folię plastikową przykrywającą, wpływa na dystans migracji substancji w układach PPEC – rys. 22. Większe ciśnienie powoduje zmniejszenie dystansu migracji substancji. Dla płytek TLC to zmniejszenie dystansu migracji substancji jest większe niż dla płytek HPTLC [195]. Efekt ten jest spowodowany różnym stopniem upakowania złoża adsorbentu w warstwach płytek TLC i HPTLC. Wokół każdej pojedynczej cząstki adsorbentu tworzy się podwójna warstwa elektryczna. Cząstki ziarna adsorbentu w zależności od ich upakowania i rozmiaru tworzą warstwę o różnej zwięzłości, co w konsekwencji prowadzi do różnego stopnia nakładania się podwójnych warstw elektrycznych i zmiany dystansu migracji stref substancji. Zmniejszenie dystansu migracji substancji ze wzrostem ciśnienia wywieranego na warstwę adsorbentu jest wynikiem powstawania węższych kapilar międzyziarnowych w warstwie adsorbentu, co prowadzi do bardziej znacznego nakładania się podwójnych warstw elektrycznych i w konsekwencji do większego obniżenia prędkości przepływu fazy ruchomej. Zastosowanie zbyt dużego ciśnienia może prowadzić do pęknięcia ziaren adsorbentu i zniszczenia jednorodnej struktury warstwy sorbentu.



Rys. 22. Wpływ ciśnienia na dystans migracji substancji: octan medroksyprogesteronu (◆), 2-acetylnaftalen (■), benzanilid (▲), o-nitroanilina (●), w układzie PPEC; płytka HPTLC RP-18 F (Merck), 55% acetonitrylu w buforze octanowym o pH = 4,7 (25 mM), U = 6 kV, 4,5 min [195]

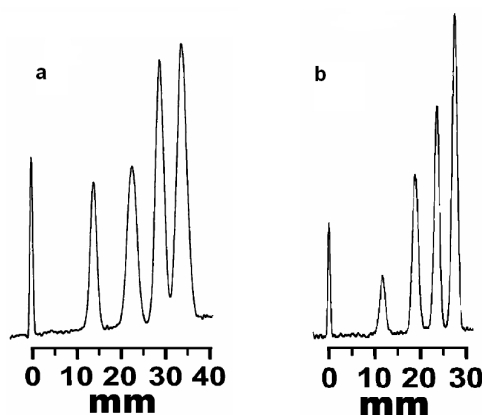
1.4.2.4. Wpływ pola elektrycznego

Prędkość przepływu elektroosmotycznego jest proporcjonalna do napięcia polaryzującego płytkę chromatograficzną zgodnie z równaniem Smoluchowskiego (równanie 4). Zatem zastosowanie wysokiego napięcia polaryzującego może znacznie skrócić czas procesu PPEC, podobnie jak w PEC – rys. 23.



Rys. 23. Wpływ różnicy potencjałów przyłożonej do elektrod na czas migracji substancji testowej 2,4 – dihydroksyazobenzen (ang. *Sudan Orange G*); dystans migracji substancji: 1 cm (●), 2 cm (■), 4 cm (▲) [182]

Zostało to wykorzystane do przeprowadzenia rozdzielania substancji testowych w bardzo krótkim czasie, 1 min, przy różnicy potencjałów 9 kV. Dla porównania proces separacji w analogicznym układzie metodą chromatografii cienkowarstwowej został przeprowadzony w czasie 24 min – rys. 24.



Rys. 24. Chromatogram testowej mieszaniny uzyskany metodą TLC, czas rozdzielania 24 min (a) i metodą PPEC, czas procesu 1 min, 9 kV (b); płytki LiChrospher RP 18 (Merck), faza ruchoma: 55% acetonitrylu w buforze octanowym, pH=4,7 (25 mM) [195]

Jednakże zastosowanie wysokiego napięcia polaryzującego płytkę chromatograficzną, np. 10 kV dla płytki o długości 10 cm, jest niekorzystne, w głównej mierze z powodu efektu wydzielania ciepła Joule'a. Wyższe napięcie potęguje ten efekt, który objawia się niekontrolowanym podwyższeniem temperatury układu. Dlatego chłodzenie układu separacyjnego może łagodzić efekty wydzielania ciepła Joule'a [195]. Ponadto wysokie napięcie polaryzujące powoduje bardziej intensywne wydzielanie się pęcherzyków gazów na elektrodach. Duża ilość pęcherzyków destabilizuje parametry prądowe procesu – mogą zachodzić zmiany natężenia prądu.

1.4.2.5. Sprawność układów PPEC

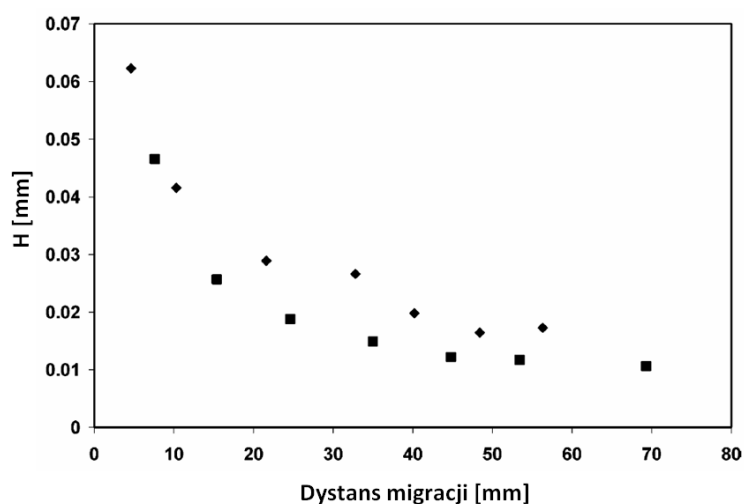
Uzyskiwana sprawność układów PPEC, z komercyjnie dostępnymi płytkami chromatograficznymi, zarówno dla płytek TLC jak i HPTLC, jest znacznie większa niż dla analogicznych układów chromatografii cienkowarstwowej. Na chromatogramie (rys. 24) można zaobserwować, że strefy rozdzielonych

substancji metodą PPEC są węższe niż w metodzie TLC. Należy pamiętać, że płytki chromatograficzne są dedykowane dla układów chromatografii cienkowarstwowej. Układy elektrochromatografii planarnej, z warstwami adsorbentu komercyjnych płytek chromatograficznych, generują duże ilości ciepła Joule'a, które jest trudno odprowadzić. Dlatego w tych układach należy oczekiwać zmniejszenia sprawności z powodu gradientu temperatury w warstwie adsorbentu. Inną niekorzystną cechą tych płytek, ze względu na sprawność układu PPEC, jest generowanie przepływu elektroosmotycznego na powierzchni szklanego nośnika. Wartość prędkości tego przepływu jest inna niż w warstwie adsorbentu. Stwierdzono, że w PPEC, zarówno dla płytek TLC i HPTLC, wraz ze wzrostem dystansu migracji chromatografowanych substancji maleje wysokość półki teoretycznej. Należy nadmienić, że szerokość strefy stężeniowej, wraz ze wzrostem migracji substancji, nie ulega poszerzeniu w takim stopniu, jak w klasycznej chromatografii cienkowarstwowej.

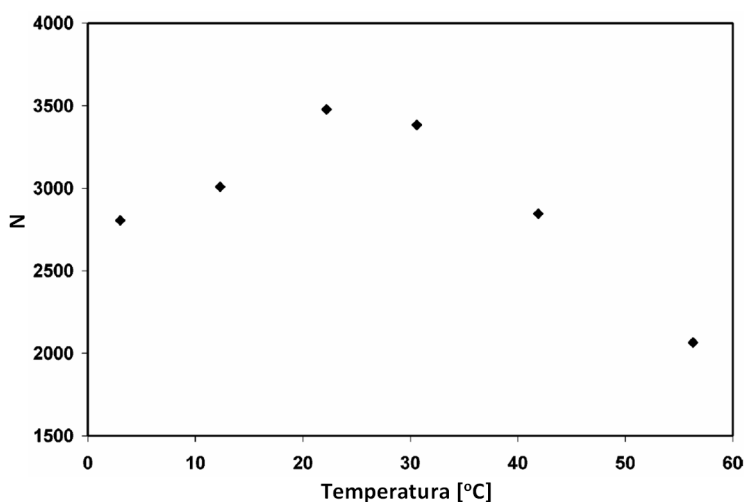
W elektrochromatografii planarnej, podobnie jak w chromatografii cienkowarstwowej, na końcowe rozmycie strefy substancji składają się trzy główne czynniki: szerokość strefy startowej substancji, rozmycie strefy substancji związane z procesem chromatograficznym/elektrochromatograficznym, poszerzenie strefy związane z jej detekcją i rejestracją. W niektórych przypadkach, gdy wywołanie chromatogramu wymaga przeprowadzenia derywatywacji rozdzielanych substancji na płytce chromatograficznej, wtedy i ten proces może wносить swój niemały wkład do końcowego rozmycia strefy substancji na chromatogramie. W praktyce, największy wkład do rozmycia stref substancji wnoszą wielkość plamki startowej oraz kinetyczne efekty procesu chromatograficznego [251,252]. Sprawność klasycznych układów cienkowarstwowych uzależniona jest również od dystansu rozwijania chromatogramu, jak i parametrów ziarna adsorbentu znajdującego się na płytce chromatograficznej. Największą sprawność uzyskuje się, gdy dystans czoła fazy ruchomej nie przekracza 5 cm na płytkach HPTLC lub 7 cm na płytkach TLC, wtedy najniższa wysokość półki teoretycznej odpowiednio wynosiła 22 – 25 i 35 – 45 μm .

Na podstawie danych dotyczących sprawności układów TLC i PPEC można stwierdzić, że w elektrochromatografii planarnej, wraz ze wzrostem dystansu migracji substancji, szerokość strefy substancji nie ulega tak znacznemu poszerzeniu, jak w układach chromatografii cienkowarstwowej. Wynikiem tego jest niska wartość

wysokości półki teoretycznej – rys. 25. Wyniki eksperymentalne wskazują, że wysokość półki teoretycznej była niska nawet, gdy dystans migracji substancji na płytce chromatograficznej jest stosunkowo długi. Efekty poszerzające strefę substancji są ograniczone, co w konsekwencji przekłada się na niską wysokość półki teoretycznej. Wysoka sprawność układów PPEC jest niewątpliwie dużą zaletą tej metody.



Rys. 25. Wpływ dystansu migracji substancji na wysokość półki teoretycznej wyznaczonej dla układów PPEC z płytkami TLC (♦) i HPTLC (■); 55% acetonitrylu w buforze octanowym, pH=4,7 (25 mM) [195]



Rys. 26. Wpływ temperatury płytki chromatograficznej na liczbę półek teoretycznych; układ elektrochromatograficzny jak na rys. 21, czas 8 min, dystans migracji o-aniliny 49 mm [195]

Stwierdzono eksperymentalnie, że ze wzrostem temperatury od ok. 3 °C, liczba pól teoretycznych rosła, by w temperaturze 26 °C osiągnąć wartość maksymalną. Dalszy wzrost temperatury powodował znaczne zmniejszenie liczby pól teoretycznych, np. w temperaturze ok. 60 °C liczba ta była o ok. 40 % mniejsza niż w temperaturze optymalnej – rys. 26. Najprawdopodobniej, w niskich temperaturach decydujący wpływ na liczbę pól teoretycznych ma opór przenoszenia masy. Natomiast, gdy temperatura płytki chromatograficznej jest wyższa, wtedy rozmycie strefy substancji jest spowodowane dyfuzją cząsteczkową substancji chromatografowanej.

2. Cel pracy

Elektrochromatografia planarna ciśnieniowa (w układzie zamkniętym) jest nową metodą chromatograficzną, w której wykorzystuje się zjawiska elektrokinetyczne do rozdzielania mieszanin substancji. Wstępne badania wskazują, że PPEC wykazuje wiele zalet w stosunku do pokrewnych technik chromatograficznych (TLC, HPLC) i elektromigracyjnych (CEC, CE). Główne zalety metody PPEC to możliwość regulowania prędkości przepływu fazy ruchomej w szerokim zakresie, wąskie strefy rozdzielanych substancji, wysoka sprawność, krótki czas procesu oraz możliwość dodatkowych zmiany selektywności rozdzielania składników próbki. Jednakże metoda PPEC jest na początkowym etapie rozwoju i do tej pory nie ma zastosowania w praktyce laboratoryjnej z powodu problemów technicznych, aparaturowych, jak i braku na rynku odpowiednich materiałów, dedykowanych tej metodzie. Ponadto, brak pełnej wiedzy teoretycznej, opisującej zjawiska zachodzące podczas rozdzielania, nie pozwala wykorzystać potencjalnych możliwości tej metody do rozdzielania skomplikowanych próbek, zwłaszcza pochodzenia biologicznego.

Celem badań niniejszej dysertacji było opracowanie reguł prowadzenia procesu elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej, które przyczyniłyby się do ułatwienia zastosowania tej metody w aplikacjach laboratoryjnych. Badania obejmowały konstrukcję urządzenia i komory do elektrochromatografii planarnej, która pozwalałaby na uzyskiwanie powtarzalnych wyników i bardziej przyjazną obsługę. Praca obejmowała badania, które miały na celu określenie wpływu różnych czynników na efektywność procesu rozdzielania metodą PPEC, np. takich jak przepływ fazy ruchomej, wielkość strefy startowej próbki, stężenie modyfikatora fazy ruchomej, pH i stężenie roztworu buforowego fazy ruchomej itp. Ponadto badania miały na celu porównanie sprawności układów PPEC, HPLC i TLC. Na podstawie przeprowadzonych badań dokonano oceny metody PPEC pod względem możliwości zastosowania jej w praktyce laboratoryjnej.

3. Część eksperymentalna

3.1. Materiały

Tabela 5. Zestawienie materiałów wykorzystanych w niniejszej pracy

Nazwa	Producent
Płytki chromatograficzne	
TLC RP-18 F254s	Merck, Darmstadt, Niemcy
HPTLC RP-18 F254s	
HPTLC RP-18 W	
Impregnaty	
Silcolase PC-263 PEX Silcolase PC-615 Platinum catalyst	Rhodia Silicones, Francja
Sarsil W Sarsil H50 Utwardzacz W	Silikony Polskie, Nowa Sarzyna, Polska

3.2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

Tabela 6. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

Nazwa	Producent
Komora pozioma DS-II-5x10	Chromdes, Lublin, Polska
Komora pozioma do zwilżania płytek chromatograficznych	prototyp
Naczynko do zwilżania płytek chromatograficznych – wersja podstawowa	prototyp
Naczynko do zwilżania płytek chromatograficznych – wersja z uszczelką teflonową	prototyp
Komora do ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej, PPEC	prototyp
Klucz dynamometryczny Belzer, model nr 745120	Baco Belzer GmbH, Niemcy

Mikrostrzykawka SGE 5 μ l, (nr kat. 001002)	SGE Analytical Science PtyLtd., Australia
Automatyczny aplikator aerozolowy: Linomat 5	Camag, MuttENZ, Szwajcaria
Pompa strzykawkowa, Kwapisz Duet 20/50	Kwapisz, Warszawa, Polska
Zasilacz wysokonapięciowy, Spellman 10 kV PCM 120	Spellman HV, USA
Densytometr TLC 2010 Diode Array Scanner	J&M, Aalen, Niemcy
Chromatograf cieczowy HP 1050 z detektorem spektrofotometrycznym i dozownikiem Rheodyne	Hewlett – Packard, Palo Alto, USA
Urządzenie do cięcia płytek chromatograficznych	OM Laboratory Chigasaki, Chigasaki, Japonia
Suszarka laboratoryjna SUP-4	Spółdzielnia Nysa, Warszawa, Polska
Zestaw do pomiaru temperatury: miernik Tenmars TM-711X	Tenmars Electronics, Taipei, Tajwan
Waga analityczna WPA 60/K	Zakład Techniki Precyzyjnej RADWAG, Radom, Polska
Zestaw do pomiaru siły parcia: miernik P2000BCP wraz z czujnikiem CM 5	Wagotechnika, Lublin, Polska

3.3. Chemikalia

Tabela 7. Zestawienie odczynników chemicznych wykorzystanych w niniejszej pracy

Odczynniki i chemikalia	Producent
Aceton cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Acetonitryl cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Acetonitryl s.g.	POCh, Głwice, Polska
Acetonitryl do gradientu	Merck, Darmstadt, Niemcy
Metanol cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Metanol do gradientu	Merck, Darmstadt, Niemcy

Etanol cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Propanol cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Metyloformamid cz.d.a.	Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy
N – metyloformamid cz.d.a.	Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy
N,N –dimetyloformamid cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Kwas cytinowy cz.d.a.	Merck, Darmstadt, Niemcy
di-Sodu wodorofosforan cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Potasu diwodorofosforan cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Kwas octowy cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Sodu octan cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Kwas borowy cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Sodu węglan cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Sodu wodorowęglan cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Sodu wodorotlenek cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Kwas solny cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Fenol cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Kwas siarkowy (VI) cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Sacharoza cz.d.a.	POCh, Głwice, Polska
Woda redestylowana	Otrzymywana w Katedrze Chemii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

3.4. Substancje testowe

Tabela 8. Substancje testowe.

Barwniki	
Sudan IV	POCh, Głwice, Polska
1-(4-chlorophenylazo)-azobenzen	Syntezowane w Zakładzie Chemii Analitycznej i Nieorganicznej UM w Lublinie
4-(dietylamino)-azobenzen	
1-(2-pyridylazo)-2-naftol	
1-(4-hydroksyfenylazo)-2-naftol	

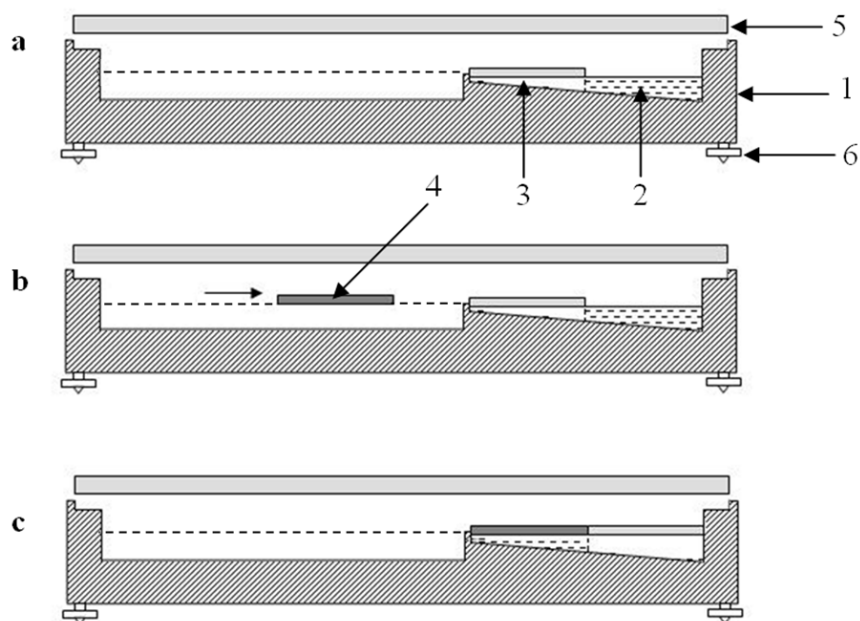
Steroidy	
Testosteronu izomaślan	Różne źródła
Premizololu hemibursztynian	
Hydrokortyzonu octan	
Testosteronu octan	
Dehydropregnenolonu octan	
1-dehydrometylotestosteron	
Pochodne kofeiny	
Acyklowir	Różne źródła
Azatiopryna	
Kofeina	
Teobromina	
Teofilina	

3.5. Urządzenia i aparatura

3.5.1. Komora do przemywania warstwy adsorbentu płytek chromatograficznych

W przeprowadzonych eksperymentach wykorzystywano dostępne komercyjnie płytki chromatograficzne. Przed użyciem, warstwy adsorbentu płytek chromatograficznych były przemywane metanolem w urządzeniu do tego celu skonstruowanym – rys. 27.

Komora do przemywania warstwy adsorbentu płytek chromatograficznych składa się z teflonowej podstawy (1), w której po prawej stronie znajduje się zbiornik (2) na roztwór przemywający. Zbiornik ten przykryty jest płytką szklaną (3), a cała komora płytą szklaną (5). Przemywanie płytki chromatograficznej (4) odbywało się poprzez skontaktowanie jej warstwy adsorbentu z metanolem w zbiorniku (2). Kolejne etapy (dwa) przemywania warstwy adsorbentu są przedstawione na rys. 27b i 27c.



Rys. 27. Schemat komory do przemywania warstwy adsorbentu płytek chromatograficznych; podstawa teflonowa (1), zbiornik cieczy (2), płytka szklana (3), płytka chromatograficzna (4), pokrywa komory (5), pokrętła poziomujące (6)

W pierwszym etapie umieszcza się płytkę chromatograficzną w komorze i nalewa metanol do zbiornika (2), rys. 26b. W drugim etapie płytkę chromatograficzną przesuwają nad zbiornik (2), rys. 27b. W tym etapie cała warstwa adsorbentu jest w kontakcie z roztworem przemywającym. Zwykle, czas kontaktu rozpuszczalnika przemywającego z warstwą adsorbentu wynosił 1 minutę. W trakcie przemywania cała komora była izolowana od otoczenia za pomocą płyty szklanej (5), umieszczonej na wierzchu komory. Komora była wyważana za pomocą obrotowych „nóżek” (6).

3.5.2. Wykonanie marginesów uszczelniających w warstwie adsorbentu płytki chromatograficznej

Marginesy uszczelniające płytki chromatograficznej o szerokości 4 mm były wykonywane z wykorzystaniem ciekłych impregnatów silikonowych. Warstwa silikonu była наносzona na płytkę chromatograficzną za pomocą pędzelka. W eksperymentach był wykorzystywany impregnat firmy Rhodia Silicones (Francja), który był przygotowywany przez zmieszanie trzech składników o nazwach: Silcolase PC-263 PEX, Silcolase PC-615 i katalizator platynowy, w proporcjach 100:10:3 (w/w). Po naniesieniu impregnatu na warstwę adsorbentu,

płytkę chromatograficzną umieszczano w suszarce, aż do całkowitego spolimeryzowania silikonu (temp. 60 – 70 °C w czasie 10 min).

W późniejszych badaniach stosowano impregnat firmy Silikony Polskie (Polska). Proces naniesienia warstwy silikonu był czteroetapowy. W pierwszym etapie nanoszono impregnat Sarsil W, którym była zwilżana warstwa adsorbentu płytki chromatograficznej. Po niecałkowitym odparowaniu rozpuszczalnika impregnatu nanoszono, na to samo miejsce, warstwę Sarsiu H50. Następnie nanoszone dwie kolejne warstwy impregnatu (Sarsil H50) w taki sposób by pomiędzy kolejnymi etapami nanoszenia warstw nie dochodziło do całkowitego odparowania rozpuszczalnika. Po naniesieniu impregnatu, płytka chromatograficzna była umieszczana w suszarce do całkowitego spolimeryzowania silikonu (temp. 105 °C w ciągu 60 min).

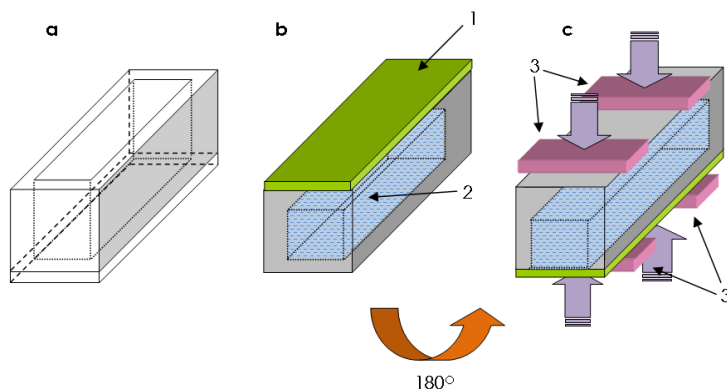
3.5.3. Rozwijanie chromatogramów cienkowarstwowych

Rozwijanie chromatogramów cienkowarstwowych odbywało się w komorach poziomych DS-II-5x10 (Chromdes, Lublin). Badane substancje były nanoszone na płytkę chromatograficzną za pomocą półautomatycznego aplikatora aerozolowego, Linomat 5, z wybraną prędkością nanoszenia. Szybkość dozowania (nanoszenia) była uzależniona od rodzaju rozpuszczalnika badanej próbki np. dla metanolu wynosiła 150 nl/sek. Próbki były nanoszone 10 mm od krawędzi płytki i w odległości 8 – 10 mm między sąsiednimi plamkami. Płytkę chromatograficzną, przed rozwijaniem chromatogramu, kondycjonowano 15 min w parach fazy ruchomej. Dystans rozwijania był zróżnicowany i zależał od rodzaju płytki. Po rozwinięciu chromatogramu płytkę chromatograficzną przenoszono do dygestorium w celu odparowania fazy ruchomej z warstwy adsorbentu. Chromatogramy były rejestrowane za pomocą skanera DAD.

3.5.4. Naczynie do zwilżania płytek chromatograficznych roztworem fazy ruchomej – wersja podstawowa

Płytki chromatograficzne przed eksperymentem elektrochromatograficznym były zwilżane roztworem fazy ruchomej. Ten etap był wymagany, ze względu na stosowanie w eksperymentach PPEC kompletnie zwilżonej warstwy adsorbentu

płytek chromatograficznych roztworem fazy ruchomej. Zwilżanie odbywało się w naczyniu przedstawionym na poniższym rysunku (rys. 28).

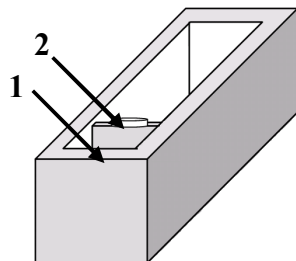


Rys. 28. Schemat naczynia i poszczególnych etapów zwilżania warstwy adsorbentu płytki chromatograficznej, widok przestrzenny naczynia (a), pierwszy etap zwilżania (b), drugi etap zwilżania (c); płytka chromatograficzna (1), roztwór fazy ruchomej (2), ściskacze laboratoryjne (3)

Naczynie do zwilżania warstwy adsorbentu składa się z czterech ścian o grubości 4 mm oraz podstawy/dna, wykonanych ze szkła rys. 28a. Zewnętrzne wymiary naczynia w przekroju poziomym są równe wymiarom płytki chromatograficznej. Górne krawędzie ścian naczynia są zaopatrzone w uszczelkę z gumy fluorosilikonowej o szerokości 4 mm i grubości 2 mm. Do takiego naczynia była wprowadzana odpowiednia porcja roztworu fazy ruchomej, zwykle 10 ml. Następnie naczynie było przykrywane płytką chromatograficzną (1) z wykonanymi wcześniej marginesami uszczelniającymi w warstwie adsorbentu (patrz poniżej). Marginesy te stykały się bezpośrednio z uszczelką z gumy fluorosilikonowej, rys. 28b. Płytkę chromatograficzną była dociskana do uszczelki fluorosilikonowej naczynia za pomocą specjalnych ściskaczy laboratoryjnych. Następnie naczynie z przymocowaną płytką chromatograficzną było obracane dnem do góry, w celu skontaktowania warstwy adsorbentu z roztworem fazy ruchomej, rys. 28c. Po określonym czasie zwilżania roztwór z naczynia był przenoszony do zbiornika urządzenia do PPEC, a płytka chromatograficzna była umieszczana w komorze do ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej.

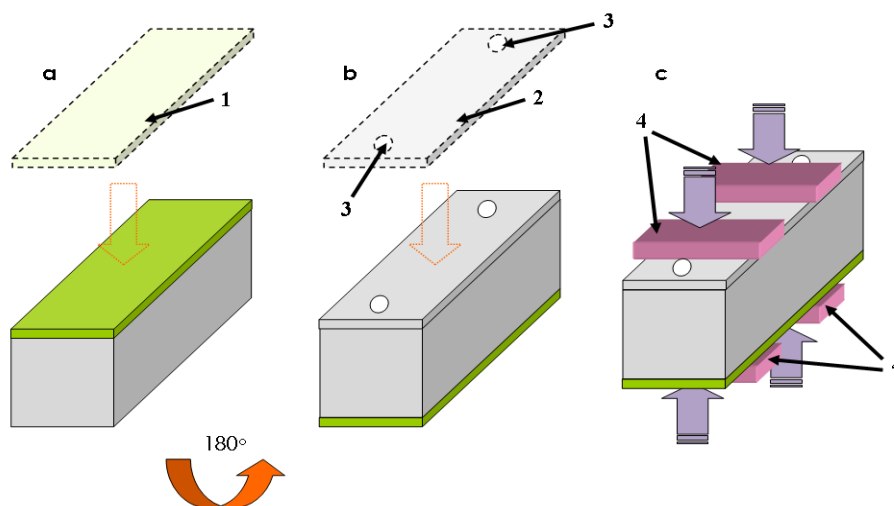
3.5.5. Naczynie do zwilżania warstwy adsorbentu płytek chromatograficznych roztworem fazy ruchomej – wariant zwilżania warstwy adsorbentu z naniesioną próbką substancji

W kolejnym etapie eksperymentów używano zmodyfikowanej wersji naczynia do zwilżania warstwy adsorbentu płytek chromatograficznych, z naniesioną próbką substancji, rys. 29. Wersja tego naczynia posiadała cztery ścianki szklane o grubości 4 mm i była wyposażona w dodatkowy element – przegrodę szklaną (1) usytuowaną w wewnętrznej części naczynia. Krawędzie górne naczynia oraz przegrody były wyposażone w uszczelkę z gumy fluorosilikonowej o grubości 2 mm i szerokości 4 mm. Do uszczelki była przyklejona folia teflonowa o grubości 0,25 mm. Przy czym uszczelka fluorosilikonowa przegrody i przyklejona do niej folia teflonowa posiadały otwór o średnicy 3 mm.



Rys. 29. Schemat naczynka do zwilżania warstwy adsorbentu płytek chromatograficznych z naniesionymi próbkami substancji; przegroda szklana (1), pierścień silikonowy (2)

W procesie zwilżania, w pierwszej kolejności, płytka chromatograficzna, zaopatrzona w marginesy uszczelniające na całym obwodzie warstwy adsorbentu, była umieszczana na krawędziach naczynia, zaopatrzonych w uszczelkę z gumy fluorosilikonowej. Przy czym, warstwa adsorbentu była skierowana do wnętrza naczynia, a próbka, naniesiona na płytce chromatograficznej, była usytuowana pod przegrodą naczynia w miejscu otworu w uszczelce z gumy fluorosilikonowej i folii teflonowej, rys. 30a. Po dociśnięciu płytki chromatograficznej do ścianek naczynia za pomocą ściskaczy laboratoryjnych, naczynie było obracane tak, by płytka chromatograficzna znajdowała się w dolnym położeniu, stanowiła dno naczynia. Do naczynia nalewano odmierzone porcje roztworu fazy ruchomej i przykrywano płytką szklaną. Czas zwilżania warstwy adsorbentu był ustalany w zależności od potrzeb prowadzonych badań, rys. 30c.



Rys. 30. Schemat urządzenia do zwilżania warstwy adsorbentu na płytce chromatograficznej z naniesioną próbką substancji; płytka chromatograficzna (1), płytka przykrywająca (2), otwory (3), miejsce docisku ściskaczy laboratoryjnych (4)

Podczas nasycania/zwilżania warstwy adsorbentu roztworem fazy ruchomej całe naczynie było poddawane łagodnemu przechylaniu w celu łatwiejszego mieszania cieczy. Ta wersja naczynka, do zwilżania warstwy adsorbentu, była stosowana wtedy, gdy dozowanie substancji na płytkę chromatograficzną odbywało się za pomocą urządzenia do półautomatycznego nanoszenia substancji w strumieniu aerozolu. Po określonym czasie zwilżania roztwór z naczynia był usuwany, przenoszony do zbiornika/ów urządzenia do ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej, a płytka chromatograficzna przenoszona do komory do PPEC.

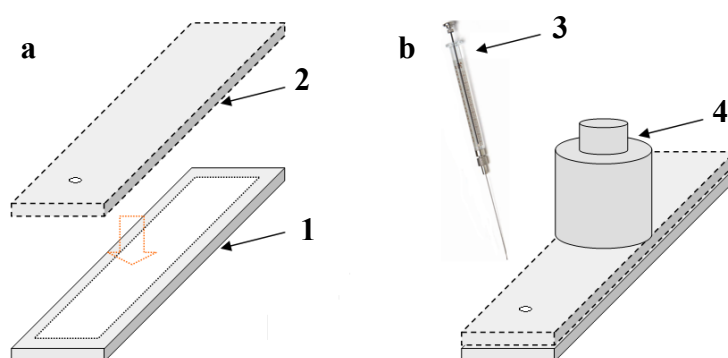
3.5.6. Nanoszenie próbek substancji na płytkę chromatograficzną

3.5.6.1. Na zwilżoną warstwę adsorbentu za pomocą mikrostrzykawkki

Dozowanie badanej mieszaniny substancji odbywało się za pomocą mikrostrzykawkki chromatograficznej. Ten sposób dozowania był związany z etapem zwilżania warstwy sorbentu opisanym w podrozdziale 3.5.4.

Zwilżoną warstwę adsorbentu roztworem fazy ruchomej, przykrywano płytką szklaną o tych samych wymiarach, co płytka chromatograficzna, rys. 31a. Następnie za pomocą mikrostrzykawkki o pojemności 5 μ l, przez otwór, o średnicy 3 mm, w płytce przykrywającej i w łagodnym strumieniu ciepłego powietrza,

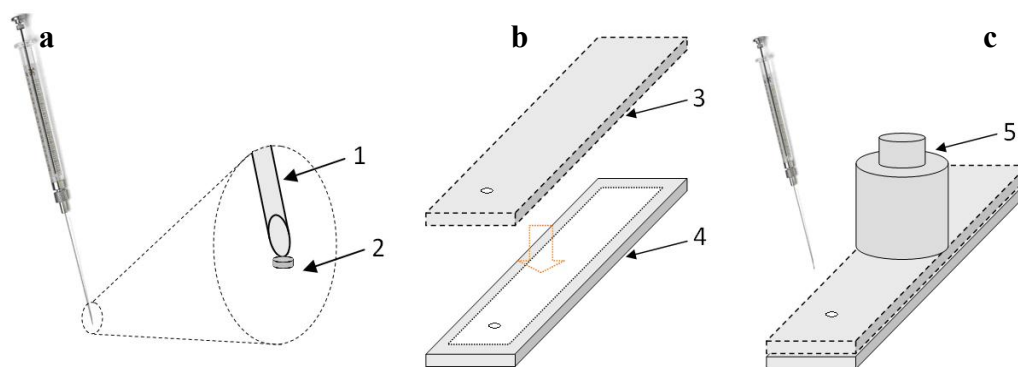
nanoszono roztwór próbki badanej na warstwę adsorbentu. Strumień ciepłego powietrza zapewniał uzyskanie minimalnej średnicy plamki startowej na mokrej warstwie adsorbentu, rys. 31b. Dodatkowo, w celu ograniczenia odparowywania fazy ruchomej, płytka szklana przykrywająca była dociskana do płytki chromatograficznej za pomocą odważnika o masie 1 kg. Niezwłocznie po naniesieniu próbki, płytkę chromatograficzną umieszczano w komorze do PPEC. Objętość наносzonej próbki wahała się od 0,2 do 0,5 μl .



Rys. 31. Schemat dozowania próbki na zwilżoną warstwę adsorbentu płytki chromatograficznej; zabezpieczenie zwilżonej warstwy adsorbentu płytką szklaną (a), wprowadzenie badanej próbki (b); płytka chromatograficzna (1), płytka przykrywająca (2), mikrostrzykawką (3), odważnik (4)

3.5.6.2. Na mokrą płytkę z wykorzystaniem fragmentu warstwy adsorbentu

W pierwszym etapie przygotowywano fragment warstwy adsorbentu (z innej płytki chromatograficznej) o średnicy ok. 1 mm, na który, za pomocą mikrostrzykawką, nanoszono roztwór próbki o objętości 1 – 1,5 μl , rys. 32a. W warstwie adsorbentu płytki chromatograficznej, zaopatrzonej w marginesy uszczelniające, formowano otwór o średnicy ok. 1mm. Następnie płytkę chromatograficzną zwilżano eluentem i niezwłocznie przykrywano płytką szklaną, w celu niedopuszczenia do odparowania fazy ruchomej, rys. 31 b. Fragment warstwy adsorbentu z próbką przenoszono w miejsce pozbawione sorbentu na płytce chromatograficznej, wykorzystując otwór o średnicy 3 mm w płytce przykrywającej, rys. 32c. Następnie płytkę chromatograficzną niezwłocznie umieszczano w komorze do PPEC.



Rys. 32. Schemat dozowania próbki na zwilżoną płytkę chromatograficzną z wykorzystaniem fragmentu warstwy adsorbentu; igła mikrostkrywkawki (1), skrawek/fragment adsorbentu (2), płytki szklana (3), płytki chromatograficznej (4), odważnik (5)

3.5.6.3. Na suchą płytkę za pomocą dozownika aerozolowego

Metodyka postępowania podczas dozowania próbek substancji jest opisana w instrukcji obsługi urządzenia, Linomat 5. Zazwyczaj uzyskiwana szerokość plamki „startowej” nie przekraczała 1mm. Próbki substancji były dozowane na suchą płytkę, która po tej operacji była zwilżana roztworem fazy ruchomej zgodnie z opisem w podrozdziale 3.5.5.

3.6. Urządzenie do ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej

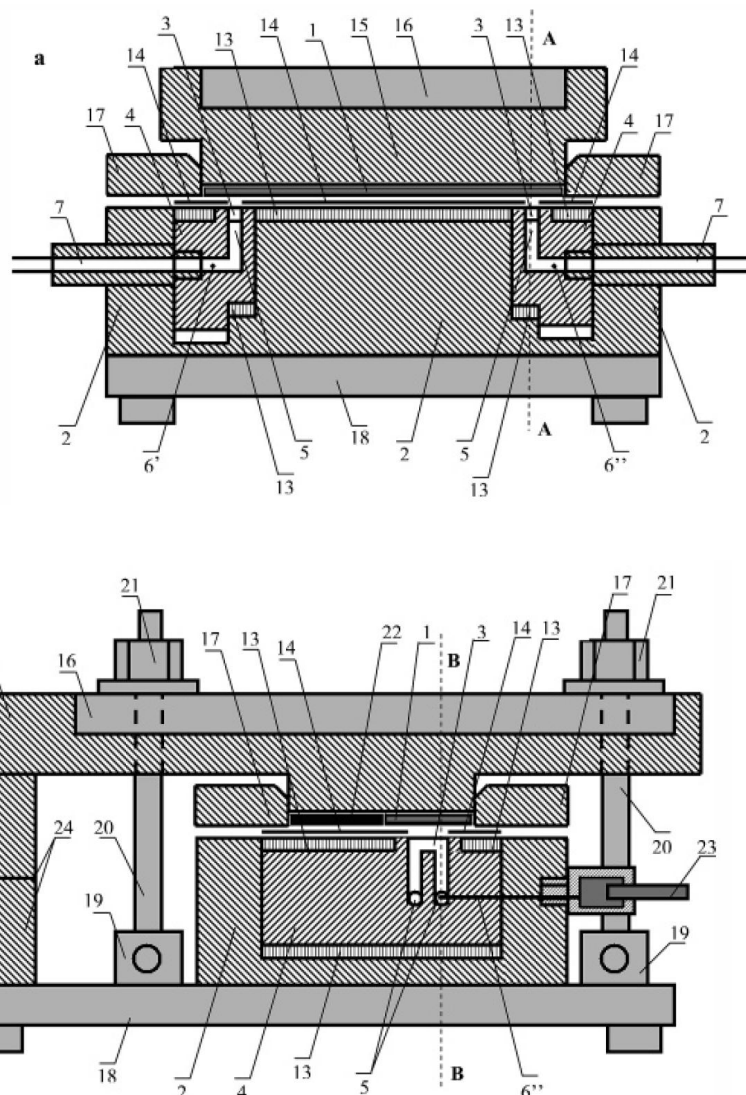
3.6.1. Zasada działania

W niniejszej pracy, do rozwijania elektrochromatogramów planarnych wykorzystano urządzenie, którego głównym elementem była komora do elektrochromatografii planarnej. Komora była zaopatrzona w parę elektrod, do których podłączony był zasilacz wysokonapięciowy, wytwarzający pole elektryczne w obrębie płytki chromatograficznej, znajdującej się w komorze – rys. 14a. Komora do elektrochromatografii planarnej była umieszczona w kabinie zabezpieczającej przed porażeniem prądem elektrycznym. W trakcie procesu mierzono wartość natężenia prądu elektrycznego oraz prędkość przepływu fazy ruchomej. W późniejszej wersji tego urządzenia wykorzystano dodatkowo pompę, która tłoczyła fazę ruchomą przemywającą przestrzeń elektrodową.

3.6.2. Konstrukcja komory do PPEC

Zastosowana komora do elektrochromatografii planarnej jest konstrukcją prototypową. Jej budowa została zgłoszona do Urzędu Patentowego RP (T.H. Dzido, P. Płocharz, P. Ślązak, nr P 376768) [253]. Na poniższym rysunku, rys. 33, przedstawiono szczegółowy przekrój poprzeczny i wzdłużny komory, z uwzględnieniem wszystkich elementów wchodzących w jej skład.

Korpus (2) komory stanowi blok wykonany z Tarnoformu®, który osadzony jest na metalowej płycie (18), wykonanej ze stali hartowanej, odpornej na odkształcenia mechaniczne. W korpusie (2) znajdują się wyprofilowane przestrzenie, w których umieszczone są bloki teflonowe (4). Bloki są osadzone na silikonowej podkładce (3) o grubości 2 mm. Od góry bloki teflonowe (4) oraz korpus komory, w części pomiędzy blokami teflonowymi, są przykryte gumą silikonową (13) (grubość 2 mm i twardość 80 wg skali Shore'a) i folią teflonową (14) o grubość 0,2 mm. Bloki teflonowe (4) są zaopatrzone w kanały (5) doprowadzające/odprowadzające ciecz. Wewnątrz kanałów, w poziomym ich segmencie, znajdują się elektrody (6', 6''), połączone wyprowadzeniami (23) z zasilaczem wysokonapięciowym, rys. 34. W górnej części bloku teflonowego znajduje się korytko (3), posiadające brzegi o wysokości 2 mm. W gumie silikonowej i folii teflonowej są wycięte otwory na to korytko. Folia teflonowa i guma silikonowa są przyciśnięte ramką (17) teflonową, która dopasowana jest do płytki chromatograficznej (1) w komorze. Płytkę chromatograficzną (1) jest umieszczona w komorze warstwą adsorbentu do dołu. Płytkę jest dociskana pokrywą (15, 16) za pomocą pary śrub (20). Pokrywa jest osadzona na wsporniku (24) wykonanym z tego samego materiału, co podstawa komory oraz w górnej części, z płyty metalowej (16), która zapobiega jej odkształcaniu. Śruby (20) są przykręcone do podstawy (19) i są odchylane na boki, po ich poluzowaniu. W późniejszej wersji komory w jej pokrywie zamontowano termoparę do pomiarów temperatury płytki chromatograficznej.

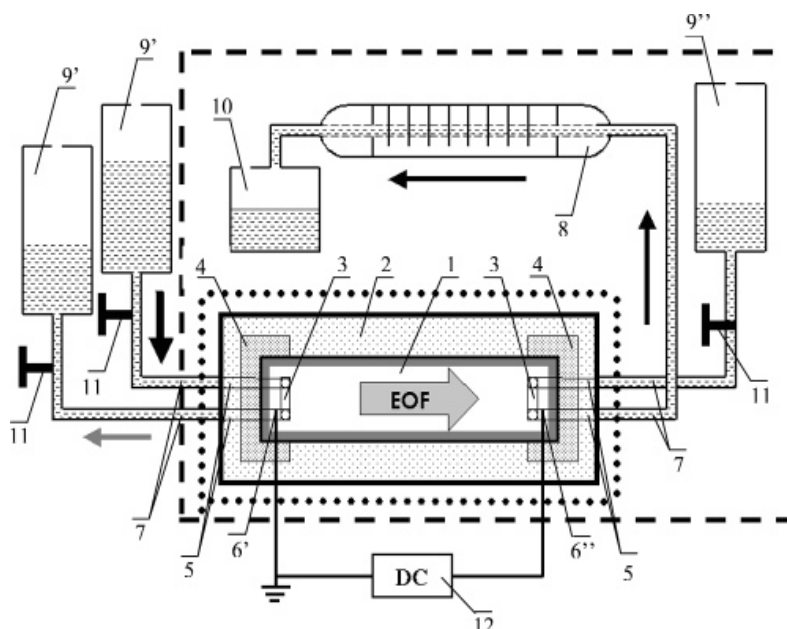


Rys. 33. Przekrój poprzeczny (a) i wzdłużny (b) komory do PPEC; płytka chromatograficzna (1), korpus (podstawa) poliacetalowy komory (2), korytka (3), blok teflonowy (4), kanały fazy ruchomej (5), elektrody (6', 6''), rurka teflonowa (7), guma silikonowa (13), folia teflonowa (14), podstawa pokrywy (15), blok płyty metalowej (16), ramka (17), metalowa podstawa komory (18), mocowanie śrub (19), śruba (20), nakrętka (21), płytka uzupełniająca (22), łącznik elektrodowy (23), wspornik pokrywy (24) [197]

3.6.3. Metodyka rozwijania elektrochromatogramów

Na rys. 34 przedstawiono schematycznie cały układ pomiarowy do elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej. Linia przerywana reprezentuje obudowę komory wraz z wszystkimi elementami, które w trakcie eksperymentu są pod napięciem. Pierwszym etapem wykonania eksperymentu było umieszczenie

płytki chromatograficznej o wymiarach 2x10 cm, wraz z naniesioną próbką substancji, na folii teflonowej w komorze. Płytkę umieszczano w taki sposób by warstwa adsorbentu stykała się z naprzeciwległymi kanałami doprowadzającymi i odprowadzającymi fazę ruchomą. Obok płytki chromatograficznej umieszczano płytkę uzupełniającą (22) o wymiarach 3x10 cm.



Rys. 34. Schemat zestawu do elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej; płytka chromatograficzna (1), korpus (podstawa) poliacyetalowy komory (2), korytko (3), blok teflonowy (4), kanały fazy ruchomej (5), elektrody (6',6''), rurka teflonowa (7), mikropipeta/przepływomierz (8), zbiorniki fazy ruchomej (9,9',9''), zbiornik ścieków fazy ruchomej (10), zawór (11) [197]

Następnie zamykano pokrywę komory i za pomocą klucza dynamometrycznego, śrub (20) z nakrętkami (21) dociskano pokrywę do płytki chromatograficznej z odpowiednią siłą. Siła docisku była ustawiona za pomocą regulatora klucza dynamometrycznego. Bardzo ważne było, aby dokręcanie śrub odbywało się równomiernie z obu stron komory, gdyż wtedy siła docisku była równomiernie rozłożona na całej powierzchni płytek. Kolejnym etapem było wypełnienie kanałów komory roztworem fazy ruchomej, tym samym, który był stosowany do zwilżenia płytki chromatograficznej. Roztwór był dostarczany do kanałów ze zbiorników po stronie anodowej (9') oraz katodowej (9''). Po stronie anodowej znajdowały się dwa zbiorniki ze względu na konieczność przemywania elektrody. W początkowym etapie badań, przemywanie elektrod odbywało się grawitacyjnie – z wykorzystaniem różnicy poziomów cieczy

w zbiornikach. Kierunek przepływu roztworu fazy ruchomej w kanałach jest zaznaczony na rysunku strzałkami. W późniejszej wersji do przemywania zastosowano pompę strzykawkową infuzyjną, która pozwalała na precyzyjne określenie prędkości przepływu fazy ruchomej. Gdy kanały zostały wypełnione roztworem fazy ruchomej, natychmiast przykładano różnicę potencjałów do elektrod w celu rozpoczęcia procesu elektrochromatografii. Komora elektrochromatograficzna była umieszczona w specjalnej obudowie zabezpieczającej, wykonanej z pleksiglasu. Objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej była mierzona za pomocą mikropipety miarowej (8) o poj. 0,2 ml z dokładnością 0,01 ml. Faza ruchoma, która opuściła komorę była zbierana w odbieralniku (10). Czas procesu separacji był mierzony za pomocą cyfrowego stopera laboratoryjnego. W trakcie procesu separacji mierzono wartość natężenia prądu w układzie chromatograficznym.

3.7. Wyznaczanie dystansu migracji substancji nie zatrzymywanej w układzie PPEC

W chromatografii cienkowarstwowej do określenia położenia plamek substancji rozdzielanych wykorzystuje się współczynnik opóźnienia, R_F . Wyznaczenie tego współczynnika wymaga pomiaru dystansu migracji czoła fazy ruchomej i dystansu migracji plamki substancji. Ustalenie pozycji plamek substancji prowadzi się wieloma metodami, które zostały opisane w rozdziale 1.1.2.6. Ustalanie położenia czoła fazy ruchomej nie jest kłopotliwe, ponieważ jest ono bardzo dobrze widoczne na płytce chromatograficznej. W układach PPEC określenie migracji substancji na płytce chromatograficznej wyznacza się takimi samymi metodami jak w klasycznej chromatografii cienkowarstwowej. Jednak bezpośrednie określenie położenia czoła fazy ruchomej nie było możliwe, ponieważ warstwa adsorbentu była kompletnie zwilżona roztworem fazy ruchomej przed procesem separacji. W niniejszej dysertacji wyznaczenie dystansu migracji czoła fazy ruchomej odbywało się przy wykorzystaniu substancji, która nie była zatrzymywana przez fazę stacjonarną. W prezentowanych badaniach tą substancją była sacharoza.

W celu wyznaczenia dystansu migracji czoła fazy ruchomej przeprowadzono serię eksperymentów, w których poddawano procesowi elektrochromatograficznemu próbkę sacharozy. Mierzono objętość fazy ruchomej, V , która w czasie, t , eksperymentu spowodowała migrację substancji na dystansie, d . Znając te parametry

oraz objętościową prędkość przepływu fazy ruchomej, u_V , można było wyznaczyć liniową prędkość przepływu, u_L , (w mm/min). To pozwalało na określenie położenie czoła fazy ruchomej po dowolnym czasie procesu separacji. Lokalizację plamki/strefy sacharozy przeprowadzano poprzez wywoływanie chromatogramu z użyciem odczynnika derywatyzyjnego (5 % H_2SO_4 w etanolu z dodatkiem fenolu).

3.8. Rejestracja chromatogramów i elektrochromatogramów

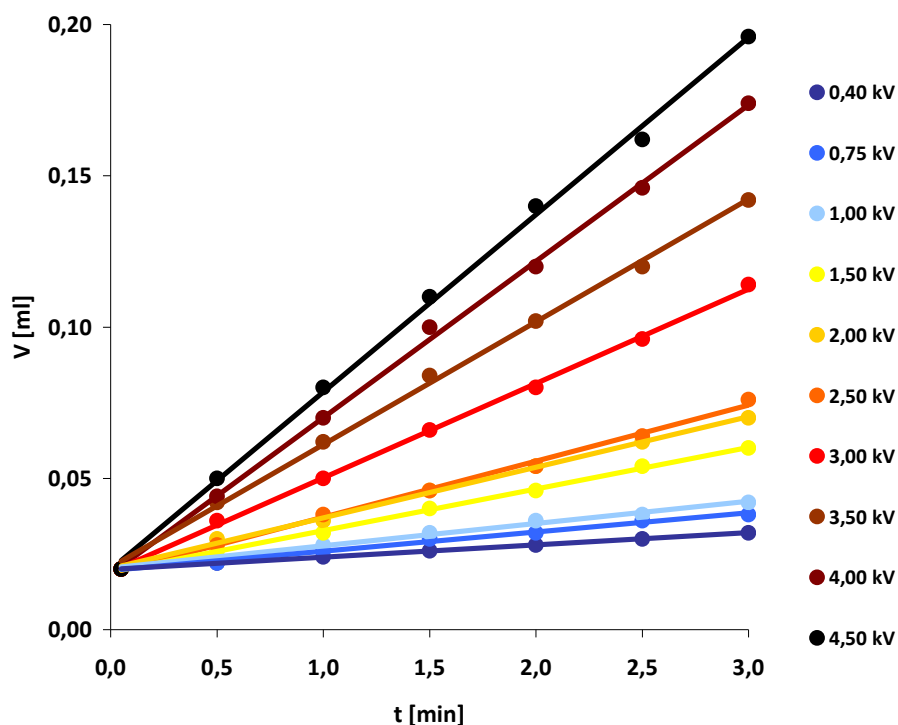
Rejestracja chromatogramów była przeprowadzana przy wykorzystaniu densytometru Tidas TLC 2010, J&M, Aalen, Niemcy. Densytometr był wyposażony w matrycę fotodiodową, która umożliwia pomiar absorpcji światła odbitego od warstwy adsorbentu płytki chromatograficznej, w szerokim zakresie długości fali (191 – 1033 nm) i z wysoką rozdzielczością optyczną (<160 μm) i mechaniczną (<20 μm). Położenie i szerokość plamki substancji wyznaczano na podstawie chromatogramu przy wybranej długości fali. Głównym kryterium wyboru długości fali była maksymalna absorpcja światła, jaką wykazywała substancja.

4. Wyniki i dyskusja

4.1. Czynniki wpływające na przepływ elektroosmotyczny w układach PPEC

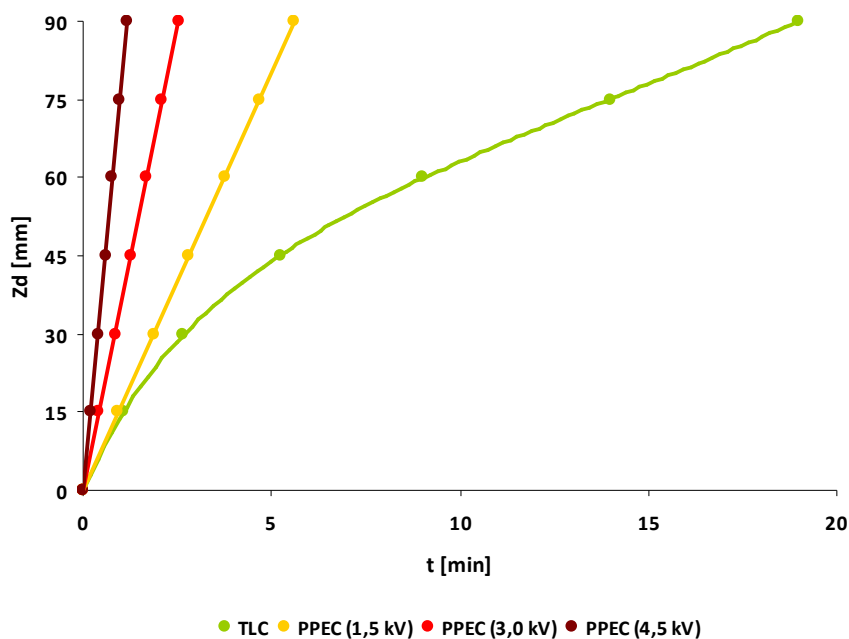
4.1.1. Napięcie polaryzujące

Na rys. 35 zostały przedstawione zależności objętości fazy ruchomej, przepływającej przez płytkę HPTLC RP-18 W, od czasu prowadzenia procesu, dla różnych wartości napięcia polaryzującego. Przyłożenie coraz to wyższej wartości różnicy potencjałów do elektrod wywoływało przepływ większej objętości fazy ruchomej. Przyrost objętości przepływającej fazy ruchomej, w tych samych odstępach czasu, był stały. Uzyskane wartości współczynnika determinacji linii trendu były zbliżone do jedności tj. w zakresie od 0,9918 do 1,0000. Taki przebieg świadczy o stałej szybkości przepływu fazy ruchomej w zależności od czasu.



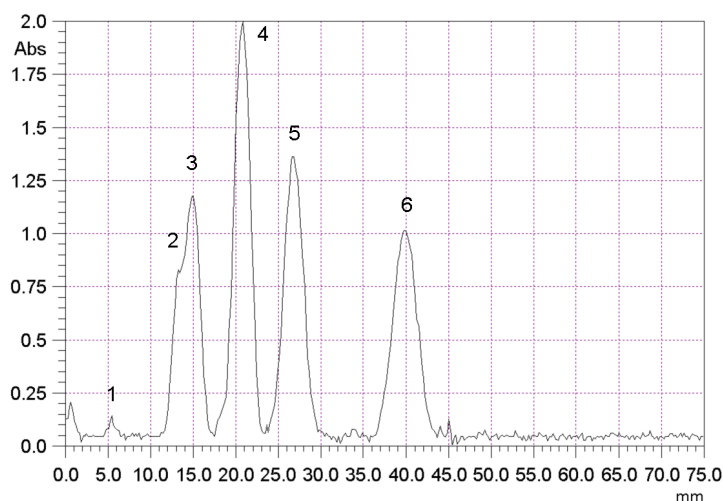
Rys. 35. Zależność objętości fazy ruchomej, przepływającej przez układ PPEC, od czasu prowadzenia procesu, dla różnych wartości napięcia polaryzującego; płytkę HPTLC RP-18 W (Merck); faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym, pH = 5,0 (6,04 mM)

W PPEC prędkość przepływu fazy ruchomej można łatwo zmieniać w szerokim zakresie, np. poprzez zmianę wartości różnicy potencjałów przyłożonej do elektrod. Na rys. 36 została przedstawiona zależność migracji fazy ruchomej, przepływającej przez układ TLC i PPEC, w jednostce czasu, przy różnych wartościach napięcia polaryzującego, przyłożonego do elektrod.

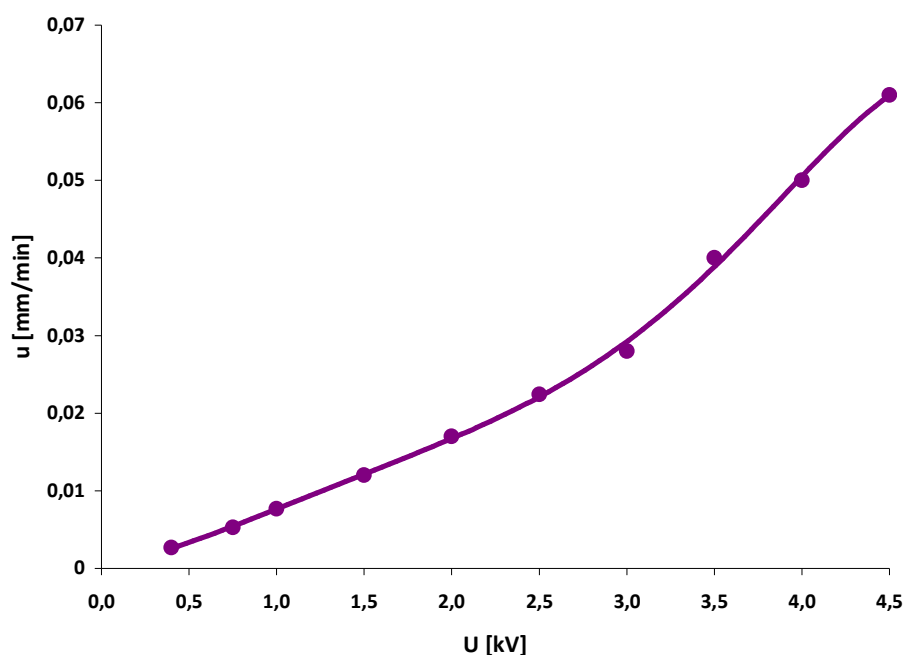


Rys. 36. Dystans migracji fazy ruchomej w funkcji czasu dla układów TLC i PPEC; płytka chromatograficzna HPTLC RP-18 W (Merck), faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym pH = 5,0 (3,0 mM)

Można stwierdzić, że prędkość przepływu fazy ruchomej ulegała zwiększeniu wraz ze wzrostem napięcia polaryzującego. Ponadto, migracja fazy ruchomej, w tym samym układzie chromatograficznym, jest większa w PPEC niż TLC. Największe różnice można zauważyć, gdy dystans migracji fazy ruchomej wynosi kilkadziesiąt mm. Stosując wysokie napięcie polaryzujące można przyspieszyć proces separacji. W takim układzie, czas eksperymentu może być krótszy niż 1 minuta. Na rys. 37, przedstawiony jest przykładowy elektrochromatogram, mieszaniny sześciu barwników w układzie PPEC, uzyskany w ciągu 45 sekund.



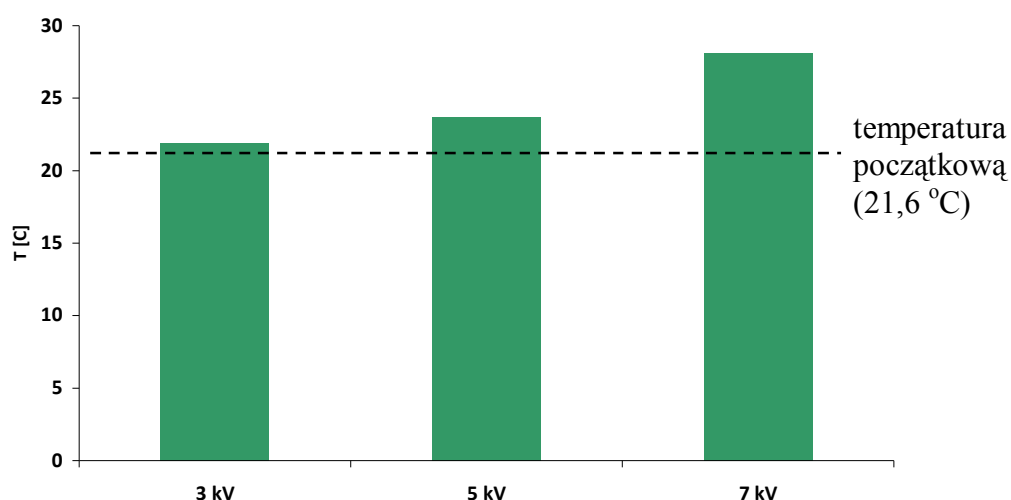
Rys. 37. Elektrochromatogram mieszaniny barwników: Sudan (IV) (1), 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (2), 1-(4-chlorofenylazo)-2-naftol (3), 4-(dietyloamino)-azobenzen (4), 1-(4-hydroksyfenylazo)-2-napftol (5), o-anilina (6); faza stacjonarna: HPTLC RP-18 F (Merck), faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym pH = 6,0, U = 7,0 kV; czas 45 sek



Rys. 38. Prędkość przepływu fazy ruchomej w układzie PPEC z płytką HPTLC RP-18 W (Merck) w zależności od napięcia polaryzującego przykładanego do elektrod; faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym, pH = 5,0 (6,04 mM)

Analizując dane na rys. 38 można zauważyć, że w zakresie niskich wartości napięcia tj. do ok. 2,5 kV, prędkości fazy ruchomej była wprost proporcjonalny do przyłożonego napięcia polaryzującego. Natomiast, przy wyższych wartościach, obserwuje się wzrost przyrostu prędkości przepływu fazy ruchomej. Taki efekt był spowodowany wzrostem temperatury układu. W wyniku tego wzrostu dochodziło do zmniejszenia lepkości fazy ruchomej.

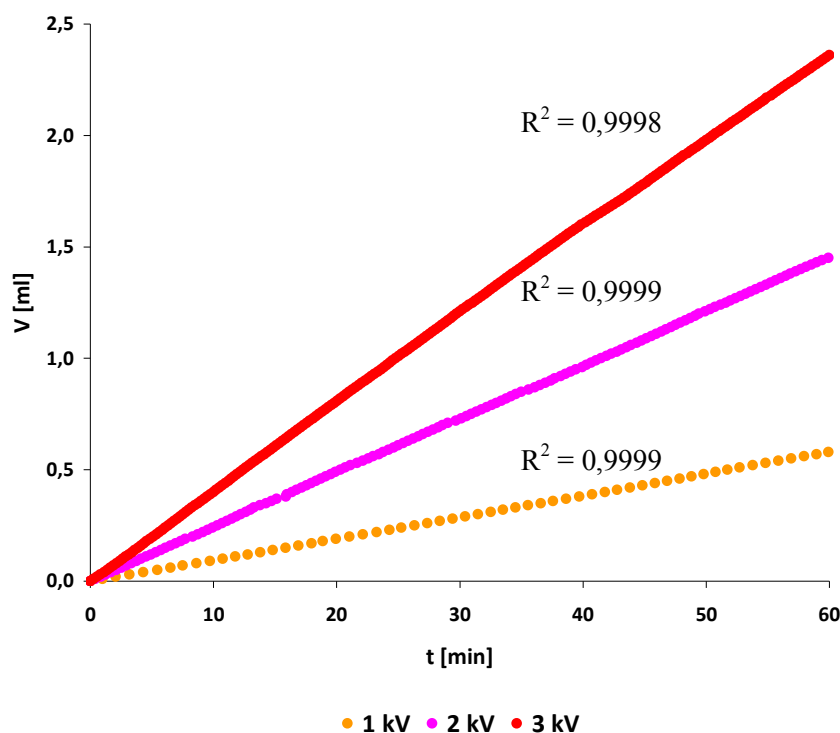
W trakcie prowadzenia procesu separacji zaobserwowano zmianę temperatury płytki chromatograficznej. Na rys. 39 przedstawione są zmiany temperatury płytki chromatograficznej dla różnych wartości napięcia polaryzującego, przykładanego do elektrod.



Rys. 39. Zależność temperatury płytki HPTLC RP-18 W (Merck) od różnicy potencjałów przyłożonej do elektrod; faza ruchoma 50 % acetonitrylu w buforze octanowym, pH = 4,8 (4 mM); czas 10 min

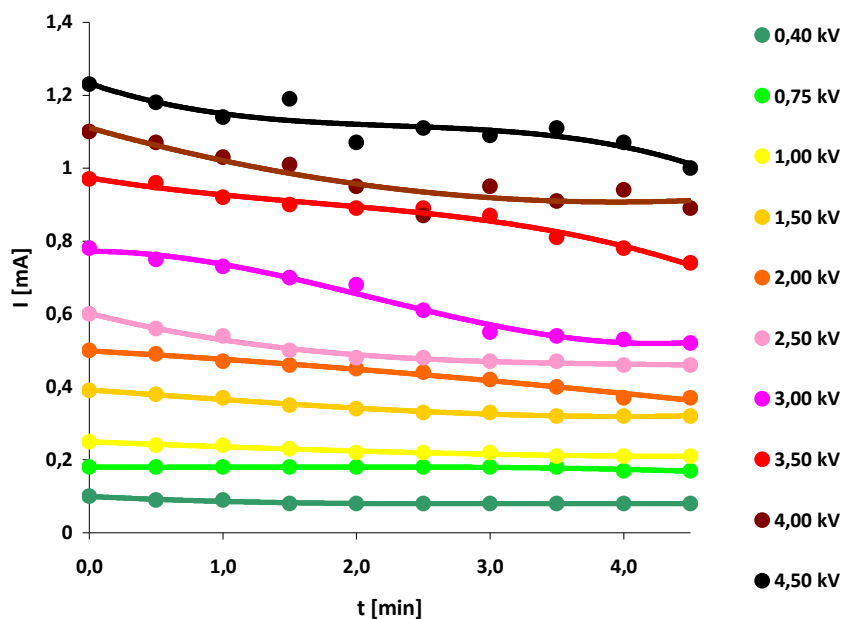
W zakresie niskich napięć tj. do ok. 3,0 kV nie zostały zaobserwowane istotne zmiany temperatury układu rozdzielczego. Natomiast wyższe wartości napięcia polaryzującego generowały większą porcję ciepła i efekt ten jest wyraźnie odzwierciedlony na rys. 39. Dlatego podczas dalszych badań, proces rozdzielania był prowadzony w układzie, w którym wartości napięcia polaryzującego nie przekraczały 3,0 kV. W takich warunkach układ chromatograficzny był stabilny – prędkość przepływu fazy ruchomej była stała, rys. 40

(przyrost objętości przepływającej fazy ruchomej, w tych samych odstępach czasu, był stały, wartości współczynnika R^2 były bliskie jedności).

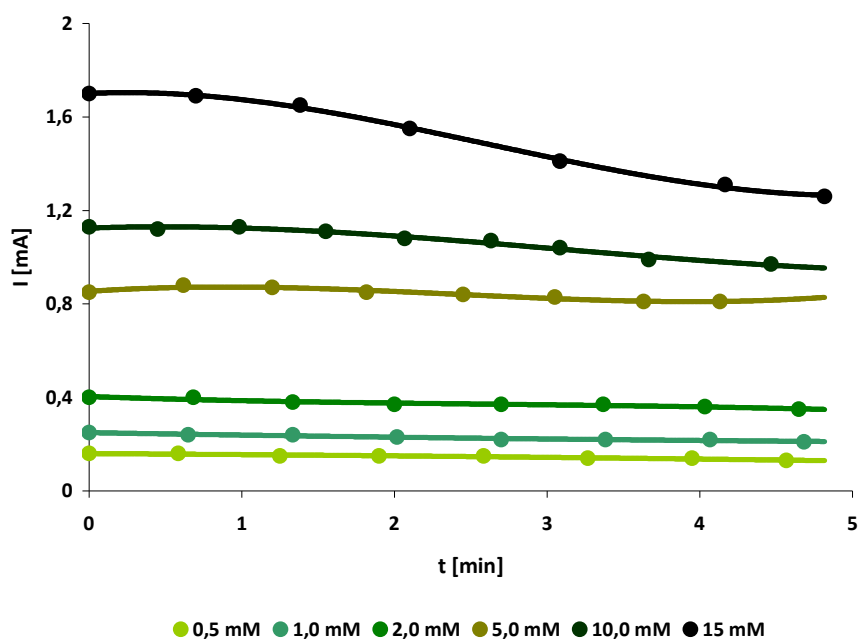


Rys. 40. Zależność objętości fazy ruchomej, przepływającej przez układ PPEC, w czasie jednej godziny, dla wartości napięcia polaryzującego w zakresie 1 – 3 kV; płytka HPTLC RP-18 W (Merck); faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym, pH=5 (6,04 mM)

Na rys. 41 przedstawione są zmiany natężenia prądu przepływającego przez układ rozdzielczy PPEC w czasie dla wybranych wartości różnicy potencjałów przyłożonej do elektrod. Zaobserwowano zmniejszenie wartości natężenia prądu w układzie w trakcie prowadzenia eksperymentu. Największe zmiany wartości prądu zaobserwowano przy napięciu polaryzującym 4,5 kV. Zaobserwowane zmiany natężenia prądu mogą świadczyć, że warunki prowadzenia procesu separacji w układzie PPEC są niestabilne. Ponadto zauważono, że w układzie z roztworem fazy ruchomej o stężeniu buforu mniejszym od 10 mM, końcowa wartość natężenia prądu, w stosunku do początkowej, praktycznie nie ulegała zmianie. Natomiast, gdy stężenie elektrolitu było większa od 10 mM, wtedy obserwowano nieznaczne obniżenie natężenia prądu w trakcie procesu separacji – rys. 42.



Rys. 41. Natężenie prądu przepływającego w układzie z płytką HPTLC RP-18 W (Merck) w zależności od czasu prowadzenia separacji dla różnych wartości różnicy potencjałów przyłożonej do elektrod; faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym, pH = 5,0 (6,04 mM)

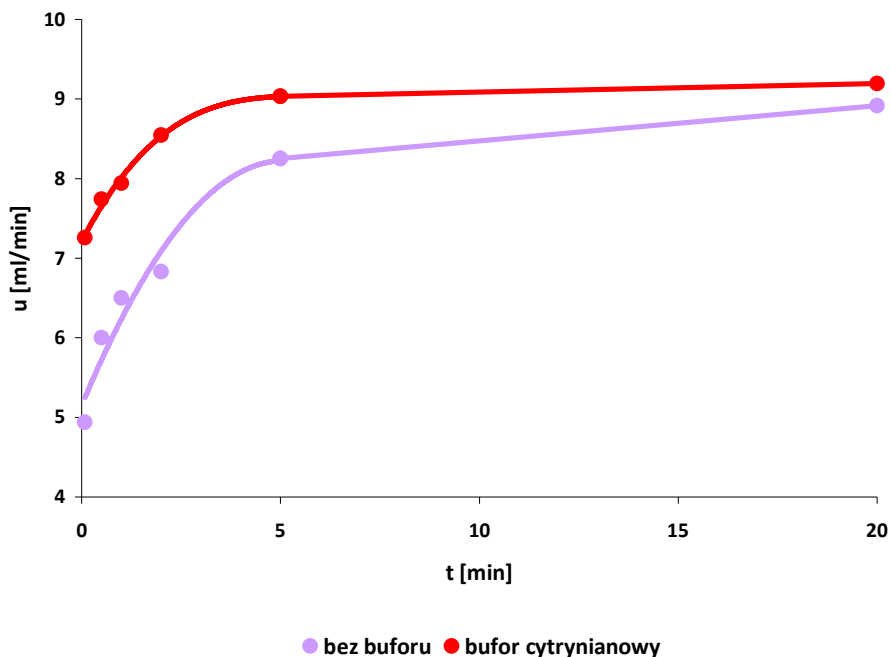


Rys. 42. Natężenie prądu przepływającego w układzie z płytką HPTLC RP-18 W (Merck) w zależności od czasu prowadzenia eksperymentu dla różnych stężeń elektrolitu w fazie ruchomej; 60 % acetonitrylu w buforze octanowym o pH = 4,8

Efekt obniżenia natężenia prądu był spowodowany wzrostem temperatury układu. W zakresie niskich napięć polaryzujących generowane ciepło Joule'a jest bardzo niewielkie. Zaś, kiedy przyłożone napięcie polaryzujące do elektrod było większe, wzrastała temperatura układu, co wywoływało obniżenie natężenia prądu. Ponadto, należy zauważyć, że układ PPEC mógł nie znajdować się w stanie pełnej równowagi fizykochemicznej, gdyż warstwa adsorbentu stosowanych płytek chromatograficznych ulegała ciągłemu przemywaniu świeżą porcją roztworu fazy ruchomej. To mogło prowadzić do wymywania zanieczyszczeń, np. kationów metali warstwy adsorbentu.

4.1.2. Zwilżenie warstwy adsorbentu

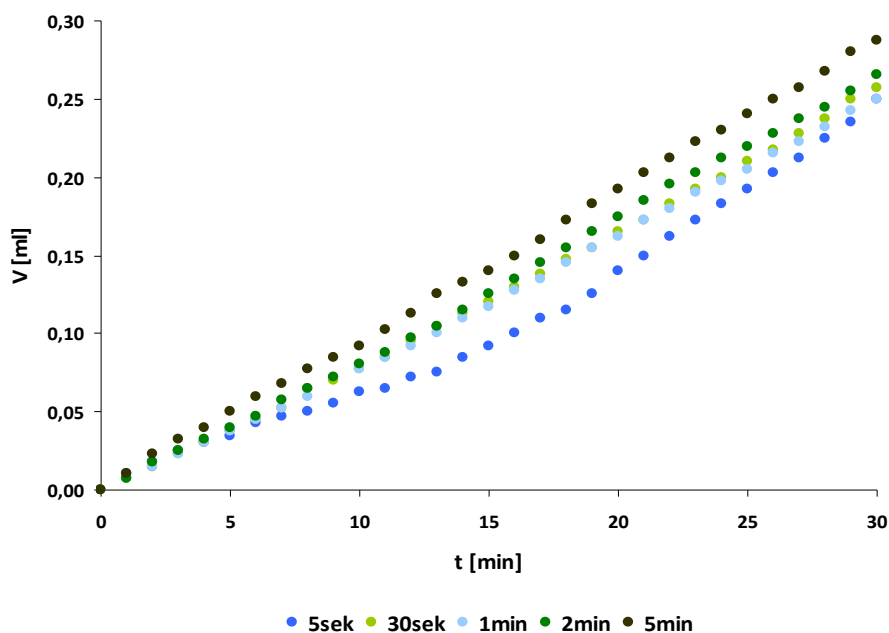
W metodzie PPEC, zwilżona warstwa adsorbentu roztworem fazy ruchomej, przed procesem separacji, zapewnia kontakt elektryczny pomiędzy elektrodami. Jest to warunek konieczny do wytworzenia przepływu elektroosmotycznego fazy ruchomej. Czas tego zwilżania wpływa na ustalanie się równowagi fizykochemicznej roztwór – adsorbent. Na rys. 43 przedstawione są zależności prędkości przepływu fazy ruchomej w funkcji czasu zwilżania warstwy adsorbentu. Warunki prowadzenia eksperymentów tj. napięcie polaryzujące i skład fazy ruchomej, zostały dobrane tak, by efekty termiczne (ciepło Joule'a) nie wpływały na prędkość przepływu fazy ruchomej. Na podstawie tych danych można stwierdzić, że wraz z wydłużeniem czasu kontaktu adsorbentu z roztworem fazy ruchomej, przed eksperymentem, rośnie jej prędkość migracji. Jednakże wzrost ten dotyczy tylko zakresu od 0 do 5 minut. Wydłużanie czasu procesu zwilżania poza ten zakres nie wpływa znacząco na wartość prędkość przepływu fazy ruchomej. W trakcie procesu zwilżania dochodzi do utworzenia równowagi w układzie chromatograficznym pomiędzy fazą stacjonarną i fazą ruchomą. W krótkim czasie zwilżania płytki chromatograficznej, stan równowagi nie jest do końca utworzony. W takim przypadku zaobserwowano wzrost migracji eluentu w trakcie eksperymentu. Podobne wyniki zostały zaprezentowane przez grupę Nuroka. Autorzy przedstawili dane, z których wynika, że zwilżanie warstwy adsorbentu dłużej niż dwie minuty nie wpływa na zmianę dystansu migracji rozdzielanych substancji [195].



Rys. 43. Prędkość przepływu fazy ruchomej w układzie PPEC z płytką HPTLC RP-18 W (Merck) w zależności od czasu równoważenia/zwilżania warstwy adsorbentu; faza ruchoma 50 % acetonitrylu w wodzie lub buforze cytrynianowym, pH = 4,6 (5,85 mM); U = 1,5 kV

Na rys. 44 przedstawiano zależności zmiany objętości fazy ruchomej przepływającej przez układ elektrochromatograficzny od czasu zwilżania płytki chromatograficznej. Jak można zauważyć, zależności uzyskane dla bardziej krótkiego czasu zwilżania warstwy adsorbentu charakteryzują się większym odchyleniem od prostoliniowego przebiegu. Efekt ten jest prawdopodobnie związany z ustalaniem równowagi fizykochemicznej roztwór fazy ruchomej – adsorbent.

W układach, w których czas równoważenia/zwilżania wynosił przynajmniej 5 min, proces elektrochromatograficzny mógł przebiegać od samego początku w warunkach bardzo zbliżonych do stanu równowagi. Co objawiało się uzyskiwaniem jednakowych zmian objętości przepływającej fazy ruchomej w trakcie eksperymentu w tych samych przedziałach czasu, rys. 44. Odpowiednie wydłużenie procesu zwilżania zapewnia jednostajną prędkość przepływu fazy ruchomej podczas całego procesu elektrochromatograficznego.

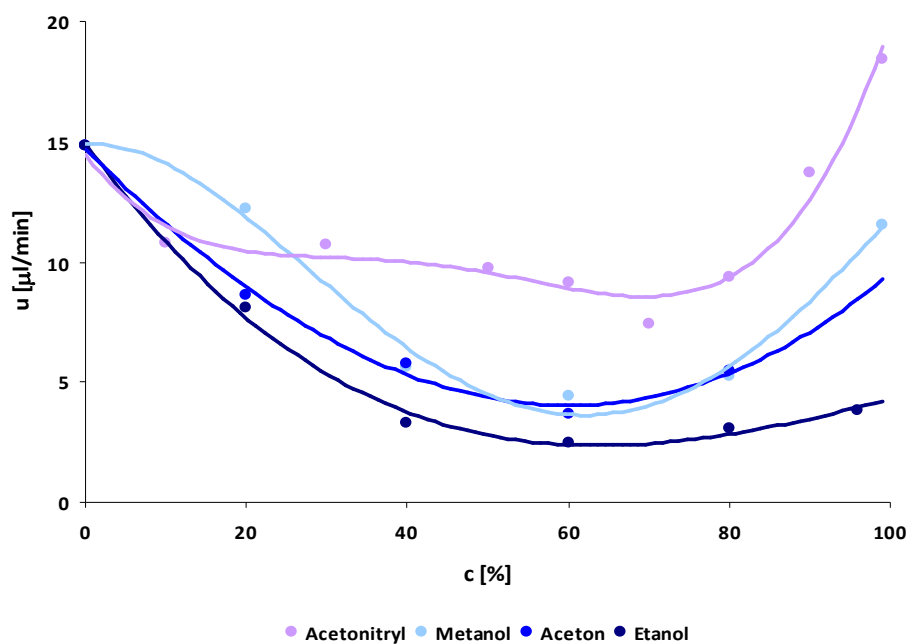


Rys. 44. Zależność objętości fazy ruchomej przepływającej w układzie PPEC od czasu dla różnych czasów zwilżania warstwy adsorbentu płytki HPTLC RP-18 W (Merck); faza ruchoma 50 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym, pH = 4,6 (5,85 mM); U = 1,5 kV

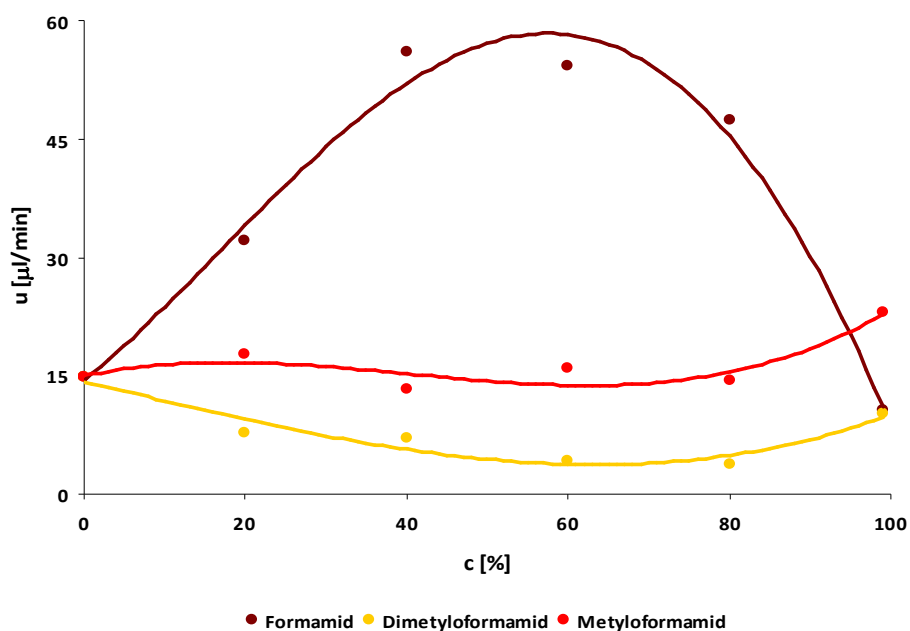
4.1.3. Faza ruchoma

4.1.3.1. Rodzaj i stężenie składnika organicznego fazy ruchomej

Na rys. 45 i 46 zaprezentowane są zależności prędkości przepływu fazy ruchomej od stężenia składnika organicznego w wodzie. Zaobserwowano trzy profile zmiany prędkości przepływu fazy ruchomej badanych układów. W pierwszym typie, krzywe wykazują wyraźne minimum, dla stężenia acetonitrylu, acetonu, metanolu lub etanolu w wodzie w zakresie 60 - 70 % v/v. Drugi rodzaj zależności jest charakterystyczny dla fazy ruchomej składającej się z mieszaniny wody i metyloformamidu lub dimetyloformamidu. Na wykresie są widoczne niewielkie zmiany prędkości przepływu fazy ruchomej w całym zakresie stężenia organicznego składnika. Zupełnie odmienny przebieg zmiany prędkości przepływu jest widoczny w układzie z fazą ruchomą zawierającą formamid. Krzywa zależności $u = f(c)$ wykazuje wyraźne maksimum przy 40 % v/v formamidu.



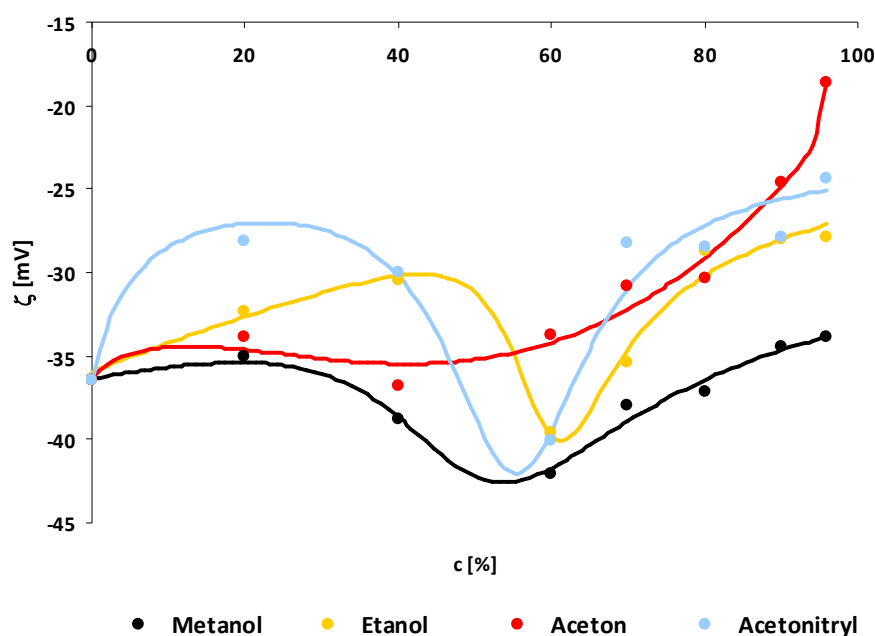
Rys. 45. Prędkości przepływu fazy ruchomej w układzie z płytką HPTLC RP-18 W (Merck), w zależności od stężenia organicznego składnika w mieszaninie z wodą; $U = 2,0 \text{ kV}$



Rys. 46. Prędkości przepływu fazy ruchomej w układzie z płytką HPTLC RP-18 W (Merck), w zależności od stężenia organicznego składnika w mieszaninie z wodą; $U = 2,0 \text{ kV}$

Zmiana prędkości przepływu fazy ruchomej w zależności od stężenia organicznego składnika wynika z właściwości fizykochemicznych jej roztworu. Zgodnie z równaniem Smoluchowskiego, prędkość przepływu elektroosmotycznego jest wprost proporcjonalna do stałej dielektrycznej fazy ruchomej i potencjału elektrokinetycznego na granicy faz ciało stałe – roztwór oraz odwrotnie proporcjonalna do lepkości fazy ciekłej. Wartości lepkości badanych roztworów są przedstawione w części teoretycznej w rozdziale 1.1.4.3. Fazy ruchome zaliczane do pierwszej grupy wykazywały minimum wartości prędkości przepływu na krzywej $u = f(c)$. Co korespondowało z maksimum wartości lepkości tych mieszanin. Podobną zależność można zaobserwować dla mieszanin drugiej grupy. Natomiast faza ruchoma formamid – woda wykazuje najwyższą wartość prędkości przepływu w zakresie wysokich wartości lepkości. Wynika to prawdopodobnie z wysokiej wartości stałej dielektrycznej formamidu tj. 109,5.

Na rys. 47 przedstawiono zależność potencjału elektrokinetycznego układów granicy faz roztwór - ciało stałe, stosowanych również w eksperymentach PPEC niniejszej dysertacji jako układy separacyjne, od procentowej zawartości składnika organicznego w buforze (0 – 96 % v/v).



Rys. 47. Zależność potencjału dzeta od stężenia składnika organicznego w buforze octanowym, pH = 4,8 (4 mM) w układzie z adsorbentem płytki HPTLC RP-18 W (Merck)

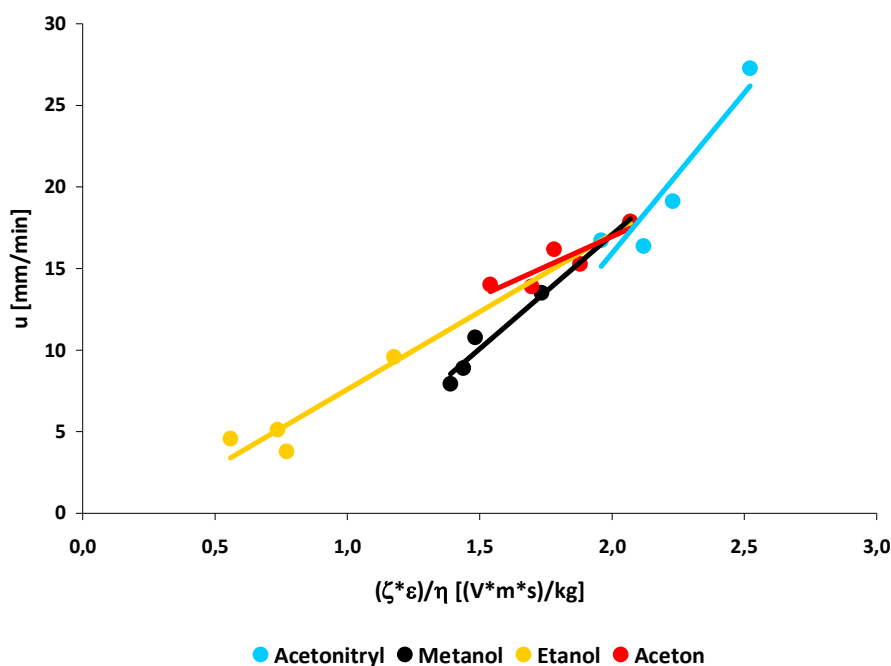
Najwyższe (najbardziej ujemne) wartości potencjału zanotowano dla układów zawierających około 60 % acetonitrylu, metanolu i etanolu oraz 40 % acetonu. Przebieg zmian potencjału ζ w zależności od stężenia komponentu organicznego w fazie ruchomej był nieregularny dla wszystkich badanych układów. Jedynie dla układów, w których faza ruchoma zawierała 96 % składnika organicznego, potencjał elektrokinetyczny wykazywał najmniejsze ujemne wartości (zbliżone do 0).

Przyczyny zmian prędkości fazy ruchomej w funkcji stężenia organicznego komponentu należy doszukiwać się w zmieniających się parametrach fizykochemicznych roztworu. Analizując wartości lepkości stosowanych mieszanin cieczy, z uzyskanymi prędkościami przepływu fazy ruchomej, można zauważyć zbieżność tych wielkości. Mieszaniny wody i organicznego składnika (acetonitryl, acetonu, metanolu, etanolu) charakteryzują się najwyższą lepkością, kiedy stężenie komponentu organicznego wynosi od 40 do 60 %. W tym zakresie stężeń składnika organicznego, faza ruchoma wykazywała najniższe wartości prędkości przepływu elektroosmotycznego.

Porównanie wartości stałej dielektrycznej roztworów fazy ruchomej z wartościami prędkości przepływu nie pozwalało na jednoznaczne określenie wpływu tego parametru, gdyż wartości ϵ maleją ze wzrostem stężenia składnika organicznego w fazie ruchomej. Porównanie wartości potencjału elektrokinetycznego z wartościami prędkości przepływu fazy ruchomej również nie pozwala na pełne wyjaśnienie zmian prędkości przepływu fazy ruchomej, gdyż zmiany wartości ζ w zależności od stężenia składnika organicznego są nieregularne. Co ciekawe, najniższe wartości potencjału dzeta, charakterystyczne dla układów zawierających 96 % organicznego składnika w roztworze, nie korespondują z najwyższymi wartościami prędkościami przepływu elektroosmotycznego tego roztworu jako fazy ruchomej.

Wyjaśnienie zmian prędkości przepływu fazy ruchomej, w zależności od stężenia organicznego modyfikatora, jest możliwe, gdy rozpatruje się jednocześnie wszystkie czynniki mające wpływ na migrację cieczy. Na rys. 48 przedstawiono korelację parametrów fizykochemicznych, ϵ , η , oraz potencjału dzeta ($\epsilon \cdot \eta \cdot \zeta^{-1}$) z przepływem fazy ruchomej układu faza ruchoma – faza stacjonarna. Jak można zauważyć, prędkość przepływu fazy ruchomej jest wprost

proporcjonalna do stosunku (ilorazu) iloczynu stałej dielektrycznej fazy ruchomej i potencjału elektrokinetycznego do lepkości fazy ruchomej. Potwierdzeniem tej obserwacji są, zbliżone do jedności, wartości współczynnika determinacji, R^2 , linii trendu. Dość wysoka korelacja $(\zeta \cdot \varepsilon) / \eta$ i prędkości przepływu fazy ruchomej dowodzi, że równanie Smoluchowskiego jest spełnione dla układów PPEC.

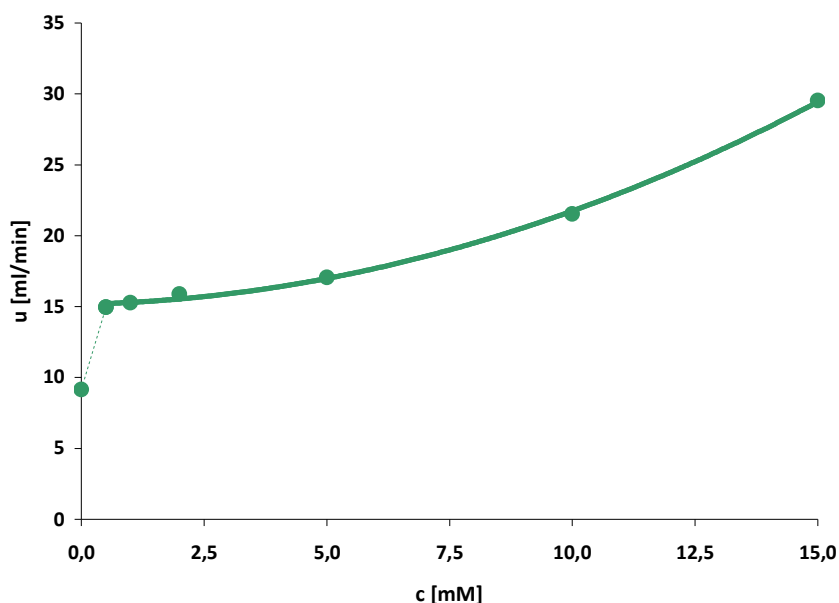


Rys. 48. Zależność przepływu elektroosmotycznego fazy ruchomej od stosunku (ilorazu) iloczynu stałej dielektrycznej i lepkości fazy ruchomej do potencjału dzeta w układach PPEC; płytką HPTLC RP-18 W (Merck); faza ruchoma: bufor octanowy pH = 4,8 (4 mM) w rozpuszczalniku organicznym o stężeniu 20 – 96 %

4.1.3.2. Rodzaj i stężenie buforu w fazie ruchomej

Na rys. 49 przedstawiono zmiany prędkości przepływu fazy ruchomej, w układzie PPEC, w zależności od stężenia elektrolitu w fazie ruchomej. Prędkość migracji fazy ruchomej wzrasta wraz ze wzrostem stężenia elektrolitu. Podobny przebieg zależności został zaobserwowany również dla innych technik elektromigracyjnych m.in. elektrochromatografii kapilarnej [139], elektrochromatografii planarnej w układzie otwartym [183] i zamkniętym [195]. Interpretacja omawianej zależności jest bardziej skomplikowana, ponieważ kilka czynników, wpływających na prędkość przepływu, zależy od stężenia elektrolitu,

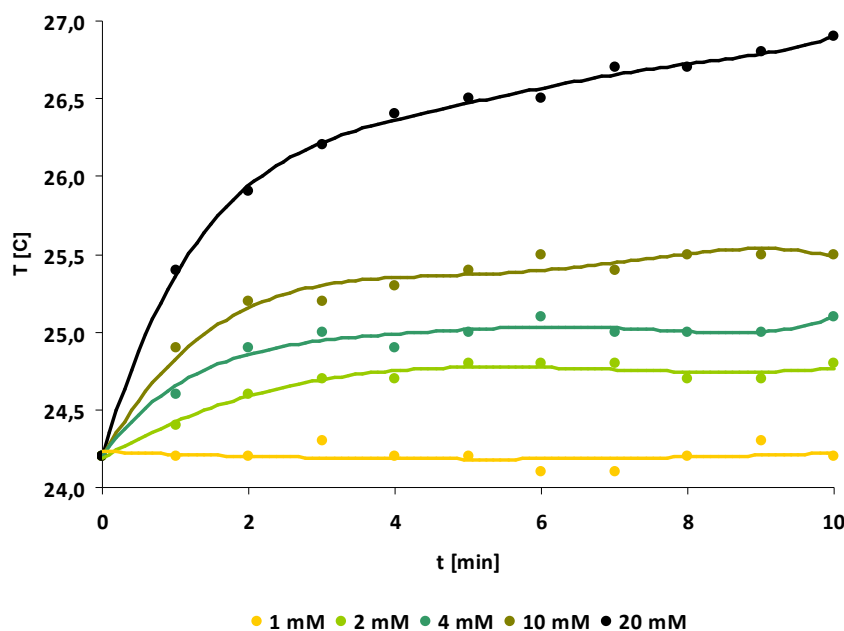
np. potencjał elektrokinetyczny i grubość podwójnej warstwy elektrycznej. Na podstawie doświadczeń elektrochromatografii kapilarnej można pokusić się o wyjaśnienie tego zjawiska w układach PPEC [98,99,254,255].



Rys. 49. Prędkość przepływu fazy ruchomej, w układzie PPEC z płytką HPTLC RP-18 W (Merck), w zależności od stężenia buforu; faza ruchoma 60 % acetonitrylu w buforze octanowym pH = 4,8 (4 mM); U = 2,0 kV

Zgodnie z równaniem 18, grubość podwójnej warstwy elektrycznej maleje wraz ze wzrostem stężenia elektrolitu. Prowadzi to do zmniejszenia potencjału elektrokinetycznego, co w konsekwencji powinno spowodować osłabienie efektu elektroosmotycznego wraz ze zwiększeniem stężenia buforu. Jednak jak wynika z badań tak nie jest, ponieważ prędkość ta zwiększa się. W badanych układach, w trakcie procesu elektroosmozy, zachodzą dwa efekty: wydzielanie ciepła Joule'a oraz nakładanie się podwójnej warstwy elektrycznej w przestrzeniach międzyziarnowych. Wpływ tych efektów na przepływ elektroosmotyczny jest względem siebie przeciwstawny. Jednakże przy bardzo małych średnicach kapilar międzyziarnowych efekt zmniejszenia grubości warstwy może mieć korzystny wpływ na przepływ elektroosmotyczny. Ponadto z powodu powolnego odprowadzania ciepła przez szklaną podstawę płytki chromatograficznej dochodzić może do podwyższenia temperatury fazy ciekłej w trakcie procesu separacji,

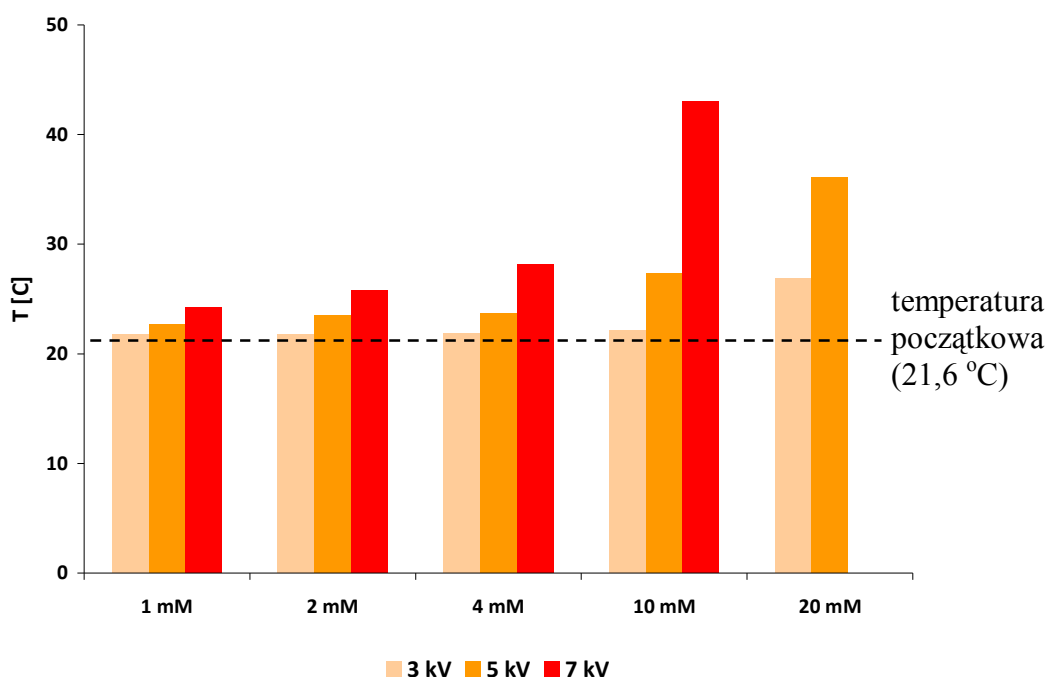
co potwierdzają dane przedstawione na rys. 50. Temperatura układu rośnie wraz ze wzrostem stężenia buforu. Efekt ten wywołuje stopniowe zmniejszenie lepkości cieczy. W konsekwencji faza ruchoma może migrować szybciej w przestrzeniach międzyziarnowych.



Rys. 50. Zmiana temperatury płytki chromatograficznej w zależności od czasu procesu elektrochromatograficznego dla różnych wartości stężenia buforu w fazie ruchomej; płytki HPTLC RP-18 W (Merck); faza ruchoma 50 % acetonitrylu w buforze octanowym o pH = 4.8; U = 2,0 kV

Na rys. 51 przedstawiono końcową temperaturę płytki chromatograficznej w układzie PPEC po 10 minutach procesu rozdzielania, w zależności od stężenia elektrolitu fazy ruchomej dla określonych wartości różnicy potencjałów przyłożonej do elektrod (3,0, 5,0 i 7,0 kV). Z przedstawionych danych wynika, że efekt termiczny miał większy wpływ na przepływ fazy ruchomej, w układach o wysokich stężeniach elektrolitu, rzędu kilkudziesięciu milimoli/litr. Udział efektu termicznego jest jeszcze większy w układach, w których przyłożona jest wysoka różnica potencjałów, rzędu 5,0 kV lub więcej. W układzie, w którym stężenie roztworu buforowego wynosiło 20 mM, zanotowano zwiększenie temperatury do około 40 °C. W takich warunkach przeprowadzenie procesu rozdzielania było bardzo ograniczone lub niemożliwe, gdyż obserwowano duże wahania przepływu fazy ruchomej, któremu towarzyszyły gwałtowne zmiany wartości natężenia prądu oraz wydzielanie

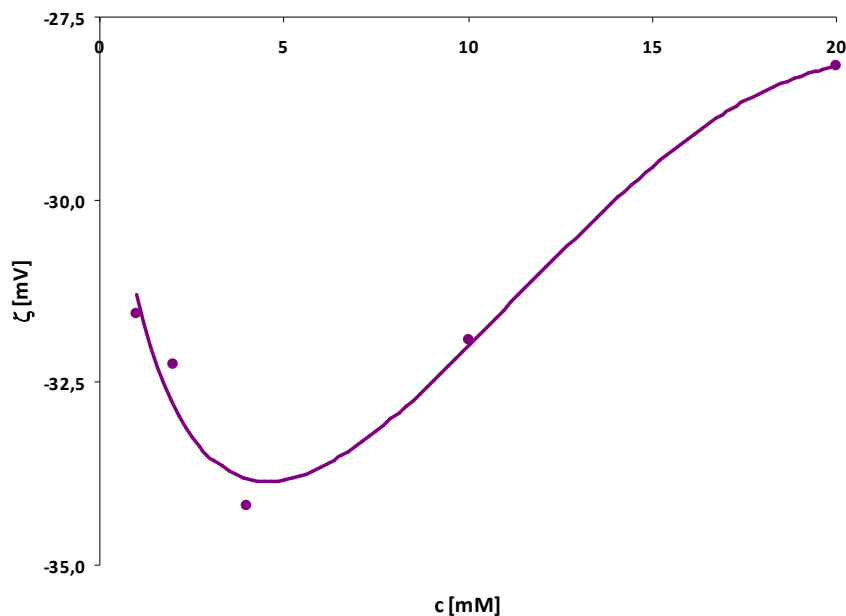
się pęcherzyków gazu wokół elektrod. W układzie, w którym stężenie elektrolitu wynosiło 20 mM, a różnica potencjałów przyłożona do elektrod 7,0 kV, temperatura płytki osiągała wartość 30,7 °C, po 1 min eksperymentu. Podczas, gdy w analogicznym układzie z buforem o stężeniu 1 mM – 22,3 °C, przy temperaturze początkowej w obu przypadkach 21,6 °C. Podobne zjawisko zanotowano dla układów elektrochromatografii kapilarnej [192].



Rys. 51. Temperatura płytki HPTLC RP-18 W (Merck) po 10 minutach procesu elektrochromatograficznego w zależności od stężenia elektrolitu dla różnych wartości napięcia polaryzującego; faza ruchoma 50 % acetonitrylu w buforze octanowym, pH = 4,8, czas 10 min

Innym ważnym efektem wpływającym na przepływ elektroosmotyczny jest nakładanie się podwójnych warstw elektrycznych. Grubość podwójnej warstwy elektrycznej zależy od siły jonowej (stężenia) elektrolitu zgodnie z wcześniej podanym równaniem (19). Stężenie elektrolitu w fazie ruchomej również wpływa na wartość potencjału dzeta. Oba parametry są związane równaniem (20).

Na rys. 52 przedstawiono zmianę wartości potencjału elektrokinetycznego podwójnej warstwy elektrycznej w zależności od stężenia elektrolitu w fazie ruchomej dla układu roztwór acetonitrylu w buforze octanowym – adsorbent płytki chromatograficznej HPTLC RP 18W (Merck).

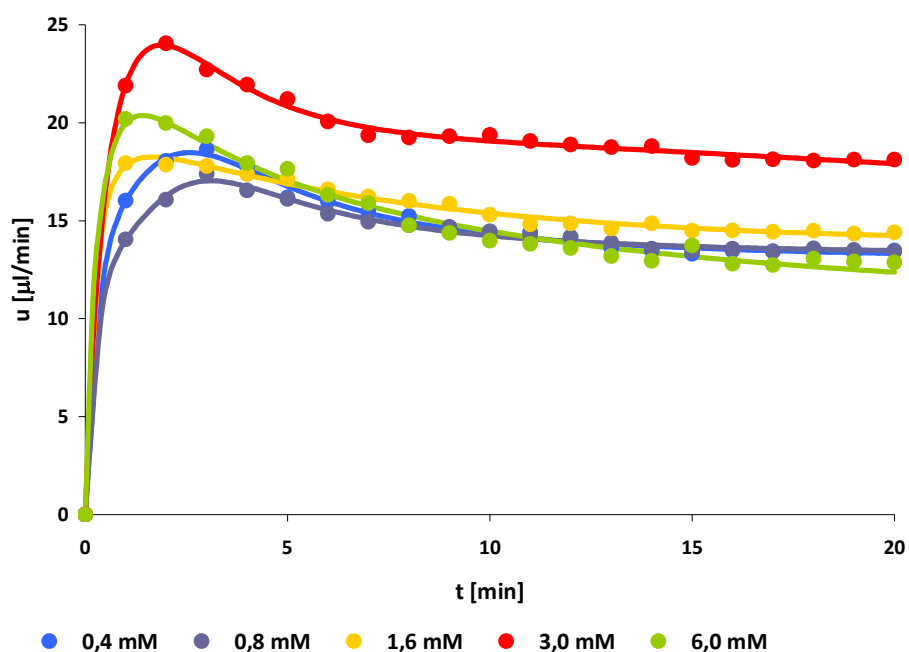


Rys. 52. Potencjał dzeta w funkcji stężenia elektrolitu w fazie ruchomej: 50 % acetonitrylu w buforze octanowym, pH = 4,8, faza stała: adsorbent płytki HPTLC RP-18 W (Merck)

Analizując zmiany potencjału elektrokinetycznego, zaobserwowano wzrost potencjału dzeta w stronę ujemnych wartości w zakresie niskiego stężenia buforu w fazie ruchomej. Zaś, gdy stężenie elektrolitu było większe niż 4 mM, zaobserwowano zmniejszenie wartości ζ (potencjał dzeta mniej ujemny). Zjawisko obniżania potencjału elektrokinetycznego wraz ze wzrostem stężenia elektrolitu jest znane i głównie spowodowane przez zmniejszenie grubości podwójnej warstwy elektrycznej. Dlatego też zjawisko nakładania się podwójnych warstw elektrycznych zachodzi w większym stopniu przy niskich stężeniach elektrolitu, gdyż grubość podwójnej warstwy zwiększa się w odpowiedzi na mniejsze stężenie jonów w fazie ruchomej.

Niektóre substancje pochodzenia organicznego, wchodzące w skład buforu, mogą oddziaływać z grupami funkcyjnymi fazy stacjonarnej, prowadząc do jej modyfikacji i w konsekwencji do zmiany przepływu elektroosmotycznego. Takie zjawisko zaobserwowano w układach z płytkami HPTLC RP-18W (Merck) i fazą ruchomą 20 % acetonitrylu w wodnym roztworze buforu TRIS.

Na rys. 53 zostały zaprezentowane zależności prędkości przepływu elektroosmotycznego fazy ruchomej od czasu prowadzenia procesu PPEC dla różnych wartości stężenia buforu TRIS (mieszanina 2-amino-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiolu i kwasu solnego).



Rys. 53. Prędkość przepływu elektroosmotycznego fazy ruchomej w zależności od czasu dla różnych wartości stężenia buforu TRIS; płytka HPTLC RP-18 W (Merck), faza ruchoma: 20 % acetonitrylu w buforze TRIS, pH = 8,0

Zaobserwowane zmiany prędkości przepływu elektroosmotycznego fazy ruchomej dla każdego układu zawierającego ten elektrolit są charakterystyczne. W ciągu pierwszych 2 – 3 minut biegu eksperymentu przepływ elektroosmotyczny fazy ruchomej osiągał wartość najwyższą, po czym stopniowo ulegał zmniejszeniu, by osiągnąć stałą wartość po 10 – 15 min. Zmniejszenie prędkości migracji fazy ruchomej, prawdopodobnie jest konsekwencją stosunkowo silnych oddziaływań cząsteczek 2-amino-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiolu (TRIS) z fazą stacjonarną C18 na bazie żelu krzemionkowego. Cząsteczka 2-amino-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiolu zawiera jedną grupę aminową, która w roztworze wodnym, badanego układu, posiada ładunek dodatni, pochodzący od grupy $-NH_3^+$, o przeciwnym znaku niż ładunek na powierzchni fazy stacjonarnej. Ponadto, cząsteczka TRIS zawiera trzy

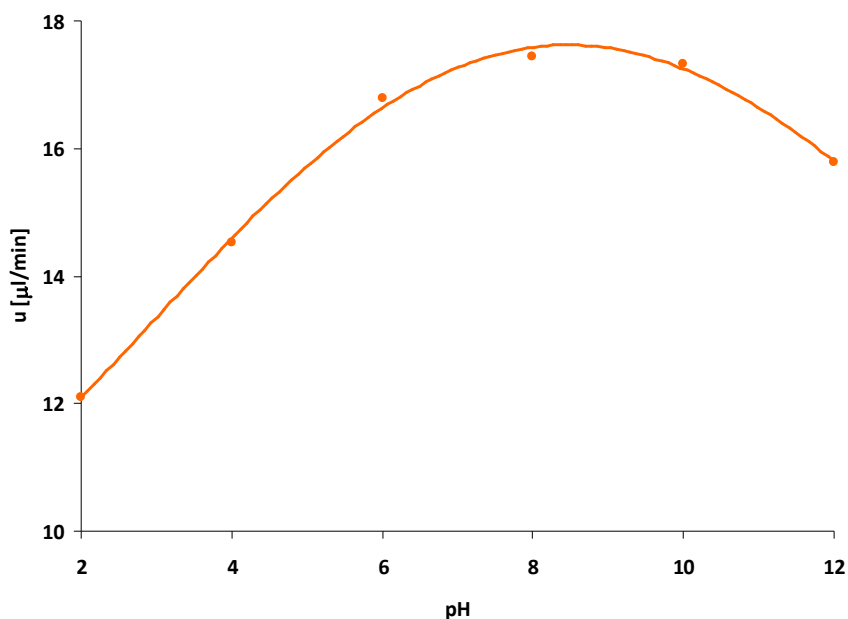
grupy hydroksylowe, które mogą silnie oddziaływać, poprzez tworzenie wiązania wodorowego, z silanolowymi grupami fazy stacjonarnej. Efektem tych oddziaływań może być adsorpcja cząsteczek TRIS i zmniejszenie gęstości ujemnego ładunku powierzchni adsorbentu. Co ostatecznie przyczynia się do zmniejszania efektu elektroosmotycznego w czasie trwania procesu. Dlatego też w przypadku układów z fazą stacjonarna typu C18, i roztworem fazy ruchomej, w której elektrolitem jest związek organiczny o złożonej budowie cząsteczkowej, należy zwracać szczególną uwagę na odpowiednie jego stężenie i dobór właściwego czasu doprowadzania do stanu równowagi.

W trakcie badań zaobserwowano ograniczenia zastosowania niektórych buforów. Zauważono zmętnienia roztworów lub pojawienie się drobnokrystalicznego osadu. Zmiany wyglądu fazy ruchomej wynikały ze zmniejszonej rozpuszczalności związków nieorganicznych w mieszaninie wodno – organicznej, szczególnie w układach o wysokim stężeniu organicznego modyfikatora w fazie ruchomej.

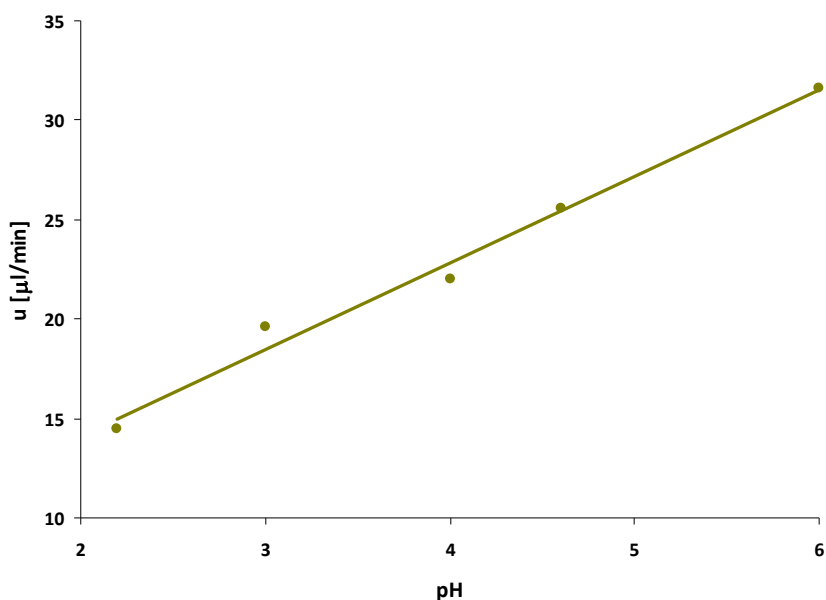
4.1.3.3. pH buforu

Prędkość przepływu fazy ruchomej w układach PPEC zależy od pH ośrodka ciekłego (fazy ruchomej), gdyż kwasowość roztworu istotnie wpływa na powstawanie podwójnej warstwy elektrycznej na granicy faz ruchomej i stacjonarnej. W niniejszej pracy zbadano wpływ pH roztworu buforowego na przepływ elektroosmotyczny fazy ruchomej.

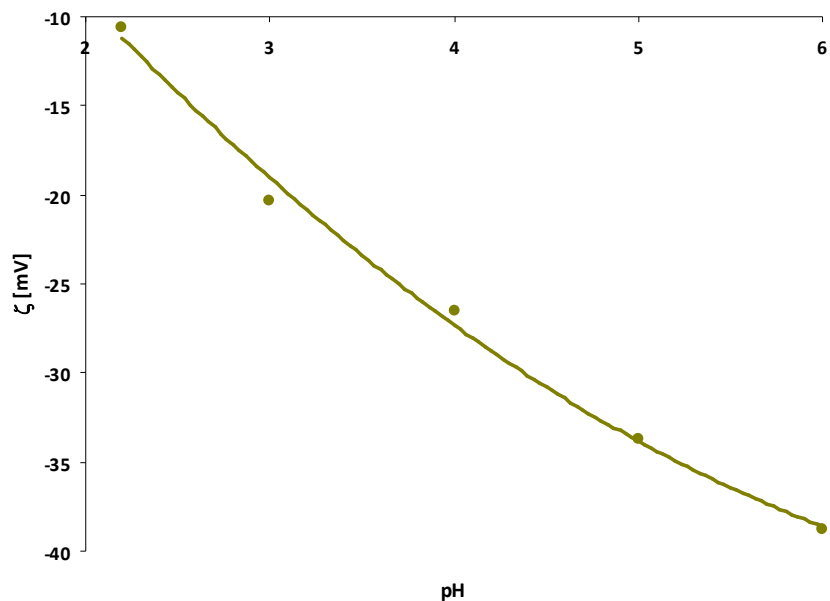
Powyższą dyskusję potwierdzają dane rys. 56, na którym przedstawiono zmierzone wartości potencjału elektrokinetycznego granicy faz ruchomej i stacjonarnej w zależności od pH buforu. Analizując uzyskane zmiany można jednoznacznie stwierdzić, że potencjał elektrokinetyczny przyjmuje wartości bardziej ujemne, gdy pH buforu ulegało zwiększeniu. Ten efekt jest wynikiem zwiększenia stopnia dysocjacji grup silanolowych ze wzrostem pH. Zwiększona jonizacja powierzchniowych grup –SiOH generowała większy przepływ fazy ruchomej w polu elektrycznym, rys. 54, 55. Natomiast, gdy pH buforu było niskie (pH ~ 2,0), prędkość przepływu fazy ciekłej osiągała wartość najmniejszą. Co świadczyło o występowaniu częściowej jonizacji grup powierzchniowych fazy stacjonarnej.



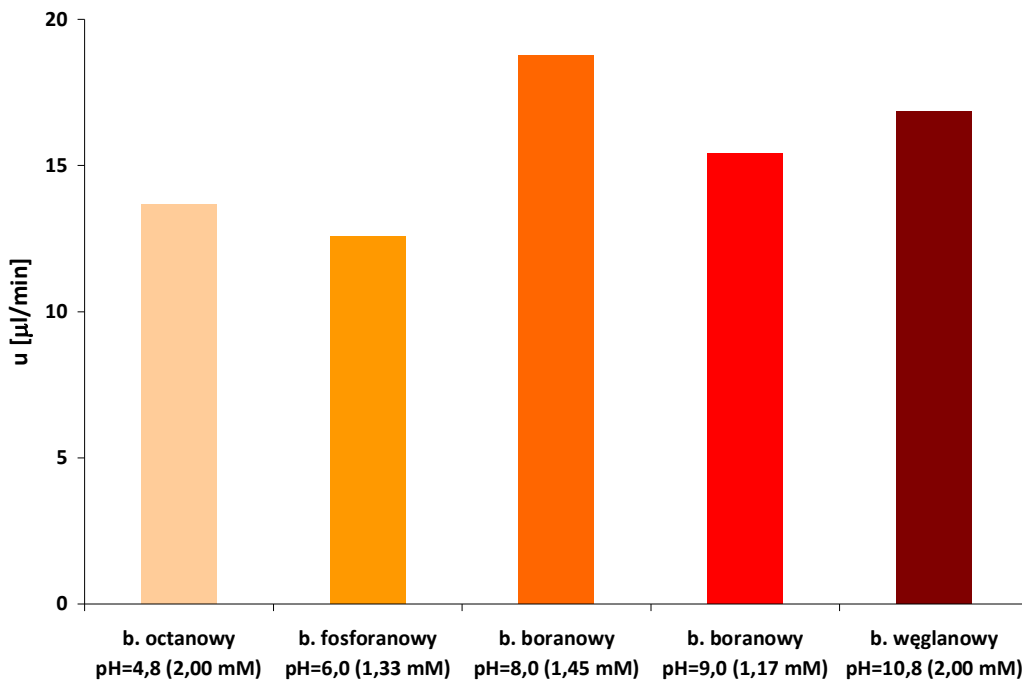
Rys. 54. Przepływ elektroosmotyczny fazy ruchomej w funkcji pH buforu, płytka HPTLC RP-18 W (Merck); faz ruchoma 20 % acetonitrylu w buforze (1 mM): fosforanowym (pH = 2,0), cytrynianowym (pH = 4,0 i 6,0), boranowym (pH = 8,0 i 12,0), węglanowym (pH = 10,0); U = 2,5 kV



Rys. 55. Przepływ elektroosmotyczny fazy ruchomej w funkcji pH buforu cytrynianowego, płytka TLC RP-18 F (Merck), faz ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym, c = 2,04 – 3,25 mM (pH = 2,2 – 6,0); U = 2,5 kV



Rys. 56. Potencjał elektrokinetyczny w zależności od pH buforu w układzie z fazą stacjonarną płytki HPTLC RP-18 W (Merck); faza ruchoma 50 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym, $c = 2,04 - 3,25 \text{ mM}$ ($\text{pH} = 2,2 - 6,0$)



Rys. 57. Wartości prędkości przepływu elektroosmotycznego fazy ruchomej w układach z płytkami HPTLC RP-18 W (Merck) i różnymi roztworami buforowymi; faza ruchoma: 20 % metyloformamidu w buforze; $U = 2,0 \text{ kV}$

Prędkość przepływu elektroosmotycznego fazy ruchomej została zbadana dla różnych rodzajów elektrolitu (buforu). Na rys. 57 przedstawiono prędkość przepływu fazy ruchomej w układach PPEC w zależności od rodzaju buforu, o tym samym lub zbliżonym stężeniu elektrolitu.

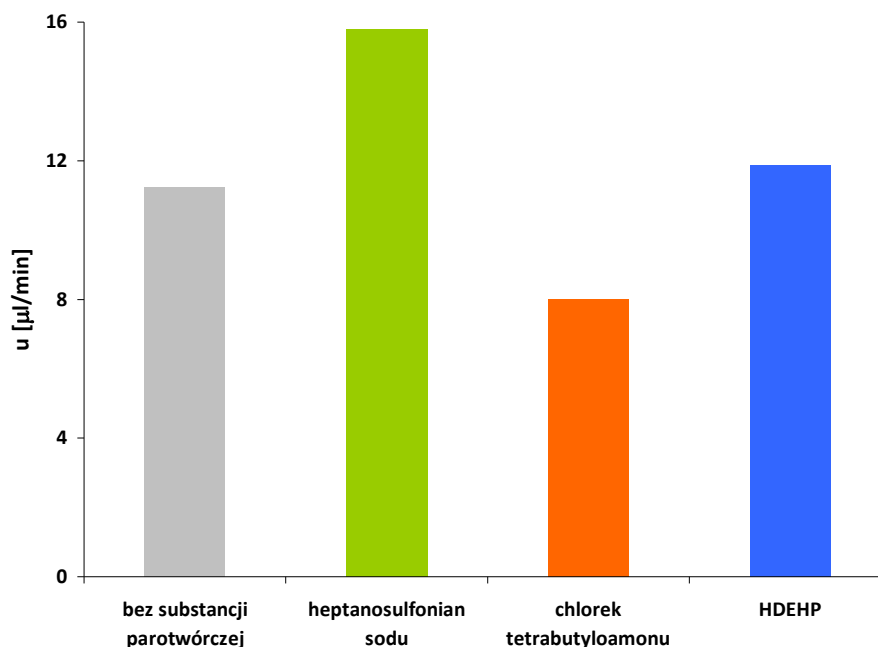
4.1.3.4. Dodatek odczynnika jonowo-asocjacyjnego

Do fazy ruchomej układów chromatografii cieczowej, np. HPLC, często dodawane są składniki tworzące pary jonowe (kompleksy solwatacyjne) z rozdzielanymi substancjami, występującymi w formie zdysocjowanej [256]. W takich warunkach substancje rozdzielane wykazują zmienioną retencję i selektywność [257]. Tego typu układy rozdzielcze (jonowo-asocjacyjne) mogą być również zastosowane w elektrochromatografii planarnej. Jednakże w takiej sytuacji obecność odczynnika jonowo-asocjacyjnego może wpływać na przepływ elektroosmotyczny w wyniku adsorpcji na fazie stacjonarnej. W niniejszej pracy zostały podjęte badania mające na celu określenie wpływu tych składników na przepływ elektroosmotyczny fazy ruchomej. Do badań wykorzystano trzy związki: sól sodową kwasu heptanosulfonowego, chlorek tetrabutylamonowy i kwas di-(2-etyloheksylo)-fosforowy (HDEHP).

Na rys. 58 przedstawione zostały wartości przepływu fazy ruchomej, zawierającej wymienione składniki „parotwórcze” w układzie z adsorbentem płytki HPTLC RP-18 W (Merck). Na podstawie diagramu można zauważyć, że obecność substancji tworzących pary jonowe w roztworze fazy ruchomej wpływa na prędkość przepływu elektroosmotycznego w stosunku do układu nie zawierającego tych substancji.

Dodatek heptanolulfonianu sodu, o stężeniu 4 mM, do fazy ruchomej spowodował wzrost prędkości migracji o ok. 40% w stosunku do układu nie zawierającego substancji „parotwórczej”. Adsorpcja tej substancji na niepolarną fazę stacjonarną (RP-18) zwiększa gęstość ładunku ujemnego powierzchni adsorbentu i wzrost ujemnej wartości potencjału elektrokinetycznego. W konsekwencji wartość generowanego przepływu elektroosmotycznego fazy ruchomej jest większa. Podobny efekt obserwuje się, gdy w fazie ruchomej znajduje się kwas di-(2-etyloheksylo)-fosforowy. Jednakże, wzrost wartości przepływu elektroosmotycznego nie jest taki duży, jak w przypadku dodatku heptanosulfonianem sodu. Zawartość HDEHP w fazie ruchomej była dwukrotnie

mniejsza niż heptanosulfonianu sodu i wynosiła 2 mM. Niższe stężenie tej substancji było wymuszone z powodu ograniczonej jej rozpuszczalność w fazie ruchomej.



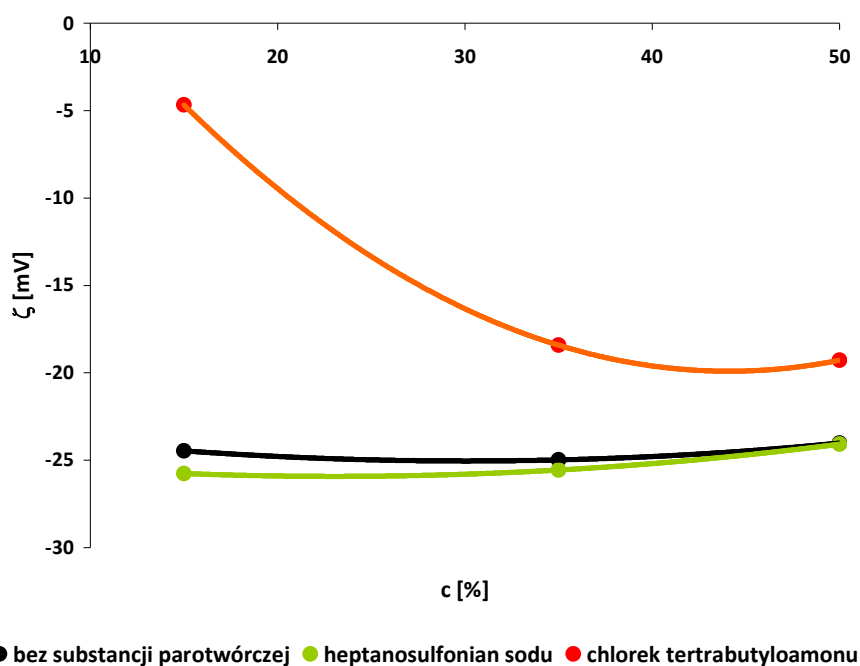
Rys. 58. Wartości prędkości przepływu fazy ruchomej w układach złożonych z płytki HPTLC RP-18 W (Merck) i fazy ruchomej: 25 % acetonitrylu w buforze octanowym pH = 4,6 (4 mM) z dodatkiem substancji „parotwórczej” (heptanosulfonian sodu, 4mM, chlorek tetrabutylamonowy, 4 mM, kwas di-(2-etyloheksylo)-fosforowy (HDEHP), 2,0 mM) i bez odczynnika jonowo-asocjacyjnego

Obecność w fazie ruchomej chlorku tetrabutylamonowego spowodowała zmniejszenie prędkości przepływu fazy ruchomej ok. 30 % w stosunku od przepływu w analogicznym układzie bez odczynnika jonowo-asocjacyjnego. Adsorpcja tej substancji na fazie stacjonarnej RP18 wnosi dodatkowy ładunek o znaku przeciwnym, do ładunku zjonizowanych grup silanowych powierzchni adsorbentu. W takim układzie dochodzi do częściowej kompensacji ujemnego ładunku powierzchniowego fazy stacjonarnej i w konsekwencji generowany elektroosmotyczny przepływ fazy ruchomej jest mniejszy.

Dodatek substancji „parotwórczych” do fazy ruchomej powoduje, że w układzie ulega zmianie struktura podwójnej warstwy elektrycznej granicy faz stacjonarnej i ruchomej, co bezpośrednio wpływa na wartość potencjału

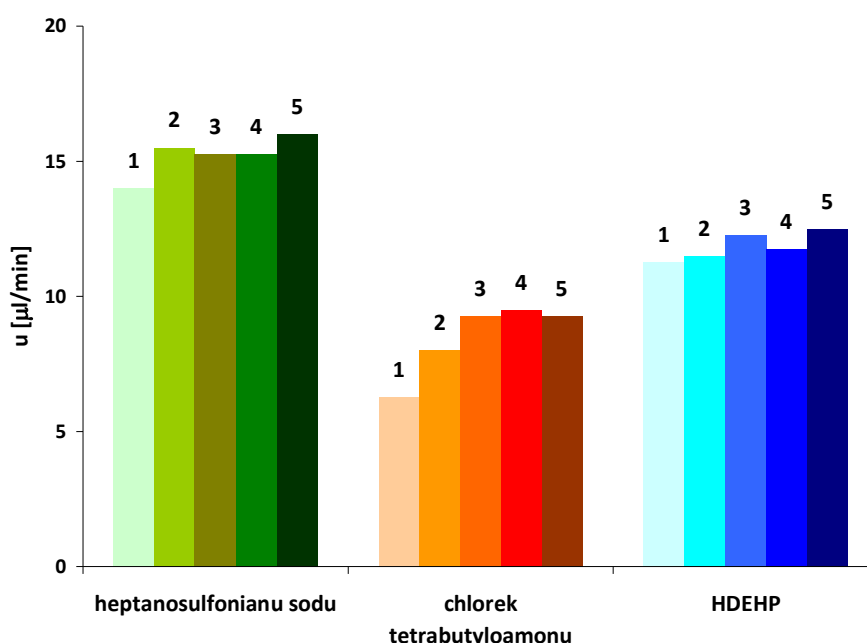
elektrokinetycznego. Na rys. 59 przedstawione są zmiany potencjału elektrokinetycznego w takich układach w zależności od stężenia acetonitrylu w fazie ruchomej.

Obecność dodatniego ładunku, zlokalizowanego w cząsteczkach chlorku tetrabutylamoniowego kompensuje, w wyniku ich adsorpcji, ujemny ładunek grup silonalowych fazy stacjonarnej i dzięki temu obserwuje się mniejszą (mniej ujemną) wartość potencjału dzeta. Podczas gdy obecność jonów heptanosulfonowych powoduje wzrost całkowitego ładunku ujemnego powierzchni adsorbentu i obserwuje się większą (bardziej ujemną) wartość potencjału dzeta. Ponadto, zróżnicowana zawartość składnika organicznego (acetonitrylu) w fazie ruchomej jest dodatkowym czynnikiem wpływającym na wartość potencjału elektrokinetycznego. W układzie PPEC z dodatkiem substancji tworzących pary jonowe acetonitryl wpływa na zdolności do adsorpcji tych substancji na fazie stacjonarnej. Ze wzrostem stężenia acetonitrylu zmniejsza się adsorpcja składników jonowo-asocjacyjnych i w związku z tym zmniejsza się ich wpływ na potencjał dzeta. Potwierdzeniem tego stwierdzenia są malejące różnice potencjału dzeta między układami z dodatkiem odczynników „parotwórczych” i układem bez tego odczynnika ze wzrostem stężenia acetonitrylu, rys. 59.



Rys. 59. Potencjał elektrokinetyczny w funkcji stężenia acetonitrylu w buforze cytrynianowym (pH = 3,8, 5,4 mM), bez dodatku i z dodatkiem składnika „parotwórczego” (4 mM); faza stacjonarna HPTLC RP-18 W (Merck)

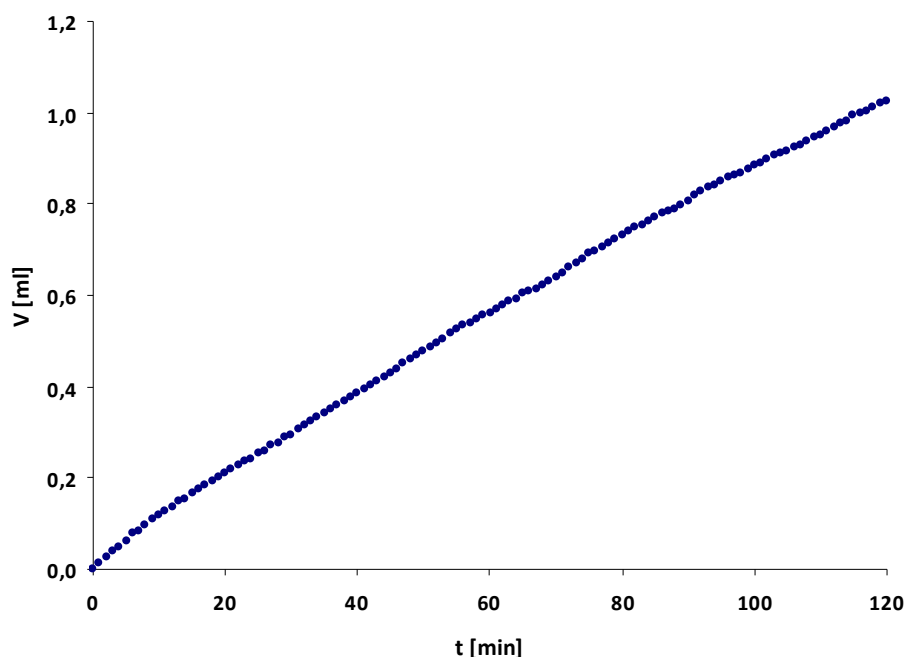
Kolejny etap niniejszej pracy obejmował badania ustalania się równowagi pomiędzy warstwą adsorbentu i roztworem fazy ruchomej, zawierającej składnik jonowo-asocjacyjny. W tym celu zostały przeprowadzone serie pomiarów przepływu elektroosmotycznego w układach z płytkami chromatograficznymi w zależności od liczby procesów kontaktowania warstwy adsorbentu z roztworem fazy ruchomej. W każdym etapie czas kontaktu warstwy adsorbentu z roztworem fazy ruchomej wynosił 5 min. Łącznie było wykonywanych 5 kolejnych procesów kontaktowania warstwy adsorbentu płytki chromatograficznej z roztworem fazy ruchomej i pomiarów przepływu elektroosmotycznego.



Rys. 60. Prędkość przepływu fazy ruchomej w zależności od liczby etapów kontaktowania roztworów fazy ruchomej z warstwą adsorbentu płytki HPTLC RP-18 W (Merck); faza ruchoma 25 % acetonitryl w buforze cytrynianowym pH = 4,6 (5,9 mM) z dodatkiem składnika „parotwórczego”: heptanosulfonian sodu (4,0 mM), chlorek tetrabutylamonowy (4 mM), kwas di-(2-etyloheksylo)-fosforowy (2,0 mM)

Na rys. 60 są zaprezentowane zależności prędkości przepływu fazy ruchomej, z dodatkami substancji „parotwórczych” od liczby etapów kontaktowania warstwy adsorbentu z jej roztworem. Z przeprowadzonych eksperymentów wynika, że liczba etapów kontaktowania warstwy adsorbentu z roztworem fazy ruchomej,

zawierającym substancje tworzące pary jonowe, istotnie wpływa na prędkość przepływu elektroosmotycznego. Najszybciej równowaga ustalała się w układzie z dodatkiem HDEHP, ponieważ kolejne etapy kontaktowania nie powodowały znaczących zmian wartości prędkości przepływu fazy ruchomej. Po pierwszym etapie wartość przepływu wynosiła 11,26 $\mu\text{l}/\text{min}$, a po piątym 12,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ (wzrost ok. 10 %). Dodatkowo, dla tego układu wykonano pomiary objętości fazy ruchomej przepływającej w ciągu 2 godzin, rys. 61.



Rys. 61. Objętość fazy ruchomej przepływającej w układzie PPEC w funkcji czasu; płytka HPTLC RP-18 W (Merck), faza ruchoma 35 % acetonitrylu w buforze octanowym pH = 4,6 (4,0 mM) z dodatkiem HDEHP (2,5 mM)

Przyrost objętości przepływającej fazy ruchomej w jednostce czasu był praktycznie stały w trakcie eksperymentu – wartość współczynnika determinacji, R^2 , wynosi 0,9928. Rezultaty tego eksperymentu potwierdzają powyższe uwagi o stosunkowo szybkim ustalaniu się równowagi sorpcyjnej w układzie z HDEHP. Niewątpliwie mniejsze stężenie tej substancji w fazie ruchomej było dodatkowym czynnikiem wpływającym na stan równowagi w układzie.

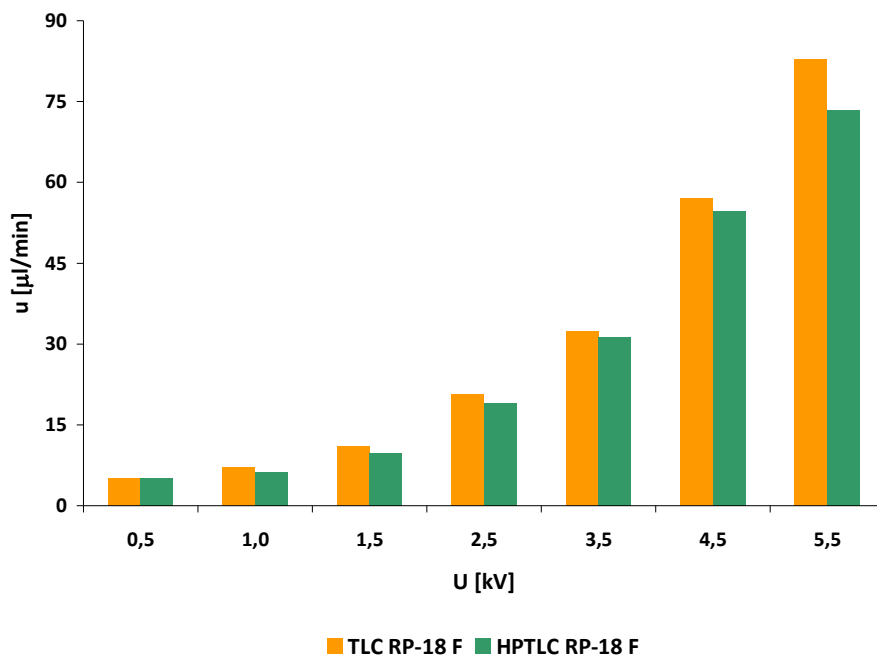
W układzie z chlorkiem tetrabutylamonium, kolejne etapy kontaktowania warstwy adsorbentu z roztworem fazy ruchomej, wywołały wzrost prędkości przepływu od 6,26 $\mu\text{l}/\text{min}$ po pierwszym etapie do 9,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ po piątym. Co stanowi

ok. 52 % przyrost prędkości przepływu. Natomiast, w obecności heptanosulfonianu sodu prędkość migracji fazy ruchomej, w analogicznych warunkach, wzrosła o ok. 15 %. Wzrost prędkości przepływu fazy ruchomej w tych układach świadczy, że czas zwilżania i liczba etapów kontaktowania fazy stacjonarnej z fazą ruchomą, zawierającą składniki jonowo-asocjacyjne, są uzależnione od rodzaju odczynnika „parotwórczego”.

4.1.4. Faza stacjonarna

Prędkość przepływu fazy ruchomej w układach PPEC nie zależy jedynie od składu jakościowego i ilościowego fazy ruchomej, ale również od rodzaju fazy stacjonarnej. W badaniach wykorzystano komercyjnie dostępne płytki chromatograficzne do chromatografii cienkowarstwowej. Były to zarówno płytki TLC (zwykłe) i HPTLC (wysokosprawne), zwilżalne i o ograniczonej zwilżalności wodną fazą ruchomą.

Na rys. 62 przedstawione są zależności przepływu fazy ruchomej od różnicy potencjałów przyłożonej do elektrod w układach PPEC z płytkami TLC i HPTLC RP18 F (Merck). Zaobserwowano, że prędkość przepływu fazy ruchomej była większa w układach z płytką TLC, niż z płytką HPTLC. Różnica wartości prędkości wahała się od 4 do 13 %. Zróżnicowane prędkości przepływu w układach z płytkami TLC i HPTLC wynikają z niejednakowych rozmiarów ziarna adsorbentu i grubości warstwy. Ziarno adsorbentu znajdującego się na płytkach wysokosprawnych ma mniejszą średnicę niż na płytkach TLC, zaś grubość warstwy adsorbentu na płytkach HPTLC wynosi 0,2 mm, podczas gdy na płytkach TLC 0,25 mm. W warstwie adsorbentu płytek HPTLC kanały między ziarnowe są o mniejszej średnicy niż w przypadku płytki zwykłej. Z tego powodu w układach z pierwszymi płytkami opór stawiany przepływowi cieczy jest większy niż w układach z drugimi. W układach z płytkami HPTLC, efekt nakładana się na siebie podwójnych warstw elektrycznych jest bardziej możliwy niż z płytkami TLC i może częściowo odpowiadać za spowolnienie migracji fazy ruchomej. Ponadto, gęstość pokrycia łańcuchami C18 na płytkach HPTLC jest większe niż TLC ($2,6 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ dla płytek HPTLC, $1,7 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ dla płytek TLC), co dodatkowo odpowiada za słabszy efekt elektroosmotyczny na płytkach wysokosprawnych.

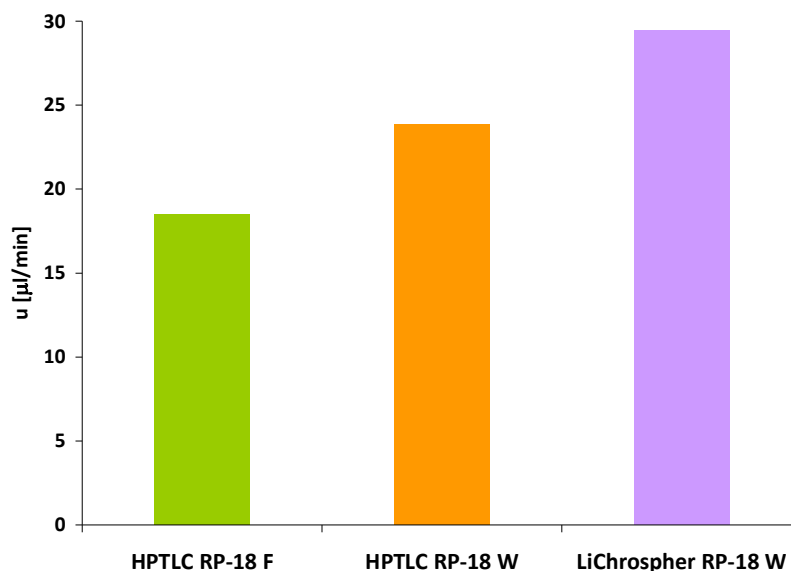


Rys. 62. Prędkość przepływu fazy ruchomej w zależności od przyłożonej różnicy potencjałów do elektrod; płytki TLC RP-18 F i HPTLC RP-18 F (Merck), faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym, pH = 6,0 (3,25 mM)

W niniejszej pracy zostały również przeprowadzone badania prędkości przepływu fazy ruchomej w układach z płytkami HPTLC RP-18W i LiChrospher RP-18W (litera W oznacza zwilżalność warstwy adsorbentu w całym zakresie stężenia wody) i roztworem wodno-organicznym w całym zakresie stężenia składników.

Na rys. 63 przedstawiono wartości prędkości przepływu fazy ruchomej w układach z trzema różnymi płytkami i fazą ruchomą o takim samym składzie przy zastosowaniu różnicy potencjałów 2,0 kV. Prędkość przepływu fazy ruchomej w układach z płytkami typu W była większa od 25 do 40 % niż z płytkami nie oznaczonymi literą W. Różnice wartości migracji wynikają z właściwości powierzchni adsorbentu warstw obu typów płytek. Warstwy adsorbentu na płytkach „W” charakteryzują się mniejszą gęstością pokrycia łańcuchami alifatycznymi, tj. $0,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2$, niż na płytkach bez oznaczenia literą „W” – $2,6 \mu\text{mol}/\text{m}^2$. Co oznacza, że te pierwsze zawierają większą ilość nie związanych grup silanolowych. W takim układzie, na powierzchni adsorbentu typu W, zgromadzi się większy ładunek ujemny, pochodzący od dysocjacji grup silanolowych,

niż na powierzchni adsorbentu płytek HPTLC RP18 F. W konsekwencji układ pierwszy generował większą prędkość przepływu elektroosmotycznego fazy ruchomej. Podobne zależności zauważono wcześniej dla układów CEC [258] i otwartych układów elektrochromatografii planarnej [182].



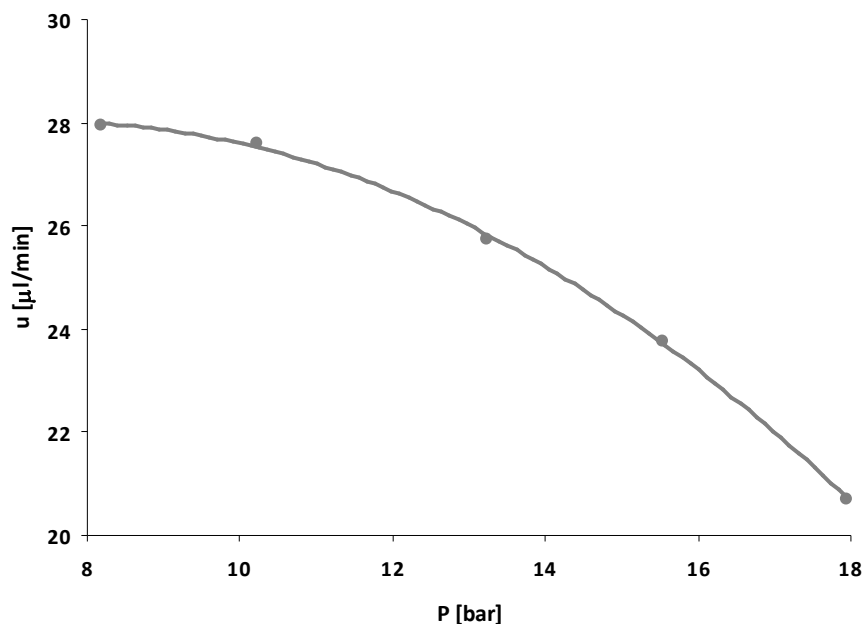
Rys. 63. Wartości prędkość przepływu fazy ruchomej w układach z płytkami HPTLC RP-18F, HPTLC RP-18W i LiChrospher RP-18W; faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym, pH = 6,0 (3,25 mM), U = 2,0 kV

4.1.5. Ciśnienie wywierane na warstwę adsorbentu

W następnym etapie badań przeprowadzone zostały pomiary mające na celu określenie wpływu siły docisku przykrywy warstwy adsorbentu na przepływ elektroosmotyczny fazy ruchomej. Mając do dyspozycji klucz dynamometryczny, który pozwala dokręcić śruby pokrywy komory z momentem siły od 2 do 20 Nm, przeprowadzono serię pomiarów prędkości przepływu fazy ruchomej w zależności od tego czynnika. Korzystając z zestawu do pomiaru siły parcia, wyznaczono ciśnienie pod jakim pokrywa komory dociskała warstwę adsorbentu płytki chromatograficznej.

Na rys. 64 przedstawiona jest zależność przepływu fazy ruchomej od ciśnienia wywieranego na warstwę fazy stacjonarnej. Powtarzalne wyniki migracji fazy mobilnej uzyskano, gdy ciśnienie było w zakresie od 8 do 18 barów.

W pozostałych układach uzyskane wyniki były rozbieżne, bądź nie można było zmierzyć wartości przepływu fazy ruchomej, ze względu na pojawiające się przerwy migracji cieczy.



Rys. 64. Zależność prędkości przepływu fazy ruchomej od ciśnienia wywieranego przez pokrywę na warstwę adsorbentu w układach z płytkami HPTLC RP-18 W i fazą ruchomą 80 % acetonitrylu w buforze octanowym, pH = 5,0 (2 mM)

Prędkość przepływu fazy ruchomej maleje wraz ze wzrostem ciśnienia wywieranego na warstwę adsorbentu płytki chromatograficznej. Upakowanie ziarna adsorbentu na płytce chromatograficznej nie jest tak gęste jak w kolumnie do HPLC. Dlatego odległości pomiędzy sąsiadującymi ze sobą ziarnami adsorbentu ulegają zmniejszeniu ze względu na działanie na warstwę adsorbentu ciśnienia zewnętrznego (docisk pokrywy komory). W konsekwencji działanie zewnętrznego ciśnienia powoduje trwałą zmianę struktury przestrzennej złoża adsorbentu. Im większe ciśnienie (siła docisku) tym opory przepływu fazy ruchomej są większe (mniejsza średnica kanałów międzyziarnowych). Można przypuszczać, że bardzo wysokie ciśnienie może doprowadzić nawet do zablokowania kanałów międzyziarnowych, co w konsekwencji spowoduje zanik migracji cieczy. W układach, w których ciśnienie działające na płytkę chromatograficzną jest niskie, prawdopodobnie część roztworu fazy ruchomej może przemieszczać się pomiędzy powierzchnią warstwy adsorbentu i folią przykrywającą. Efekt ten może powodować

dotatkowe rozmycie stref rozdzielanych substancji. Omawianą powyżej zależność zaobserwowali także Nurok i wsp. [195]. Stwierdzili oni, że wraz ze wzrostem ciśnienia wywieranego na płytkę, malał dystans migracji rozdzielanych substancji, co świadczyłoby o malejącej prędkości przepływu fazy ruchomej.

4.1.6. Powtarzalność dystansu migracji substancji w układach PPEC

W tabeli 9 i 10 zestawione są wartości dystansu migracji oraz względnego odchylenia standardowego dystansu migracji wyznaczone dla rozdzielanych substancji, w układach PPEC z płytkami TLC RP-18 F i HPTLC RP-18 F (Merck). Dozowanie próbek na płytkę przeprowadzono ręcznie za pomocą mikrostrzykawki oraz z wykorzystaniem dozownika aerozolowego.

Tabela. 9. Zestawienie średnich wartości dystansów migracji i odchylenia standardowego, układy PPEC. Faza stacjonarna: płytki TLC RP-18 F, faza ruchoma: 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym pH = 6,0, U = 2,5 kV

Substancja	Liczba powtórzeń	Metoda dozowania			
		Ręczna (mikrostrzykawka)		Aplikator aerozolowy	
		Z _s [mm]	RSD (Z _s)	Z _s [mm]	RSD (Z _s)
1-(2-pirydylo)-2-naftol	7	15,54	0,073	15,51	0,065
4-(dimetyloamino)-azobenzen		28,57	0,084	28,57	0,065
1-(4-hydroksyfenylo)-2-naftol		40,83	0,070	38,82	0,042

Wartości dystansów migracji substancji na płytkach TLC były porównywalne, zarówno gdy naniesienie substancji na płytkę chromatograficzną prowadzono ręcznie, jak i z wykorzystaniem dozownika aerozolowego. Natomiast w układzie z płytkami HPTLC, dystanse migracji substancji dozowanych za pomocą mikrostrzykawki były ok. 25 % krótsze, w porównaniu do dystansów uzyskanych, gdy nanoszenie próbek dokonywano z wykorzystaniem dozownika automatycznego. Jak się później okazało te różnice retencji substancji były spowodowane wykorzystaniem płytek chromatograficznych pochodzących z dwóch różnych szarż

produkcyjnych. Wartość względnego odchylenia standardowego (RSD) jest mniejsza dla płytek „wysokosprawnych” niż zwykłych. Powtarzalność uzyskanych dystansów migracji badanej próbki była wyższa dla układów, w których dozowanie było prowadzone za pomocą automatycznego dozownika.

Tabela. 10. Zestawienie średnich wartości dystansów migracji i odchylenia standardowego, układy PPEC. Faza stacjonarna: płytki HPTLC RP-18 F, faza ruchoma: 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym pH = 6,0, U = 2,5 kV

Substancja	Liczba powtórzeń	Metoda dozowania			
		Ręczna (mikrostrzykawka)		Aplikator aerozolowy	
		Z _s [mm]	RSD (Z _s)	Z _s [mm]	RSD (Z _s)
1-(2-pirydylo)-2-naftol	7	8,88	0,078	11,57	0,037
4-(dimetyloamino)-azobenzen		20,89	0,049	27,73	0,032
1-(4-hydroksyfenylo)-2-naftol		34,86	0,041	46,30	0,034

4.2. Czynniki wpływające na sprawność układów PPEC

4.2.1. Faza stacjonarna

W niniejszej pracy sprawność układu rozdzielczego jest charakteryzowana głównie poprzez wysokości półki, H. W badaniach wykorzystano dostępne komercyjnie płytki chromatograficzne TLC RP-18 F i HPTLC RP-18 F. W celach porównawczych, zestawiono wartości wysokości półki, uzyskane dla układów klasycznej chromatografii cienkowarstwowej i elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej. Otrzymane wyniki są przedstawione w tabeli 11.

Uzyskane wartości wysokości półki w układzie PPEC były niższe niż w analogicznym układzie klasycznej chromatografii cienkowarstwowej. Sprawność układu TLC jest ściśle związana z dystansem migracji czoła fazy ruchomej. Zgodnie z danymi literaturowymi, optymalne warunki uzyskania najwyższej sprawności procesu separacji techniką TLC to: dystans rozwijania

chromatogramu – 7 cm dla płytek typu TLC i 4 – 5 cm dla płytek typu HPTLC, a współczynnik R_F rozdzielanych substancji powinien przyjmować wartości w zakresie 0,3 – 0,5. W testowanym układzie 1-(4-hydroksyfenyloazo)-2-naftol, wykazuje współczynnik opóźnienia w granicach optymalnego zakresu R_F . Natomiast 4-(dimetyloamino)-azobenzen jest silniej zatrzymywany przez fazę stacjonarną.

Tabela 11. Zestawienie wartości wysokości półki, H – metoda TLC i PPEC. Faza stacjonarna: TLC RP-18 F, HPTLC RP-18 F, faza ruchoma: 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym pH = 6,0. Dystans rozwijania chromatogramu w układzie TLC wynosił 70 mm

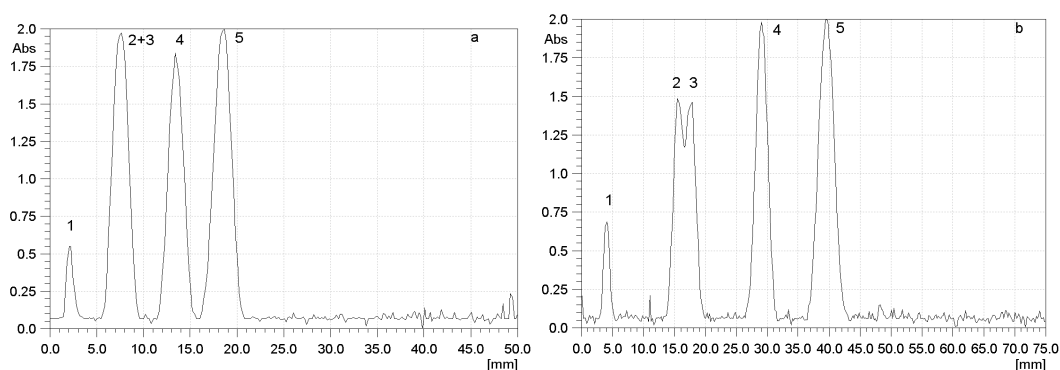
Substancja	Liczba powtórzeń	TLC TLC RP-18 F		PPEC TLC RP-18 F		PPEC HPTLC RP-18 F	
		H [μm]	RSD (H)	H [μm]	RSD (H)	H [μm]	RSD (H)
4-(dimetyloamino)- azobenzen	7	74,79	0,051	61,52	0,058	48,33	0,044
1-(4-hydroksyfenyloazo)-2- naftol		66,13	0,053	47,68	0,081	37,10	0,050

W układach PPEC nie można bezpośrednio wyznaczyć położenie czoła fazy ruchomej, ponieważ podobnie jak w układach kolumnowych, faza ruchoma przemieszcza się przez zwilżone złożo adsorbentu. Niską wysokość półki, uzyskuje się dla substancji o słabej retencji, gdyż na płytkach o wymiarach 2x10 cm, najdłuższa efektywna droga migracji wynosi 7,4 cm. Efekt ten był obserwowany dla obu rodzajów płytek. Różnice sprawności układów separacyjnych z różnymi płytkami chromatograficznymi wynikają z niejednakowej średnicy ziarna warstwy adsorbentu. Podobnie jak w innych metodach chromatograficznych, np. HPLC, im mniejsza średnica ziarna adsorbentu tym wysokość półki jest niższa [48].

Podobne porównanie sprawności przeprowadzili Nurok i wsp. [194] Wyznaczyli wysokość półki dla układów chromatograficznych z płytkami TLC RP-18 F i LiChropsher RP-18 WF. Wyższą sprawność zanotowano dla układów z płytkami ze sferycznym ziarnem adsorbentu [194]. Należy jednak zaznaczyć, że na płytkach chromatograficznych znajduje się składnik wiążący ziarna

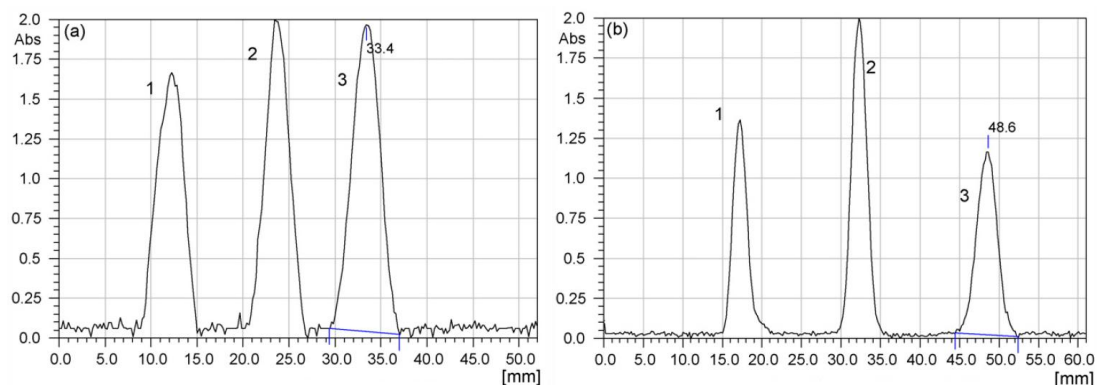
adsorbentu – polimer organiczny, który zapewne bierze udział w procesie chromatograficznym, przyczyniając się do zmniejszenia sprawności układu.

Na rys. 65 przedstawiono chromatogram TLC i elektrochromatogram PPEC, mieszaniny testowej pięciu barwników, rozdzielanych przy wykorzystaniu tej samej fazy ruchomej. Wyższa sprawność w układach PPEC niż TLC, owocuje lepszym rozdzieleniem mieszaniny substancji. Ponadto, dystans migracji substancji w układach PPEC był prawie dwukrotnie dłuższy niż w układzie TLC przy zastosowaniu tego samego czasu eksperymentu. W klasycznej chromatografii cienkowarstwowej prędkości przepływu czoła fazy ruchomej nie jest stała, zmniejsza się z wydłużeniem dystansu migracji. Rozwijanie klasycznych chromatogramów cienkowarstwowych na dystansie dłuższym niż kilkanaście centymetrów jest procesem długotrwałym i powoduje, że strefy rozdzielanych substancji stają się szerokie i w konsekwencji obserwuje się duży spadek sprawności układu.



Rys. 65. Chromatogramy mieszaniny barwników: Sudan IV (1), 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (2), 1-(4-chlorofenylazo)-2-naftol (3), 4-(dietyloamino)-azobenzen (4), 1-(4-hydroksyfenylazo)-2-naftol (5), uzyskane techniką TLC (a) i PPEC (b) z płytką TLC RP-18 F (Merck); faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym pH = 6,0 (3,30 mM), U = 2 kV, czas rozwijania 5 min

Podobną zależność znaleziono dla innej próbki testowej – rys. 66. Na tym rysunku można zauważyć wyraźną różnicę sprawności układów z płytkami zwykłymi i wysokosprawnymi. Te ostatnie przyczyniają się do znacznie większej sprawności układu separacyjnego.



Rys. 66. Elektrochromatogramy mieszaniny testowej: 1-(2-pyridylazo)-2-naftol (1), 4-(dietyloamino)-azobenzen (2), 1-(4-hydroksyfenylazo)-2-naftol (3); płytka TLC RP-18 F (Merck), $U = 4,5$ kV, $u_{lin} = 19,0$ mm/min, $t = 2,7$ min (a) oraz płytka HPTLC RP-18 F (Merck) $U = 3,5$ kV, $u_{lin} = 20,6$ mm/min, $t = 2,5$ min (b); faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym pH = 6,0 (3,30 mM)

4.2.2. Metoda dozowania próbki i zwilżania fazy stacjonarnej

Jednym z głównych czynników, wpływających na sprawność planarnych układów chromatograficznych, jest szerokość strefy startowej próbki. W klasycznych układach TLC, szerokość plamki na płytce chromatograficznej, zależy od sposobu wprowadzania substancji na warstwę adsorbentu. Najlepsze rezultaty osiąga się podczas dozowania aerozolowego za pomocą półautomatycznego lub automatycznego aplikatora. Wykorzystanie tej metody do układów elektrochromatografii planarnej jest utrudnione, ponieważ w układach chromatografii cienkowarstwowej wprowadzenie substancji jest prowadzone na suchą płytkę, podczas gdy w układach PPEC faza stacjonarna, przed rozwinięciem elektrochromatogramu, jest zwilżona roztworem fazy ruchomej.

W tabeli 12 zestawiono wartości szerokości strefy startowej (4σ) próbki testowej na płytkach TLC i HPTLC, uzyskane trzema metodami dozowania. W początkowym okresie badań, dozowanie badanej próbki było prowadzone bezpośrednio po zwilżeniu warstwy adsorbentu.

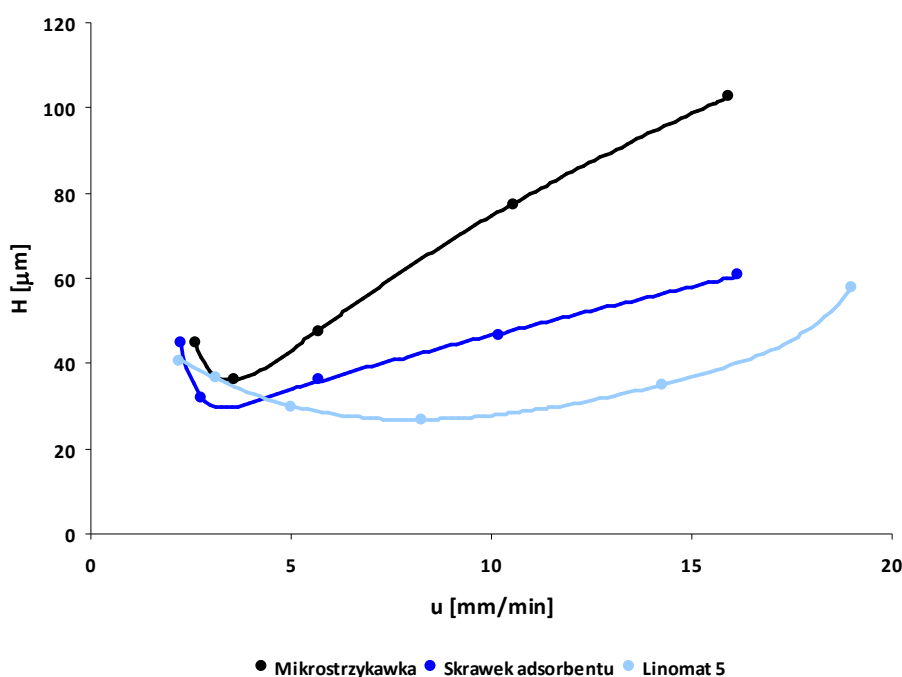
Tabela 12. Zestawienie wyników szerokości plamki startowej, uzyskanych trzema metodami dozowania, objętość próbki 0,2 μ l, 0,1 % 1-(4-hydroksyfenylazo)-2-naftolu

Metoda nanoszenia próbki	Liczba powtórzeń	TLC RP-18 F		HPTLC RP-18 F	
		4 σ [mm]	RSD	4 σ [mm]	RSD
Ręczna, za pomocą mikrostrzykawki	7	1,52	0,11	1,56	0,10
Ręczna, z użyciem skrawka adsorbentu		1,62	0,12	1,55	0,11
Aplikator aerozolowy (1,5 μ l/min; $5 \cdot 10^5$ Pa)		1,17	0,07	0,98	0,08

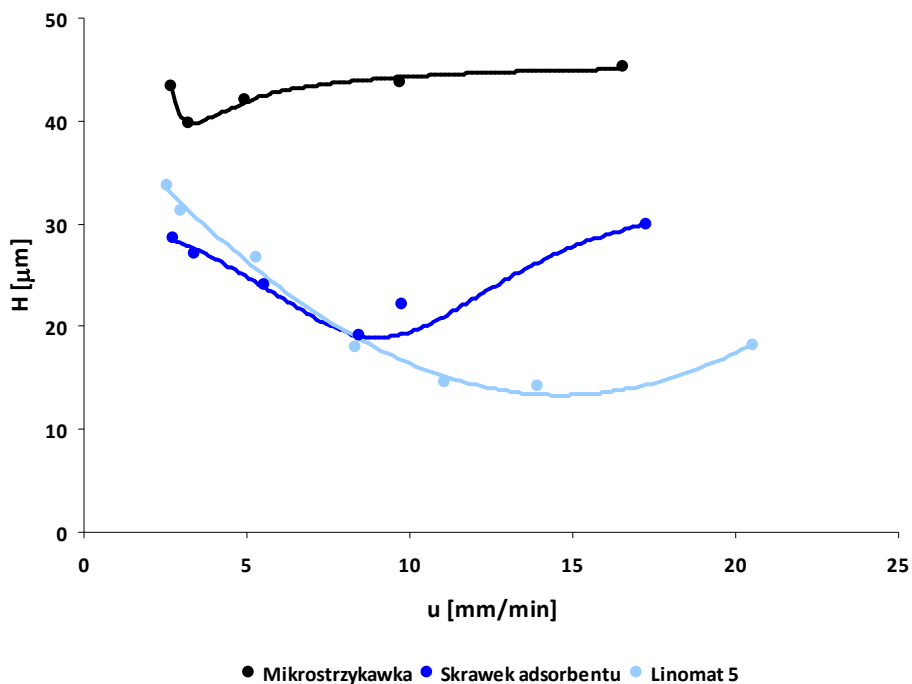
Pierwsza metoda polegała na ręcznym wprowadzeniu plamki substancji z mikrostrzykawki, w strumieniu ciepłego powietrza, na mokrą warstwę adsorbentu. Szerokość strefy wynosiła 1,5 – 1,6 mm. Jednakże dozowanie tym sposobem było kłopotliwe, ponieważ uzyskanie plamki o porównywalnych rozmiarach, wymagało od analityka doświadczenia przy operowaniu mikrostrzykawką. Niedogodności, jakie zaobserwowano podczas pracy z mikrostrzykawką, były związane z opanowaniem właściwego ruchu tłoka. Powolny ruch tłoka mikrostrzykawki powodował nieilościowe wprowadzenie substancji na płytkę, gdyż część masy substancji krystalizowała na końcu igły. Ponadto, strumień ciepłego powietrza powodował odparowanie bardziej lotnych składników fazy ruchomej z powierzchni płytki chromatograficznej np. acetonu, acetonitrylu. Niekorzystny efekt zaobserwowano również, gdy ruch tłoka mikrostrzykawki był zbyt szybki. Strefy substancji były szerokie, ponieważ roztwór próbki bardzo szybko penetrował przestrzeń ziarnowatą zwilżonej warstwy adsorbentu. Ponadto podczas dozowania ręcznego dochodzi czasem do uszkodzenia warstwy fazy stacjonarnej w momencie kontaktu igły mikrostrzykawki z adsorbentem. W optymalnych warunkach dozowanie próbki o objętości 0,2 μ l trwało od 15 do 20 sek. W kolejnym etapie badań, metoda dozowania została zmodyfikowana w ten sposób, że skrawek adsorbentu pełnił rolę strefy startowej. Na zwilżoną płytkę chromatograficzną, z której usunięto fragment adsorbentu o średnicy ok. 1 – 1,5 mm, wprowadzano skrawek adsorbentu wraz z naniesioną na nim mieszaniną substancji, próbką. Metoda ta pozwalała na uzyskanie plamki startowej o zbliżonych rozmiarach, jak podczas ręcznego dozowania mikrostrzykawką. Jednakże, główną zaletą tej metody, było ograniczenie odparowywania fazy ruchomej z odsłoniętej części płytki

chromatograficznej. Zaś niedogodnością, było kłopotliwe uzyskiwanie powtarzalnych wymiarów fragmentów „startowych”. Skrawki adsorbentu otrzymywano z płytki chromatograficznej, wycinając fragmenty fazy stacjonarnej o pożądanych wymiarach. Podczas wycinania, bardzo często fragmenty adsorbentu ulegały zniszczeniu lub uszkodzeniu, co prowadziło do uzyskiwania skrawków o nieregularnych kształtach – takie fragmenty nie były wykorzystywane.

Najwyższe strefy startowe, tj. ok. 1 mm, uzyskano z wykorzystaniem aplikatora aerozolowego. W niniejszej metodzie proces dozowania substancji odbywał się przed zwilżeniem płytki chromatograficznej, podobnie jak w TLC. Następnie warstwa adsorbentu wraz z naniesioną próbką była zwilżana w specjalnym naczyniu, w którym efekt poszerzania strefy substancji był ograniczony. Optymalny czas zwilżania wynosił 2 – 5 minut w zależności od rodzaju adsorbentu płytki chromatograficznej.



Rys. 67. Zależność wysokości półki od prędkości przepływu fazy ruchomej w układzie PPEC dla różnych sposobów nanoszenia próbki na płytkę chromatograficzną; płytka TLC RP-18, faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym, pH = 6,0 (6,5 mM)



Rys. 68. Zależność wysokości półki od prędkości przepływu fazy ruchomej w układzie PPEC dla różnych sposobów nanoszenia próbki na płytkę chromatograficzną; płytkę HPTLC RP-18, faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym, pH = 6,0 (6,5 mM)

Wpływ metody dozowania na sprawność układu PPEC, przedstawiono na rys. 67 i 68 w postaci wysokości półki w funkcji prędkości przepływu fazy ruchomej w układach z warstwami płytek TLC i HPTLC. Prędkość przepływu fazy ruchomej była regulowana poprzez zmianę różnicy potencjałów, przyłożonych do elektrod w zakresie 0,75 – 4,50 kV.

Jak można zauważyć, najwyższe wysokości półki zanotowano, gdy próbka była wprowadzana ręcznie, za pomocą mikrostrzykawki. W układach tych, najniższa wysokość półki wynosiła ok. 35 – 40 μm, zarówno dla płytek TLC i HPTLC. Uzyskane wartości wysokości półki były niższe niż notowane w układach klasycznej chromatografii cienkowarstwowej [228]. Jednakże, porównując najniższe wartości wysokości półek, należałoby się spodziewać wyższej sprawności układu PPEC z płytkami wysokosprawnymi niż zwykłymi. Zbliżone wartości minimalnej wysokości półki, dla obu typów płytek wskazują, że metoda ręcznego wprowadzania substancji jest niewłaściwa. Natomiast ciekawy jest przebieg profilu krzywej

dla płytki HPTLC, ponieważ sprawność układu PPEC wraz ze wzrostem prędkości przepływu fazy ruchomej, ulega niewielkiemu pogorszeniu. Można przypuszczać, że średnica strefy startowej substancji była zbyt duża i w warunkach tego eksperymentu większa prędkość przepływu fazy ruchomej nie wносиła dużego wkładu do poszerzenia strefy substancji. Ważnym czynnikiem jest również średnica ziarna oraz grubość warstwy adsorbentu, ponieważ w układzie z płytką TLC, wraz ze wzrostem prędkości przepływu fazy ruchomej, sprawność układu maleje.

Wykorzystanie skrawka adsorbentu, jako strefy startowej, spowodowało, wzrost sprawności układu separacyjnego. Najniższa wysokość półki, zanotowana dla płytek TLC i HPTLC, odpowiednio wynosiła 32 i 20 μm . Największy wzrost sprawności można zauważyć w układzie z płytkami HPTLC, ponieważ najniższa wysokość była niższa o ok. 50% w stosunku do analogicznego układu, w którym dozowanie odbywało się ręcznie, za pomocą mikrostrzykawki. Na wzrost sprawności układu PPEC składa się kilka czynników. Jednym z nich jest ograniczenie odparowania fazy ruchomej z odsłoniętej części płytki chromatograficznej w trakcie wprowadzania fragmentu adsorbentu z próbką. Podczas dozowania tą metodą nie wykorzystuje się strumienia ciepłego powietrza oraz czas ekspozycji odsłoniętej części płytki chromatograficznej jest krótszy. Ponadto, strefa startowa (na skrawku adsorbentu) nie ulega znacznemu poszerzeniu, ponieważ skrawek adsorbentu jest suchy i w pierwszym kontakcie z mokrą warstwą adsorbentu płytki chromatograficznej zwilża się tą cieczą. Dopiero później, cząsteczki substancji ze skrawka, dyfundują w przestrzenie międzyziarnowe płytki chromatograficznej. Jednak, zjawisko to trwa zaledwie kilka sekund, ponieważ po umieszczeniu płytki chromatograficznej, natychmiast przykłada się różnicę potencjałów do elektrod, co powoduje rozpoczęcie procesu separacji. Obserwując profil krzywej na rys. 68 można zauważyć, że obniżenie sprawności przy większych wartościach prędkości przepływu, nie jest tak duże jak w układzie, w którym wprowadzanie substancji prowadzono mikrostrzykawką. Sprawność układu PPEC z płytkami HPTLC jest najwyższa, przy większej prędkości przepływu fazy ruchomej, niż z płytkami TLC. Jest to niewątpliwie zaleta, gdyż rozdzielanie w układzie PPEC, można prowadzić w krótszym czasie, przy zachowaniu wysokiej sprawności.

Najwyższą sprawność układu PPEC zanotowano, gdy dozowanie substancji było prowadzone metodą aerozolową (Linomat 5) na suchą płytkę

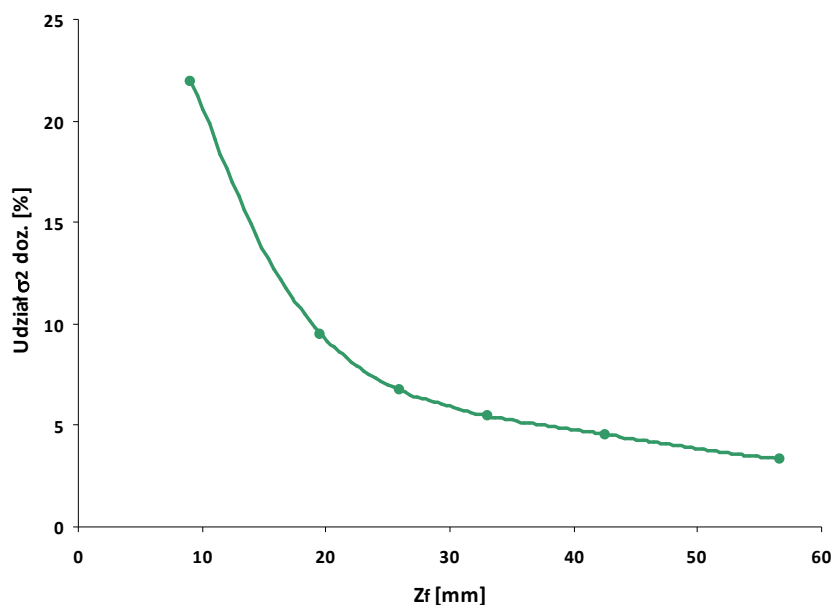
chromatograficzną. Najniższa wysokość półki, w układzie z płytkami TLC i HPTLC, wynosiła odpowiednio 27 i 14 μm . Wartości H w układzie PPEC były ponad 50% niższe niż w analogicznym układzie klasycznej chromatografii cienkowarstwowej. Ponadto najniższą wysokość półki zanotowano przy większej prędkości przepływu fazy ruchomej. Profil zmiany sprawności, H, w zależności od prędkości przepływu fazy ruchomej jest korzystny, ponieważ wzrost szybkości migracji fazy ruchomej, nie powoduje znacznego pogorszenia sprawności układu PPEC. Dobre rezultaty dozowania aerozolowego próbki na suchą płytkę chromatograficzną, w odniesieniu do pozostałych metod, wynikają z ograniczenia i wyeliminowania kilku efektów niekorzystnie wpływających na ten etap. Są to: odparowywanie fazy ruchomej z płytki chromatograficznej, uzyskiwanie szerokiej strefy startowej oraz czynników poszerzających tę strefę przed procesem rozdzielania.

4.2.3. Wpływ szerokość strefy startowej na sprawność układu PPEC

W poprzednim rozdziale zaprezentowano wyniki, ukazujące wpływ metody dozowania na szerokość strefy startowej. Największe plamki uzyskiwano podczas aerozolowego wprowadzania substancji na nie zwilżoną warstwę adsorbentu. Średnica strefy startowej na płytkach TLC i HPTLC wynosiła ok. 1 mm. Znając początkową (startową) i końcową szerokość strefy oraz dystans migracji substancji można określić udział wariancji dozowania w końcowej sprawności układu.

Na rys. 69, przedstawiony jest procentowy udział strefy startowej w końcowej szerokość plamki w zależności od dystansu migracji substancji. Jak można zauważyć, wraz ze wzrostem dystansu migracji substancji maleje udział wariancji szerokości strefy startowej w całkowitej sprawność układu PPEC. Największy udział wariancji strefy startowej, σ_s^2 , zanotowano, gdy dystans migracji substancji ulegał skróceniu. Dla najkrótszego zmierzonego dystansu migracji, który wynosił 9 mm, udział ten był 20 %. Natomiast, gdy dystans migracji substancji był dłuższy o 10 mm, udział wariancji był dwukrotnie mniejszy. Udział wariancji dozowania w całkowitej wariancji szerokości strefy substancji na elektrochromatogramie, na dystansie migracji substancji dłuższym niż 30 mm, wynosił mniej niż 5 %. Największy udział σ_s^2 w sprawności układu występuje

w układzie, w którym dystans migracji substancji wynosił kilka milimetrów. Wtedy sprawność układu PPEC jest niska. Z tego też powodu, rozwijanie elektrochromatogramów na krótkim dystansie migracji jest niekorzystne. Zachowanie wysokiej sprawności układu PPEC na krótkim dystansie migracji wymaga opracowania nowej metody dozowania, tak by strefy startowe były węższe niż 1 mm oraz nowych (cieńszych) warstw adsorbentu na płytkach chromatograficznych.

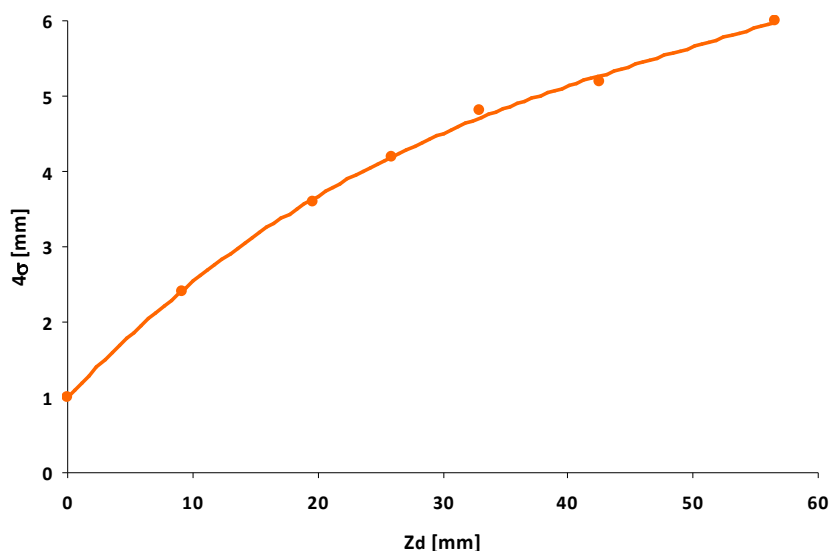


Rys. 69. Udział wariancji plamki startowej w całkowitej wariancji szerokość strefy substancji po rozwinięciu elektrochromatogramu; faza stacjonarna: HPTLC RP-18 F (Merck), faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym pH = 6,0 (6,5 mM), U = 2,5 kV

4.2.4. Dystans migracji

W technikach chromatograficznych z wykorzystaniem warstw adsorbentu, sprawność układu separacyjnego zależy od dystansu migracji substancji. Poszerzenie strefy substancji, wraz ze wzrostem dystansu migracji, jest dobrze zbadane i wynika z efektów kinetycznych procesu. Aspekty teoretyczne tego efektu są dobrze poznane i opisane w wielu monografiach. Autorzy stwierdzili, że w układach klasycznej chromatografii cienkowarstwowej szerokość plamki substancji rośnie wprost proporcjonalnie do czasu migracji tej substancji [41]. W układach PPEC, poszerzenie

strefy substancji również zależy od czasu migracji tej substancji i zgodnie z wcześniej przyjętymi założeniami (dla TLC), powinno być wprost proporcjonalne do dystansu migracji (w układach PPEC prędkość przepływu jest stała, więc dystans migracji jest wprost proporcjonalny do czasu migracji).

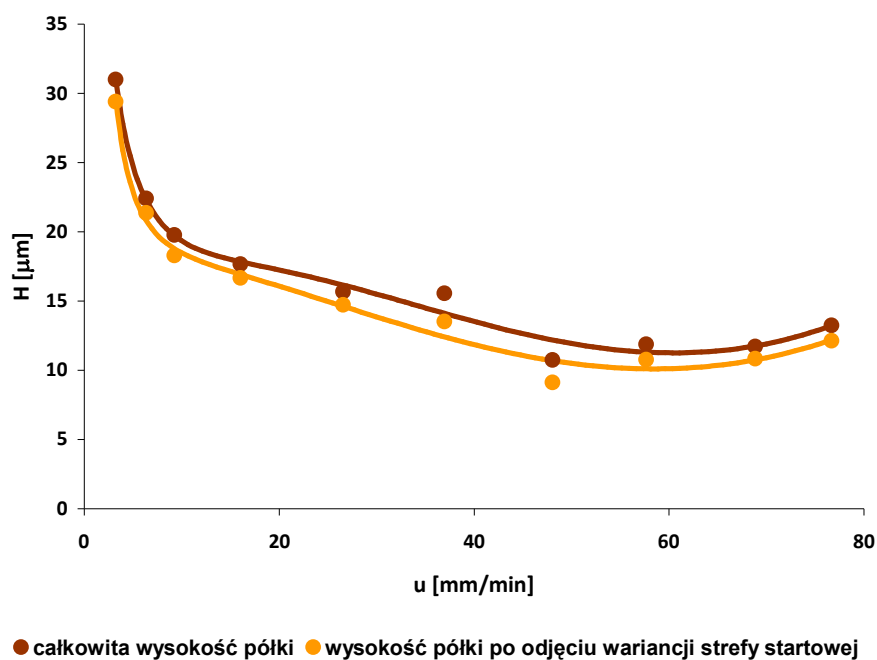


Rys. 70. Wpływ dystansu migracji 1-(4-hydroksyfenylazo)-2-naftolu na szerokość strefy (szerokość pików przy podstawie, 4σ) na płytkach HPTLC RP-18 F, w układzie PPEC; faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym pH = 6,0 (6,5 mM), U = 2,5 kV

Na rys. 70 przedstawiono wpływ dystansu migracji substancji na szerokość strefy na elektrochromatogramie. Jak można zauważyć, szerokość plamki substancji nie rośnie wprost proporcjonalnie do dystansu migracji (czasu rozwijania), w przeciwieństwie do klasycznych układów cienkowarstwowych. W układach TLC, prędkość przepływu fazy ruchomej maleje wraz ze wzrostem dystansu migracji czoła fazy ruchomej. W związku z tym szybkość migracji substancji w warstwie fazy stacjonarnej również zmniejsza się. Powolna migracja substancji, sprzyja dyfuzji substancji, co w konsekwencji prowadzi do poszerzania strefy. W układach PPEC poszerzenie strefy substancji w mniejszym stopniu zależy od czasu i dystansu migracji niż w układach TLC. Jest to niewątpliwie duża zaleta układów PPEC, ponieważ wydłużenie migracji substancji nie powoduje obniżenia sprawności, ale, wręcz przeciwnie, w niewielkim stopniu wpływa na obniżenie wysokości półki.

4.2.5. Prędkość przepływu fazy ruchomej

W poprzednim rozdziale, zaprezentowano obiecujące wyniki, ponieważ wynikało z nich, że sprawność układu PPEC jest wysoka. Wysokości półek zostały wyznaczone w ograniczonym zakresie prędkości przepływu fazy ruchomej. Dlatego też, kolejnym etapem badań była ocena sprawności układu PPEC w szerokim zakresie prędkości przepływu fazy ruchomej. Prędkość przepływu fazy ruchomej była regulowana poprzez zmianę napięcie polaryzującego, przyłożonego do elektrod. W celu ograniczenia efektów termicznych (ciepło Joule'a), zastosowano napięcie polaryzujące w zakresie 0,4 – 4,5 kV oraz niskie stężenie elektrolitu w fazie ruchomej, co pozwoliło na uzyskanie stabilnych warunków podczas prowadzenia eksperymentów.



Rys. 71. Wysokość półki w zależności od prędkości przepływu fazy ruchomej układu PPEC; płytka HPTLC RP-18 W, faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym pH = 5,0 (6,04 mM); U = 0,4 – 4,5 kV

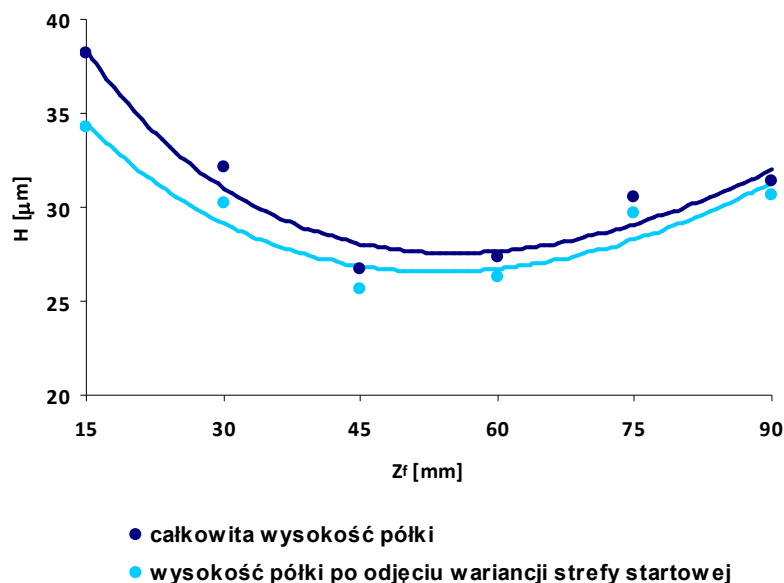
Na rys. 71 przedstawiono wpływ prędkości przepływu fazy ruchomej na sprawność układu PPEC z uwzględnieniem wariacji wynikającej z dozowania. Wysokości półek, po odjęciu wariacji strefy startowej, były niższe o ok. 5 – 15 % od całkowitej. Najniższa wyznaczona wysokość półki wynosiła 9 μm. Na powyższym wykresie, można zauważyć, że krzywa wykazuje minimum wartości

wysokości półki przy prędkości przepływu fazy ruchomej równej ok. 50 mm/min. Interesujący przebieg zmian sprawności układu PPEC zaobserwowano, gdy prędkość przepływu fazy ruchomej była w zakresie 50 – 80 mm/min. Badany układ PPEC wykazywał niewielkie pogorszenie sprawności, a największy wzrost wysokości półki, w stosunku do minimalnej wartości, wynosił ok. 30% przy prędkości 80 mm/min. Taka właściwość układu PPEC jest niewątpliwie dużą zaletą. Proces separacji, z wykorzystaniem płytek o długości 10 cm, można prowadzić w krótkim czasie, ok. 1 min, bez znaczącego pogorszenia sprawności. Najniższa wysokość półki odpowiadała, w przybliżeniu, dwukrotnej średnicy ziarna adsorbentu na płycie chromatograficznej. To świadczy, że PPEC można zaliczyć do wysokosprawnych metod chromatograficznych. W zakresie przepływu 3 – 10 mm/min, sprawność układu PPEC była najniższa.

4.2.5.1. Porównanie sprawność układów TLC, HPLC i PPEC

W związku z uzyskanymi niskimi wysokościami półek techniką PPEC, dokonano również wyznaczenia sprawności układów chromatograficznych HPTLC i HPLC. Zastosowano taki sam układ chromatograficzny (faza ruchoma, stacjonarna i substancja testowa) dla wszystkich rozważanych technik. Sprawność układu HPTLC przedstawiono w postaci zależności wysokości półki w funkcji dystansu migracji czoła fazy ruchomej (rys. 72), zaś metod HPLC (rys. 73, 74) i PPEC (rys. 71) jako wysokość półki w zależności od prędkości przepływu fazy ruchomej.

Najniższa wysokość półki układu HPTLC wynosiła ok. 25 μm , gdy dystans migracji czoła fazy ruchomej wynosił 45 mm. Wynik ten jest porównywalny z danymi literaturowymi [259]. Należy zaznaczyć, że dystans migracji strefy substancji był stosunkowo krótki, a w takich warunkach istotne znaczenie nabiera szerokość plamki startowej. Wkład tej szerokości, w zmniejszenie sprawności, maleje ze wzrostem dystansu migracji.

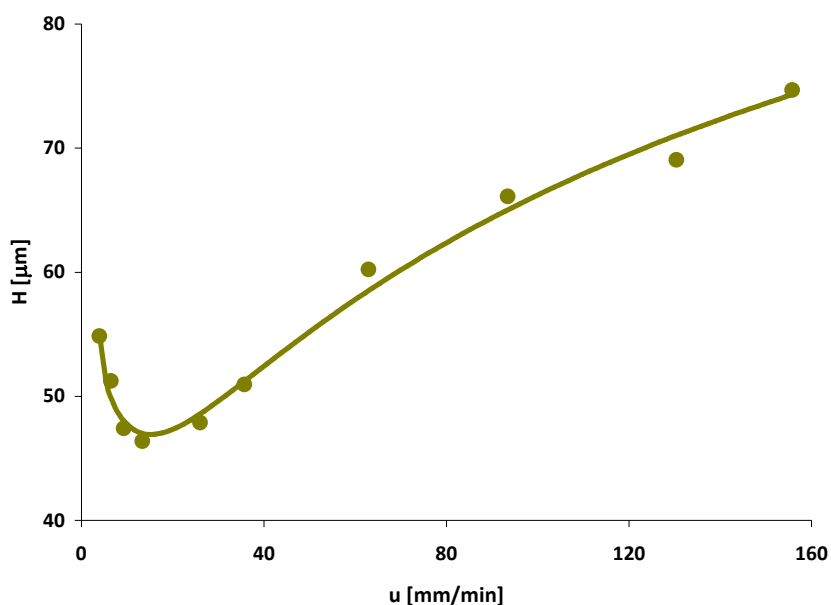


Rys. 72. Zależność całkowitej wysokości półki oraz wysokości półki pomniejszonej o wariancję dozowania od dystansu migracji czoła fazy ruchomej układu TLC; płytka HPTLC RP-18 W (Merck); faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym, pH = 5,0 (6,04 mM)

Sprawność układu HPLC wyznaczono dla kolumny, o typowych wymiarach: długość 10 cm, średnica wewnętrzna 4,6 mm. Wypełnienie kolumny stanowił adsorbent pochodzący z płytki chromatograficznej (HPTLC RP-18 W). Wysokości półek były wyznaczone w szerokim zakresie prędkości przepływu fazy ruchomej. Współczynnik retencji badanej substancji wynosił 0,56.

Na rys. 73 jest przedstawiona zależność wysokości półki w funkcji prędkości przepływu fazy ruchomej dla układu HPLC. Najniższa wysokość półki wynosiła 46 μm. Jest to wartość zaskakująca, gdyż zgodnie z danymi literaturowymi, wysokość półki w układach kolumnowych wysokosprawnych jest równa ok. 2 – 3 krotnej średnicy ziarna wypełnienia kolumny. W tym przypadku, średnia średnica ziarna wypełnienia, którym był adsorbent płytki HPTLC (Merck) jest w przedziale 5 – 6 μm. Można przypuszczać, że niska sprawność kolumny, wynika z niejednorodności wypełnienia kolumny chromatograficznej. Adsorbent pochodził bezpośrednio z płytki chromatograficznej i pomimo kilkugodzinnego utrzymywania w polu ultradźwiękowym, mógł zawierać związane/sklejone ze sobą cząstki. W warstwie adsorbentu, znajduje się środek

wiążący ziarna adsorbentu ze sobą. Prawdopodobnie, powodowało to niejednorodną strukturę wypełnienia kolumny.

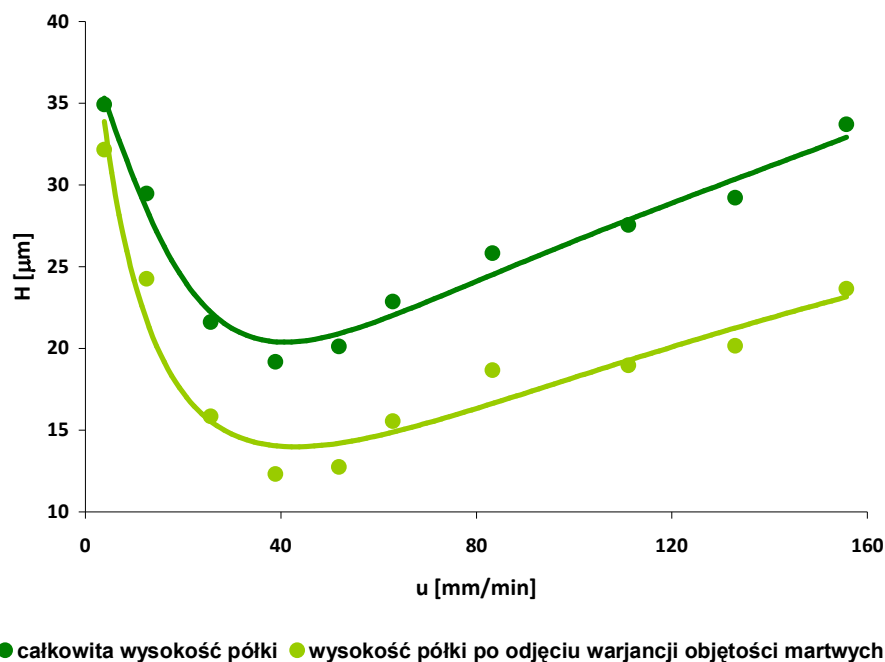


Rys. 73. Zależność wysokości półki w funkcji prędkości przepływu fazy ruchomej w układzie HPLC; kolumna – długość 10 cm, średnica wew. 4,6 mm, wypełnienie: adsorbent z płytki chromatograficznej HPTLC RP-18 W (Merck), faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym, pH = 5,0 (6,04 mM)

W związku z niską sprawnością diskutowanej kolumny, zastosowano wypełnienie dedykowane do wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Dlatego wykorzystano wypełnienie o zbliżonych parametrach i właściwościach do adsorbentu płytki chromatograficznej, tj. LiChrosorb RP-18 o średniej średnicy ziarna $5 \mu\text{m}$ (Merck). Wartość współczynnika retencji dla testowej substancji uległa niewielkiej zmianie i wynosiła 0,67.

Na rys. 74 została przedstawiona zależność wysokości półki w funkcji prędkości przepływu fazy ruchomej dla układu HPLC. Najniższa wysokość półki teoretycznej (po odjęciu wariacji objętości pozakolumnowych) wynosiła $12 \mu\text{m}$, co odpowiada ok. dwukrotnej średnicy ziarna adsorbentu. Jak można zauważyć, sprawność kolumny upakowanej adsorbentem dedykowanym do HPLC jest zdecydowanie wyższa niż wypełnieniem pochodzącym z płytki chromatograficznej. Ponadto, kolumna upakowana ziarnem LiChrosorb RP-18 wykazuje minimum

wysokości półki przy dwukrotnie większej prędkości przepływu, niż dla układu z adsorbentem z płytki chromatograficznej.



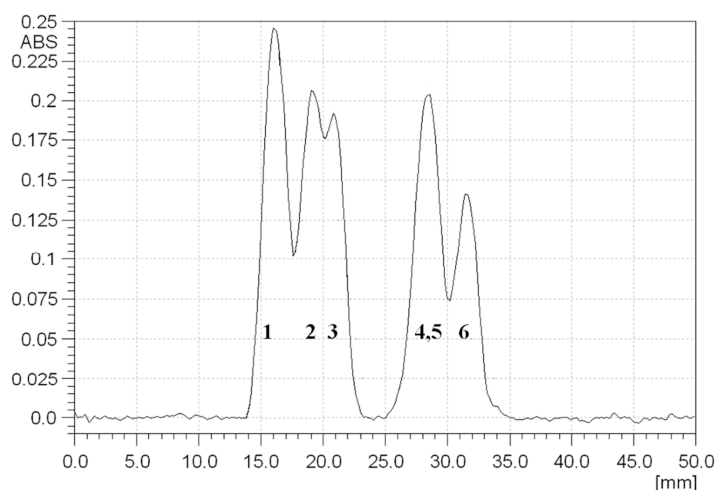
Rys. 74. Zależność całkowitej wysokości półki i wysokości półki po odjęciu wariacji objętości martwych układu HPLC od prędkości przepływu fazy ruchomej; kolumna: długość 10 cm, średnica wew. 4,6 mm, wypełnienie LiChrosorb RP-18 (5 µm); faza ruchoma: 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym, pH = 5,0 (6,04 mM)

Porównując sprawności układów separacyjnych, można stwierdzić, że PPEC charakteryzuje najniższą wysokością półki. Sprawności układów PPEC i HPLC były zbliżone, a najniższe wysokości półek były równe ok. dwukrotnej średnicy ziarna adsorbentu. Należy jednak zauważyć, że kolumna chromatograficzna, wypełniona adsorbentem usuniętym z płytki chromatograficznej, wykazywała bardzo niską sprawność, niższą niż układ HPTLC. Zaletą układu PPEC, w porównaniu do HPLC, była wyższa sprawność przy większej prędkości przepływu fazy ruchomej. Ponadto, przyrost wysokości półki wraz ze zwiększaniem prędkości przepływu fazy ruchomej był większy w HPLC niż PPEC. Sprawność układu HPTLC była najniższa. Uzyskane wyniki dla układów HPTLC i HPLC są porównywalne z danymi dostępnymi w literaturze fachowej [6].

4.3. Przykłady rozdzielania mieszanin substancji metodą PPEC

4.3.1. Separacja mieszaniny sterydów. Porównanie rozdzielania technikami PPEC, HPTLC i HPLC

Przeprowadzono rozdzielanie mieszaniny testowej składającej się z sześciu sterydów o podobnej budowie cząsteczkowej. Ponadto, proces separacji przeprowadzono metodami PPEC HPTLC i HPLC w tym samym układzie chromatograficznym, jaki zaprezentowano w poprzednim podrozdziale.



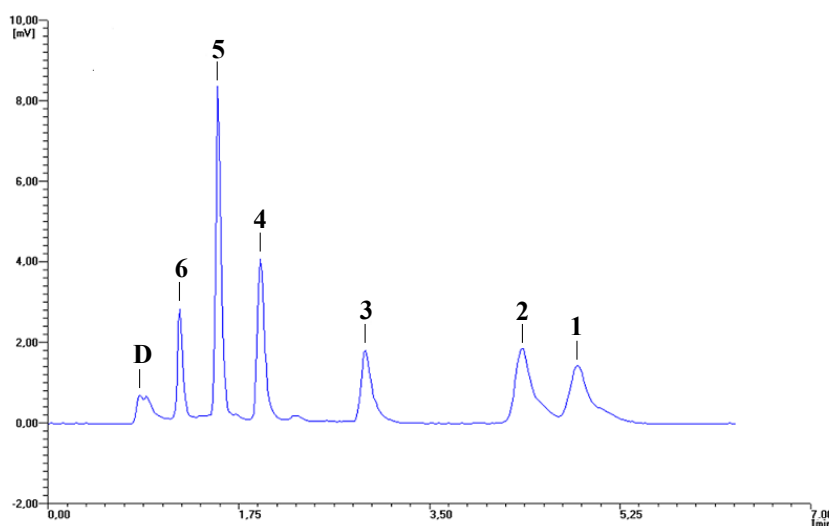
Rys. 75. Chromatogram mieszaniny testowej sterydów: izomaślan testosteronu (1), octan testosteronu (2), metanolom (3), octan hydrokortyzonu (4), octan dehydropregnonolonu (5), bursztynian prednisolononu (6); płytka HPTLC RP-18W w układzie klasycznej chromatografii cienkowarstwowej; faza ruchoma 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym pH = 5,0 (6,04 mM), dystans rozwijania 50 mm; czas separacji 6,5 min.

Na rys. 75 przedstawiono chromatogram otrzymany w układzie HPTLC. Jak można zauważyć, składniki próbki nie rozdzieliły się całkowicie, gdyż substancje wykazywały zbliżone wartości współczynnika opóźnienia. Wartości R_F odpowiednio wynosiły: izomaślan testosteronu – 0,32, octan testosteronu – 0,38, metanolom – 0,42, octan hydrokortyzonu – 0,57, octan dehydropregnonolonu – 0,57, bursztynianu prednisolononu – 0,63. Pomimo rozwijania chromatogramu na optymalnym dystansie dla płytek wysokosprawnych – 50 mm, sprawność układu była niewystarczająca, o czym świadczą szerokie piki. Zmiana składu fazy ruchomej (stężenia acetonitrylu)

nie przyniosła oczekiwanego efektu w postaci poprawienia rozdzielania składników mieszaniny.

Do rozdzielania próbki testowej zastosowano metodę HPLC. Kolumna chromatograficzna, o długości 10 cm, była upakowana ziarnem adsorbentu dedykowanym do metody (LiChrosorb RP-18). Zrezygnowano z kolumny z wypełnieniem pochodzącym z płytki chromatograficznej HPTLC RP-18 W, ponieważ jak wcześniej zauważono (roz. 4.2.5.1), jej sprawność była bardzo niska.

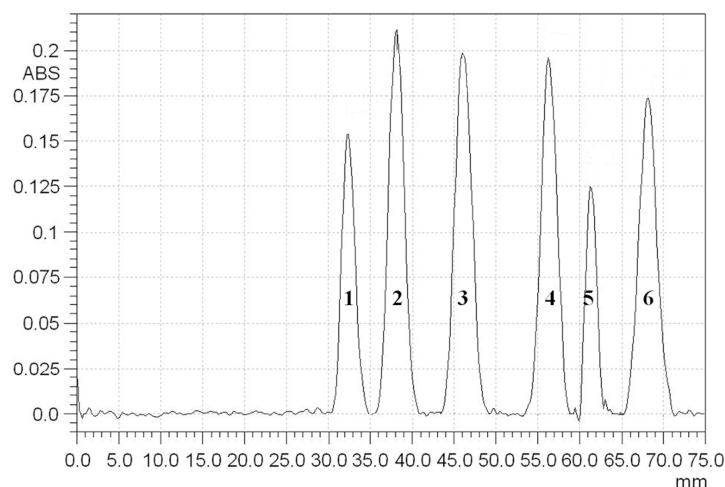
Na rys. 76 przedstawiono chromatogram otrzymany w układzie HPLC. Jak można zauważyć, składniki próbki rozdzieliły się całkowicie. Selektywność rozdzielania substancji uległa nieznacznej zmianie, ponieważ ziarno LiChrosorb RP-18 wykazuje nieco inne właściwości w stosunku do ziarna na płycie HPTLC RP-18 W. Rezultat ten potwierdza wcześniejsze przypuszczenia (4.2.5.1), że ziarno adsorbentu pochodzące z płytki chromatograficznej nie było odpowiednie do uzyskania efektywnego rozdzielania składników mieszaniny.



Rys. 76. Chromatogram HPLC. Kolumna: LiChrosorb RP-18; faza ruchoma: 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym, pH=5,0 (6,04 mM). Prędkość przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min. D – rozpuszczalnik próbki

Na rys. 77 przedstawiono elektrochromatogram mieszaniny testowej w układzie PPEC. Jak można zauważyć, sześciokładnikowa próbka uległa całkowitemu rozdzielaniu. Dystans migracji substancji o najniższej retencji wynosił 68 mm, zaś najsilniej zatrzymywanej na fazie stacjonarnej – 32 mm. Separacja badanej próbki testowej, w układzie elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej, była również możliwa (poza wysoką sprawnością) dzięki

wykorzystaniu znacznie większego dystansu rozwijania elektrochromatogramu niż w układzie HPTLC.

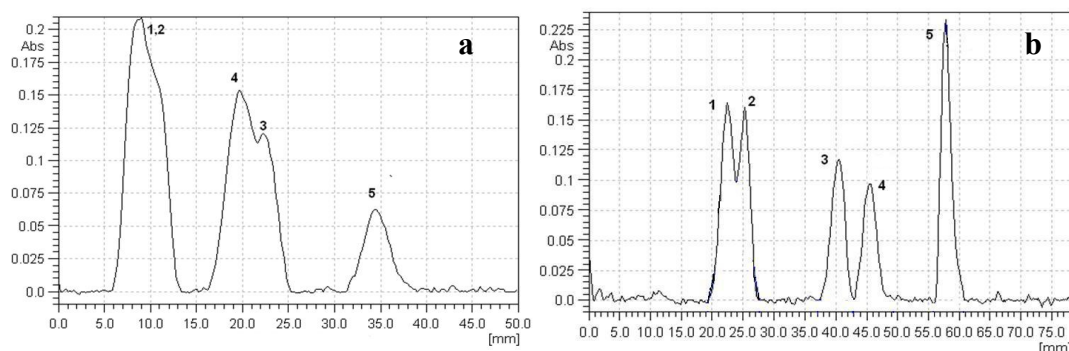


Rys. 77. Elektrochromatogram PPEC mieszaniny sterydów jak na rys 77. Faza stacjonarna: HPTLC RP-18W; faza ruchoma: 80 % acetonitrylu w buforze cytrynianowym, pH=5,0 (6,04 mM).; czas separacji: 5 min, U = 2,5 kV

Porównując rozdzielanie składników próbki można stwierdzić, że najlepsze efekty uzyskano metodami HPLC i PPEC. Natomiast separacja metodą HPTLC nie była w pełni skuteczna. Chromatogram obnaża podstawowe wady metody HPTLC tj. niską sprawność, brak regulacji prędkości przepływu fazy ruchomej, krótki dystans rozwijania. Z punktu widzenia wysokiej efektywności rozdzielania, bardzo ważnym czynnikiem jest krótki czas procesu chromatografowania. Rozdzielenie mieszaniny w układzie PPEC, przy prędkości przepływu fazy ruchomej równej 24,6 mm/min, uzyskano w ciągu 5 minut. Z tego wynika, że „wirtualny” front fazy ruchomej przebył dystans w przybliżeniu 120 mm, co odpowiada dwukrotnie większej migracji w porównaniu do układu HPTLC. W związku z tym, dystans migracji substancji, w układzie PPEC w tym samym czasie, jest znacznie dłuższy niż w układzie chromatografii cienkowarstwowej. Większa wydajność przepływu fazy ruchomej oraz dłuższy dystans migracji rozdzielanych substancji na płycie chromatograficznej, sprawiają, że rozdzielczości w układzie PPEC jest dużo większa niż w HPTLC. Analizując rozdzielanie mieszaniny w warunkach eksperymentów metodami HPLC i PPEC można zauważyć, że czas separacji był zbliżony, ale prędkość przepływu fazy ruchomej, w technice kolumnowej, była ok. pięciokrotnie większa niż w elektrochromatograficznej.

4.3.2. Rozdzielanie składników mieszaniny wybranych pochodnych kofeiny

W układach klasycznej chromatografii cienkowarstwowej, jak i ciśnieniowej chromatografii planarnej, migracja/retencja substancji jest wynikiem oddziaływań międzycząsteczkowych substancji ze składnikami fazy ruchomej i stacjonarnej. Natomiast w układzie PPEC, migracja cząsteczek obdarzonych ładunkiem, dodatkowo, zależy od pola elektrycznego.

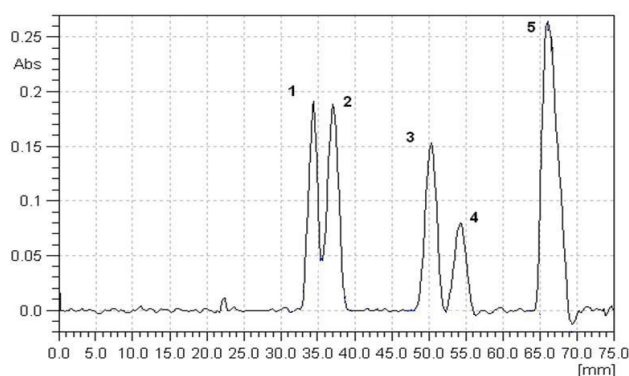


Rys. 78. Chromatogramy mieszaniny testowej: azatiopryna (1), kofeina (2), teobromina (3), teofilina (4), acyklowir (5), uzyskane metodami TLC (a) i PPEC (b), płytka HPTLC RP-18W (Merck), faza ruchoma: 20% acetonitrylu w buforze TRIS, pH = 8,0 (1 mM); HPTLC dystans rozwijania 50 mm, czas prowadzenia eksperymentu 25 minut; PPEC napięcie polaryzujące 2,5 kV, czas 9 minut

Na rys. 78 znajdują się chromatogramy mieszaniny złożonej z acyklowiru, azatiopryny, kofeiny, teobrominy i teofiliny, otrzymane metodą TLC i PPEC, w tym samym układzie chromatograficznym. Jak można zauważyć, metodą TLC nie udało się uzyskać pełnej separacji składników próbki. Natomiast w układzie PPEC widoczna jest poprawa rozdzielania. Rozwijanie elektrochromatogramu było prowadzone na dłuższym dystansie niż chromatogramu cienkowarstwowego. Ponadto, selektywność rozdzielania badanej mieszaniny uległa zmianie, gdyż substancje, których cząsteczki są obdarzone ładunkiem (jony), w polu elektrycznym ulegają elektroforezie, co stanowi dodatkowy czynnik wpływający na migrację tych cząsteczek i zmianę ich selektywności rozdzielania.

Dystans migracji substancji, których cząsteczki tworzą jony, w układzie PPEC może być dłuższy lub krótszy, niż w układzie, w którym nie występuje

zjawisko elektroforezy cząsteczek analitów. Jeżeli kierunek elektroforetycznej migracji cząsteczki substancji jest zgodny z elektroosmotycznym kierunkiem przepływu fazy ruchomej, wtedy jej dystans migracji jest dłuższy (porównaj dyskusję w rozdziale 1.1.6). Natomiast, jeżeli kierunek elektroforetyczny jest przeciwny, wtedy dystans migracji substancji jest krótszy lub może być odwrócony w stosunku do kierunku przepływu fazy ruchomej. Wpływ migracji elektroforetycznej na całkowity dystans migracji substancji, można regulować poprzez zmianę pH lub/i rodzaju buforu w fazie ruchomej – rys. 79.



Rys. 79. Elektrochromatogram mieszaniny testowej: azatiopryna (1), kofeina (2), teobromina (3), teofilina (4), acyklowir (5), na płytkach HPTLC RP-18W (Merck); faza ruchoma: 20% acetonitrylu w buforze cytrynianowym pH = 4,0 (1 mM), U = 2,5 kV, czas 9 minut

Rozdzielanie substancji jonowych, metodą PPEC, prowadzi do zmiany selektywności rozdzielania w stosunku do metody HPTLC. Taka cecha układów PPEC jest pożądana, ponieważ pozwala na uzyskanie dodatkowych zmian selektywności rozdzielania substancji, których strefy są położone blisko siebie lub nakładają się w układach chromatografii cieczowej.

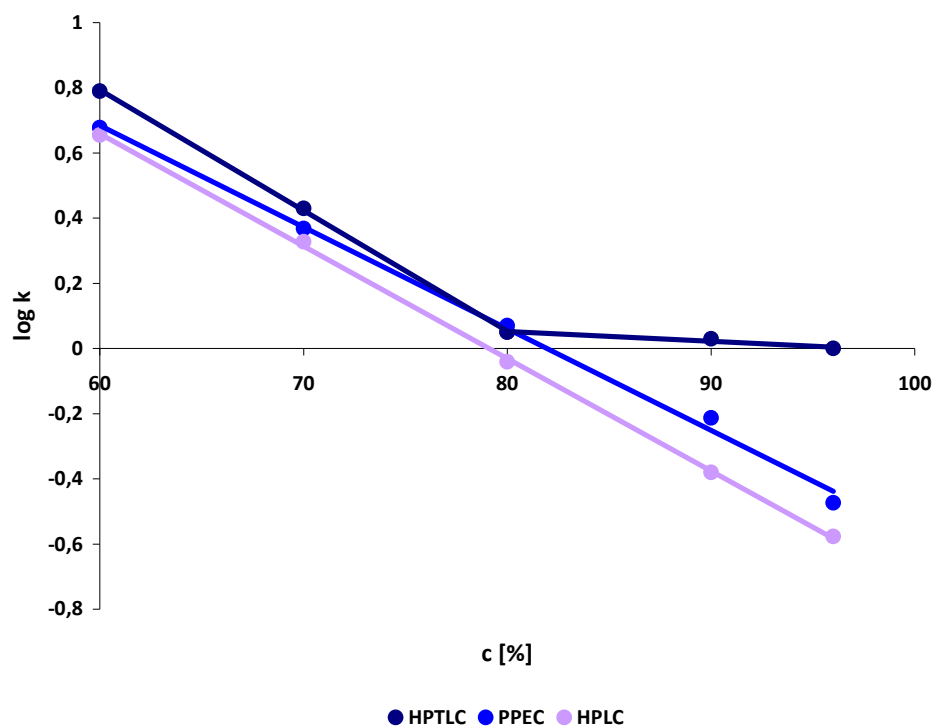
4.3.3. Wykorzystanie techniki PPEC do wyznaczania zależności retencja – skład ilościowy fazy ruchomej

Najpopularniejszym równaniem, wykorzystywanym do wyznaczenia korelacji pomiędzy retencją substancji, a stężeniem organicznego modyfikatora w fazie ruchomej, w układzie faz odwróconych, jest [260]:

$$\log k = \log k_w - m \cdot C \quad (20)$$

gdzie k_w – współczynnik retencji substancji, gdy fazą ruchomą jest woda lub wodny bufor, m – stała (współczynnik kierunkowy), c – stężenie modyfikatora w fazie ruchomej.

Na podstawie tego równania można przewidzieć zmianę retencji substancji, selektywności rozdzielania w układzie, zinterpretować zależność pomiędzy retencją a strukturą analizowanych substancji oraz badać relację pomiędzy aktywnością biologiczną substancji a jej strukturą cząsteczkową [34,216].



Rys. 80. Zależność współczynnika retencji, $\log k$, 1-hydroksyfenylo-2-naftolu w zależności od stężenia acetonitrylu w buforze octanowym, pH = 4,8 (5,4 mM); faza stacjonarna HPTLC RP-18 W (Merck); U = 2,0 kV

Na rys. 80 przedstawiono zależności retencji substancji od stężenia organicznego składnika w fazie ruchomej, w tym samym układzie chromatograficznym, metodą PPEC, HPLC i HPTLC. Wartości $\log k$ wyznaczono dla 1-hydroksyfenylo-2-naftolu, którego cząsteczki, w stosowanych roztworach fazy ruchomej, były w postaci niezjonizowanej. Wybór takiej fazy ruchomej gwarantował, że migracja substancji, wynikała wyłącznie z jej podziału pomiędzy fazę ruchomą i stacjonarną. Było to bardzo ważne z punktu widzenia omawianej

korelacji, ponieważ w metodach HPTLC i HPLC, cząsteczki obdarzone ładunkiem nie ulegają elektroforezie.

Jak można zauważyć, retencja substancji maleje wraz ze wzrostem stężenia acetonitrylu w fazie ruchomej. Malejące zatrzymanie substancji przez fazę stacjonarną wynika ze wzrostu siły elucyjnej eluentu. Wyżej przedstawione zależności, dla PPEC i HPLC, wykazują bardzo dobrą korelację – R^2 zbliżone do jedności, przy podobnych wartościach współczynnika nachylenia prostej w badanym zakresie stężenia organicznego składnika w fazie ruchomej – tabela 13. Położenie punktów zależności dla układu HPTLC jest podobne jak dla PPEC i HPLC, ale tylko wtedy, gdy stężenie acetonitrylu wynosiło 60 – 80 %. Natomiast, w układzie o wyższym stężeniu organicznego składnika (80 – 96 %) można odnotować wyraźne odchylenie od prostoliniowego przebiegu zależności. Prawdopodobnie, taki przebieg zależności jest spowodowany silną preadsorpcją par acetonitrylu w trakcie kondycjonowania układu. W układzie, w którym stężenie acetonitrylu było większe niż 80%, dochodziło do znaczącego wzrostu ciśnienia parcjalnego tego rozpuszczalnika, co dalej prowadzi do wzmożonej preadsorpcji acetonitrylu.

Tabela 13. Zestawienie parametrów korelacyjnych

Metoda	Równanie prostej	R^2
HPTLC	$\log k = -0,0220 C + 2,0023$	0,8699
HPLC	$\log k = -0,0345 C + 2,7277$	0,9996
PPEC	$\log k = -0,0312 C + 2,5571$	0,9966

Jak wcześniej wspomniano wartości współczynników nachylenia prostej były nieznacznie różne dla układów PPEC (-0,0312) i HPLC (-0,0345). Z tego wynika, że retencja substancji w pierwszym układzie maleje ze wzrostem stężenia acetonitrylu w mniejszym stopniu niż w drugim. Prawdopodobnie, ten efekt jest związany ze zmianami temperatury płytki chromatograficznej, a więc i fazy ruchomej, w trakcie procesu chromatografowania w polu elektrycznym (w trakcie prowadzenia procesu separacji generowane jest ciepło Joule'a, które odpowiada

za wzrost temperatury w układzie PPEC, 4.1.3). Niestety, komora do PPEC nie była zaopatrzona w wymiennik ciepła. W celu ograniczenia tego efektu zastosowano niskie napięcie polaryzujące tj. 2,0 kV, co pozwoliło, w przybliżeniu, na zachowanie stałej temperatury w trakcie całego procesu chromatografowania (zanotowane zmiany temperatury wynosiły $\pm 1^{\circ}\text{C}$).

5. Wnioski

- I. W niniejszej pracy, do rozwijania elektrochromatogramów planarnych wykorzystano urządzenie własnej konstrukcji, które pozwalało na bezpieczne i efektywne prowadzenie eksperymentów. Po raz pierwszy został zastosowany prototyp komory do PPEC, który umożliwiał pomiar przepływu fazy ruchomej w trakcie procesu separacji.
- II. Uzyskiwane wyniki charakteryzowały się wysoką powtarzalnością dystansu migracji, o czym świadczą niskie wartości względnego odchylenia standardowego (RSD).
- III. Wykazano, że efekt elektroosmotyczny w układach PPEC jest uzależniony od wielu czynników:
 - a) napięcia polaryzującego płytkę chromatograficzną,
 - i) prędkość przepływu fazy ruchomej jest stała, a jej przepływ wprost proporcjonalny do napięcia polaryzującego płytkę w zakresie 0,4 – 2,5 kV,
 - ii) zastosowanie wyższego napięcia skutkuje wzmożoną migracją fazy ruchomej, co z jednej strony pozwala na skrócenie czasu rozdzielania, zaś z drugiej, jest niekorzystne, ponieważ migracja fazy ruchomej jest nie kontrolowana ze względu na wzrost temperatury płytki chromatograficznej (ciepło Joule'a);
 - b) czasu zwilżania warstwy adsorbentu,
 - i) prędkość przepływu fazy ruchomej rośnie wraz z wydłużeniem czasu zwilżania adsorbentu roztworem fazy ruchomej. Optymalny czas zwilżania wynosi 2 - 5 minut, dłuższy czas równoważenia/zwilżania nie wpływa znacząco na prędkość przepływu;
 - c) składu fazy ruchomej,
 - i) prędkości przepływu fazy ruchomej zależy od rodzaju i stężenia organicznego składnika, gdyż efekt elektroosmotyczny jest wypadkową wpływu takich jej właściwości jak stała dielektrycznej i lepkości oraz potencjału elektrokinetycznego granicy faz,
 - ii) wraz ze wzrostem stężenia elektrolitu rośnie prędkość przepływu elektroosmotycznego. Stosowanie buforów o stężeniu wyższym niż 10 mM jest niekorzystne, ponieważ prowadzi do zwiększonego

wzrostu temperatury płytki chromatograficznej; z tego powodu konieczne staje się termostatowanie układu oraz prowadzenie dalszych badań nad wykorzystaniem płytek dedykowanych do elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej,

- iii) stosowanie niektórych buforów zawierających składniki organiczne np. bufor TRIS, w fazie ruchomej powoduje, że prędkość przepływu maleje w trakcie prowadzenia eksperymentu,
 - iv) prędkość przepływu fazy ruchomej zależy od pH buforu. Największą prędkością przepływu fazy ruchomej charakteryzuje się w układ z fazą stacjonarną na bazie żelu krzemionkowego i buforem, którego pH wynosi 8,
 - v) obecność, substancji tworzących asocjaty jonowe w roztworze fazy ruchomej wpływa na prędkość przepływu elektroosmotycznego;
- d) rodzaju fazy stacjonarnej,
- i) prędkość przepływu fazy ruchomej w układach z płytkami typu „W” jest większa niż z płytkami nie oznaczonymi literą W, płytki pierwszego typu charakteryzują się mniejszą gęstością pokrycia łańcuchami alifatycznymi od drugiego typu;
- e) ciśnienia wywieranego na warstwę adsorbentu
- i) prędkość przepływu fazy ruchomej maleje wraz ze wzrostem ciśnienia wywieranego na warstwę adsorbentu.

IV. Układy PPEC charakteryzują się niską wysokością półki teoretycznej, porównywalną do układów HPLC i zdecydowanie niższą niż dla układów HPTLC. Najniższa otrzymana wysokość półki jest równa 9 μm , co odpowiada około dwukrotnej średnicy ziarna adsorbentu. Wysokość półki zależy od:

- a) rodzaju adsorbentu, największa sprawność jest osiągnięta dla układów z płytkami HPTLC, których warstwa adsorbentu posiada najmniejszą średnicę ziarna;
- b) metody dozowania, układ PPEC wykazuje najwyższą sprawność, gdy dozowanie substancji jest prowadzone na suchą płytkę chromatograficzną za pomocą techniki aerozolowej;

- c) prędkości przepływu fazy ruchomej, podobnie jak w innych metodach chromatograficznych. Ponadto ważne jest, że sprawność układu PPEC jest wysoka w szerokim zakresie prędkości przepływu. Taka właściwość jest dużą zaletą, ponieważ proces separacji można prowadzić przy wysokiej prędkości przepływu, bez znaczącego pogorszenia sprawności;
- d) dystansu migracji substancji. Korzystne jest rozwijanie elektrochromatogramów na całej długości płytki chromatograficznej, ponieważ wysokość półki jest niska i nie ulega znaczącym zmianom z wydłużeniem dystansu migracji substancji, w odróżnieniu do techniki chromatografii cienkowsarstwowej.

V. Przydatność metody PPEC, do zastosowania w praktyce laboratoryjnej, jest przedstawiona na przykładzie rozdzielania mieszanin substancji biologicznie aktywnych, w porównaniu do innych popularnych metod chromatograficznych tj. HPTLC, HPLC:

- a) na przykładzie separacji mieszaniny sterydów można stwierdzić, że metoda PPEC może być równie efektywna jak metoda HPLC i znacznie bardziej efektywna niż metoda HPTLC,
- b) zastosowanie techniki PPEC do rozdzielania mieszaniny kofeiny i jej pochodnych, doprowadziło do zmiany selektywności separacji w stosunku do metody HPTLC. Taka cecha układów PPEC jest bardzo pożądana, ponieważ pozwala na zmianę selektywności rozdzielania w stosunku do układów chromatografii cieczowej.
- c) przebieg zależności retencja – skład fazy ruchomej, uzyskany metodą PPEC, jest bardzo podobny do przebiegu zależności uzyskanego techniką HPLC, co potwierdza możliwość prowadzenia procesu elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej w warunkach równowagi fizykochemicznej, podobnie jak w układach chromatograficznych kolumnowych, w przeciwieństwie do układów chromatografii cienkowsarstwowej.

6. Literatura

- ¹ C.G. Horváth, S.R. Lipsky, *Nature* 221 (1966), 748
- ² C.G. Horváth, B.A. Preiss, S.R. Lipsky, *Anal. Chem.* 39 (1967), 1422
- ³ M.W. Dong, *Modern HPLC for Practicing Scientists*, (2006) John Wiley & Sons, USA
- ⁴ J.S. Kowalczyk, *Opis serii prototypowych chromatografów cieczowych*, (1975) Politechnika Gdańska, Polska
- ⁵ <http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/5990-5061EN.pdf>
- ⁶ L.R. Snyder, J. J. Kirkland, J. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, (2010) John Wiley & Sons, USA
- ⁷ K.K. Unger, *Packings and Stationary Phases in Chromatographic Techniques*, (1990) Marcel Dekker, New York, USA
- ⁸ L.C. Sander, S.A. Wise, *CRC. Crit. Rev. Anal. Chem.*, 18 (1987), 299
- ⁹ H.A. Claessens, *Characterization of Stationary Phases for Reversed Phase Liquid Chromatography; Column Testing, Classification and Chemical Stability*, (1999) TUE, Eindhoven, Holandia
- ¹⁰ D. Qiang, W. Lu, *J. Petrol. Sci. Eng.* 22 (1999), 31
- ¹¹ L.Ch. Heinz, H. Pasch, *Polymer* 46 (2005), 12040
- ¹² R. Izquierdo-Hornillos, R. Gonzalo-Lumbreras, *J. Chromatogr. B* 798 (2003), 69
- ¹³ H. Hikino, C. Konno, *J. Chromatogr.* 211 (1981), 123
- ¹⁴ P. Kulanthaivel, S.W. Pelletier, *J. Chromatogr.* 402 (1987), 366
- ¹⁵ C.E. Poole, S.K. Poole, *Chromatography today*, (1991) Elsevier, Amsterdam, Holandia
- ¹⁶ W.H. Menges, D.W. Armstrong, *Chiral Separation by Liquid Chromatography*, (1991) ASC, Washington D.C., USA
- ¹⁷ T. Sokoliess, U. Menyes, U. Roth, T. Jira, *J. Chromatogr. A*, 948 (2002), 309
- ¹⁸ G. Subramanian, *Chiral Separation Techniques (Third Edition)*, (2007) Wiley-VCH, Niemcy
- ¹⁹ Y. Saito, K. Jinno, J.J. Pesek, Y.L. Chen, G. Luehr, J. Archer, J.C. Fetzer, W.R. Biggs, *Chromatographia* 38 (1994), 295
- ²⁰ J.J. Pesek, T. Cash, *Chromatographia* 27 (1987), 559
- ²¹ K. Jinno, *Chromatographic Separation Based on Molecular Recognition*, (1996) Wiley-VCH, New York, USA

-
- ²² C. Pidgeon, U.V. Venkataram, *Anal. Biochem.* 176 (1989), 36
- ²³ B. Buszewski, M. Jezierska-Świtała, R. Kaliszan, A. Wojtczak, K. Albert, S. Bachmann, M.T. Matyska, J.J. Pesek, *Chromatographia* 53 (2001), 204.
- ²⁴ J. Nawrocki, *Chromatographia* 31 (1999), 177
- ²⁵ J. Nawrocki, M. P. Rigney, A. McCormick, P. W. Carr, *J. Chromatogr.* 657 (1993), 229
- ²⁶ J. Nawrocki, C.J. Dunlap, P.W. Carr, J.A. Blackwell, *Biotechnology Progress* 10 (1994), 561
- ²⁷ E. Forgács, T. Cserháti, *Adv. Chromatogr.* 40 (2000), 359
- ²⁸ C. J. Dunlap, C.V. McNeff, D. Stoll, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 73(21) (2001), A598
- ²⁹ B. Buszewski, M. Jaroniec, R.K. Gilpin, *J. Chromatogr. A* 673 (1994), 11
- ³⁰ V. Tittlebach, R.K. Gilpin, *Anal. Chem.* 67 (1995), 347
- ³¹ P.A. Bristow, J.H. Knox, *Chromatographia* 13 (1977), 339
- ³² H. Engelhardt, M. Jungheim, *Chromatographia* 29 (1990), 59
- ³³ M.J. Walters, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70 (1987), 465
- ³⁴ R. Kaliszan, *Handbook of Advanced Materials Testing, Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationship*, (1995) Marcel Dekker Inc., NY, USA
- ³⁵ R. Kaliszan, M. van Straten, M. Markuszewski, C.A. Cramers, H.A. Claessens, *J. Chromatogr. A* 835 (1999), 455
- ³⁶ <http://www.waters.com>
- ³⁷ N.A. Izmailov, M.S. Shraiber, *Farmatizija* 3 (1938), 1
- ³⁸ E. Stahl, *Pharmazie* 11 (1956), 633
- ³⁹ E. Stahl, *Chemiker-Ztg* 82 (1958), 323
- ⁴⁰ H. Halpaap, *J. Chromatogr.* 78 (1973), 77
- ⁴¹ A. Zlatkis, R.E. Kaiser, *HPTLC high performance thin-layer chromatography*, (1977) Elsevier, Amsterdam, Holandia
- ⁴² E. Reich, *Instrumental Thin-Layer Chromatography (Planar Chromatography)*, *Handbook of Thin-Layer Chromatography Third Edition, Revised and Expanded*; edytorzy: J. Sherma, B. Fred; (2003) Marcel Dekker, NY, USA
- ⁴³ A. Oriňák, H. F. Arlinghaus, G. Vering, R. Oriňáková, S. Hellweg, *J. Chromatogr. A* 113 (2005), 1084
- ⁴⁴ G. Morlock, Y. Ueda, *J. Chromatogr. A*, 1143 (2007), 243
- ⁴⁵ G.J. Van Berkel, B. A. Tomkins, V. Kertesz, *Anal. Chem.* 79 (2007), 2278

-
- ⁴⁶ D.T. Isbell, A.I. Gusev, N.I. Taranenko, C.H. Chen, D.M. Hercules, J. Fresenius, *Anal. Chem.* 365 (1999), 625
- ⁴⁷ K.J. Bare, H. Read, *Analyst* 112 (1987), 433
- ⁴⁸ R. A. de Zeeuw, *Anal. Chem.* 40 (1968), 915
- ⁴⁹ E. Soczewiński, *J. Chromatogr.* 516 (1990), 461
- ⁵⁰ T.H. Dzido, *J. Planar Chromatogr.* 6 (1993), 78
- ⁵¹ T.H. Dzido, *Modern TLC Chambers, in Planar Chromatography – A Retrospective View for the Third Millennium*; edytor: Sz. Nyiredy, (2001) Springer, Budapeszt, Węgry
- ⁵² T.H. Dzido, Pat. Pol., 280087, 1989
- ⁵³ T.H. Dzido, W. Gołkiewicz, M.A. Hawrył, E. Soczewiński, Patent Polski, nr 303531, 1994
- ⁵⁴ T.H. Dzido, *zgłoszenie patentowe komory DS-G*, 1995
- ⁵⁵ T.H. Dzido, Patent Polski, nr 313053, 1996
- ⁵⁶ T.H. Dzido, w *Encyclopedia of Separation Science*; edytorzy: I Wilson, M. Cooke, C. Poole, (2000) Academic Press Ltd., London, Wielka Brytania
- ⁵⁷ T.H. Dzido, B. Polak, *Methodical Possibilities of the Horizontal Chambers in PLC, Preparative Layer Chromatography*; edytorzy: T. Kowalska, J. Sherma, CRC Press, (2006) Taylor and Francis Group, Boca Raton, USA
- ⁵⁸ <http://www.camag.com/v/products/development/amd2.html>
- ⁵⁹ C.F. Poole, S.K. Poole, *Anal. Chem.* 66 (1994), 27A
- ⁶⁰ O. Hadzija, *J. Liq. Chromatogr.* 10 (1987), 3673
- ⁶¹ D. Chobanov, R. Tarandjiiska, B. Nikolova-Damyanova, *J. Planar Chromatogr.* 5 (1992), 157
- ⁶² B. Nikolova-Damyanova, B. Amidzhin, *J. Planar Chromatogr.* 4 (1991), 397
- ⁶³ M. Ajmal, A. Mohammad, S. Anwar, *J. Planar Chromatogr.* 3 (1990), 511
- ⁶⁴ C. Michalek, *J. Planar Chromatogr.* 3 (1990), 273
- ⁶⁵ K. Price, H. Perpall, G. Bicker, *J. Liq. Chromatogr.* 12 (1990), 2783
- ⁶⁶ A. Janssen, D. Sobczak, *Chromatographia* 13 (1980), 479
- ⁶⁷ B. Paw, G. Misztal, *J. Planar Chromatogr.* 13 (2000), 195
- ⁶⁸ G. Zgorka, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 24 (2001), 1397
- ⁶⁹ M. Waksmundzka-Hajnos, *J. Planar Chromatogr.*, 4 (1991), 127

-
- ⁷⁰ M. Waksmundzka-Hajnos, M.L. Bieganowska, A. Petruczynik, *J. Planar Chromatogr.* 5 (1992), 83
- ⁷¹ G. Zgórkka, *J. Liq. Chromatogr.*, 20 (1997), 1397
- ⁷² R. Bushan, *J. Chromatogr. Sci.* 55 (1991), 353
- ⁷³ E. Soczewiński, H. Szumiło, *J. Chromatogr.* 81 (1973), 99
- ⁷⁴ R.S. Bayliss, J.R. Knowles and G.B. Wybrandt, *J. Biochem.* 113 (1969), 377
- ⁷⁵ J.G. Heathcote, C. Haworth, *J. Chromatogr.* 43 (1969), 84
- ⁷⁶ J.M. Davies, *J. Chromatogr.* 69 (1972), 333
- ⁷⁷ K. Randerath, H. Struck, *J. Chromatogr.* 61 (1961), 365
- ⁷⁸ H. Rössler, *Thin-Layer Chromatography A Laboratory Handbook*; edytor: E. Stahl, (1969) Springer-Verlag, Berlin, Niemcy
- ⁷⁹ J.I. Haleem, *J. Liq. Chromatogr. & RT* 3, 10 (1980), 1423
- ⁸⁰ N.D. Danielson, J.E. Katon, S.P. Bouffard, Z. Zhu, *Anal. Chem.* 64 (2002), 2183
- ⁸¹ <http://www.microsolytech.com/oplc.asp>
- ⁸² E. Tyihak, E. Mincsovics, H. Kalasz, *J. Chromatogr.* 174 (1979), 75
- ⁸³ E. Mincsovics, E. Tyihak, J. Kalasz, *J. Chromatogr.* 191 (1980), 293
- ⁸⁴ Z. Witkiewicz, J. Błądek, *J. Chromatogr. A* 373 (1986), 111
- ⁸⁵ R.E. Kaiser, R.I. Rieder, *Planar Chromatography*, Vol. 1. Heidelberg: Hiithig, 1986
- ⁸⁶ R. E. Kaiser, *Einführung in die HPLC*, Heidelberg: Hiithig, 1987
- ⁸⁷ E. Tyihak, E. Mincsovics, *J. Planar Chromatogr.* 1 (1987), 6
- ⁸⁸ Sz. Nyiredy, *Modes of development in planar chromatography. Forced Flow, OPLC, and centrifugal modes of development*; edytorzy: I.D. Wilson, E.R. Adlard, M. Cooke, C.F. Poole, *Encyclopedia of Separation Science*, Vol. 2, Academic Press, London, UK
- ⁸⁹ E. Mincsovics, E. Tyihak, *J. Planar. Chromatogr.* 1 (1988), 309
- ⁹⁰ E. Mincsovics, K. Ferenczi-Fodor, E. Tyihak, *Overpressured Layer Chromatography, Handbook Thin Layer Chromatography*; edytorzy: J. Sherma, B. Fred, (2003) Marcel Dekker, New York, USA
- ⁹¹ E. Tyihak, E. Mincsovics, T. J. Szekely, *J. Chromatogr.* 471 (1989), 375
- ⁹² L. Botz, Sz. Nyiredy, O. Sticher, *J. Planar. Chromatogr.* 5 (1990), 352
- ⁹³ Sz. Nyiredy, *TrAC* 20 (2001), 2
- ⁹⁴ H. Strain, *J. Am. Chem. Soc.*, 61 (1939), 1292
- ⁹⁵ H. Strain, J. Sullivan, *Anal. Chem.* 23 (1951), 816

-
- ⁹⁶ V. Pretorius, B.J. Hopkins, J.D. Schieke, *J. Chromatogr.* 99 (1974), 23
- ⁹⁷ J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *J. Chromatogr.* 218 (1981), 209
- ⁹⁸ J.H. Knox and I.H. Grant, *Chromatographia*, 24 (1987) 135
- ⁹⁹ J.H. Knox and I.H. Grant, *Chromatographia*, 32 (1991) 317
- ¹⁰⁰ E.R. Verheij, U.R. Tjaden, W.M.A. Niessen, J van der Greef, *J. Chromatogr.* 554 (1991), 339
- ¹⁰¹ G.P. Rozing, A. Dermaux, P. Sandra w *Capillary electrochromatography* (Journal Of Chromatography Library vol.62; edytorzy: Zdeněk Deyl, František Švec, (2001) Elsevier Science, Holandia
- ¹⁰² K.M. Hutterer, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.* 71 (1999), 1293
- ¹⁰³ G. Choudhary, C. Horvath, *J. Chromatogr. A* 781 (1997), 161
- ¹⁰⁴ C. Yan, D. Schaufelberger, F. Erni, *J. Chromatogr. A* 670 (1994), 15
- ¹⁰⁵ Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques, 3rd Edition editor James P. Landers, CRC Press, Taylor & Francis, 2008, FL, USA
- ¹⁰⁶ D.J. Rose, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.* 59 (1987), 799
- ¹⁰⁷ X. Huang, M.J. Gordon, R.N. Zare, *Anal. Chem.* 60 (1988), 375
- ¹⁰⁸ A. Maruška, U. Pyell, *J. Chromatogr. A* 782 (1997), 167
- ¹⁰⁹ W. Wei, G.A. Luo, G.Y. Hua, C. Yan, *J. Chromatogr. A* 817 (1998), 65
- ¹¹⁰ A.P. McKeown, M.R. Euerby, C.M. Johnson, M. Koeberle, H. Lomax, H. Ritchie, P. Ross. *Chromatographia* 52 (2000), 777
- ¹¹¹ M.R. Euerby, C.M. Johnson, S.F. Smyth, N. Gillott, D.A. Barrett, P.N. Shaw, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999), 305
- ¹¹² S. Li and D.K. Lloyd, *Anal. Chem.* 65 (1993), 3684
- ¹¹³ N.W. Smith, M.B. Evans, *Chromatographia* 41 (1995), 197
- ¹¹⁴ M.G. Cikalo, K.D. Bartle, P. Myers, *Anal. Chem.* 71 (1999), 1820
- ¹¹⁵ S. Nilsson, L. Schweitz, M. Petersson, *Electrophoresis* 18 (1997), 884
- ¹¹⁶ T. Tsuda, *Anal. Chem.* 59 (1987), 521
- ¹¹⁷ J.H. Knox, I.H. Grant, *Chromatographia* 32 (1991), 317
- ¹¹⁸ D.M. Li, H.H. Knobel, V.T. Remcho, *J. Chromatogr. B* 695 (1997), 169
- ¹¹⁹ J. Zhang, X. Huang, S. Zhang, C. Horwith, *Anal. Chem.* 72 (2000), 3022
- ¹²⁰ M.R. Euerby, D. Gilligan, C.M. Johnson, S.C.P. Roulin, P. Myers and K.D. Bartle, *J. Microcol. Sep.* 9 (1997), 373

-
- ¹²¹ L. Zhang, Y. Zhang, W. Shi, H. Zou, *J. High Res. Chromatogr.* 22 (1999), 666
- ¹²² N.W. Smith, M.B. Evans, *J. Chromatogr. A* 832 (1999), 41
- ¹²³ A.E. Barron, D.D. Soane, H.W. Blanch, *J. Chromatogr.* 652 (1993), 3
- ¹²⁴ P.G. Righetti, C. Gelfi, *Forensic Science Intl.* 92 (1998), 239
- ¹²⁵ S. Li, D.K. Lloyd, *J. Chromatogr. A* 666 (1994), 321
- ¹²⁶ D.K. Lloyd, S. Li, P. Ryan, *J. Chromatogr. A* 694 (1995), 285
- ¹²⁷ C. Fujimoto, J. Kino, H. Sawada, *J. Chromatogr. A* 715 (1995), 107
- ¹²⁸ A. Banholczer, U. Pyell, *J. Microcol. Sep.* 10 (1998), 321
- ¹²⁹ H. Rebscher, U. Pyell, *J. Chromatogr. A* 737 (1996), 171
- ¹³⁰ K. Pusecker, J. Schewitz, P. Gfrorer, L.H. Tseng, K. Albert E. Bayer, *Anal. Chem.* 70 (1998), 3280
- ¹³¹ P. Gfrorer, J. Schewitz, K. Pusecker, E. Bayer, *Anal. Chem.* 71 (1999), 315A
- ¹³² H.J. Jakubetz, H. Czesla, V. Schurig, *J. Microcol. Sep.* 9 (1997), 421
- ¹³³ R.J. Hunter, *Foundations of Colloid Science*, Clarendon Press, Oxford, 1986, UK
- ¹³⁴ R.J. Hunter, *Zeta Potential in Colloid Science Principles and Applications*, (1988) Academic Press, London, , Wielka Brytania
- ¹³⁵ P.C. Hiemenz, R. Rajagopalan, *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, (1997) Marcel Dekker, New York, 3rd ed., USA
- ¹³⁶ M. von Smoluchowski, *Bull. Intern. Acad. Sci. Cracovie* (1903), 184
- ¹³⁷ J. Billen, K. Broeckhoven, A. Liekens, K. Choikhet, H. Rozing, G. Desmet, *J. Chromatogr. A* 1210 (2008), 30
- ¹³⁸ K.D. Altria, N.W. Smith, C.H. Turnbull, *J. Chromatogr. B* 717 (1998), 341
- ¹³⁹ S.E. van de Bosch, S. Heemstra, J.C. Kraak and H. Poppe, *J. Chromatogr. A* 755 (1996), 165
- ¹⁴⁰ G. Choudhary, Cs. Horváth, *J. Chromatogr. A* 781 (1997), 161
- ¹⁴¹ C.E. Schwartz, J. M. Smith, *Ind. Eng. Chem.*, 45 (1953), 1209
- ¹⁴² J.T.G. Overbeek, P.W.O. Wijga, *Rec. Trav. Chim.* 65 (1946), 556
- ¹⁴³ J.T.G. Overbeek, *Colloid Science*; edytor: H.R. Kruyt, (1952) Elsevier, New York, USA
- ¹⁴⁴ A.S. Rathore, Cs. Horvath, *J.Chromatogr. A* 781 (1997), 185
- ¹⁴⁵ N.I. Zharkikh, X. Pendze, S.S. Dukhin, *Colloid Journal* 56 (1994), 573
- ¹⁴⁶ G. Ross, M.M. Dittmann, G.P. Rozing, *Internat. Lab.* (1996), 10A
- ¹⁴⁷ J.H. Knox, K.A. McCormack, *Chromatographia* 38 (1994), 279

-
- ¹⁴⁸ J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *J. High Resol. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 4 (1981), 230
- ¹⁴⁹ X. Huang, W.F. Coleman, R.N. Zare, *J. Chromatogr.* 480 (1989), 95
- ¹⁵⁰ K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr.* 480 (1989), 91
- ¹⁵¹ C. Rentel, P. Gfroerer, E. Bayer, *Electrophoresis* 20 (1999), 2329
- ¹⁵² P.T. Vallano, V.T. Remcho, *J. Chromatogr. A* 887 (2000), 125
- ¹⁵³ T. Helboe, S.H.Hansen, , *J. Chromatogr. A* 836 (1999), 315
- ¹⁵⁴ R.R. Zhao, B.P. Johnson, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 23 (2000), 1851
- ¹⁵⁵ L. Michaelis, *Biochemische Zeitschrift* 17, (1909), Niemcy
- ¹⁵⁶ A. Tiselius, *Trans. Faraday Soc.* 33 (1937), 524
- ¹⁵⁷ R. Consden, A.H. Gordon, A.J.P. Martin, *J. Biochem.* 38 (1944), 224
- ¹⁵⁸ T. Wieland, E. Fischer, *Naturwissenschaften*, 35 (1948), 29
- ¹⁵⁹ O. Smithies, *J. Biochem.* 61 (1955), 629
- ¹⁶⁰ P.Graber, C.A. Williams, *Biochem. Biophys. Acta*, 10 (1953), 193
- ¹⁶¹ S. Hjerten, *Biochem. Biophys. Acta*, 53 (1961), 514
- ¹⁶² A. Kolin, *J. Chem. Phys.* 22 (1954) ,1628
- ¹⁶³ S. Hjerten, *Chromatogr. Rev.* 9 (1967), 122
- ¹⁶⁴ O. Vesterberg, *Acta Chem. Scand.* 23 (1969), 2653
- ¹⁶⁵ S. Raymond, L. Weintraub, *Science*, 130 (1959), 711
- ¹⁶⁶ L. Ornstein , *Ann. NY Acad. Sci.* 121 (1964), 321
- ¹⁶⁷ B. J. Davis, *Ann NY Acad Sci.* 121, (1964), 247
- ¹⁶⁸ J. W.Jorgenson, K.D. Lukacs, *Anal.Chem.* 53 (1981), 1298
- ¹⁶⁹ E. Y. Li, *Capillary electrophoresis, principles, practice and applications*, (1992) Elsevier, Holandia
- ¹⁷⁰ S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal.Chem.* 56 (1984), 111
- ¹⁷¹ H.J. Issaq, *Electrophoresis* 21 (2000), 1921
- ¹⁷² W. Walther, U. Stein, C. Voss, T. Schmidt, M. Schleef, P.M. Schlag, *Anal. Biochem.* 318 (2003), 230
- ¹⁷³ M.T. Valenzuela, M.I. Nunez, M.R. Guerrero, M. Villalobos, J.M. Almodovar, *J. Chromatogr. A* 871 (2000), 321
- ¹⁷⁴ X. Liu, Z. Sasic, I.S. Kroll, *J. Chromatograph. A* 735 (1996), 165
- ¹⁷⁵ Q. Mao, J. Pawliszyn, *J. Biochem. Biophys. Methods* 39 (1999), 93

-
- ¹⁷⁶ E. Kenndler, *Encyclopedia of Chromatography*; edytor: J. Cazes, Marcel Dekker Inc., New York, 2001, p. 126, USA
- ¹⁷⁷ E. Szłyk, A. Jastrzębska, B. Brudka, *Talanta* 63 (2004), 575
- ¹⁷⁸ V. Pretorius, B. J. Hopkins, J. D. Schieke, *J. Chromatogr.* 99 (1974), 23
- ¹⁷⁹ M. Pukl, M. Prosek, R. E. Kaiser, *Chromatographia* 38 (1994), 83
- ¹⁸⁰ T. Shafik, A.G. Howard, F. Moffatt, I.D. Wilson, *J. Chromatogr. A* 841 (1999), 127
- ¹⁸¹ T. Shafik, A.G. Howard, F. Moffatt, I.D. Wilson, *J. Chromatogr. A* 844 (1999), 333
- ¹⁸² D. Nurok, M.C. Frost, D. M. Chenoweth, *J. Chromatogr. A* 903 (2000), 211
- ¹⁸³ D. Nurok, J.M. Koers, D.A. Nyman, W.M. Liao, *J. Planar Chromatogr.* 14 (2001) 409
- ¹⁸⁴ D. Nurok, J.M. Koers, M.A. Carmichael, *J. Chromatogr. A* 983 (2003) 247
- ¹⁸⁵ D. Nurok, J. M. Koers, M.A. Carmichael, T.H. Dzido, *J. Planar Chromatogr.* 15 (2002) 320
- ¹⁸⁶ T.H. Dzido, R. Majewski, B. Polak, W. Gołkiewicz, E. Soczewiński, *J. Planar Chromatogr.* 16 (2003), 176
- ¹⁸⁷ T.H. Dzido, R. Majewski, *Proceedings of the International Symposium on Planar Separations* (2003) Budapest, Węgry
- ¹⁸⁸ I. Malinowska, I. K. Różyło, *J. Planar Chromatogr.* 11 (1998), 411
- ¹⁸⁹ I. Malinowska, *J. Planar Chromatogr.* 12 (1999), 408
- ¹⁹⁰ I. Malinowska, *J. Planar Chromatogr.* 13 (2000), 307
- ¹⁹¹ I. Malinowska, M. Studziński, H. Malinowski, *J. Planar Chromatogr.* 21 (2008), 379
- ¹⁹² J.H. Knox, *Chromatographia* 26 (1988), 329
- ¹⁹³ C.J. van Oss, R.J. Good, M.K. Chadhury, *J. Chromatogr.* 391 (1987), 53
- ¹⁹⁴ D. Nurok, J.M. Koers, A.L. Novotny, M.A. Carmichael, J.J. Kosiba, R.E. Santini, G.L. Hawkins, R.W. Replogle, *Anal. Chem.* 76 (2004), 1690
- ¹⁹⁵ A.L. Novotny, D. Nurok, R.W. Replogle, G.L. Hawkins, R.E. Santini, *Anal. Chem.* 78 (2006), 2823
- ¹⁹⁶ T.H. Dzido, J. Mróz, G.W. Józwiak, *J. Planar Chromatogr.*, 17 (2004), 404
- ¹⁹⁷ T.H. Dzido, P.W. Płocharz, P. Ślęzak, *Anal. Chem.* 78 (2006), 4713

-
- ¹⁹⁸ P.W. Płocharz, T.H. Dzido, P. Ślązak, G.W. Jóźwiak, A. Torbicz, *J. Chromatogr. A* 1170 (2007), 91
- ¹⁹⁹ T.H. Dzido, P.W. Płocharz, A. Klimek-Turek, A. Torbicz, B. Buszewski, *J. Planar Chromatogr.*, 21 (2008) 4
- ²⁰⁰ P.W. Płocharz, A. Klimek-Turek, T.H. Dzido, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010), 4868
- ²⁰¹ B. Polak, K. K. Wojtanowski, P. Ślązak, T.H. Dzido, *Chromatographia* 73 (2011), 339
- ²⁰² *W przygotowaniu do druku*
- ²⁰³ A. Hałka – Grysińska, Praca doktorska (2010), Uniwersytet Medyczny w Lublinie
- ²⁰⁴ A. Chomicki, P. Ślązak, T.H. Dzido, *Electrophoresis* 30 (2009), 3718
- ²⁰⁵ P.A. Tate, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A* 1079 (2005), 317
- ²⁰⁶ P.A. Tate, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006), 150
- ²⁰⁷ W. Gołkiewicz, *Chromatographia* 14 (1981), 629
- ²⁰⁸ K. Valkó, S. Olajos, T. Cserháti, *J. Chromatogr. A* 19 (1990), 361
- ²⁰⁹ L.R. Snyder, *Principles of adsorption chromatography*, (1968) Marcel Dekker, New York, , USA
- ²¹⁰ K. Kaczmarski, W. Prus, T. Kowalska, *J. Chromatogr. A* 869 (2000), 57
- ²¹¹ R.P.W. Scott, *J. Chromatogr. A* 656 (1993), 51
- ²¹² F. Murakami, *J. Chromatogr.* 178 (1979), 393
- ²¹³ J. Ko, J.C. Ford *J. Chromatogr. A* 913 (2001), 3
- ²¹⁴ P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. de Galan, *J. Chromatogr.* 218 (1981), 261
- ²¹⁵ R. Tijssen, H.A.H. Billiet, P.J. Schoenmakers, *J. Chromatogr.* 122 (1979), 185
- ²¹⁶ R. Kaliszan, *Structure and retention in chromatography*, (1997) Harwood Academic Publisher, Amsterdam , Holandia
- ²¹⁷ M.J. Kamlet, J.M. Abboud, M.H. Abraham, R.W. Taft, *J. Org. Chem.* 48 (1983), 2877
- ²¹⁸ M.H. Abraham, *Chem. Soc. Rev.* 22 (1993), 73
- ²¹⁹ M.H. Abraham, H.S. Chadha, G.S. Whiting, R.C. Mitchell, *J. Pharm. Sci.* 83 (1994), 1085
- ²²⁰ R. Kaliszan, M. Markuszewski, P. Haber, A. Nasal, T. Cserhati, E. Forgacs, R. Gadzała-Kopciuch, B. Buszewski, *Anal. Chem.* 43 (1998), 547
- ²²¹ R. Bonfichi, *J. Chromatogr. A* 678 (1994), 213

-
- ²²² R.G. Wolcott, J.W. Dolan, L.R. Snyder, *J. Chromatogr. A* 869 (2000), 3
- ²²³ J.A. Lewis, D.C. Lommen, W.D. Raddatz, J.W. Dolan, L.R. Snyder, I.J. Molnar, *Chromatography* 592 (1992), 183
- ²²⁴ G. Hendriks, J.P. Franke, D.R.A. Uges, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005), 193
- ²²⁵ R.M. Krisko, K. McLaughlin, M.J. Koenigbauer, C.E. Lunte, *J. Chromatogr. A*, 1122 (2006), 186
- ²²⁶ C. Marutoiu, C. Sarbu, M. Lassa, C. Liteanu, P. Bodoga, *Analysis* 14 (1986), 95
- ²²⁷ T. Dzido, Patent Polski, nr 313053 (1996)
- ²²⁸ P.E. Wall, *Thin-layer Chromatography, A Modern Practical Approach*, 2005, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK
- ²²⁹ R.J. Laub, J.H. Purnell, *J. Chromatogr.* 112 (1975), 71
- ²³⁰ D. Nurok, R.M. Beker, M.J. Richard, P.D. Cunningham, W.B. Gorman, C.L. Bush, *J. High Resolut Chromatogr. Chromatogr. Commun* 5 (1982), 373
- ²³¹ Sz. Nyiredy, B. Meier, C.A.J. Erdelmeier, O. Sticher. *J High Resolut Chromatogr. Chromatogr. Commun* 8 (1985), 186
- ²³² K. Dallenbach-Toelke, Sz. Nyiredy, B. Meier, O. Sticher, *J. Chromatogr.* 365 (1986), 63
- ²³³ K. Dallenbach-Toelke, Sz. Nyiredy, S.Y. Meszaros, O. Sticher. *J. High Resolut Chromatogr. Chromatogr. Commun* 10 (1987), 362
- ²³⁴ J.L. Glajch, J.J. Kirkland, K.M. Squire, J.M. Minor, *J. Chromatogr.* 199 (1980), 57
- ²³⁵ J.L. Glajch, J.J. Kirkland, *Anal. Chem.* 55 (1983), 319A
- ²³⁶ R.S. Henly, *J. Chromatogr. Sci.* 11 (1973), 221
- ²³⁷ D.L. Massart, H. De Clercq, *Anal. Chem.* 46 (1974), 1988
- ²³⁸ D.M. Li, V.T. Remcho, *J. Microcol. Sep.* 9 (1997), 389
- ²³⁹ G. Choudhary, Cs. Horvath, *J. Chromatogr. A* 781 (1997), 161
- ²⁴⁰ S. Zhang, J. Zhang, C. Horvath, *J. Chromatogr. A* 914 (2001), 189
- ²⁴¹ M.M. Dittmann, G.P. Rozing, *J. Microcol. Sep.*, 9 (1997), 399
- ²⁴² M.T. Matyska, J.J. Pesek, A. Katrekar, *Anal. Chem.* 71 (1999), 5508
- ²⁴³ K. Kanitsar, *J. Liquid Chromatogr.* 26 (2003), 455
- ²⁴⁴ Y.Q. Feng, L.Q. Shaoping, L. Peng, W.T. Yi, *Electrophoresis* 28 (2007), 1681
- ²⁴⁵ L.A. Colon, G. Burgos, T.D. Maloney, J.M. Cintrón, R.L. Rodríguez, *Electrophoresis*, 21 (2000), 3965

-
- ²⁴⁶ G. Vanhoenacker, T. van den Bosch, G. Rozing, P. Sandra, *Electrophoresis* 22 (2001), 4064
- ²⁴⁷ M.G. Cikalo, K.D. Bartle, M.M. Robson, P. Myers, M.R. Euerby, *Analyst*, 123 (1998), 87R
- ²⁴⁸ E.P.C. Lai, E. Dabek-Zlotorzynska, *Electrophoresis* 20 (1999), 2366
- ²⁴⁹ J. Wang, D. Wang, H. Zhang, Y. Zhang, S. Zhou, *J. Planar Chromatogr.* 19 (2006), 313
- ²⁵⁰ T. P. Iglesias, J. P. Fernandez, *J. Chem. Thermodynamics*, 33 (2001), 1375
- ²⁵¹ C.F. Poole, w *Planar Chromatography – A Retrospective View for the Third Millennium*; edytor: Sz. Nyiredy (2001) Springer, Budapest, Węgry
- ²⁵² W. Markowski, *Encyclopedia of Chromatography*; edytor: Jack Cazes, (2001) Marcel Dekker, New York,,USA
- ²⁵³ Zgłoszenie patentowe. T.H. Dzido, P.W. Płocharz, P. Ślżak, *Urządzenie do rozdzielania mieszanin substancji z wykorzystaniem efektu elektroosmotycznego*, nr zgłoszenia P 376768 (25.08.2005)
- ²⁵⁴ T.S. Stevens, H.J. Cortes, *Anal. Chem.* 55 (1983), 1365
- ²⁵⁵ Q-H. Wan, *Anal. Chem.* 69 (1997), 361
- ²⁵⁶ T. Cecchi, *Ion-Pair Chromatography and Related Techniques* (2010), CRC Press, Taylor& Francis Group, Boca Raton, USA
- ²⁵⁷ H. Lindner, W. Helliger, *Chromatographia* 30 (1990), 518
- ²⁵⁸ M. Szumski, M. Buszewski, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004), 141
- ²⁵⁹ C.F. Poole, S.K. Poole, *J. Chromatogr. A* 703 (1995), 573
- ²⁶⁰ E. Soczewiński, C. A. Wachtmeister, *J. Chromatogr.* 7 (1962), 311