

CENTRUM MEDYCyny DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
POLSKA AKADEMIA NAUK

Bronisław K. Głód

CHROMATOGRAFIA JONOWO-WYKLUCZAJĄCA

TEORIA PROCESU, WPŁYW PARAMETRÓW FIZYKOCHEMICZNYCH I APLIKACJE



WARSZAWA 1997



LS 185
H 3080

Bronisław K. Głód

CHROMATOGRAFIA JONOWO-WYKLUCZAJĄCA

TEORIA PROCESU, WPLYW PARAMETRÓW FIZYKOCHEMICZNYCH I APLIKACJE



LS 185

dublet

Instytut Centrum Medycyny
Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Wydział Chemii PW

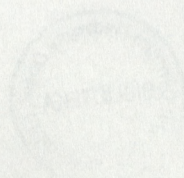
Warszawa 1997

Bronisław K. Głód

CHROMATOGRAFIA

JONOWO-WYKŁUCZAJĄCA

TEORIA PROCESU WPŁYW PARAMETRÓW FIZYKOCHIMICZNYCH I FIZJOLOGII



12 185

Wydawnictwo Instytutu Centrum Medycyny

Doświadczalnej i Klinicznej PAN

ul. Pawińskiego 5

02-106. Warszawa

ISBN 83-908527-0-5

<http://rcin.org.pl>

PRZEDMOWA

Chromatografię najkrócej można zdefiniować jako rozdział poprzez zetknięcie dwu faz będących we względnym ruchu, przy maksymalnie rozwiniętej powierzchni.

Możliwość rozdziału chromatograficznego odkryta została w 1903 r. przez Cwieta [1, 2], rosyjskiego botanika pracującego na Uniwersytecie i Politechnice Warszawskiej. Przez następne lata technika ta była nieco zapomniana, gdyż uważano ją za bardzo pracochłonną i długotrwałą. Przełom został dokonany w 1941 r. przez Martina i Syngego [3] po wprowadzeniu chromatografii gazowej. Za prace te zostali oni dziesięć lat później uhonorowani nagrodą Nobla. Chromatografię cieczową w dalszym ciągu tradycyjnie uważano za mało skuteczną i długotrwałą. Podobny przełom w chromatografii cieczowej nastąpił po 1967 r. kiedy to Huber i Hulsman [4] opisali szybką chromatografię podziałową. Okazało się bowiem, że po wymuszeniu przepływu wysokim ciśnieniem i zastosowaniu złożeń o małych średnicach ziarna można uzyskać szybkie rozdziały charakteryzujące się wysoką sprawnością. Stąd pochodzi nazwa techniki - wysokosprawna chromatografia cieczowa. Powszechnie używa się skrótu **HPLC**, od angielskiego High Performance Liquid Chromatography lub High Pressure Liquid Chromatography, choć niektórzy wywodzą go od High Price Liquid Chromatography.

Wymieniacze jonowe, głównie naturalne glinokrzemiany (zeolity), były stosowane w chromatografii niemal od zarania jej powstania [5]. W 1953 r. Wheaton i Bauman [6] opublikowali pierwszą pracę poświęconą chromatografii jonowo-wykluczającej, **IEC**. Od pionierskiej pracy Smalla [7] datuje się szybki rozwój chromatografii jonowej, **IC**. Stosuje się ją do oznaczania jonów, po ich rozdziale na wymieniaczach jono-

wych, na detektorze konduktometrycznym. Ponieważ duże przewodnictwo fazy ruchomej uniemożliwiało detekcję konduktometryczną bufor usuwany był na dodatkowej kolumnie. Z czasem w technice tej zaczęto stosować inne detektory i techniki rozdzielcze, a same wymiennicze wykorzystywano do rozdziału związków niejonowych. W wyniku tego chromatografia jonowa stopiła się obecnie z wysokosprawną chromatografią ciecząową. Tym niemniej wraz z gwałtownym rozwojem chromatografii jonowej rozwinęła się również chromatografia jonowo-wykluczająca. Obecnie ok. 10 % analiz chromatografii jonowej wykonuje się z zastosowaniem chromatografii jonowo-wykluczającej [8].

W trakcie pracy nad rozwojem tej techniki wykazano, że oprócz wad przypisywanych tej technice - mała sprawność kolumn i ograniczony zakres retencji, posiada ona też szereg zalet. Do tych ostatnich zaliczyć można np. wyjątkową trwałość kolumn (umożliwia to analizę wielu próbek bez konieczności wstępnego ich oczyszczania), łatwość rozdziału związków jonowych od niejonowych oraz możliwość stosowania detekcji konduktometrycznej bez konieczności stosowania dodatkowych kolumn. Z kolei zastosowanie nowych rodzajów kolumn o zwiększonych wymiarach, opartych na złożu z kopolimeru styrenu i diwinylobenzenu umożliwiło znaczne zwiększenie zakresu retencji, a także analizę nowych klas związków. Ostatnio pokazano również możliwość analizy mocnych kwasów i zasad przy zastosowaniu słabych wymienniczy [9].

Mimo ostatnio obserwowanego gwałtownego rozwoju technik chromatograficznych teoria procesu jest w dalszym ciągu znacznie mniej rozwinięta niż innych technik analitycznych. W chromatografii jonowo-wykluczającej mamy do czynienia głównie z oddziaływaniami elektrostatycznymi. Głównym parametrem opisującym retencję w przypadku czystego mechanizmu wykluczania jonów jest stała dysocjacji. Jej wartości są dobrze przebadane dla szeregu związków. Z tego powodu technika ta jest łatwa do opisu teoretycznego. Okazało się, że na podstawie stosunkowo prostych równań, bez konieczności wstępnego wyznaczenia parametrów fenomenologicznych, można przewidzieć retencję ana-

lizowanych związków. Uzyskano bardzo dobrą, jak na warunki chromatograficzne, zgodność z danymi eksperymentalnymi.

W pracy opisano w skrócie całość zagadnień związanych z chromatografią jonowo-wykluczającą. Szczególnie dużo uwagi poświęcono mechanizmowi retencji i teorii procesu. Tę część pracy oparto wyłącznie na własnych publikacjach i wynikach. W oparciu o przewidywania teoretyczne i dane eksperymentalne opisano wpływ parametrów fizykochemicznych, charakteryzujących analizowaną próbkę, fazę ruchomą i stacjonarną, złożę oraz kolumnę, na retencję. Jako oddzielne zagadnienie potraktowano przedyskutowanie różnych mechanizmów retencji w chromatografii jonowo-wykluczającej. Stosunkowo skrótowo potraktowano część aplikacyjną uznając, że przedstawiona teoria pozwala w dużym stopniu przewidzieć retencję i opracować metodę analizy. Aparatura stosowana w chromatografii jonowo-wykluczającej generalnie nie różni się od stosowanej w chromatografii jonowej i wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej. W chromatografii jonowo-wykluczającej często fazą ruchomą jest czysta woda lub rozcieńczone roztwory kwasów. Pozwala to na stosowanie w tej technice detektorów opartych na pomiarze różnicowych własności próbki i fazy ruchomej. Dlatego też w skrócie omówiono metody detekcyjne stosowane w tej technice. Wszystkie wyniki eksperymentalne przedstawione na rysunkach i w tabelach pochodzą z prac własnych autora. Zostały one jednak od nowa opisane i przedyskutowane.

3.1.1. Stopień i stała dysocjacji	53
3.1.2. Pola powierzchni cząsteczki	54
3.1.3. Budowa cząsteczki	54
3.2. Faza ruchoma	57
3.2.1. Bufor i moc jonowa	57
3.2.2. Rozpuszczalnik organiczny	59
3.2.3. Oddziaływania jonowo-asocjacyjne	61
3.2.4. Związki kompleksujące	64
3.3. WŁASNOŚCI FAZY RUCHOMEJ	69
3.3.1. Właściwości fizykochemiczne	69
3.3.2. Właściwości fizyczne	70
3.3.3. Właściwości chemiczne	71
3.3.4. Właściwości fizyczne i chemiczne	72
3.4. BUDOWA KOLUMNY I JEJ TEMPERATURA	75

SPIS TREŚCI

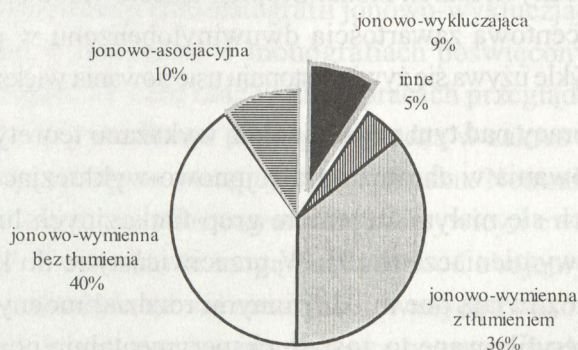
PRZEDMOWA	3
1. WPROWADZENIE	9
2. PODSTAWY PROCESU	11
3. OPIS TEORETYCZNY	15
3.1. Sformułowanie modelu	15
3.2. Równania globalne	23
3.3. Modelowanie kolumny	26
3.4. Eksperymentalna weryfikacja wyprowadzonych równań	28
4. MECHANIZMY RETENCJI	33
4.1. Wykluczanie jonowe	33
4.2. Efekt ekranowania	36
4.3. Hydrofobowa adsorpcja	39
5. PARAMETRY WPLYWAJĄCE NA RETENCJĘ	45
5.1. PRÓBKA	45
5.1.1. Ładunek elektryczny	45
5.1.2. Ilość próbki	47
5.1.3. Stopień i stała dysocjacji	50
5.1.4. Pole powierzchni cząsteczki	51
5.1.5. Budowa cząsteczki	54
5.2. FAZA RUCHOMA	57
5.2.1. Bufor i moc jonowa	57
5.2.2. Rozpuszczalnik organiczny	59
5.2.3. Oddziaływania jonowo-asocjacyjne	61
5.2.4. Związki kompleksujące	64
5.3. FAZA STACJONARNA	69
5.3.1. Struktura złoża	69
5.3.2. Własności grup funkcyjnych	70
5.4. BUDOWA KOLUMNY I JEJ TEMPERATURA	75

6. ZASTOSOWANIA	79
7. DETEKCCJA	83
8. SKOROWIDZ SYMBOLI	87
9. SKOROWIDZ SKRÓTÓW	91
10. LITERATURA	93
11. SUMMARY	101
12. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W ZAKRES ROZPRAWY	103

1	1. WPROWADZENIE	103
2	2. PODSTAWY PROCESU	103
3	3. OWE TEORETYCZNE	103
15	3.1. Stwierdzanie modelu	103
15	3.2. Równania globalne	103
23	3.3. Modelowanie kolumny	103
26	3.4. Eksperymentalny weryfikacja wyników w prowadzonych równaniach	103
28	4. MECHANIZM REAKCJI	103
33	4.1. Wzrostowe jonowe	103
33	4.2. Faza cząsteczkowa	103
39	4.3. Hydrofobowa adsorpcja	103
45	5. PARAMETRY WERYFIKACJI NA RZĄDZIE	103
45	5.1. Próba	103
45	5.1.1. Izbny czysty	103
47	5.1.2. Izbny czysty	103
50	5.1.3. Stopień i stan dysocjacji	103
51	5.1.4. Pole rowięzności ekspansyjnej	103
54	5.1.5. Budowa ekspansyjnej	103
57	5.2. Faza ruchoma	103
57	5.2.1. Budowa fazy jonowej	103
59	5.2.2. Rozpuszczenie organiczne	103
61	5.2.3. Oddziaływanie jonowo-adsorpcyjne	103
64	5.2.4. Związki kationowe	103
69	5.3. Katalizacja	103
69	5.3.1. Budowa fazy	103
73	5.3.2. Wzrostowe grup funkcyjnych	103
75	5.4. Budowa kolumny i temperatura	103

1. WPROWADZENIE

Chromatografia jonowo-wykluczająca jest techniką znajdującą szerokie zastosowanie do rozdzielania związków jonowych od niejonowych, a także do analizy słabych kwasów i zasad. Technika ta po raz pierwszy została opisana przez Wheatona i Baumana [6] w 1953 r. Obecnie tą techniką wykonuje się ok. 10% (patrz Rys. 1.1) wszystkich analiz chromatografii jonowej [8, 10]. W przybliżeniu równa się to ilości analiz przeprowadzanych za pomocą znacznie bardziej popularnej obecnie chromatografii jonowo-asocjacyjnej (tzw. chromatografii par jonowych). W ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania tą techniką [11, 12].



Rys. 1.1. Częstość stosowania różnych technik chromatografii jonowej.

Cechą charakterystyczną chromatografii jonowo-wykluczającej jest ten sam ładunek elektryczny zdysocjowanych grup funkcyjnych jonowymiennej żywicy i analizowanych związków jonowych. Oznacza to, że próbki charakteryzujące się ujemnym ładunkiem, np. zdysocjowane kwasy, są rozdzielane na kationicie zawierającym anionowe grupy fun-

kcyjne (obecnie są to głównie reszty kwasów sulfonowych). Podobnie próbki zawierające związki naładowane dodatnio (zasady) rozdzielane są na anionicie zawierającym kationowe grupy funkcyjne (zwykle są to jony tetraalkiloamonioowe). W pewnym sensie mamy tu do czynienia z sytuacją odwrotną do chromatografii jonowo-wymiennej, w której aniony rozdzielane są na anionicie, a kationy na kationicie. Tak więc mimo iż w chromatografii jonowo-wykluczającej wykorzystuje się kolumny jonowo-wymienne do prawdziwej wymiany jonów nie dochodzi. Z reguły te same kolumny mogą być stosowane w obu technikach. Cechą charakterystyczną komercyjnie dostępnych kolumn do chromatografii jonowo-wykluczającej jest ich wysoka pojemność wymiany. Osiąga się to przez zwiększenie wymiarów kolumny i stężenia grup funkcyjnych złoża oraz przez stosowanie mocnych wymiennaczy jonowych [8]. Zwykle jako złożo wykorzystuje się makroporowaty, całkowicie sulfonowany, kopolimer styrenu i diwinylobenzenu charakteryzujący się wysoką pojemnością wymienną. Żywice takie otrzymuje się poprzez katalityczną polimeryzację zemulgowanej w wodzie mieszaniny styrenu i diwinylobenzenu [13]. Tak przeprowadzona reakcja pozwala na uzyskanie usieciowanych, sferycznych ziaren złoża. Stopień usieciowania charakteryzowany jest procentową zawartością dwuwinylobenzenu w mieszaninie reakcyjnej. Zwykle używa się żywicy o stopniu usieciowania większym niż 8%.

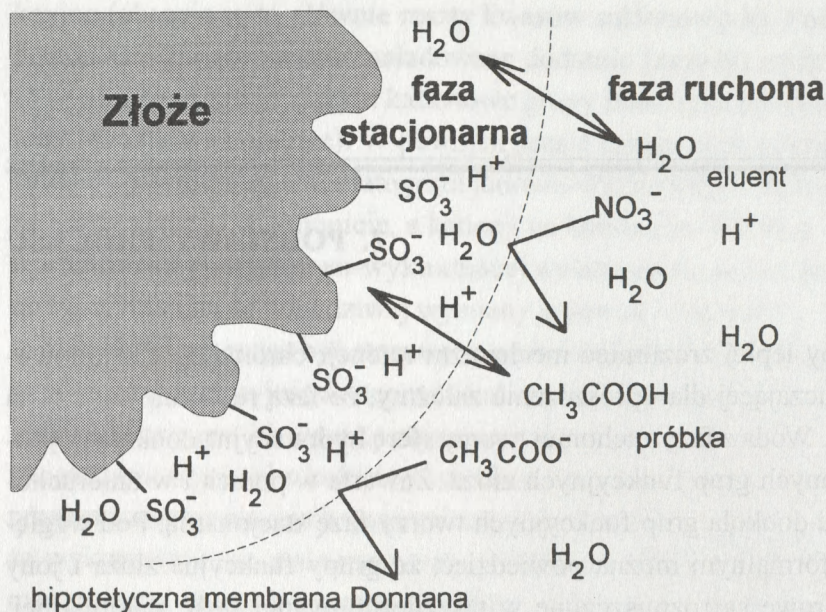
W trakcie pracy nad tym zagadnieniem wykazano teoretycznie możliwość zastosowania w chromatografii jonowo-wykluczającej złożo charakteryzujących się małym stężeniem grup funkcyjnych lub też będących słabymi wymiennaczami [9]. W przeciwieństwie do klasycznych wypełnień umożliwiają one między innymi rozdział mocnych kwasów lub zasad. Zweryfikowane to zostało eksperymentalnie poprzez zastosowanie słabych wymiennaczy [14], oraz kolumn wypełnionych silikażelem [15, 16] i mordenitem [17]. Jako kolumny do chromatografii jonowo-wykluczającej można również stosować klasyczne kolumny do chromatografii faz odwróconych dynamicznie modyfikowane wymiennaczami (SDS) [18].

2. PODSTAWY PROCESU

Aby lepiej zrozumieć mechanizm retencji chromatografii jonowo-wykluczającej dla uproszczenia założymy, że fazą ruchomą jest czysta woda. Woda z fazy ruchomej tworzy sferę hydratacyjną dookoła zdysocjowanych grup funkcyjnych złoże. Zawarta w porach i w unieruchomiona dookoła grup funkcyjnych tworzy fazę stacjonarną. Pod względem formalnym można powiedzieć, że grupy funkcyjne złoże i jony wodorowe są rozpuszczone w tak zdefiniowanej fazie stacjonarnej. Wobec tego należy rozważać trzy części kolumny: stałe złoże, fazę stacjonarną i ciecz poruszającą się między ziarnami złoże, czyli fazę ruchomą.

Mechanizm retencji chromatografii jonowo-wykluczającej został skróto opisany w literaturze w monografiach poświęconych chromatografii jonowej [8, 19 - 26] oraz w kilku pracach przeglądowych [8, 10 - 12, 27 - 29]. Trzy środkowe pozycje wchodzą w zakres niniejszej rozprawy. Jest on oparty na następującym zjawisku. Neutralne, nienaładowane cząsteczki mogą penetrować wewnątrz żywicy i ewentualnie z nią oddziaływać. Cząsteczki te mogą pochodzić od obojętnych związków, np. cukrów i alkoholi, lub od niezdisocjowanych kwasów lub zasad. Z drugiej strony jony o tym samym ładunku co grupy funkcyjne złoże są od niego odpychane elektrostatycznie. Występuje tu analogia do równowagi Donnana na półprzepuszczalnych membranach (Rys. 2.1). Jony i obojętne cząsteczki mogą swobodnie przechodzić hipotetyczną membranę między obu fazami za wyjątkiem kowalentnie związanych ze złożem jego grup funkcyjnych.

Ponieważ, z reguły stężenie jonów w fazie stacjonarnej jest znacznie większe niż w ruchomej następuje osmotyczny przepływ wody do żywi



Rys. 2.1. Schemat ilustrujący mechanizm wykluczania jonów.

cy, powodujący jej pęcznienie. Proces pęcznienia zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia jonów w fazie ruchomej i wzrostem stopnia usieciowania żywicy.

Stosunek stężenia zjonizowanych do obojętnych postaci analizowanych związków jest zależny od ich stałych dysocjacji i stężenia próbki. Określa on efektywny ładunek roztworu. Dlatego retencja kwasów i zasad oznaczanych metodą chromatografii jonowo-wykluczającej jest zależna od ich stałych dysocjacji. Mocne, całkowicie zdysocjowane, kwasy lub zasady są elektrostatycznie odpychane od złoża. W konsekwencji są one wmywane nierozdzielone w objętości martwej kolumny, tzn. objętości fazy ruchomej w kolumnie. Z kolei niezdisocjowane cząsteczki mogą penetrować wewnątrz żywicy. W przypadku czystego mechanizmu wykluczania jonowego (brak oddziaływań z żywicą) są one również wmywane nierozdzielone w sumie objętości martwej i wewnętrznej kolumny. Objętość wewnętrzna kolumny oznacza tu objętość fazy stacjonarnej w kolumnie. W ten sposób można w łatwy sposób wyznaczyć eksperymentalnie obie te objętości [30 - 32]. Tylko kwasy i zasady o pośrednich wartościach stałych dysocjacji ($10^{-7} \div 10^{-2}$) mogą być rozdzielane w tej technice (przy założeniu czystego mechanizmu wyklu-

czania jonów). Większą retencję należy więc oczekiwać dla kwasów charakteryzujących się wyższymi wartościami pKa, jak to zostało wykazane przez Tanakę i wsp. [30]. Analogiczna zależność dla zasad została po raz pierwszy zaobserwowana przez Haddada i wsp. [32] (jest ona przedmiotem niniejszej rozprawy). Zależności te są analogiczne do obserwowanych w chromatografii wykluczania sterycznego między współczynnikiem podziału, a logarytmem z mas molekularnych analizowanych związków.

Podobnie do innych technik chromatograficznych również w chromatografii jonowo-wykluczającej mamy rzadko do czynienia z jednym mechanizmem retencji. Z dodatkowych mechanizmów wymienić można retencję w układzie faz normalnych i odwróconych, hydrofobową adsorpcję na żywicy złoża, wykluczanie steryczne, wymianę jonową, oddziaływania typu van der Waalsa czy też tzw. efekt ekranowania [30 - 34]. Mechanizmy, szczególnie opisane przez autora, będą dokładnie omówione w dalszej części pracy. Jedną z głównych zalet chromatografii jonowo-wykluczającej jest możliwość analizy za jej pomocą złożonych próbek. W pracy nad tym zagadnieniem wykazano, że nawet wstrzykiwanie nieoczyszczonych próbek musztardy i wina nie wpływało na zmniejszenie długotrwałej żywotności i sprawności kolumny [31, 35].

do stałego piku. Jest to hipotetyczna objętość w której z założenia przyjmujemy stałe stężenie próbki równe jej stężeniu w maksimum piku. Przy założeniu przekładu Gaussa stężenie to opisuje równanie [40]:

$$(3.1) \quad c_0 = \frac{c_p}{V_p} \sqrt{\frac{V}{2\pi}}$$

gdzie c_0 - stężenie w maksimum piku, c_p - stężenie wstrzykiwanej próbki, V_p - objętość próbki, V_p - objętość retencji i N - sprawność kolumny (liczba pól).

Z prawa zachowania masy otrzymuje się wówczas:

$$(3.2) \quad V_p = V_p \sqrt{\frac{2\pi}{N}}$$

gdzie V_p oznacza objętość piku.

3. OPIS TEORETYCZNY

3.1. Sformułowanie modelu

Mechanizm retencji chromatografii jonowo-wykluczającej opisany został w szeregu pracach [9 - 12, 31, 33, 34, 36 - 39], przy zastosowaniu różnych modeli. Ta część rozprawy oparta została całkowicie na wynikach własnych. W najprostszych przypadkach, używając bardzo zgrubnych założeń otrzymano proste równania analityczne pozwalające na wyznaczenie współczynnika podziału [31, 36, 37, 39]. Bardziej realistyczne podejście znacznie komplikuje wyprowadzone równania. Mogą być one rozwiązane globalnie. W tym przypadku podstawowe zależności chromatograficzne oraz równowagi termodynamiczne odniesione są do objętości pików. Jest to hipotetyczna objętość w której z założenia przyjmuje się stałe stężenie próbki równe jej stężeniu w maksimum pików. Przy założeniu rozkładu Gaussa stężenie to opisuje równanie [40]:

$$(3.1) \quad c_m = \frac{c_i v_i}{V_R} \sqrt{\frac{N}{2\pi}},$$

gdzie c_m - stężenie w maksimum pików, c_i - stężenie wstrzykiwanej próbki, v_i - objętość próbki, V_R - objętość retencji i N - sprawność kolumny (ilość półek).

Z prawa zachowania masy otrzymuje się wówczas:

$$(3.2) \quad V_p = V_R \sqrt{\frac{2\pi}{N}},$$

gdzie V_p oznacza objętość pików.

Drugim podejściem jest komputerowe modelowanie kolumny. Rozdział chromatograficzny jest procesem bardzo złożonym. Jego model teoretyczny musi uwzględniać dużą grupę procesów w materiale porowatym, fazie ruchomej i stacjonarnej. Zalicza się do nich procesy termodynamiczne odpowiadające za selektywność układu oraz tzw. kinetyczne uwzględniające konwekcję, dyfuzję i kinetykę oddziaływań. Z procesem chromatograficznym związany jest przepływ fazy ruchomej przez kolumnę. Oznacza to, że mamy w tym przypadku do czynienia z procesem nierównowagowym, a więc nieodwracalnym. Dokładny opis można uzyskać po rozwiązaniu układu równań opisujących prawo zachowania masy systemu. Dla układów przepływowych bilans masy można zapisać w postaci:

$$(3.3) \quad \frac{\partial \rho_i}{\partial t} = -\operatorname{div} \rho_i u + r_i,$$

gdzie ρ_i oznacza gęstość, u - liniową szybkość przepływu, a r_i ilość substancji powstającej lub zanikającej w jednostce czasu.

W przypadku roztworów, gęstość cieczy można zastąpić stężeniem składnika próbki:

$$(3.4) \quad \rho_i = M_i c_i,$$

gdzie M_i - masa cząsteczkowa.

Wówczas:

$$(3.5) \quad \frac{\partial c_i}{\partial t} = -\operatorname{div} c_i u + \sum_{i,j} M_i v_{i,j} r_j,$$

gdzie v - współczynnik stechiometryczny.

Zakładając stałą w czasie i przestrzeni liniową szybkość przepływu cieczy De Vault w 1943 r. przekształcił powyższe równanie do warunków chromatograficznych [41, 42]. Jest ono w ogólności nierozwiązywalne. Analitycznie można je rozwiązać jedynie dla bardzo uproszczonych przypadków jednoskładnikowej próbki. Nieco bardziej skomplikowane układy można rozwiązywać metodami numerycznymi, modelującymi cykliczne przechodzenie próbki z fazy ruchomej do stacjonarnej i na odwrót.

W najprostszym przypadku proces chromatograficzny możemy sobie wyobrazić w ten sposób, że po ustaleniu się stanu stacjonarnego próbka przechodząc przez kolumnę pozostaje w stanie *quasi* równowagi termodynamicznej. Zgodnie więc z tzw. **modelem Craiga** (pozwalającym m.in. na mnemotechniczne zrozumienie samego procesu chromatograficznego) kolumnę chromatograficzną możemy podzielić na szereg elementów (celek). Zakładamy, że w każdym z nich ustala się równowaga termodynamiczna czyli, że są one tożsame z wysokościami równoważnymi półkom chromatograficznym. Oznaczmy przez p i q prawdopodobieństwo przebywania cząsteczki próbki odpowiednio w fazie ruchomej i stacjonarnej. Prawdopodobieństwa te mogą być również interpretowane jako frakcje próbki w obu fazach. Ich suma równa jest jedności:

$$(3.6) \quad p + q = 1.$$

Zgodnie z tym jeśli wprowadzimy do pierwszej celki kolumny próbkę o stężeniu jednostkowym, wówczas podzieli się ona między dwie fazy tak, że jej stężenia będą wynosiły odpowiednio p i q . Możemy wówczas wykonać eksperyment myślowy i rozdzielić proces chromatograficzny na dwa niezależne etapy: ustalenie się równowagi w celce i ruch fazy ruchomej wzdłuż kolumny o jedną celkę. Ruch fazy przeniesie więc próbkę (o stężeniu p) z pierwszej celki do drugiej. Po ustaleniu się równowagi stężenie próbki w fazie stacjonarnej drugiej celki wyniesie pq . W fazie ruchomej zaś p^2 . W następnym kroku próbka o tym stężeniu przeniesiona zostanie do celki 3. Proces ten można dalej kontynuować tak jak to zostało przedstawione na Rys. 3.1. W ostatniej jego kolumnie została podana całkowita ilość próbki w kolumnie. Na podstawie ilości próbki w poszczególnych celkach łatwo zauważyć, że całkowita jej ilość w kolumnie wynosi $(q + p)^r$:

$$(3.7) \quad (p + q)^r = 1,$$

gdzie r oznacza ilość kroków (odpowiadających objętości retencji).

nr celki	0	1	2	3	4	5	ilość
$r = 0$	$c_i = 1$	1					1
$r = 1$		↓ q	↘ p				$(q + p)$
$r = 2$		↓ q ²	↘ 2pq	↘ p ²			$(q + p)^2$
$r = 3$		↓ q ³	↘ 3pq ²	↘ 3p ² q	↘ p ³		$(q + p)^3$
$r = 4$		↓ q ⁴	↘ 4pq ³	↘ 6p ² q ²	↘ 4p ³ q	↘ p ⁴	$(q + p)^4$

Rys. 3.1. Schemat przebiegu procesu modelowania kolumny metodą Craiga.

Ze schematu przedstawionego na Rys. 3.1 otrzymać można rozkład stężenia próbki na kolumnie (równoważny rozkładowi w czasie próbki opuszczającej kolumnę i rejestrowanej przez detektor). Z zasad kombinatoryki wynika, że prawdopodobieństwo, że cząsteczka po r krokach znajduje się w N celce wynosi:

$$(3.8) \quad P_N^r = r!q^r - \frac{p^N}{N!(r-N)!}$$

Powyższy wzór wynika z faktu, że przy opisie procesu założono iż próbka w sposób statystyczny może przebywać w fazie ruchomej lub stacjonarnej. p i q w tym ujęciu oznaczają więc wagi statystyczne. W wyniku tego rozmieszczenie próbki na kolumnie przedstawia klasyczną krzywą dzwonową rozkładu statystycznego Gaussa. Na tej podstawie wiele osób intuicyjnie uważa, że w idealnych warunkach chromatograficznych powinno się otrzymać symetryczne piki. Ich asymetria zaś pojawia się w wyniku zniekształcenia tego procesu. Niestety nie jest to prawdą. Należy bowiem zauważyć, że na opisaną powyżej dyspersję próbki nakłada się przepływ cieczy. Przy przepływie laminarnym ciecz w środku kanału lub kapilary porusza się szybciej niż przy ich brzegach. Oznacza to, że ogonowanie piku jest integralną częścią procesu chromatograficznego.

Każda celka kolumny ma swoją objętość. Zamiast więc krokami można się posługiwać objętością retencji (zatrzymania próbki na kolumnie). Przesuwanie się ruchomych części celek symbolizuje więc przepływ fazy ruchomej. Stąd rozkład Gaussa przybiera postać:

$$(3.9) \quad c(V) = \frac{c_i v_i}{J} \cdot \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi N}} e^{-\frac{(V-V_R)^2}{2\sigma^2}}$$

gdzie σ - odchylenie standardowe, a J - objętościowa szybkość przepływu.

Próbki w chromatografii jonowo-wykluczającej są z reguły zdysocjowane. Oznacza to, że w ogólności mogą one występować w obu fazach w co najmniej dwu postaciach. Komplikuje to równania i powoduje, między innymi, niesymetryczne piki chromatograficzne. W przeciwieństwie do omówionego poprzednio i powszechnie znanego ogonowania cechą charakterystyczną chromatografii jonowo wykluczającej jest frontalne rozmycie próbek. W metodzie modelowania komputerowego kolumny równania opisujące równowagi termodynamiczne odnoszą się do wysokości równoważnej półce chromatograficznej. W tym przypadku należy więc metodą iteracyjną rozwiązać układ równań na poszczególnych półkach umożliwiając symulację procesu przepływu próbki przez kolumnę.

Zarówno równania globalne, jak i modelowanie kolumny zastosowane zostały zarówno do układów z fazą ruchomą będącą czystym rozpuszczalnikiem, jak i zawierającą bufor [33]. Ponadto uwzględniono mieszany jonowo-wykluczająco - adsorpcyjny mechanizm retencji [34]. Opracowane modele pozwoliły na przewidzenie wpływu szeregu parametrów charakteryzujących próbkę, fazę ruchomą i stacjonarną oraz kolumnę na retencję. W szczególności zaliczyć do nich można objętość i stężenie próbki, jej stałą dysocjacji, stężenie i stałą dysocjacji buforu, obecność w fazie ruchomej związków inkluzyjnych lub jonowo-asocjacyjnych, stężenie i stałą dysocjacji grup funkcyjnych złoza, wymiary kolumny oraz jej sprawność. Wpływ takich parametrów jak stężenie rozpuszczalnika organicznego, izomeria i obecność wielu grup funkcyjnych w cząsteczce przedyskutowano w oparciu o analizę danych eksperymentalnych.

Omawiane modele oparte zostały na następujących ogólnych założeniach [10]:

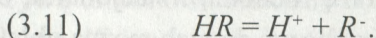
1. Kolumnę chromatograficzną rozważano jako jednorodną i homogeniczną mieszaninę eluentu i złoża. Oznacza to, że stosunek objętości fazy ruchomej do stacjonarnej jest stały. Założono jednorodną i stałą wzdłuż kolumny i w czasie szybkość przepływu fazy ruchomej, małą, w porównaniu z wymiarami kolumny, średnicę ziaren złoża oraz jednorodnie jego upakowanie.
2. Mechanizm wykluczania jonów opisany jest przez równowagę membranową Donnana.
3. Adsorpcję opisuje izoterma liniowa, co jest z reguły postulowane w warunkach analitycznych.
4. Szybkość ustalania się równowagi podziału jest na tyle duża, że można pominąć efekty kinetyczne, zmiany temperatury oraz inne efekty nierównowagowe. Dyfuzja aksjalna próbki jest mała w porównaniu z konwekcją.

Współczynnik podziału próbki można w prosty sposób wyznaczyć z danych chromatograficznych:

$$(3.10) \quad K_d = (V_R - V_M)/V_S$$

gdzie V_M i V_S oznaczają odpowiednio objętość martwą i wewnętrzną kolumny.

Rozważmy kwas, HR , dysocjujący zgodnie z równaniem [31, 33]:



W najbardziej ogólnym przypadku obie formy kwasu (zdysocjowana i niezdisocjowana) mogą występować w obu fazach. Stężenie anionów w fazie stacjonarnej równoważone jest jonami wodorowymi tak, że obie fazy są elektrycznie neutralne. W większości przypadków można założyć, że aniony mogą występować tylko w fazie ruchomej [33, 34, 37].

Warunkiem równowagi termodynamicznej jest równość potencjałów elektrochemicznych, $\bar{\mu}_i$, w fazie ruchomej, M , i stacjonarnej, S :

$$(3.12) \quad \sum_i \bar{\mu}_i^S = \sum_i \bar{\mu}_i^M$$

Potencjał elektrochemiczny opisany jest również:

$$(3.13) \quad \bar{\mu}_i = \mu_i^0(\Delta P) + RT \ln a_i + z_i F \varphi,$$

gdzie μ_i^0 standardowy potencjał chemiczny (zależny między innymi od ciśnienia), R - uniwersalna stała gazowa, T - temperatura, a_i - aktywność i -tego składnika, z_i - wartościowość, F - stała Faraday'a i φ - potencjał wewnętrzny.

Dla jedno-jednowartościowego elektrolitu [9, 43]:

$$(3.14) \quad z^+ = z^-,$$

$$(3.15) \quad \mu_+^S + \mu_-^S = \mu_+^M + \mu_-^M.$$

Ostatnie równanie oznacza, że dla jednozasadowych kwasów można pominąć wpływ potencjału Donnana na retencję. Duże stężenie grup funkcyjnych w fazie stacjonarnej powoduje pęcznienie żywicy. Efekt ten zmniejsza się gdy faza ruchoma zawiera bufor. Ponadto zmiany wywołane ciśnieniem i zmianami potencjałów standardowych mogą być uwzględnione we współczynnikach aktywności. Spadek wartości współczynników aktywności spowodowany jest również tworzeniem się par jonowych na powierzchni złoża [44]. Związane to jest z dużym lokalnym stężeniem grup funkcyjnych złoża powodującym niedobór dostępnej wody hydratacyjnej oraz wpływem jonów i siatki złoża na zmiany stałej dielektrycznej. Zmniejsza to efektywny ładunek złoża. Z powyższej dyskusji wynika, że warunek równowagi można przedstawić w postaci:

$$(3.16) \quad a_{HR}^S a_R^S a_{H^+}^S = a_{HR}^M a_R^M a_{H^+}^M.$$

Dla rozcieńczonych roztworów równanie to przyjmuje postać:

$$(3.17) \quad [H^+]_M [R^-]_M [HR]_M = [H^+]_S [R^-]_S [HR]_S.$$

Jak wspomniano, przy dokładniejszych rozważaniach w fazie stacjonarnej należy uwzględnić aktywności. Ponadto różnice stałej dielektrycznej obu faz wpływają na zmiany stałych dysocjacji, K_a :

$$(3.18) \quad K_a^M = \frac{[H^+]_M [R^-]_M}{[HR]_M},$$

$$(3.19) \quad K_a^S = \frac{a_{R^-}^S a_{H^+}^S}{a_{HR}^S}.$$

W uproszczonym podejściu można założyć, że obie fazy są po prostu wodą charakteryzującą się tą samą stałą dysocjacji i aktywności zastąpić stężeniami [31, 33, 34, 36]. Podobne równania można zapisać dla buforu, HB , (w chromatografii jonowo-wykluczającej często jako bufor wykorzystuje się po prostu rozcieńczone roztwory mocnych kwasów lub zasad) i grup funkcyjnych złoże, HF :

$$(3.20) \quad [H^+]_M [B^-]_M [HB]_M = [H^+]_S [B^-]_S [HB]_S,$$

$$(3.21) \quad K_b = \frac{[H^+]_M [B^-]_M}{[HB]_M},$$

$$(3.22) \quad K_f = \frac{[H^+]_S [F^-]_S}{[HF]_S}.$$

Dla rozcieńczonych roztworów warunków electroneutralności obu faz można przedstawić w postaci:

$$(3.23) \quad [H^+]_M = [R^-]_M + [B^-]_M,$$

$$(3.24) \quad [H^+]_S = [F^-]_S + [R^-]_S + [B^-]_S.$$

Obojętne cząsteczki mogą swobodnie penetrować złoże, stąd:

$$(3.25) \quad [HR]_M = [HR]_S,$$

$$(3.26) \quad [HB]_M = [HB]_S.$$

Całkowite stężenia buforu i grup funkcyjnych złoże opisują równania:

$$(3.27) \quad c_b = [B^-]_M + [HB]_M,$$

$$(3.28) \quad c_f = [F^-]_S + [HF]_S.$$

Adsorpcję opisuje liniowa izoterma Henry'ego:

$$(3.29) \quad [HR]_A = K_H [HR]_S.$$

Powyższe równania łącznie z prawem zachowania masy pozwalają wyznaczyć współczynnik podziału próbki, jak to zostanie przedstawione w następnjej części pracy.

3.2. Równania globalne

W poprzednim rozdziale przedstawione zostały ogólne założenia modeli opisujących mechanizm retencji w chromatografii jonowo-wyklucającej. Są to jednak założenia zbyt ogólne aby można w oparciu o nie wyprowadzić konkretne równania opisujące współczynnik podziału w IEC. Ponadto tak ogólne równania byłyby mało użyteczne praktycznie ze względu na ich skomplikowaną postać i występowanie w nich wielu trudno dostępnych parametrów. Dlatego wyprowadzono szereg równań przy dodatkowych założeniach upraszczających. Współczynnik podziału, K_d , równy jest stosunkowi sumy stężeń wszystkich postaci próbki w obu fazach. Przy braku adsorpcji i dodatkowych oddziaływań przyjmuje on postać:

$$(3.30) \quad K_d = \frac{[HR]_s + [R^-]_s}{[HR]_M + [R^-]_M}$$

W przypadku buforowanej fazy ruchomej z równań (3.18 ÷ 3.28) otrzymuje się równanie kwadratowe w którym niewiadomą jest stężenie zdysocjowanej postaci analizowanego kwasu. Po jego rozwiązaniu, wstawieniu, razem z równaniem (3.29), do równania (3.30), założeniu, że jonowy wodorowy w fazie ruchomej pochodzą tylko od buforu, a w fazie stacjonarnej tylko od grup funkcyjnych złoża otrzymuje się [9]:

$$(3.31) \quad K_d = \frac{1 + \frac{2K_a^S \gamma_{H^+}^S \gamma_{F^-}^S}{\sqrt{K_f^2 + 4K_f c_f \gamma_{H^+}^S \gamma_{F^-}^S} - K_f} K_p}{1 + \frac{2K_a^M}{\sqrt{K_b^2 + 4K_b c_b} - K_b}}$$

gdzie $\gamma_{H^+}^S$ i $\gamma_{F^-}^S$ oznaczają odpowiednio współczynnik aktywności jonów wodorowych i zdysocjowanych grup funkcyjnych złoża w fazie

stacjonarnej, a K_p oznacza współczynnik podziału niezdysonowanej postaci kwasu.

Po założeniu, że bufor i grupy funkcyjne złoża są mocnymi kwasami i ich stężenie jest znacznie większe od stężenia analizowanej próbki powyższe równanie upraszcza się do postaci [39]:

$$(3.32) \quad K_d = \frac{1 + K_a^S/c_f}{1 + K_a^M/c_b} K_p.$$

W chromatografii jonowo-wykluczającej tradycyjnie stosuje się silne wymiennicze do oznaczania kwasów słabych i średniej mocy. Z równania (3.31) wynika, że zmniejszenie stężenia zdysocjowanych grup funkcyjnych złoża (poprzez zmniejszenie ich całkowitego stężenia lub zastosowanie słabego wymiennicza) powinno zwiększyć współczynnik podziału. Takie podejście umożliwiłoby rozdział również mocnych kwasów tą techniką, co faktycznie zostało potwierdzone eksperymentalnie [14 - 17].

Nieco inne podejście opisano w pracy [33] i, w nieco uproszczonej wersji, w [37]. Zrezygnowano w nich z założenia, że stężenia grup funkcyjnych złoża i buforu są znacznie większe od stężenia analizowanej próbki. Założono natomiast, że rozpuszczalnik w obu fazach charakteryzuje się tymi samymi parametrami fizykochemicznymi, a w szczególności stałą dielektryczną. Żywica i jej grupy funkcyjne są rozpuszczone w fazie stacjonarnej. Analizowana próbka może występować w obu fazach. Prawo zachowania masy przyjmuje wówczas postać:

$$(3.33) \quad c_i v_i = \{([R]_S + [HR]_S) V_S + ([R]_M + [HR]_M) V_M\} V_P / (V_M + V_S).$$

Współczynnik podziału wyznaczono z równań (3.17, 3.18, 3.20 - 3.28 oraz 3.30). Otrzymano rozwiązanie [34] w postaci układu równań będących funkcją K_a , K_b , K_f , c_p , c_b , c_f , v_p , V_M , V_S i N . Równania te nie mogą być przedstawione w postaci analitycznej. Rozwiązać je można numerycznie metodą iteracyjną. W metodzie tej [33] zakłada się początkową, przykładowo równą 1/2, wartość współczynnika podziału. Wówczas oblicza się pozostałe nieznanne. Korzystając z tak obliczonych wielkości oblicza się nową wartość współczynnika podziału. Operację powtarza się aż dwie

kolejne wartości współczynnika podziału są mniejsze od zadanej dokładności. W ten sposób wyznaczono wpływ różnych parametrów charakteryzujących analizowaną próbkę, fazę ruchomą i stacjonarną na współczynnik podziału [33, 34, 37].

Omawiane równania upraszczają się znacznie gdy [34]:

- kwas zastosowany jako bufor jest całkowicie zdysocjowany i jego stężenie jest znacznie większe od stężenia analizowanej próbki,
- grupy funkcyjne złoża są mocnym kwasem i ich stężenie w fazie stacjonarnej jest znacznie większe od stężenia analizowanej próbki. Ze względu na kowalencyjne związanie ze złożem nie mogą one przechodzić do fazy ruchomej. Protony również nie mogą swobodnie przechodzić między fazami ze względu na warunek ich elektroobojętności.

Powyższe założenia są zwykle spełnione w przypadku kolumn analitycznych. Wówczas współczynnik podziału opisuje równanie (3.32). Przy uwzględnieniu w nim drugiej stałej dysocjacji, K_2 , i adsorpcji na żywicy złoża otrzymuje się [34]:

$$(3.34) \quad K_d = \frac{K_a/c_f + K_H V_A/V_S + 1}{K_a/c_b + K_a K_2/c_b^2 + 1},$$

gdzie V_A - objętość szkieletu żywicy złoża.

Z porównania równań (3.32) i (3.34), przy założeniu, że żywica jest częścią składową fazy stacjonarnej, wynika:

$$(3.35) \quad K_p = K_H + I.$$

W przypadku gdy dodatkowo założymy, że adsorpcja następuje w fazie stacjonarnej, druga stała dysocjacji jest znacznie mniejsza od pierwszej, stężenie grup funkcyjnych złoża jest większe od stałej dysocjacji próbki i tylko niezdisocjowana postać próbki może przechodzić do fazy stacjonarnej, równanie (3.34) upraszcza się do postaci:

$$(3.36) \quad K_d = \frac{c_b K_p}{c_b + K_a}.$$

Proste równanie analityczne otrzymano również w przypadku gdy fazą ruchomą była czysta woda i przy założeniu, że objętości fazy ruchomej i stacjonarnej są sobie równe [31, 36]:

(3.37)

$$K_d = \frac{4c_{\max} + K_a - \sqrt{K_a^2 + 8K_a c_{\max}}}{4c_{\max} - K_a + \sqrt{K_a^2 + 8K_a c_{\max}}} = \frac{2c_{\max} + K_a - \sqrt{K_a^2 + 8K_a c_{\max}}}{2c_{\max} - 2K_a}$$

gdzie c_{\max} - stężenie w maksimum piku.

Z powyższego równania wynika m.in., że współczynnik podziału zależy od jednej tylko wielkości eksperymentalnej, stosunku c_{\max}/K_a .

3.3. Modelowanie kolumny

Podjęcie globalne jest niekonsekwentne, korzysta się w nim bowiem z rozkładu Gaussa zakładającego liniową izotermę adsorpcji. Jak wspomniano przy omawianiu Rys. 3.1 możemy z nią mieć do czynienia gdy analizowana próbka występuje w jednej postaci. Gdy ulega ona asocjacji, dysocjacji lub wszelkiego rodzaju kompleksowaniom wówczas w ogólnym przypadku nie ma powodu aby obie postaci próbki były dokładnie tak samo zatrzymywane przez kolumnę. Powoduje to asymetrię piku. W przypadku próbki ulegającej dysocjacji w fazie ruchomej jej stały stopień dysocjacji zapewnia dodanie buforu do fazy ruchomej. Bufor uniemożliwia pracę niektórym detektorom (np. konduktometrycznemu, elektrokinetycznemu czy też potencjometrycznemu). W chromatografii jonowo-wykluczającej często jako fazę ruchomą stosuje się czystą wodę. Ponieważ kształt piku odwzorowuje w nim zmiany stężenia próbki, wówczas w różnych jego częściach mamy do czynienia z różnym stopniem dysocjacji próbki. Z obu stron jego podnóża stężenie próbki jest najmniejsze. Oznacza to największy efektywny ujemny ładunek próbki. Zgodnie z mechanizmem wykluczania jonów początek i koniec piku poruszają się szybciej niż jego maksimum. Na chromatogramie przejawia się to frontalnym rozmyciem pików. Ponadto retencja próbki zależy wówczas od jej stężenia. Zarówno bardzo mocne jak i bardzo słabe kwasy występują w jednej postaci i dają symetryczne piki chromatograficzne.

W modelowaniu komputerowym kolumny metodą Craiga obliczenia numeryczne symulujące kolumnę chromatograficzną są zastosowane lokalnie do małych jej fragmentów odpowiadających półkom teoretycznym. Zakłada się przy tym, że na każdej półce dochodzi do ustalenia się równowagi. Metoda rekurencyjna symuluje przechodzenie próbki przez kolumnę. Polega ona na obliczaniu metodą iteracyjną, opisaną w poprzednim rozdziale, równowagowych stężeń próbki i buforu w fazie ruchomej i stacjonarnej na każdej półce. Ilość próbki ulegająca podziałowi jest równa sumie przyniesionej w porcji fazy ruchomej i pozostałej w fazie stacjonarnej z poprzedniego kroku czasowego. W następnym kroku faza ruchoma porusza się o jedną półkę wzdłuż kolumny i obliczane są nowe stężenia próbki i buforu. Wykorzystywany jest przy tym układ równań [33]:

$$(3.38) \quad c_s(i,j) = [R]_S + [HR]_S,$$

$$(3.39) \quad c_m(i,j) = [R]_M + [HR]_M,$$

$$(3.40) \quad m(i,j) = c_s(i-1,j)v_s + c_m(i-1,j-1)v_m,$$

$$(3.41) \quad k_d(i,j) = c_s(i,j)/c_m(i,j),$$

$$(3.42) \quad c_{bm}(i,j) = [B]_M + [HB]_M,$$

$$(3.43) \quad c_{bs}(i,j) = [B]_S + [HB]_S,$$

$$(3.44) \quad m_b(i,j) = c_{bm}(i-1,j)v_m + c_{bs}(i-1,j-1)v_s,$$

gdzie c_s i c_m oznaczają sumaryczne stężenia obu postaci próbki na poszczególnych półkach odpowiednio w fazie stacjonarnej i ruchomej, c_{bs} i c_{bm} - analogiczne stężenia buforu, v_s i v_m - objętości fazy stacjonarnej i ruchomej na jednej półce, k_d - współczynnik podziału na danej półce, i i j - krok czasowy i kolejny numer półki, a m i m_b - masę próbki i buforu na danej półce.

W przypadku uwzględniania również hydrofobowej adsorpcji równanie bilansu masy przyjmuje postać [34]:

$$(3.45) \quad m = [R]_M v_M + [HR]_M v_M + [HR]_S v_S + [HR]_A v_A,$$

gdzie v_A - objętość warstwy adsorpcyjnej na jednej półce.

Równania (3.38 - 3.45) mogą być rozwiązane przy założeniu następujących warunków granicznych [33]:

$$(3.46) \quad c_s(0,j) = c_m(0,j) = 0 \quad \text{dla } j = 1, \dots, N,$$

$$(3.47) \quad c_{bm}(0,j) = c_b \quad \text{dla } j = 1, \dots, N,$$

$$(3.48) \quad c_{bs}(0,j) = c_{bs}^0,$$

gdzie c_{bs}^0 - stężenie buforu w fazie stacjonarnej, pozostającego w początkowej równowadze z równowagowym stężeniem w fazie ruchomej c_b .

Warunki początkowe opisują równania:

$$(3.49) \quad c_m(i,0) = c_i \quad \text{dla } i = 1, \dots, v_i/v_M,$$

$$(3.50) \quad c_m(i,0) = 0 \quad \text{dla } i > v_i/v_M,$$

$$(3.51) \quad c_{bm}(i,0) = c_b \quad \text{dla wszystkich kroków czasowych.}$$

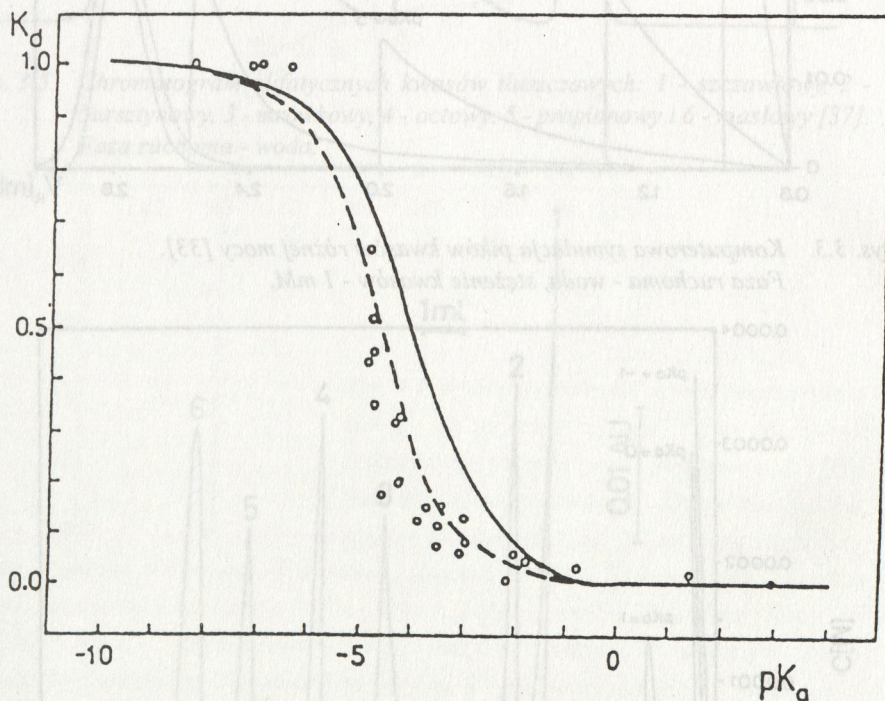
Próbka jest wprowadzana razem z fazą ruchomą wchodzącą do kolumny na całkowitą ilość pótek, których objętość fazy ruchomej równa jest objętości próbki. Obliczenia są przeprowadzane do momentu opuszczenia przez próbkę kolumny. Metoda ta umożliwi badanie rozwijania się piku w trakcie przechodzenia próbki przez kolumnę. Pozwala ona ponadto na zbadanie wpływu różnych parametrów nie tylko na retencję, jak w przypadku równań globalnych, ale i na kształt piku [33, 34].

3.4. Eksperymentalna weryfikacja wprowadzonych równań

Równania wprowadzone w poprzednich rozdziałach były wielokrotnie weryfikowane eksperymentalnie [31, 33, 34, 36, 37]. Wykazano dobrą zgodność, jak to będzie omówione w dalszej części pracy, obliczonej i wyznaczonej eksperymentalnie zależności współczynnika podziału od ilości (stężenia lub objętości) analizowanej próbki dla małych jej stężeń [37]. Na Rys. 3.2 przedstawiono wpływ wartości stałych dysocjacji analizowanych kwasów na współczynnik podziału. Prezentowane wyniki uzyskano eksperymentalnie, za pomocą równań globalnych oraz modelowania kolumny [33]. Uzyskano bardzo dobrą, jak na warunki chromatograficzne, zgodność obliczonych danych z uzyskanymi eksperymentalnie. Zgodnie z dyskusją w poprzednim rozdziale należy ocze-

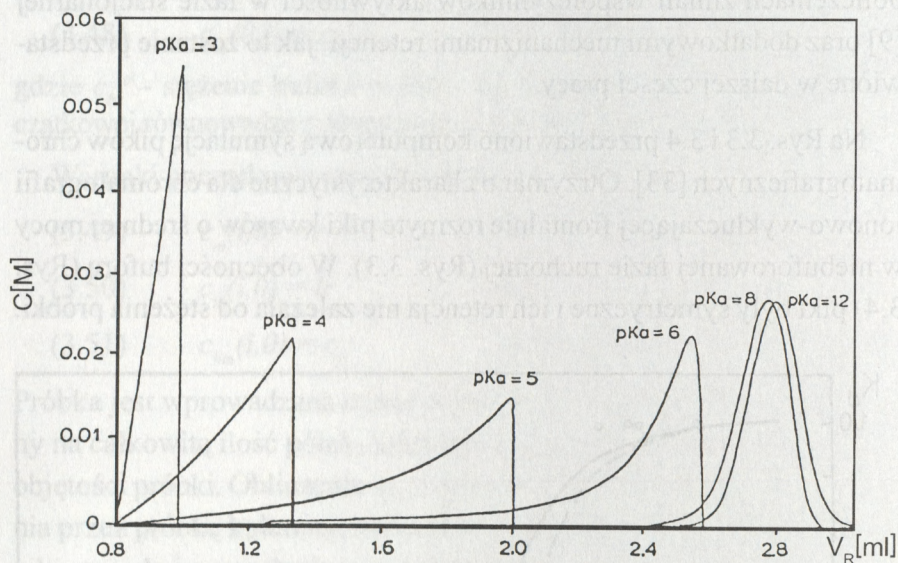
kiwać lepszej zgodności obliczeń uzyskanych za pomocą modelowania kolumny niż równań globalnych, co też zostało potwierdzone. Występujące na Rys. 3.2 różnice między danymi otrzymanymi teoretycznie i eksperymentalnie spowodowane są nie uwzględnieniem w powyższych obliczeniach zmian współczynników aktywności w fazie stacjonarnej [9] oraz dodatkowymi mechanizmami retencji, jak to zostanie przedstawione w dalszej części pracy.

Na Rys. 3.3 i 3.4 przedstawiono komputerową symulację pików chromatograficznych [33]. Otrzymano charakterystyczne dla chromatografii jonowo-wykluczającej frontalnie rozmyte piki kwasów o średniej mocy w niebuforowanej fazie ruchomej (Rys. 3.3). W obecności buforu (Rys. 3.4) piki były symetryczne i ich retencja nie zależała od stężenia próbek.

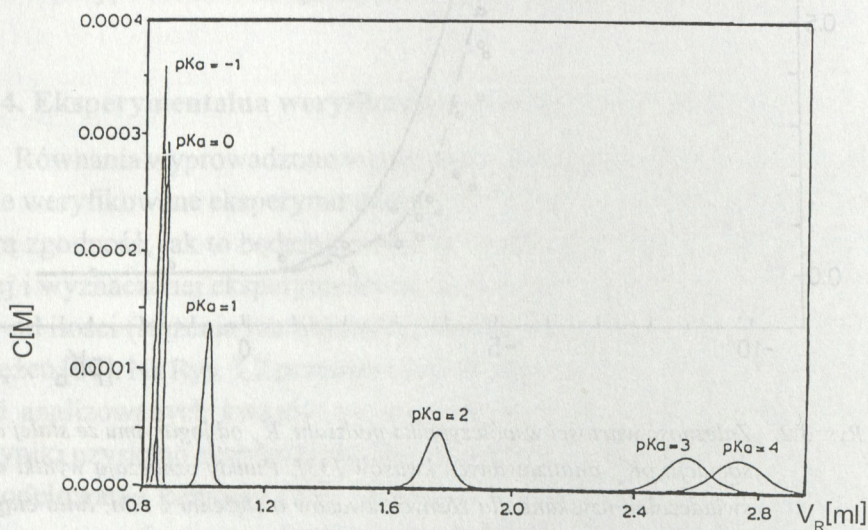


Rys. 3.2. Zależność wartości współczynnika podziału, K_d , od logarytmu ze stałej dysocjacji, pK_a , analizowanych kwasów [33]. Punkty oznaczają wyniki doświadczalne uzyskane dla różnych kwasów o stężeniu 1 mM, linia ciągła obliczona została w oparciu o równania globalne, przerywana - w wyniku modelowania kolumny.

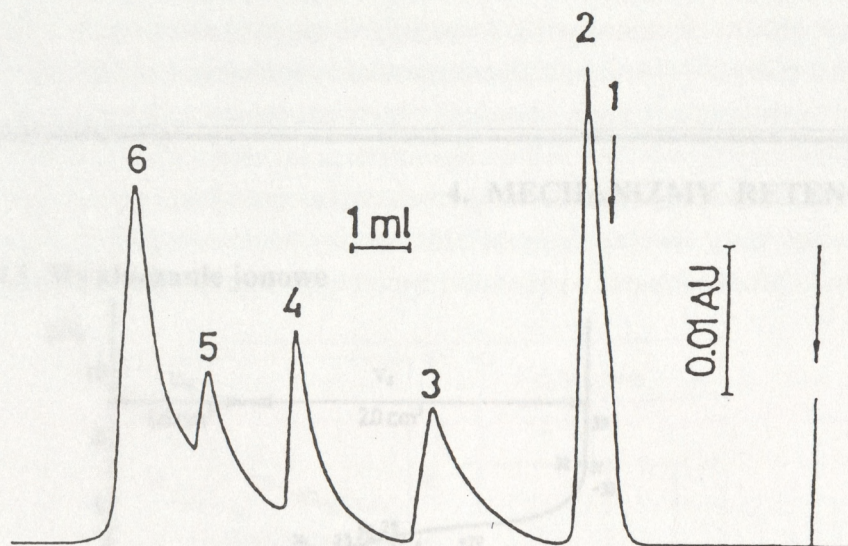
Dla porównania na Rys. 3.5 i 3.6 przedstawiono eksperymentalnie uzyskane chromatogramy alifatycznych kwasów karboksylowych w wodzie i 0,1 M H_2SO_4 [37]. Widać z nich jakościową zgodność z wynikami otrzymanymi za pomocą modelowania komputerowego.



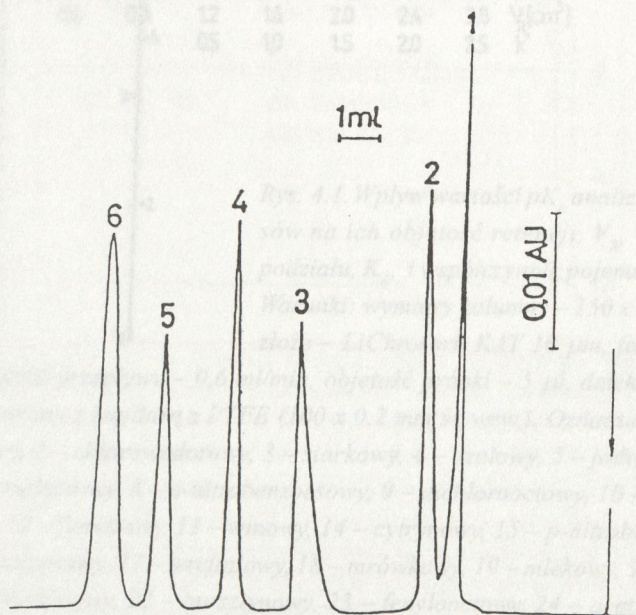
Rys. 3.3. Komputerowa symulacja pików kwasów różnej mocy [33].
Faza ruchoma - woda, stężenie kwasów - 1 mM.



Rys. 3.4. Komputerowa symulacja pików kwasów różnej mocy [33]. Faza ruchoma - 1 mM mocny kwas, stężenie analizowanych kwasów - 1 mM.



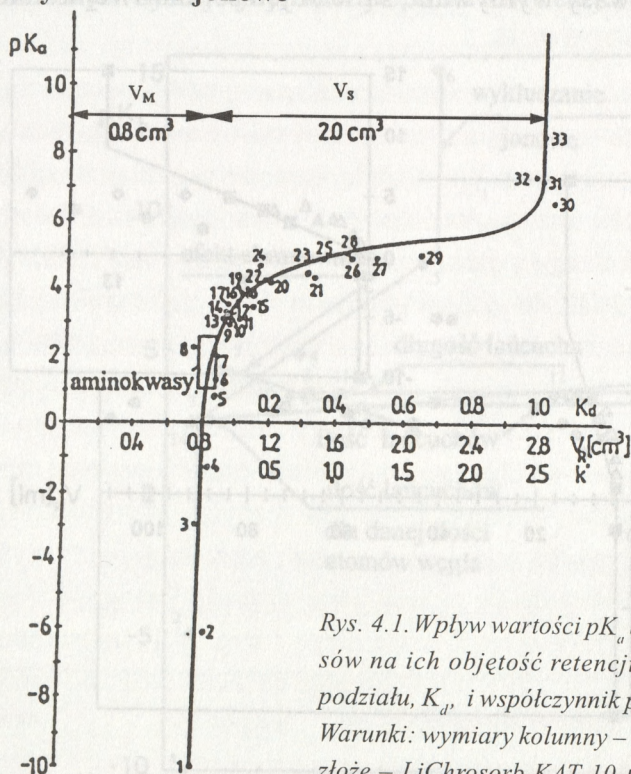
Rys. 3.5. Chromatogram alifatycznych kwasów tłuszczowych: 1 - szczawiowy, 2 - bursztynowy, 3 - mrówkowy, 4 - octowy, 5 - propionowy i 6 - masłowy [37]. Faza ruchoma - woda.



Rys. 3.6. Chromatogram kwasów tłuszczowych przedstawionych na Rys. 3.5, uzyskany przy zastosowaniu 0,1 mM H_2SO_4 jako fazy ruchomej [37].

4. MECHANIZMY RETENCJI

4.1. Wykluczanie jonowe

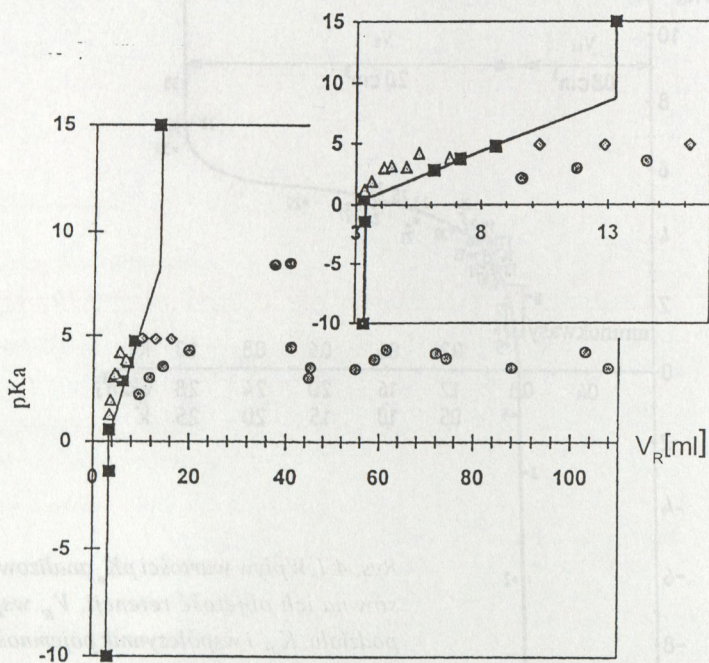


Rys. 4.1. Wpływ wartości pK_a analizowanych kwasów na ich objętość retencji, V_r , współczynnik podziału, K_d , i współczynnik pojemności, k' , [31].

Warunki: wymiary kolumny – 150 x 4 mm śr. wew.,
złóże – LiChrosorb KAT 10 μ m, faza ruchoma –

woda, szybkość przepływu – 0,6 ml/min, objętość próbki – 5 μ l, detekcja – detektor elektrokinetyczny z kapilarą z PTFE (100 x 0,2 mm śr. wew.). Oznaczone kwasy: 1 – nadchlorowy, 2 – chlorowodorowy, 3 – siarkowy, 4 – azotowy, 5 – jodowy, 6 – szczawinowy, 7 – maleinowy, 8 – o-nitrobenzoesowy, 9 – dichlorooctowy, 10 – fталowy, 11 – salicylowy, 12 – fumarowy, 13 – winowy, 14 – cytrynowy, 15 – p-nitrobenzoesowy, 16 – m-nitrobenzoesowy, 17 – tereftalowy, 18 – mrówkowy, 19 – mlekowy, 20 – benzoesowy, 21 – askorbinowy, 22 – bursztynowy, 23 – fenylooctowy, 24 – acetylosalicylowy, 25 – octowy, 26 – izomasłowy, 27 – walerianowy, 28 – węglowy, 29 – kapronowy, 30 – fenol, 31 – p-nitrofenol, 32 – o-nitrofenol, 33 – m-nitrofenol.

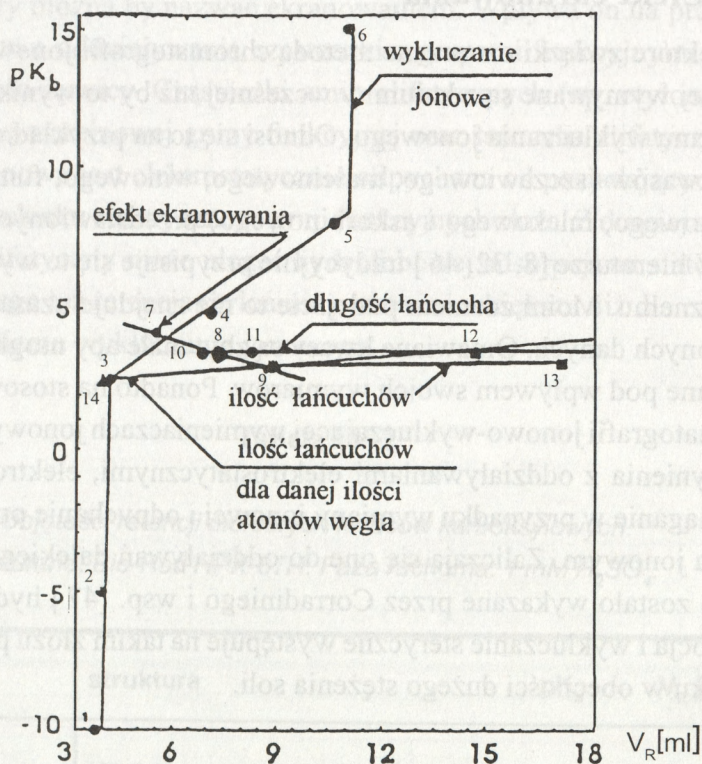
Nazwy poszczególnych technik chromatograficznych wywodzą się od ich głównych mechanizmów retencji. Z reguły jednak mechanizm ten jest mieszany. Na Rys. 4.1 przedstawiono, wchodzącą w zakres rozprawy doktorskiej autora, zależność objętości retencji od wartości pK_a analizowanych kwasów [31]. Ponieważ retencja zależy od efektywnego ładunku cząsteczek analizowanego związku zależność ta przyjmuje charakterystyczny dla chromatografii jonowo-wykluczającej [30] S-owaty kształt. Mocne kwasy wymywane są w objętości martwej kolumny,



Rys. 4.2. Wpływ wartości pK_a analizowanych kwasów na ich objętość retencji, V_R [45]. Kolumna: Bio-Rad Aminex ion-exclusion HPX-87H, 300 x 7,8 mm śr. wew., wymiennicz kationowy (H^+), stopień usieciowania - 8%, średnica ziarna - 9 μm . Faza ruchoma - 1 mN H_2SO_4 . Analizowane kwasy: ■ - rozdzielane przez czysty mechanizm wykluczania jonów (nadchlorowy, azotowy, sulfosalicylowy, chlorooctowy, mrówkowy, octowy, metanol), Δ - retencja kontrolowana przez efekt ekranowania (szczawiowy, maleinowy, winowy, fumarowy, cytrynowy, mlekowy, askorbinowy), \diamond - alifatyczne kwasy tłuszczowe o różnej długości łańcucha (propionowy, masłowy, walerianowy), \circ - kwasy aromatyczne (fталowy, izoftalowy, tereftalowy, o-, p- i m-nitrobenzoesowe, benzoesowy, salicylowy, m-nitrofenol, o-chlorofenol, o-, m- i p-toluilowy, o-metoksybenzoesowy, p-chlorobenzoesowy, difenowy).

bardzo słabe kwasy w sumie objętości martwej i wewnętrznej. Tylko kwasy o pośredniej mocy ulegają rozdzielowi.

Z rysunku tego odczytać można ponadto, że kwasy alifatyczne o różnej długości łańcucha (od octowego do kapronowego) charakteryzują się różną retencją mimo, że wartości ich stałych dysocjacji są prawie takie same. Z kolei niektóre kwasy aromatyczne (salicylowy i acetylosalicylowy oraz ftalowy i tereftalowy) charakteryzują się podobną retencją mimo różnic stałych dysocjacji. Oznacza to, że na ich retencję, oprócz wykluczania



Rys. 4.3. Wpływ wartości pK_b analizowanych zasad na ich objętości retencji, V_R [32]. Kolumna: Bio-Rad Aminex HPX-720. Faza ruchoma – 10 mM NaOH. Analizowane zasady rozdzielane przez czysty mechanizm wykluczania jonów: 1 – KOH, 2 – NaOH, 3 – $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 4 – NH_4OH , 5 – hydroksyloamina, 6 – metanol; efekt ekranowania: 7 – etylenodiamina, 8 – etyloamina, 9 – dietyloamina; wpływ długości łańcucha: 10 – metylo-, 8 – etylo-, 11 – propylo-, 12 – butyloamina; wpływ ilości łańcuchów: 8 – etylo-, 9 – dietylo-, 13 – trietyloamina; wpływ ilości łańcuchów przy zachowanej ilości atomów węgla w cząsteczce: 14 – wodorotlenek tetrametyloamoniowy, 9 – dietyloamina, 12 – butyloamina.

jonowego wpływają również inne mechanizmy. Efekt ten jest jeszcze bardziej zauważalny na kolumnie wypełnionej złożem opartym na kopolimerze styrenu i diwinylobenzenu (Rys. 4.2). Analogiczna zależność, przedstawiona na Rys. 4.3, dla zasad została po raz pierwszy zaobserwowana przez Haddada i wsp. [32]. Również i w tym przypadku widoczny jest cały szereg odstępstw od mechanizmu wykluczania jonowego.

4.2. Efekt ekranowania

Niektóre związki oznaczane metodą chromatografii jonowo-wykluczającej wymywane są z kolumny wcześniej niż by to wynikało z mechanizmu wykluczania jonowego. Odnosi się to na przykład do niektórych kwasów (szczawiowego, maleinowego, winowego, fumarowego, cytrynowego, mlekowego i askorbinowego) przedstawionych na Rys. 4.2. W literaturze [8, 32, 46] tradycyjnie przypisuje się to wykluczaniu sterycznemu. Moim zdaniem podejście to nie znajduje uzasadnienia w dostępnych danych. Omawiane kwasy są zbyt małe aby mogły być wykluczane pod wpływem swoich wymiarów. Ponadto na stosowanych w chromatografii jonowo-wykluczającej wymienniczkach jonowych mamy do czynienia z oddziaływaniami elektrostatycznymi, elektrostatyczne przyciąganie w przypadku wymiany jonowej i odpychanie przy wykluczaniu jonowym. Zaliczają się one do oddziaływań dalekiego zasięgu. Jak to zostało wykazane przez Corradiniego i wsp. [47] hydrofobowa adsorpcja i wykluczanie steryczne występuje na takim złożu po depresji ładunku w obecności dużego stężenia soli.

Tabela IV-1

Własności i objętości retencji pochodnych etyloaminy

grupa:	polarna	hydrofobowa	polarna	hydrofobowa	pK _b	V _R [ml]
		NH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	etylenodiamina		4,1	5,3
		CH ₃ -CH ₂ -NH ₂	etyloamina		3,3	7,5
dietyloamina		CH ₃ -CH ₂ -NH-CH ₂ -CH ₃			2,9	8,7

Dokładniej efekt ten zostanie przedyskutowany w oparciu o aminy [10, 12, 32, 45]. Rozważmy serię związków z Rys. 4.3: etylenodiaminę, etyloaminę i dietyloaminę. Zgodnie z danymi przedstawionymi w Tabeli IV-1 ich retencja jest odwrotna niż wynika to z mechanizmu wykluczania jonowego. Trudno jest również zauważyć korelację między retencją, a wymiarami ich cząsteczek. Zmniejszenie retencji etylenodiaminy częściowo wyjaśnia uwzględnienie drugiej stałej dysocjacji (patrz równanie 3.34). Dokładniej wytłumaczyć to można przez uwzględnienie efektu który można by nazwać ekranowaniem. Wpływa on na prawdopodobieństwo oddziaływania cząsteczki z grupami funkcyjnymi złoża lub szkieletu żywicy. Cząsteczki amin alifatycznych (np. etyloamina) składają się z aminowej grupy funkcyjnej oraz łańcucha alifatycznego. Grupa aminowa jest elektrostatycznie odpychana od posiadających ten sam znak ładunku elektrycznego grup funkcyjnych złoża. Z drugiej strony łańcuch alifatyczny może ulegać hydrofobowej adsorpcji na siatce żywicy. Dlatego też retencja etyloaminy jest nieco większa niż dla czystego mechanizmu wykluczania jonowego.

Tabela IV-2

Objętości retencji niektórych kwasów karboksylowych.
Kolumna: Bio-Rad HPX-87H. Faza ruchoma: 1 mM H₂SO₄.

Kwas	struktura	pK _a	V _R [ml]
winowy	HOOC-CH(OH)-CH(OH)-COOH	3,04	4,1
cytrynowy	HOOC-CH ₂ -COH(COOH)-CH ₂ COOH	3,10	4,4
fumarowy	HOOC-CH=CH-COOH	3,05	5,0
chlorooctowy	Cl-CH ₂ -COOH	2,87	6,1

Przyłączenie drugiej grupy aminowej, jak ma to miejsce w etylenodiaminie, blokuje możliwość hydrofobowej adsorpcji łańcucha. Z drugiej strony przyłączenie dodatkowego łańcucha (dietyloamina) blokuje oddziaływania grupy aminowej z grupami funkcyjnymi złoza. Można wobec tego powiedzieć, że następuje wzajemne ekranowanie grup funkcyjnych i łańcuchów alifatycznych cząsteczki.

Powyższe rozumowanie odnieść można również do retencji kwasów (patrz Rys. 4.1 i 4.2) [31, 48 - 50]. W Tabeli IV-2 przedstawiono kwasy [12, 45] charakteryzujące się podobnymi stałymi dysocjacji. Analogicznie do amin różnią się one retencją. Zauważyć tu można wpływ na nią długości łańcucha i efektu ekranowania. Oba efekty tłumaczą też różnice retencji kwasów aromatycznych przedstawionych w Tabeli IV-3.

Z prawdziwym wykluczaniem sterycznym mamy prawdopodobnie do czynienia przy rozdziale cukrów [50 - 52]. Z drugiej strony drugorzędym mechanizmem retencji w chromatografii wykluczania sterycznego jest wykluczanie jonowe [53], szczególnie przy małym stężeniu elektrolitów w fazie ruchomej [47].

Tabela IV-3

Porównanie wpływu na objętość retencji, V_R , i wartości pK_a różnych podstawników kwasu benzooesowego.

Kolumna: Bio-Rad HPX-87H. Faza ruchoma: 1 mM H_2SO_4 .

Kwas	orto-		para-		meta-	
	pK_a	V_R [ml]	pK_a	V_R [ml]	pK_a	V_R [ml]
<i>toluילowy</i>	3,91	59,0	4,36	61,6	4,27	103
<i>nitrobenzoesowy</i>	2,17	9,6	3,44	55,0	3,49	88,0
<i>ftalowy</i>	2,98	11,8	3,51	45,3	3,54	34,5

4.3. Hydrofobowa adsorpcja

W przeciwieństwie do opisanych w poprzednim rozdziale, niektóre związki są zatrzymywane na kolumnie silniej niż by to wynikało z mechanizmu wykluczania jonowego [32, 34, 39, 45, 48 - 50, 54 - 55 56]. Z Rys. 4.2 i 4.3 odczytać można, że homologiczne szeregi kwasów alifatycznych i amin alifatycznych charakteryzują się bardzo podobnymi stałymi dysocjacji lecz obserwowane objętości retencji poszczególnych związków znacznie się między sobą różnią [32, 39, 45]. Szczególnie dużą retencję obserwuje się dla związków aromatycznych (Rys. 4.2) [32, 39, 48]. W Tabeli IV-4 przedstawiono objętości retencji różnych kwasów karboksylowych. Łatwo z niej zauważyć, że wzrost długości łańcucha alifatycznego zwiększa ich retencję. W stosunku do retencji przewidywanej przez czysty mechanizm wykluczania jonowego (równanie 3.32) dziesięciokrotnie większą retencją charakteryzuje się aromatyczny kwas benzoesowy [39].

Tabela IV-4

Wpływ ilości atomów węgla, N_C ,
w cząsteczce na objętość retencji, V_R , kwasów.
Kolumna: Bio-Rad HPX-87H, Faza ruchoma: 1 mM H_2SO_4 .

Kwas	pK_a	N_C	V_R [ml]
mrówkowy	3,74	1	7,16
octowy	4,76	2	8,55
propionowy	4,87	3	10,25
masłowy	4,85	4	12,86
walerianowy	4,84	5	16,20
benzoesowy	4,21	7	72,00

Przyczyną tej zwiększonej retencji jest hydrofobowa adsorpcja. Ze względu na możliwość występowania π -elektronowych oddziaływań jest ona znacznie bardziej uwidoczniona na złożu z kopolimeru styrenu i diwinylobenzenu niż na kolumnach silikażelowych (porównaj Rys. 4.1 i 4.2). Ilościowo efekt ten opisują równania (3.34 i 3.36).

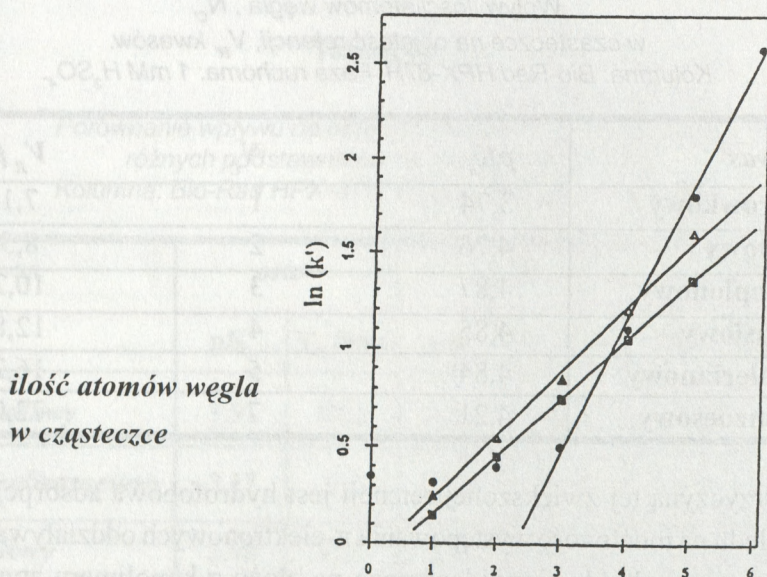
Z danych przedstawionych na Rys. 4.3 [32, 45] odczytać można, że wzrost retencji i adsorpcji następuje ze:

- wzrostem długości łańcucha w cząsteczce,
- wzrostem ilości łańcuchów (np. etylo-, dietylo- i trietyloamina),
- przy danej ilości atomów węgla w cząsteczce, wraz ze zmniejszaniem ilości i wzrostem długości łańcuchów (jon tetraalkiloamoniowy, dietyloamina, butyloamina),
- obecnością w cząsteczce wiązań podwójnych, a w szczególności pierścieni aromatycznych.

Powyższe obserwacje oznaczają też, że wzrost hydrofobowej adsorpcji następuje wraz ze wzrostem wymiarów i masy cząsteczkowej, spadkiem polarności i rozpuszczalności w wodzie analizowanych związków [8].

Obecność hydrofobowej adsorpcji potwierdzona została:

- liniową zależnością Kovacsa (wzrostu logarytmu ze współczynników pojemnościowych od ilości atomów węgla w łańcuchu alifatycznym) [32, 45] oraz
- liniowym spadkiem wartości logarytmu ze współczynnika pojemności od stężenia rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej [32].

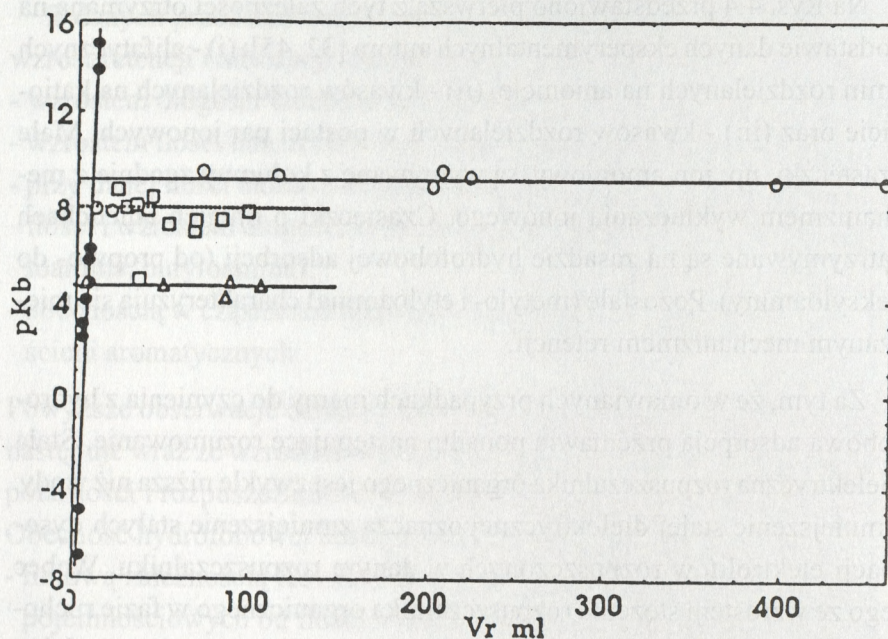


Rys. 4.4. Zależność wartości logarytmów ze współczynników pojemnościowych k' , od liczby atomów węgla w cząsteczce [12]: ■ - alifatycznego kwasu, Δ - alifatycznego kwasu rozdzielanego jako pary jonowej i ● - alifatycznej aminy.

Na Rys. 4.4 przedstawiono pierwszą z tych zależności otrzymaną na podstawie danych eksperymentalnych autora [32, 45]: (i) - alifatycznych amin rozdzielanych na anionie, (ii) - kwasów rozdzielanych na kationie oraz (iii) - kwasów rozdzielanych w postaci par jonowych. Małe cząsteczki, np. jon amoniowy, są wymywane z kolumny zgodnie z mechanizmem wykluczania jonowego. Cząsteczki o długich łańcuchach zatrzymywane są na zasadzie hydrofobowej adsorpcji (od propylo- do heksyloaminy). Pozostałe (metylo- i etyloamina) charakteryzują się mieszanym mechanizmem retencji.

Za tym, że w omawianych przypadkach mamy do czynienia z hydrofobową adsorpcją przemawia ponadto następujące rozumowanie. Stała dielektryczna rozpuszczalnika organicznego jest zwykle niższa niż wody. Zmniejszenie stałej dielektrycznej oznacza zmniejszenie stałych dysocjacji elektrolitów rozpuszczonych w danym rozpuszczalniku. Wobec tego ze wzrostem stężenia rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej, tzn. ze spadkiem stopnia zjonizowania analizowanych związków, należałoby oczekiwać wzrostu retencji. Faktycznie zachowanie takie zostało zaobserwowane dla mocnych kwasów o małych cząsteczkach [57, 58]. Jednakże dla kwasów [54] i amin [32] alifatycznych zaobserwowano odwrotny efekt - spadek retencji pod wpływem rozpuszczalnika organicznego. Zależność ta jest bardzo charakterystyczne dla hydrofobowej adsorpcji.

W literaturze często można spotkać się ze stwierdzeniem, że w chromatografii jonowo-wykluczającej drugorzędym mechanizmem retencji jest hydrofobowa adsorpcja [8]. Stwierdzenie to sugeruje, że w niewielkim tylko stopniu modyfikuje ona retencję oznaczanej próbki. Na Rys. 4.5 [32, 45] przedstawiono zależność objętości retencji od wartości pK_b różnych zasad. Okazało się, że małe cząsteczki tworzą (linia ciągła) charakterystyczną dla chromatografii jonowo-wykluczającej S -owatą zależność. Natomiast retencja niektórych amin aromatycznych była nawet stukrotnie większa niż dla czystego mechanizmu wykluczania jonowego.



Rys.4.5 Porównanie objętości retencji amin alifatycznych i aromatycznych [32].
 ● - aminy alifatyczne o krótkim łańcuchu i zasady nieorganiczne.
 ○ - pochodne aniliny, □ - pirydyny i Δ - benzyloaminy. Warunki jak na Rys. 4.3.

Sam proces hydrofobowej adsorpcji związany jest z energią powierzchniową tworzenia dziury Onsagera dookoła cząsteczek analizowanego związku [58 - 62]. Potencjał termodynamiczny, ΔG , w takim przypadku opisany jest przez równanie:

$$(4.1) \quad \Delta G = N_a A \sigma + N_a A_s \sigma (k_s^e - 1),$$

gdzie N_a - liczba Avogadry, A - pole powierzchni cząsteczki, A_s - pole powierzchni cząsteczki rozpuszczalnika, σ - napięcie powierzchniowe, k_s^e - stała charakteryzująca rozpuszczalnik.

Wobec tego stałą adsorpcji opisuje równanie [39, 62]:

$$(4.2) \quad \ln K_H = \alpha + \beta A,$$

gdzie α i β - stałe eksperymentalne.

Ostatnie równanie oznacza, że należy oczekiwać wzrostu retencji ze wzrostem pola powierzchni cząsteczkowej oznaczanych związków. Łątwo zauważyć, że omawiane dotychczas czynniki zwiększające hydrofobową adsorbcję związane są ze wzrostem powierzchni cząsteczkowej próbek. Efekt ten tłumaczy również wzrost retencji ze spadkiem stopnia izomeryzacji alkoholi (*tert*-, *sec*- i *n*-butanol) [51] i kwasów [63] (kwas izomasłowy wymywany jest przed masłowym). Hydrofobową adsorbcję można zwiększyć dodając bufor [34] i jony parujące [39, 64] do fazy ruchomej. Z drugiej strony zmniejsza ją dodatek rozpuszczalnika organicznego [32] lub związków inkluzyjnych [38, 45, 65] do fazy ruchomej.

W literaturze zwykło się zakładać, że całkowitą powierzchnię cząsteczek można obliczyć z addytywnych udziałów wchodzących w jej skład atomów i grup [62]. Zgodnie z tym podejściem izomery podstawienia kwasów aromatycznych powinny się charakteryzować dokładnie tą samą retencją. Nie zostało to jednakże potwierdzone danymi eksperymentalnymi (Tabela IV-3) [39]. Z moich obserwacji wynika, że retencja rośnie w porządku *orto*-, *para*- i *meta*-. Wyniki te otrzymane zostały na kolumnie wypełnionej silikażelem [31] i kopolimerem styrenu i diwinylobenzenu [39]. Otrzymano je dla kwasów [39], związków objętych [31] i zasad [32] rozdzielanych przy zastosowaniu różnych faz ruchomych [39]. Można więc stwierdzić, że obrazują one pewną ogólną prawidłowość. Z danych tych wynika korelacja między objętościami retencji i gęstością analizowanych związków, a więc ich powierzchnią cząsteczkową [39].

Wykorzystując modelowanie metodą Craiga [34] przebadalem wpływ wielu parametrów na retencje próbki. Wygenerowane komputerowo piki chromatograficzne dobrze zgadzały się z danymi eksperymentalnymi. Z różnic objętości retencji wyznaczonych eksperymentalnie i obliczonych przy zastosowaniu równań (3.38 - 3.44 i 3.46 - 3.50) wyznaczone zostały stałe adsorpcji kwasów karboksylowych, alkoholi i amin [34].

Na koniec tej części warto zaznaczyć, że na kolumnach jonowo-wykluczających możemy mieć również do czynienia z wymianą jonową. Występuje ona gdy próbka posiada ten sam znak co złoże, jak będzie

dokładnie omówione w następnym rozdziale. Z drugiej strony w technice tej mogą być wykorzystywane typowe kolumny jonowo-wymienne [31, 66].

5. PARAMETRY WPLYWAJĄCE NA RETENCJĘ

W tej części pracy omówiony zostanie wpływ różnych parametrów fizykochemicznych i chromatograficznych na retencję. Oparto ją o przedstawiony poprzednio opis teoretyczny i dostępne (w zasadzie pochodzące z własnych pomiarów i publikacji) wyniki eksperymentalne.

5.1. Próbka

5.1.1. Ładunek elektryczny

Jak już wspomniano w chromatografii jonowo-wykluczającej jony o tym samym ładunku elektrycznym co grupy funkcyjne złoża są od niego odpychane, natomiast cząsteczki elektrycznie obojętne mogą penetrować jego wnętrze. Oznacza to, że retencja próbki zależy od wypadkowego, efektywnego ładunku elektrycznego cząsteczek próbki. Ładunek ten zależy nie tylko od budowy samej cząsteczki ale i od otaczającego ją środowiska, tzn. pH fazy ruchomej oraz stężenia w niej rozpuszczalnika organicznego i jonów parujących. Dokładniej zagadnienia te zostaną omówione w następnych rozdziałach.

Z drugiej strony związki o cząsteczkach przeciwnie naładowanych w stosunku do złoża są przez nie elektrostatycznie przyciągane [12, 47, 67]. Ze względu na to, że są to oddziaływania dalekiego zasięgu dominują one w stosunku do innych występujących w tej technice.

W Tabeli V-1 [68, 69] przedstawiono objętości retencji różnych aromatycznych kwasów sulfonowych. Kwasy sulfonowe na kationicie są rozdzielane na zasadzie mechanizmu wykluczania jonowego. Przyłączenie drugiej grupy kwasowej (kwas sulfosalicylowy) uniemożliwia hydrofobową adsorpcję grupy aromatycznej. Jeśli w pierścieniu jako

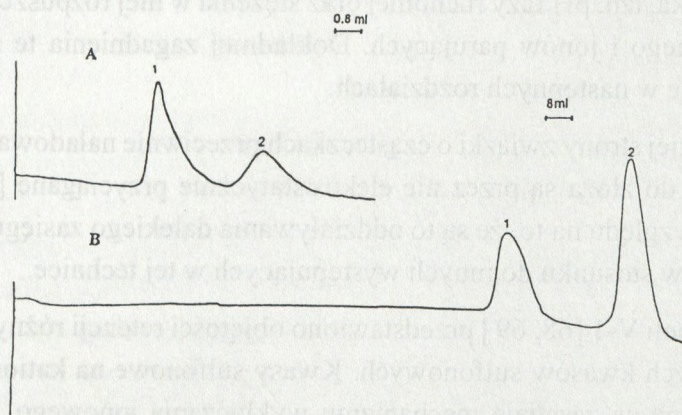
Tabela V-1

Objętości retencji wybranych aromatycznych kwasów sulfonowych.
Kolumna: Bio-Rad HPX-87H, faza ruchoma: 1 mM H₂SO₄.

Kwas	V _R [ml]	dotatkowa grupa funkcyjna	typ oddziaływania
sulfosalicylowy	3,26	-COO ⁻	odpychanie
<i>p</i> -sulfotoluilowy	5,81	-CH ₃	adsorpcja
<i>p</i> -anilinosulfonowy	33,8	-NH ₃ ⁺	przyciąganie

druga występuje grupa metylowa wówczas zwiększa ona hydrofobową adsorpcję, stąd i retencję, niepolarną część cząsteczki. Bardzo duży wzrost retencji obserwowany jest natomiast po przyłączeniu do cząsteczki dodatnio naładowanej grupy funkcyjnej, np. aminowej. Oznacza to, między innymi, możliwość bardzo efektywnego kontrolowania zmianami pH retencji związków z dwiema grupami funkcyjnymi przeciwnie naładowanymi, np. aminokwasów lub białek. W tym przypadku bufor nie tylko zmienia stopień dysocjacji badanej próbki ale również jej ładunek. Ładunek ten zanika w punkcie izoelektrycznym.

Cechą charakterystyczną chromatografii jonowo-wykluczającej są frontalnie rozmyte piki. Dodatek buforu (zwykle mocnego kwasu lub zasady) do fazy ruchomej poprawia symetrię piku zwiększając jednocześnie jego retencję. Na Rys. 5.1 pokazano rozdział kwasów aminobenzoowych. Odczytać z niego można bardzo duży (ok. 20-krotny) wzrost



Rys. 5.1. Rozdział kwasów: 1 - *para*- i 2 - *meta*-aminobenzoowych [68]. Kolumna: Bio-Rad HPX-87H, detektor: UV-254nm, faza ruchoma: woda (A) i 1 mM H₂SO₄ (B).

ich retencji po dodaniu mocnego kwasu do wodnej fazy ruchomej. Poprawa symetrii piku nie jest już tak ewidentna. W czystej wodzie natomiast, zamiast frontalnie rozmytych otrzymano ogonowane piki. Niewątpliwie spowodowane to jest elektrostatycznym przyciąganiem grup aminowych do złoża.

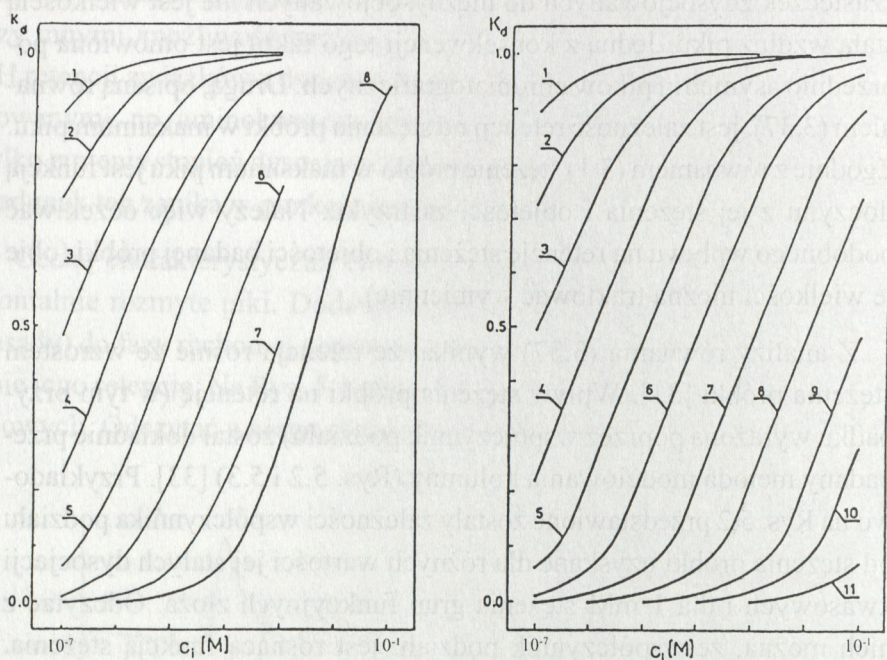
5.1.2. Ilość próbeki

W chromatografii jonowo-wykluczającej często jako fazę ruchomą stosuje się po prostu czystą wodę. W tym przypadku stosunek stężenia cząsteczek zdysocjowanych do niezdisocjowanych nie jest wielkością stałą wzdłuż piku. Jedną z konsekwencji tego faktu jest omówiona poprzednio asymetria pików chromatograficznych. Drugą, opisaną równaniem (3.37), jest zależność retencji od stężenia próbki w maksimum piku. Zgodnie z równaniem (3.1) stężenie próbki w maksimum piku jest funkcją iloczynu z jej stężenia i objętości zastrzyku. Należy więc oczekiwać podobnego wpływu na retencję stężenia i objętości badanej próbki (obie te wielkości można traktować wymiennie).

Z analizy równania (3.37) wynika, że retencja rośnie ze wzrostem stężenia próbki [31]. Wpływ stężenia próbki na retencję (w tym przypadku wyrażoną poprzez współczynnik podziału) został dokładnie przebadany metodą modelowania kolumny (Rys. 5.2 i 5.3) [33]. Przykładowo na Rys. 5.2 przedstawione zostały zależności współczynnika podziału od stężenia próbki uzyskane dla różnych wartości jej stałych dysocjacji kwasowych i dla 1 mM stężenia grup funkcyjnych złoża. Odczytać z nich można, że współczynnik podziału jest rosnącą funkcją stężenia. Wykresy tych zależności kształtem przypominają literę *S*. Zarówno dla małych jak i dla dużych stężeń współczynnik podziału prawie jest od nich niezależny i wynosi, odpowiednio θ i 1 . Dla wartości stałych dysocjacji dużo mniejszych od stężenia grup funkcyjnych złoża otrzymuje się szereg równoległych krzywych (Rys. 5.3), wówczas współczynnik podziału jest niezależny od tego stężenia. Gdy stała dysocjacji osiąga wartości porównywalne ze stężeniem grup funkcyjnych złoża wówczas

współczynnik podziału jest praktycznie niezależny od jej wartości (krzywa 8 na Rys. 5.2). Ze wzrostem stężenia grup funkcyjnych złoża ta graniczna krzywa przesuwa się w stronę większych stężeń aż do otrzymania zależności przedstawionych na Rys. 5.3. W praktyce chromatograficznej zwykle ten ostatni przypadek ma miejsce.

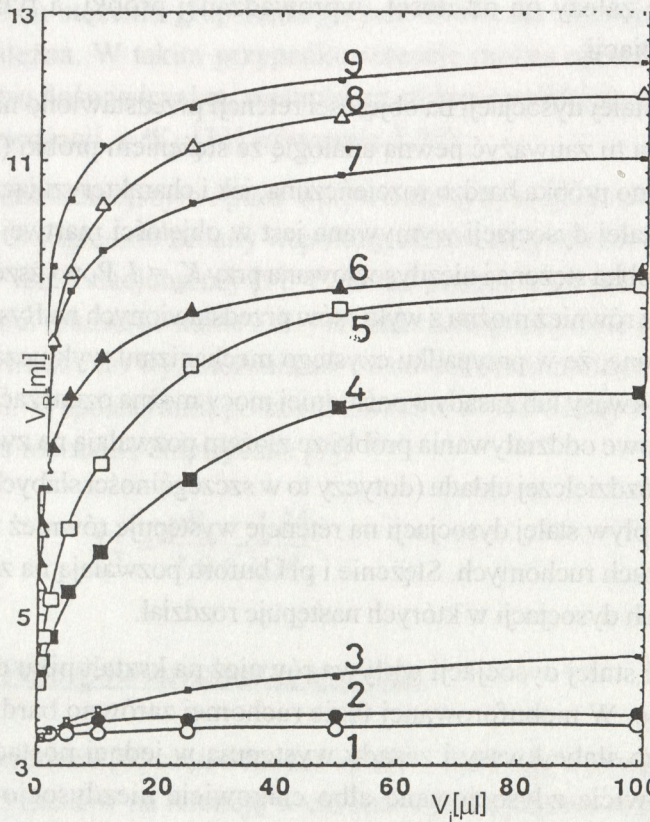
Bufor dodany do fazy ruchomej uniezależnia retencję od stężenia próbki. Jego obecność jest niepożądana w przypadku niektórych systemów detekcyjnych. Opracowana metoda modelowania kolumny pozwala na optymalizowanie stężenia buforu tak aby z jednej strony zapewniał on stałą, niezależną od stężenia, retencję, z drugiej zaś nie zwiększał niepożądanie przewodnictwa fazy ruchomej [31, 33].



Rys. 5.2. Wpływ stężenia próbki, c_p , na wartości współczynnika podziału, K_d , [33]. Stężenie grup funkcyjnych złoża $c_f = 10^{-3}$ M, objętość martwa kolumny - 0,8 ml, objętość wewnętrzna kolumny - 2 ml, $N = 1000$, stałe dysocjacji, K_a : 1 - 10^{-10} , 2 - 10^{-9} , 3 - 10^{-8} , 4 - 10^{-7} , 5 - 10^{-6} , 6 - 10^{-5} , 7 - 10^{-4} , 8 - $\geq 10^{-3}$.

Rys. 5.3. Wpływ stężenia próbki, c_p , na wartości współczynnika podziału, K_d , [33]. Stężenie grup funkcyjnych złoża $c_f = 10^3$ M, stałe dysocjacji, K_a : 1 - 10^{-10} , 2 - 10^{-9} , 3 - 10^{-8} , 4 - 10^{-7} , 5 - 10^{-6} , 6 - 10^{-5} , 7 - 10^{-4} , 8 - 10^{-3} , 9 - 10^{-2} , 10 - 10^{-1} , 11 - 10^0 . Pozostałe warunki jak na Rys. 5.2.

Powyższe przewidywania teoretyczne potwierdzają doświadczalnie uzyskane zależności wielkości współczynnika podziału od stężenia [31] i objętości zastrzyku próbki [37]. Ta ostatnia zależność została przedstawiona na Rys. 5.4. Widać z niego dobrą zgodność przewidywań teoretycznych z wynikami eksperymentalnymi szczególnie dla małych ilości próbek wprowadzanych na kolumnę.



Rys. 5.4. Zależność objętości retencji, V_R , od objętości zastrzyku, V_p , różnych kwasów [37]. Kolumna: Bio-Rad HPX-87H 300x7,8 sr. wew. , faza ruchoma - 10^{-4} M H_2SO_4 , badane kwasy (jeśli tego nie zaznaczono inaczej krzywe przedstawiają dane doświadczalne): 1 - szczawiowy (krzywa uzyskana za pomocą modelowania komputerowego), 2 - szczawiowy, 3 - winowy, 4 - mrówkowy, 5 - mrówkowy (modelowanie), 6 - octowy, 7 - propionowy, 8 - octowy (modelowanie) i 9 - izomasłowy, o stężeniu - 10^{-4} M.

5.1.3. Stopień i stała dysocjacji

W przypadku chromatografii jonowo-wykluczającej pojęcie stopnia dysocjacji równoważne jest z efektywnym ładunkiem próbki. Im bardziej jest ona zdysocjowana (zjonizowana) tym mniejsza jest jej retencja. Spowodowane to jest efektem Donnana. W przypadku niebuforowanej fazy ruchomej stopień dysocjacji próbki zależy od jej stężenia, stałej dysocjacji oraz składu fazy ruchomej. W buforowanej fazie ruchomej nie zależy on od ilości wprowadzanej próbki, a tylko od jej stałej dysocjacji.

Wpływ stałej dysocjacji na objętości retencji przedstawiono na Rys. 4.1 - 4.3. Można tu zauważyć pewną analogię ze stężeniem próbki (Rys. 5.2 i 5.3). Zarówno próbka bardzo rozcieńczona, jak i charakteryzująca się dużą wartością stałej dysocjacji wymywana jest w objętości martwej kolumny ($K_d = 0$). Próbka stężona i niezdisocjowana przy $K_d = 1$. Powyższe zależności odczytać również można z wykresów przedstawionych na Rys. 5.2 i 5.3. Oznaczają one, że w przypadku czystego mechanizmu wykluczania jonowego tylko kwasy lub zasady o pośredniej mocy można oznaczać tą techniką. Dodatkowe oddziaływania próbki ze złożem pozwalają na zwiększenie zdolności rozdzielczej układu (dotyczy to w szczególności słabych kwasów i zasad). Wpływ stałej dysocjacji na retencję występuje również w buforowanych fazach ruchomych. Stężenie i pH buforu pozwalają na zmianę zakresu stałych dysocjacji w których następuje rozdział.

Wartość stałej dysocjacji wpływa również na kształt piku chromatograficznego. W niebuforowanej fazie ruchomej zarówno bardzo mocne jak i bardzo słabe kwasy i zasady występują w jednej postaci. Są one albo całkowicie zdysocjowane albo całkowicie niezdisocjowane. Na chromatogramie tworzą one symetryczne piki. Kwasy i zasady o pośrednich mocach charakteryzują się pikami frontalnie rozmytymi. Hydrofobowa adsorpcja dodatkowo zwiększa ich asymetrię [34]. Buforowanie fazy ruchomej zapewnia stały stopień dysocjacji próbki wzdłuż pasma i symetryczne piki wszystkich związków (Rys. 3.3 - 3.6). Oczywiście, jak i w innych technikach chromatograficznych, może się tu poja-

wić tzw. ogonowanie pików związane np. z niejednorodnością ubicia kolumny.

Jak to już omówiono retencja próbki zależy od ilości jej zastrzyku i wartości stałej dysocjacji. Zwykle w pomiarach chromatograficznych objętość wprowadzanej na kolumnę próbki jest stała. Okazało się, że pod względem formalnym retencję próbki można opisać za pomocą tylko dwóch zredukowanych wielkości, stosunków c_i/K_a i c_f/K_a [33]. W chromatografii jonowo-wykluczającej zwykle dąży się do uzyskania złoża o dużym stężeniu grup funkcyjnych. Wówczas retencja nie jest od niego zależna. W takim przypadku retencję można opisać tylko jedną wielkością doświadczalną, stosunkiem stężenia próbki do wartości z jej stałej dysocjacji, c_i/K_a , [33] (równanie 3.37).

Przy dokładniejszym opisie wpływu stałej dysocjacji na retencję należałoby uwzględnić zmiany współczynników aktywności i stałej dysocjacji w fazie stacjonarnej [9]. Chociaż podejście to jest możliwe do wykonania (patrz równanie 3.31) jednak mało praktyczne gdyż wielkości te są trudne do wyznaczenia zarówno doświadczalnego, jak i teoretycznego. Współczynnik podziału kwasów o pośredniej mocy opisuje wówczas równanie empiryczne [9]:

$$(5.1) \quad K_d = \frac{pK_a - 1,25}{7,9 - 1,25}.$$

5.1.4. Pole powierzchni cząsteczki

W literaturze [8] często można spotkać dyskusję nad wpływem różnych parametrów na retencję w chromatografii jonowo-wykluczającej. Zaliczyć do nich można rozpuszczalność analizowanych próbek w wodzie, wymiary i masę cząsteczkową, obecność w cząsteczce podwójnych wiązań lub różnych typów izomerów. Łatwo zauważyć, że wymienione czynniki powinny być związane z hydrofobową adsorpcją analizowanych związków. W pracy tej zaprezentowane jest podejście (równanie 4.2) [9] uzależniające wielkość hydrofobowej adsorpcji od jedne-

go tylko parametru, pola powierzchni cząsteczki analizowanego związku. Okazało się (rozdział 4.3), że uwzględniając go możemy, przynajmniej jakościowo, przewidzieć retencję i powiązać ją z wyżej wymienionymi parametrami fizykochemicznymi. Poniżej zostaną one pokrótce przypomniane.

Z wykresów przedstawionych na Rys. 4.1 - 4.3 wynika, że wzrost retencji następuje wraz ze wzrostem długości łańcucha badanych kwasów [8, 35, 37, 64] i amin [32]. Podobny efekt zaobserwowano również dla alkoholi rozdzielanych omawianą techniką [51]. Głównym mechanizmem retencji wymienionych związków jest hydrofobowa adsorpcja. Dla ich szeregu homologicznego cząsteczkowe pole powierzchni proporcjonalne jest do ilości atomów węgla w cząsteczce. Zależności logarytmów współczynników pojemnościowych od tej liczby otrzymane dla różnych klas związków przedstawione zostały na Rys. 4.4. Są to zależności typowe dla chromatografii w układzie faz odwróconych [70]. Przyjęto, że ich liniowy charakter potwierdza występowanie hydrofobowej adsorpcji. Zaobserwowane one zostały również na kolumnie silikażelowej użytej w charakterze jonowo-wykluczającej [16], co zostanie szerzej omówione w dalszej części pracy.

Wzrost pola powierzchni cząsteczki można osiągnąć nie tylko poprzez zwiększenie długości jej łańcucha alifatycznego ale i poprzez zwiększenie ilości łańcuchów w cząsteczce (Rys. 4.3), np. w serii: metylo-, dimetylo- i trimetyloamina [32]. Podobny efekt daje też takie rozłożenie atomów węgla w cząsteczce aby otrzymać jak najdłuższy łańcuch. Rozważmy na przykład jon tetrametyloamoniowy, dietyloaminę i butyloaminę. Te trzy związki mimo, że zawierają w cząsteczce taką samą liczbę atomów węgla charakteryzują się różną retencją. W jonie tetrametyloamoniowym są one rozłożone tak, że tworzą najbardziej kulistą cząsteczkę, a więc o najmniejszym polu powierzchni. W konsekwencji jego retencja jest najmniejsza (Rys. 4.3). Największą powierzchnią charakteryzuje się liniowa cząsteczka butyloaminy i stąd jej retencja jest największa.

W podobny sposób można wytłumaczyć różną retencję izomerów łańcuchowych. Bardziej rozgałęzione cząsteczki mają mniejsze pole powierzchni i są przez to wymywane wcześniej, jak to zostało stwierdzone w przypadku kwasów [63] i alkoholi [51].

Wymienione powyżej różnice w budowie cząsteczek wpływają również na rozpuszczalność związków w wodzie. Im próbka jest mniej rozpuszczalna w wodzie, będącej głównym składnikiem fazy ruchomej, tym ma większe powinowactwo do niepolarnego szkieletu żywicy. Tłumaczy to też zwiększoną retencję związków aromatycznych. Ich wyjątkowo duża retencja związana jest prawdopodobnie z ich mniejszą rozpuszczalnością w wodzie oraz z oddziaływaniami typu van der Waalsa i π -elektronowymi. Z porównania retencji izomerów podstawienia związków aromatycznych wynika, że największą retencją charakteryzują się zwykle izomery w pozycji *meta*- (patrz rozdział 4.3 i Tabela IV-3). Przeczy to zasadzie addytywności grup funkcyjnych pochodzącej z przybliżonego kulowego modelu cząsteczek [62]. Również różnice w stałych dysocjacji tych związków są zbyt małe aby mogły wytłumaczyć obserwowane znaczne różnice w retencjach. Przynajmniej częściowo można je wytłumaczyć różnicami w objętościach, a stąd i powierzchniach, cząsteczkowych. Ponieważ objętości te są odwrotnie proporcjonalne do gęstości należy oczekiwać spadku retencji z jej wzrostem (Tabela V-2) [39]. Różnice w gęstościach są stosunkowo małe i nie w pełni odzwierciedlają one objętości cząsteczkowe. Tym niemniej symptomatyczne jest to, że korelację tę i zwykle największą retencję izomeru *meta* zaobserwowałem dla różnych kwasów aromatycznych (np. toluilowego i ntrobenzoesowego) [39], fenoli [31] i amin aromatycznych (pikolin, leutydyn, toluidyn i pochodnych aniliny) [32], rozdzielanych na różnych typach kolumn. Również dodatek do fazy ruchomej jonów parujących [39] i związków inkluzyjnych [65] nie zmieniał tej tendencji (Tabela V-2).

Tabela V-2

Objętości retencji [ml] izomerów podstawienia kwasu nitrobenzoesowego uzyskane przy użyciu faz ruchomych. Kolumna: Bio-Rad Aminex Ion-Exclusion HPX-87H.

Izomer	pK _a	ρ [g/mL]	woda	Faza ruchoma	
				0,5 mM H ₂ SO ₄	0,5 mMTBABr
<i>orto</i>	2,17	1,575	5,1	9,6	8,3
<i>para</i>	3,44	1,550	5,2	55	49,1
<i>meta</i>	3,49	1,494	9,3	88	74,5

5.1.5. Budowa cząsteczki

Z mechanizmu wykluczania jonowego wynika, że współczynnik podziału związków obojętnych powinien być równy jedności. Oczywiście może go zwiększyć dodatkowy udział hydrofobowej adsorpcji. Niektóre związki obojętne o dużych cząsteczkach charakteryzują się jednak współczynnikiem podziału mniejszym od 1 [8, 52, 71]. Spowodowane to jest wykluczeniem sterycznym tych związków.

Zmniejszoną, w stosunku do mechanizmu wykluczania jonowego, retencją charakteryzują się również kwasy lub aminy z dwoma grupami funkcyjnymi [8, 32, 50, 68]. Stąd np. kwas szczawiowy wmywany jest przed octowym mimo, że oba posiadają tę samą liczbę atomów węgla w cząsteczce (Tabela V-3). Na podobnej zasadzie kwas malonowy charakteryzuje się mniejszą retencją niż propionowy, a kwas bursztynowy niż masłowy. Zachowanie to wyjaśnia omówiony wcześniej efekt ekranowania, którego wpływ na retencję jest przeciwny do wpływu hydrofobowej adsorpcji (Rys. 4.2, Tabela IV-1). Wpływ stałych dysocjacji kwasów

dwu- i trójkarboksylowych na retencję jest analogiczny do kwasów monokarboksylowych [48]. Podobny wpływ na retencję jak ilość grup funkcyjnych ma zasadowość lub kwasowość kwasów lub zasad nieorganicznych. Ich zmniejszoną retencję wyjaśnia uwzględnienie kolejnych stałych dysocjacji (równanie 3.34).

Obecność w cząsteczce wiązania podwójnego zwiększa retencję związku [55, 63]. Dlatego też kwas akrylowy charakteryzuje się większą retencją niż propionowy o tej samej długości łańcucha. Szczególnie dużą retencją charakteryzują się omówione wcześniej związki aromatyczne, tak jak to przedstawiono dla kwasów w Tabeli IV-4 i zasad w Tabeli V-4 [45]. O wielkości wpływu pierścieni aromatycznych na retencję świadczy przykładowo retencja 3,5-ksylidyny. Jest ona ok. 50-krotnie większa niż by to wynikało z jej ładunku (Tabela IV-4).

Tabela V-3

*Wpływ drugiej grupy karboksylowej na objętość retencji, V_R , kwasów o różnej ilości atomów węgla, N_C , w cząsteczce.
Kolumna: Bio-Rad HPX-87H, Faza ruchoma: 1 mM H_2SO_4 .*

<i>Kwas</i>	<i>pK_a</i>	<i>N_C</i>	<i>V_R [ml]</i>
octowy	4,76	2	9,4
szczawiowy	1,27	2	3,5
propionowy	4,87	3	11,1
malonowy	2,86	3	4,1
masłowy	4,84	4	14,5
bursztynowy	4,22	4	7,5

Tabela V-4

Wpływ ilości atomów węgla, N_C , w cząsteczce na objętość retencji, V_R , amin alifatycznych i aromatycznych. Kolumna: Bio-Rad HPX-720, Faza ruchoma: 1 mM NaOH.

	<i>Amina</i>	pK_b	N_C	V_R [ml]
alifatyczna	jon amoniowy	4,75	0	4,0
	metyloamina	3,34	1	3,4
	etyloamina	3,30	2	4,1
	propyloamina	3,40	3	5,0
	butyloamina	3,37	4	7,1
	pentyloamina	3,37	5	11,2
	heksyloamina	3,36	6	16,5
aromatyczna	pirydyna	8,76	5	22,4
	anilina	9,39	6	114
	<i>p</i> -toluidyna	8,89	7	201
	<i>o</i> -toluidyna	9,56	7	207
	<i>m</i> -toluidyna	8,30	7	223
	4,6-ksylidyna	9,11	8	394
3,5-ksylidyna	9,11	8	456	

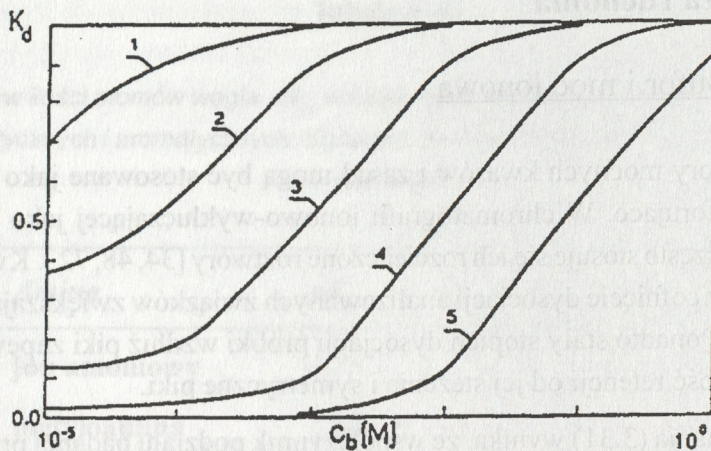
5.2. Faza ruchoma

5.2.1. Bufor i moc jonowa

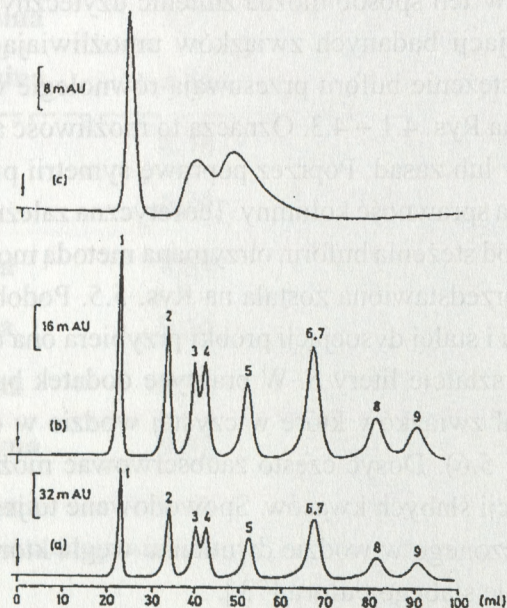
Roztwory mocnych kwasów i zasad mogą być stosowane jako roztwory buforujące. W chromatografii jonowo-wykluczającej jako fazy ruchome często stosuje się ich rozcieńczone roztwory [34, 48, 72]. Kwasy te poprzez cofnięcie dysocjacji analizowanych związków zwiększają ich retencję. Ponadto stały stopień dysocjacji próbki wzdłuż piki zapewnia niezależność retencji od jej stężenia i symetryczne piki.

Z równania (3.31) wynika, że współczynnik podziału badanej próbki zależy zarówno od stałej dysocjacji jak i stężenia kwasu (zasady) pełniącego rolę buforu [9]. Metodą modelowania komputerowego wykazano, że wzrost obu tych wielkości (K_b i c_b) poprzez zmniejszenie dysocjacji analizowanych kwasów (zasad), zwiększa ich retencję (Rys. 3.3 ÷ 3.6) [33, 34]. W ten sposób można zmienić użyteczny zakres wartości stałych dysocjacji badanych związków umożliwiając ich rozdział. Zmiana pH i stężenie buforu przesuwają równoległe wzdłuż osi rzędnych krzywe na Rys. 4.1 ÷ 4.3. Oznacza to możliwość analizy mocniejszych kwasów lub zasad. Poprzez poprawę symetrii piku bufor dodatkowo zwiększa sprawność kolumny. Teoretyczna zależność współczynnika podziału od stężenia buforu, otrzymana metodą modelowania komputerowego, przedstawiona została na Rys. 5.5. Podobnie jak w przypadku stężenia i stałej dysocjacji próbki przybiera ona charakterystyczny kształt w kształcie litery S . W praktyce dodatek buforu umożliwia często rozdział związków które w czystej wodzie w ogóle są nierozdzielane (Rys. 5.6). Dostyc często zaobserwować można słabą odtwarzalność retencji słabych kwasów. Spowodowane to jest różnym stężeniem rozpuszczonego w wodzie dwutlenku węgla który w takim przypadku pełni rolę słabego buforu [73].

Na wzrost retencji wpływa również zwiększenie mocy jonowej fazy ruchomej [18]. Prawdopodobnie związane to jest z efektem wysalania i zmianami napięcia powierzchniowego. Przy małym stężeniu soli mamy do czynienia głównie z oddziaływaniami elektrostatycznymi. Jego wzrost



Rys. 5.5. Wpływ stężenia buforu, c_b , na współczynnik podziału, K_d [33]. Stężenie badanych kwasów - 1 mM, ich stałe dysocjacji, K_a : 1 - 10^{-5} , 2 - 10^{-4} , 3 - 10^{-3} , 4 - 10^{-2} , 5 - 10^{-1} . Objętości, martwa i wewnętrzna kolumny, wynoszą odpowiednio 0,8 i 2 ml, a jej sprawność $N = 1000$.



Rys. 5.6. Chromatogramy amin aromatycznych [74]. Faza ruchoma: (a) 10, (b) 1 i (c) 0 mM NaOH, Kolumna: Bio-Rad HPX-72-O, 300 x 7,8 mm śr. wew. Badane aminy: 1 - pirydyna, 2 - 2-pikolina, 3 - 4-pikolina, 4 - 3-pikolina, 5 - 2,6-leutydyna, 6 - 2,4-leutydyna, 7 - 2,3-leutydyna, 8 - 3,4-leutydyna i 9 - 3,5-leutydyna.

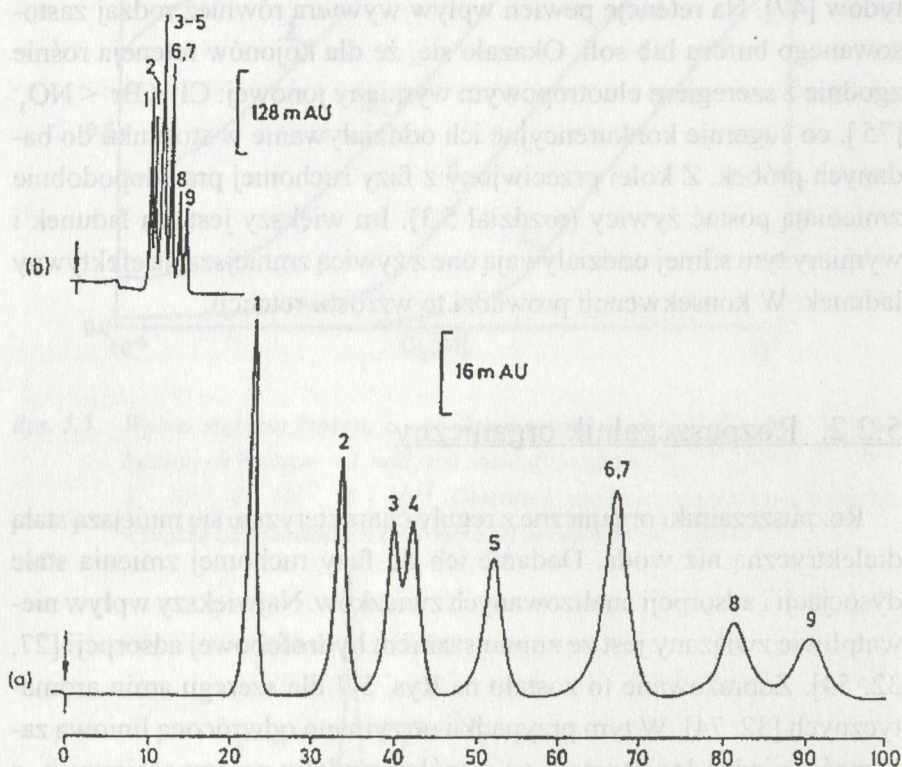
pozwała na wykluczanie steryczne, a następnie hydrofobową adsorpcję. Widoczne to jest szczególnie w przypadku dużych cząsteczek, np. peptydów [47]. Na retencję pewien wpływ wywiera również rodzaj zastosowanego buforu lub soli. Okazało się, że dla kojonów retencja rośnie zgodnie z szeregiem eluotropowym wymiany jonowej: $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{NO}_3^-$ [75], co sugeruje konkurencyjne ich oddziaływanie w stosunku do badanych próbek. Z kolei przeciwjony z fazy ruchomej prawdopodobnie zmieniają postać żywicy (rozdział 5.3). Im większy jest ich ładunek i wymiary tym silniej oddziałują one z żywicą zmniejszając efektywny ładunek. W konsekwencji prowadzi to wzrostu retencji.

5.2.2. Rozpuszczalnik organiczny

Rozpuszczalniki organiczne z reguły charakteryzuje się mniejszą stałą dielektryczną niż woda. Dodanie ich do fazy ruchomej zmienia stałe dysocjacji i adsorpcji analizowanych związków. Największy wpływ niewątpliwie związany jest ze zmniejszeniem hydrofobowej adsorpcji [27, 32, 54]. Zobrazowane to zostało na Rys. 5.7 dla szeregu amin aromatycznych [32, 74]. W tym przypadku otrzymano odwróconą liniową zależność między logarytmem ze współczynników pojemnościowych, a stężeniem rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej [32]. Liniowość tej zależności potwierdza, że głównym mechanizmem retencji w tym przypadku jest hydrofobowa adsorpcja [76]. Dodatkowo umacnia to fakt, że tak duże zmiany retencji pod wpływem rozpuszczalnika organicznego obserwowane są dla związków aromatycznych lub związków alifatycznych o długim łańcuchu. Związki o małych cząsteczkach są znacznie mniej od niego zależne [54].

Niektóre rozpuszczalniki dodane nawet w niewielkich ilościach do fazy ruchomej wpływają na znaczne zmniejszenie retencji [45, 73]. Dotyczy to np. alkoholi o długich łańcuchach które same ulegając hydrofobowej adsorpcji blokując dostępne miejsca dla badanych próbek. Zgodnie z równaniem (4.2) ich wpływ na zmiany retencji powinien zależeć od pola powierzchni cząsteczkowej. Tłumaczy to dlaczego większe

zmiany obserwowane były dla alkoholi o dłuższych i nierozgałęzionych łańcuchach [73].



Rys. 5.7. Chromatogramy różnych amin aromatycznych [74]. Faza ruchoma: (a) - 1 mM NaOH w H_2O , (b) - 1 mM NaOH w H_2O + ACN (70+30)% obj./obj., pozostałe warunki jak na Rys. 5.6.

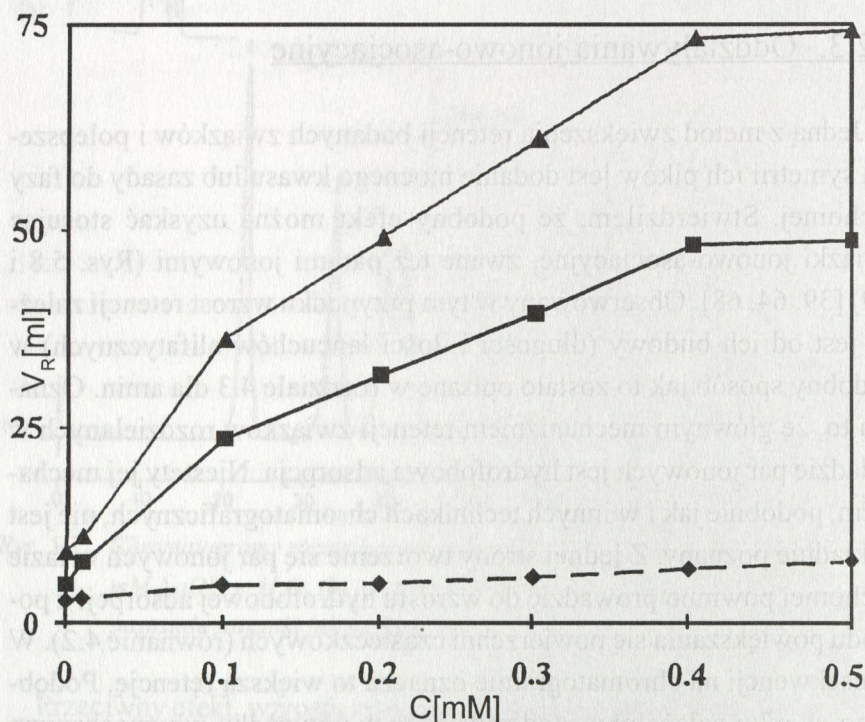
Przeciwny efekt, wzrostu retencji, zaobserwowano dla małych związków nieorganicznych po dodaniu do fazy ruchomej rozpuszczalnika o niskiej stałej dielektrycznej [57, 58]. Jak wiadomo zmniejszenie stałej dielektrycznej zmniejsza stałą dysocjacji [43], co prowadzi do wzrostu retencji. Papp i Keresztes [50] zaobserwowali dla kwasów dikarboksylowych udział obu omawianych efektów. Retencja tych kwasów zwiększała się ze wzrostem stężenia acetonitrylu w fazie ruchomej do osiągnięcia pewnego maksimum (wpływ rozpuszczalnika na zmiany stałej dysocjacji). Dalszy wzrost jego stężenia zmniejszał retencję (wpływ na hydrofobową adsorpcję).

Z omawianym zagadnieniem wiąże się również obserwowane polepszenie symetrii pików i sprawności kolumn po dodaniu do fazy ruchomej niektórych związków organicznych. Szczególnie duży efekt zaobserwowano dla związków (alkoholi i cukrów) z wieloma grupami hydroksylowymi [77, 78]. Te same związki stosowane były zarówno do rozdzielania kwasów jak i zasad. Prawdopodobnie związane to jest ze wzrostem hydrofilowości złoża.

5.2.3. Oddziaływania jonowo-asocjacyjne

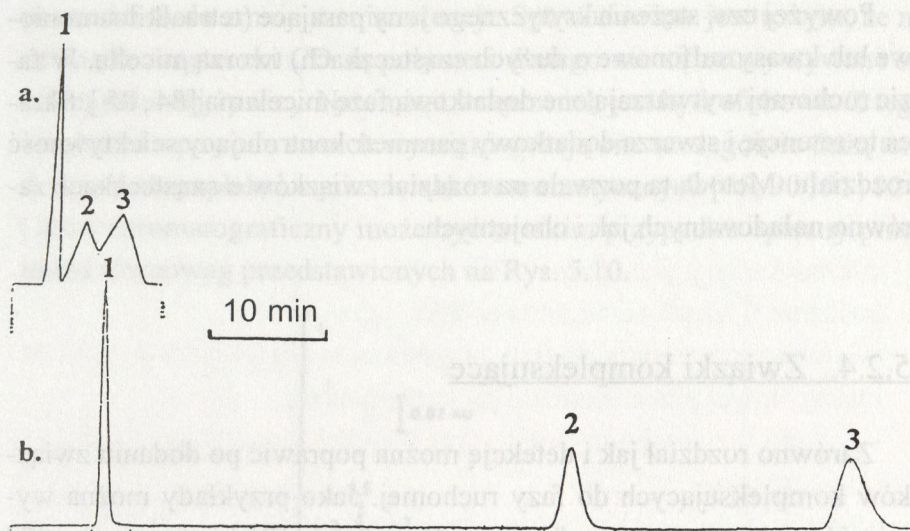
Jedną z metod zwiększenia retencji badanych związków i polepszenia symetrii ich pików jest dodanie mocnego kwasu lub zasady do fazy ruchomej. Stwierdziłem, że podobny efekt można uzyskać stosując związki jonowo-asocjacyjne, zwane też parami jonowymi (Rys. 5.8 i 5.9) [39, 64, 68]. Obserwowany w tym przypadku wzrost retencji zależy od ich budowy (długości i ilości łańcuchów alifatycznych) w podobny sposób jak to zostało opisane w rozdziale 4.3 dla amin. Oznacza to, że głównym mechanizmem retencji związków rozdzielanych w układzie par jonowych jest hydrofobowa adsorpcja. Niestety jej mechanizm, podobnie jak i w innych technikach chromatograficznych, nie jest dokładnie poznany. Z jednej strony tworzenie się par jonowych w fazie ruchomej powinno prowadzić do wzrostu hydrofobowej adsorpcji z powodu powiększania się powierzchni cząsteczkowych (równanie 4.2). W konsekwencji na chromatogramie oznacza to większą retencję. Podobnego wyniku należałoby spodziewać się w przypadku gdy mechanizm ten polegałby na elektrostatycznym przyłączaniu się związków parujących do grup funkcyjnych złoża. Oddziaływania te również są zależne od pola powierzchni cząsteczkowej. Prowadzi to do zmniejszenia efektywnego stężenia grup funkcyjnych złoża, a stąd i jego ładunku. Zgodnie z równaniem (3.32) następuje wówczas wzrost retencji. Ponadto zmniejszenie ładunku i zwiększenie obojętnej powierzchni złoża umożliwia hydrofobową adsorpcję. Nakładanie się tych efektów jest przyczyną tak znacznych zmian retencji obserwowanych na Rys. 5.8 i 5.9.

O oddziaływaniach elektrostatycznych odpowiedzialnych za obserwowane zmiany retencji może świadczyć fakt bardzo szybkiego ustalania się równowagi na kolumnie. Praktycznie, już po kilkuminutowym kondycjonowaniu kolumny otrzymywano chromatogramy o retencji charakterystycznej dla danego stężenia związków parujących [39, 68]. Przy dokładniejszym opisie należy uwzględnić zmiany współczynników aktywności i stałej dielektrycznej fazy stacjonarnej pod wpływem tworzenia się w niej par jonowych (równanie 3.31) [44].



Rys. 5.8. Wpływ stężenia bromku tetrabutylamoniowego na objętości retencji kwasów nitrobenzoesowych [39]. Kolumna: Bio-Rad HPX-87H 300x7,8 śr. wew., badane kwasy: \blacklozenge - o-nitrobenzoesowy, \blacksquare - p-nitrobenzoesowy i \blacktriangle - m-nitrobenzoesowy.

Obecność elektrolitu (np. buforu) w fazie ruchomej zwiększa próg wykrywalności detektorów elektrochemicznych opartych na pomiarze sumarycznej własności fazy ruchomej i analizowanej próbki. Dotyczy to w szczególności detektora konduktometrycznego [79, 80], potencjo-



Rys. 5.9. Chromatogramy kwasów 1 - orto-, 2 - para- i 3 - meta-nitrobenzoesowych [68]. Kolumna: Bio-Rad HPX-87H 300x7,8 śr. wew., faza ruchoma: (a) - woda, (b) - 0,5 mM TBABr, objętościowa szybkość przepływu - 1 ml/min.

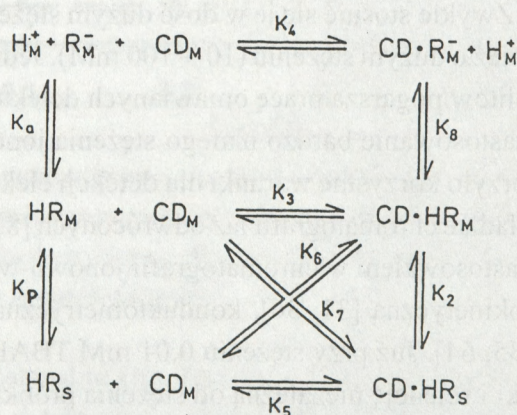
metrycznego [35, 64] i elektrokinetycznego [31, 36, 81, 82]. Przy braku buforu lub gdy jego stężenie jest zbyt małe piki chromatograficzne są asymetryczne, a retencja próbki jest zależna od jej stężenia. Ponadto pozbawiamy się możliwości jej kontroli. W literaturze opisana jest metoda kontroli retencji za pomocą dodatku jonów parujących do fazy ruchomej [83]. Zwykle stosuje się je w dość dużym stężeniu w obecności buforu, również o dużym stężeniu (10 ÷ 100 mM). Jednakże tak duże stężenie elektrolitów pogarsza pracę omawianych detektorów. Okazało się jednak, że zastosowanie bardzo małego stężenia jonów parujących bez buforu stworzyło korzystne warunki dla detekcji elektrokinetycznej i rozdzielu w układzie chromatografii faz odwróconych [81, 82]. To samo rozumowanie zastosowałem w chromatografii jonowo-wykluczającej z detekcją elektrokinetyczną [31, 36], konduktometryczną [80] i potencjometryczną [35, 64]. Już przy stężeniu 0,01 mM TBABr otrzymałem symetryczne piki i retencję niezależną od stężenia próbki [39, 68]. Jednocześnie, nawet tak małe stężenia jonów parujących znacznie wpływały na retencję badanych związków (Rys. 5.8 i 5.9).

Powyżej tzw. stężenia krytycznego jony parujące (tetraalkiloamonio-
we lub kwasy sulfonowe o dużych cząsteczkach) tworzą micelle. W fa-
zie ruchomej wytwarzają one dodatkową fazę micelną [84, 85]. Skra-
ca to retencję i stwarza dodatkowy parametr kontrolujący selektywność
rozdziálu. Metoda ta pozwala na rozdział związków o cząsteczkach za-
równo naładowanych jak i obojętnych.

5.2.4. Związki kompleksujące

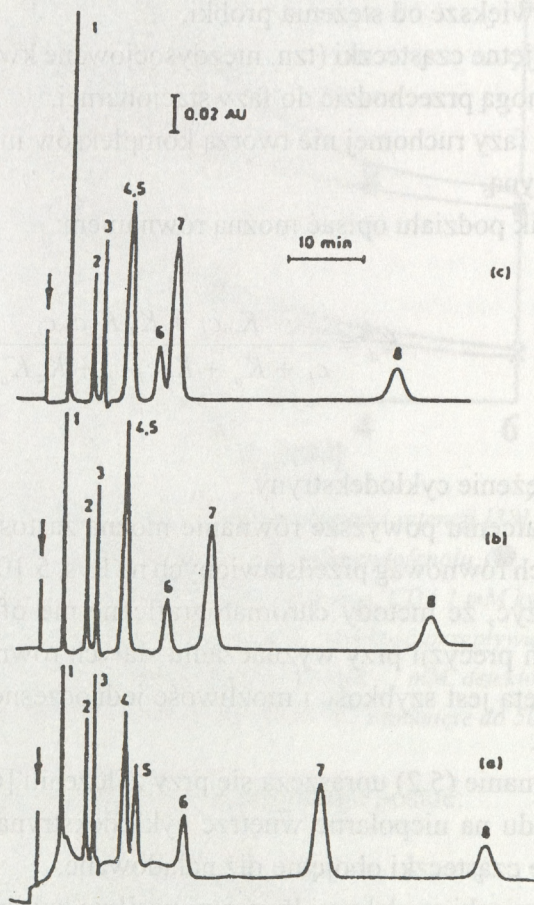
Zarówno rozdział jak i detekcję można poprawić po dodaniu zwią-
zków kompleksujących do fazy ruchomej. Jako przykłady można wy-
mienić analizę boranu w obecności D-sorbitolu [86] i mannitolu [87]
oraz formaldehydu w tetraboranie [88].

Szczególnymi własnościami kompleksującymi charakteryzują się
związki inkluzyjne. W chromatografii jonowo-wykluczającej stosowane
były etery koronowe [89] i β -cyklodekstryna, CD, [38, 65, 68]. Nieco
szerzej omówiony zostanie, opracowany przez autora, wpływ na roz-
dział cyklodekstryny. Dodanie jej do fazy ruchomej zwiększa prawdo-
podobieństwo przebywania w niej badanych związków. W rezultacie



Rys. 5.10. Schemat równowag istniejących w układzie chromatografii jonowo-wy-
kluczającej z fazą ruchomą zawierającą β -cyklodekstrynę [65].

prowadzi to do zmniejszenia retencji. Spowodowane jest to tym, że na zewnątrz cząsteczki CD są polarne i dlatego nie są zatrzymywane na mniej polarnej żywicy. Natomiast wewnątrz jest hydrofobowe. Z tego względu i z powodu swoich wymiarów mają one szczególnie dużą tendencję do kompleksowania związków aromatycznych [65, 90, 91, 92]. Układ chromatograficzny może być w takim przypadku opisany przez układ równowag przedstawionych na Rys. 5.10.



Rys. 5.11. Chromatogramy kwasów [65]: 1 - 2-naftolo-6-sulfonowego, 2 - anilinosulfonowego, 3 - barbiturowego, 4 - gallusowego, 5 - o-nitrobenzoesowego, 6 - acetylosalicylowego, 7 - salicylowego i 8 - m-nitrobenzoesowego. Kolumna: Bio-Rad HPX-87H, objętościowa szybkość przepływu - 0,5 ml/min., faza ruchoma: 1 mM kwas kamfosulfonowy i (a) - 0, (b) - 5 i (c) - 10 mM CD w EtOH + H₂O (20+80)% obj./obj.

Przy założeniu [65], że:

- kolumna jest zrównoważona, tzn. stężenia buforu i cyklodekstryny są stałe i równe ich stężeniom analitycznym,
- grupy funkcyjne (sulfonowe) żywicy oraz kwas pełniący rolę buforu są całkowicie zdysocjowane i ich stężenia są znacznie większe od stężenia próbki,
- cyklodekstryna występuje tylko w fazie ruchomej i jej stężenie jest znacznie większe od stężenia próbki,
- tylko obojętne cząsteczki (tzn. niezdisocjowane kwasy lub ich kompleksy) mogą przechodzić do fazy stacjonarnej,
- składniki fazy ruchomej nie tworzą kompleksów inkluzyjnych z cyklodekstryną,

współczynnik podziału opisać można równaniem:

$$(5.2) \quad K_d = \frac{K_p c_b + K_p K_5 c_D c_b}{c_b + K_a + K_3 c_D c_b + K_4 K_a c_D},$$

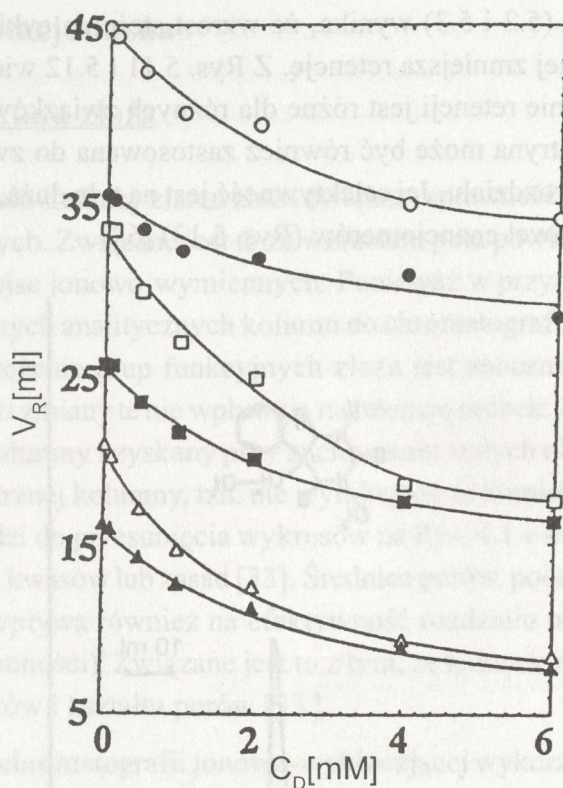
gdzie c_D - stężenie cyklodekstryny.

Po przekształceniu powyższe równanie można zastosować do wyznaczenia stałych równowag przedstawionych na Rys. 5.10 [65]. Warto przy tym zaznaczyć, że metody chromatograficzne nie oferują wprawdzie najwyższych precyzji przy wyznaczaniu stałych równowag ale ich olbrzymią zaletą jest szybkość i możliwość jednoczesnego wyznaczenia kilku z nich.

Równanie (5.2) upraszcza się przy założeniu [68], że:

- ze względu na niepolarnie wnętrze cyklodekstryny znacznie silniej inkluduje cząsteczki obojętne niż naładowane,
- badane związki są słabymi kwasami w silnie kwaśnym środowisku,
- stężenie cyklodekstryny w fazie ruchomej jest małe (wynika to m.in. z jej ograniczonej rozpuszczalności w wodzie) i oddziałuje ona tylko ze związkami w fazie ruchomej:

$$(5.3) \quad K_d = K_p / (1 + K_3 c_D).$$



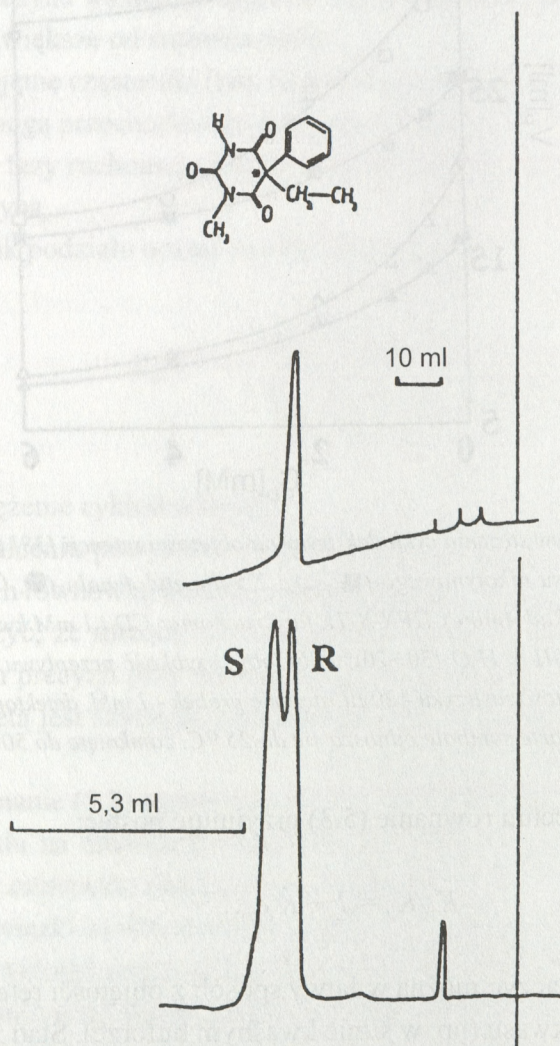
Rys. 5.12. Wpływ stężenia cyklodekstryny na objętości retencji [38] fenolu (▲, △), kwasu nikotynowego (■, □) i 2,5-dimetylofenolu (●, ○). Kolumna: BioRad Aminex HPX-87H, faza ruchoma: CD i 1 mM kwas siarkowy w MeOH + H₂O (30+70)% obj./obj., szybkość przepływu - 0,7 ml/min., objętość zastrzyku - 20 μl, stężenie próbek - 1 mM, detektor - UV-210 nm. Otwarte symbole odnoszą się do 25 °C, zamknięte do 50 °C.

Po przekształceniu równanie (5.3) przyjmuje postać:

$$(5.4) \quad K_p/K_d = 1 + K_3 c_D.$$

Stałą K_p wyznaczyć można w łatwy sposób z objętości retencji niezdysoncjanowanego kwasu (np. w silnie kwaśnym buforze). Stąd z nachylenia liniowej zależności K_p/K_d od c_D wyznaczyć można stałą inkluzji K_3 [68].

Z równań (5.2 i 5.3) wynika, że wzrost stężenia cyklodekstryny w fazie ruchomej zmniejsza retencję. Z Rys. 5.11 i 5.12 widać jednak, że to zmniejszenie retencji jest różne dla różnych związków. Oznacza to, że cyklodekstryna może być również zastosowana do zwiększenia selektywności rozdziału. Jej selektywność jest na tyle duża, że umożliwia to rozdział nawet enancjomerów (Rys. 5.13) [68].



Rys. 5.13. Rozdział enancjomerów metylofenylobarbitalu [68]. Kolumna: BioRad Aminex HPX-87H, faza ruchoma: (a) - 0,5 mM H₂SO₄, (b) - 0,5 mM H₂SO₄ i 10 mM β-cyklodekstryna.

5.3. Faza stacjonarna

5.3.1. Struktura złoża

Zmniejszenie średnicy ziaren złoża zwiększa sprawność kolumn chromatograficznych. Związane jest to ze wzrostem pola powierzchni złoża, tzn. ilości miejsc jonowo-wymiennych. Ponieważ w przypadku komercyjnie dostępnych analitycznych kolumn do chromatografii jonowo-wykluczającej stężenie grup funkcyjnych złoża jest znacznie większe od stężenia próbki zmiany te nie wpływają na retencję próbek. Z kolei wzrost sprawności kolumny uzyskany przy zachowaniu stałych objętości, martwej i wewnętrznej kolumny, tzn. nie wynikający ze zmniejszenia ziarna złoża, prowadzi do przesunięcia wykresów na Rys. 4.1 ÷ 4.3 w kierunku mocniejszych kwasów lub zasad [33]. Średnica porów, podobnie do średnicy ziarna, wpływa również na efektywność rozdziła nie zmieniając retencji (pojemności). Związane jest to z tym, że ładunek złoża nie zależy od wymiarów i kształtu porów [93].

Zwykle w chromatografii jonowo-wykluczającej wykorzystuje się żywice mikroporowate. Ostatnio obserwuje się jednak również tendencję do zastępowania ich żywicami makroporowatymi o mniejszej pojemności lecz bardziej wytrzymałymi mechanicznie [73, 94]. Zastosowane przez autora złoża oparte na silikażelu [31, 66] charakteryzowały się znacznie mniejszym udziałem hydrofobowej adsorpcji na retencję badanych związków, co można zaobserwować np. z porównania wykresów przedstawionych na Rys. 4.1 i 4.2. Spowodowane jest to oczywiście głównie brakiem grup aromatycznych na tym złożu.

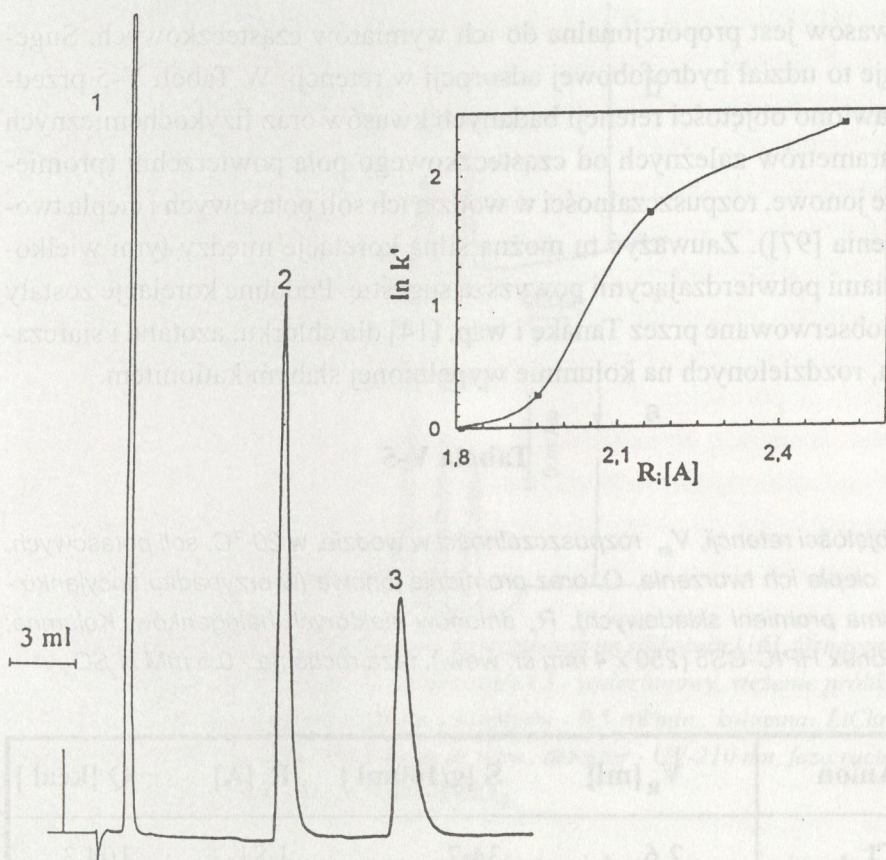
Najczęściej stosowanym złożem w chromatografii jonowo-wykluczającej jest kopolimer styrenu i diwinylobenzenu o różnym stopniu usieciowania. Do powierzchni takiego złoża przyłączone są kowalencyjnie grupy funkcyjne o dużym stężeniu. W konsekwencji stężenie jonów w fazie stacjonarnej jest dużo większe niż w fazie ruchomej. Kowalencyjnie związane grupy funkcyjne złoża nie mogą przechodzić do fazy ruchomej. Ze względu na warunek elektroobojętności dotyczy to również jonów wodorowych. W tej sytuacji doprowadzenie do równowagi ter-

modynamicznej (równanie 3.12) jest możliwe gdy część wody przejdzie z fazy ruchomej do stacjonarnej. Proces ten prowadzi do pęcznienia żywicy. Zależny on jest zarówno od stężenia grup funkcyjnych jak i stopnia jej usieciowania. Stopień usieciowania wpływa bowiem na sztywność mechaniczną żywicy. Jego zwiększenie zmniejsza pęcznienie. Prowadzi to do wzrostu stężenia grup funkcyjnych złoża, co oznacza mniejszą penetrację złoża przez próbkę i zmniejszenie objętości wewnętrznej kolumny. Pogarsza to zdolność rozdzielczą kolumny [8, 63]. Z drugiej strony wzrost usieciowania, poprzez wzrost sztywności mechanicznej, pozwala na pracę przy wyższych ciśnieniach i szybkościach przepływu fazy ruchomej. Zwykle w chromatografii jonowo-wykluczającej stosuje się żywice o 8% stopniu usieciowania jako optymalnym z punktu widzenia obu tych efektów.

5.3.2. Własności grup funkcyjnych

We *Wprowadzeniu* napisałem, że komercyjnie dostępne kolumny do chromatografii jonowo-wykluczającej charakteryzują się dużym ładunkiem złoża. Wychodzono w tym przypadku z założenia, że duże stężenie zdysocjowanych grup funkcyjnych zwiększa efekt wykluczania jonowego [8]. Z analizy równań (3.31 i 3.32) wynika jednak, że użycie złożeń charakteryzujących się małym stężeniem grup funkcyjnych lub ich niską stałą dysocjacji jest możliwe. Powinno to prowadzić do wzrostu retencji [11]. Lee i Lord zsyntezowali szereg żywic o różnym stężeniu grup sulfonowych (0 ÷ 1,1 m równ./g) [27]. Przy 0,3 m równ./g otrzymali oni maksimum retencji kwasów karboksylowych. Zmniejszenie retencji ze wzrostem stężenia grup funkcyjnych powyżej maksimum wytłumaczyć można mechanizmem wykluczania jonowego. Odwrotna zależność obserwowana w zakresie małych stężeń prawdopodobnie związana jest ze wzrostem objętości wewnętrznej kolumny.

Zmniejszenie stężenia grup funkcyjnych złoża powoduje wzrost retencji i stwarza możliwość rozdziału mocnych kwasów, nie dzielących się na standardowych kolumnach. Komercyjnie dostępne są kolumny



Rys. 5.14. Rozdział anionów: 1 - Br^- , 2 - I^- i 3- SCN^- oraz wpływ ich promienia jonowego na logarytmy współczynników pojemnościowych [11]. Kolumna: Dionex HPIC CS-5, faza ruchoma - 0,5 mM H_2SO_4 .

zawierające tzw. złoża zaglomerowane. Złoże takie zbudowane jest zwykle z ziaren kopolimeru styrenu i diwinylobenzenu, podobnie do stosowanego w chromatografii jonowo-wykluczającej [95, 96]. Do jego powierzchni elektrostatycznie, hydrofobowo lub mechanicznie przyłączone są mniejsze ziarna z grupami funkcyjnymi o przeciwnym znaku. W rezultacie efektywny ładunek takiego złoża jest znacznie niższy niż tworzących go cząstek. Rys. 5.14 przedstawia otrzymany przeze mnie chromatogram soli kwasów halogenowodorowych rozdzielonych na tego typu złożu [11]. Kwasy te nie są rozdzielane na klasycznym złożu jonowo-wykluczającym. Z górnej części rysunku widać, że retencja tych

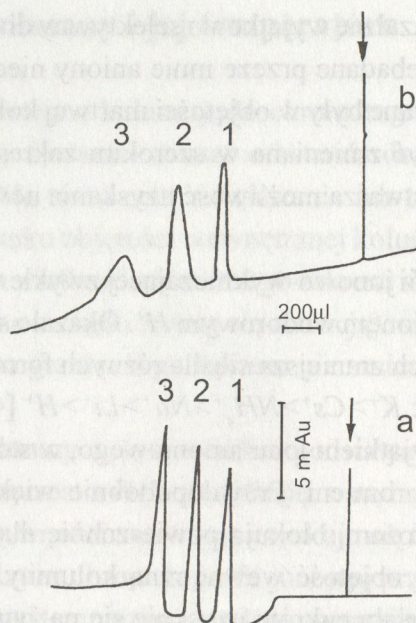
kwasów jest proporcjonalna do ich wymiarów cząsteczkowych. Sugeruje to udział hydrofobowej adsorpcji w retencji. W Tabeli V-5 przedstawiono objętości retencji badanych kwasów oraz fizykochemicznych parametrów zależnych od cząsteczkowego pola powierzchni (promienie jonowe, rozpuszczalności w wodzie ich soli potasowych i ciepła tworzenia [97]). Zauważyć tu można silną korelację między tymi wielkościami potwierdzającymi powyższą sugestię. Podobne korelacje zostały zaobserwowane przez Tanakę i wsp. [14] dla chlorku, azotanu i siarczynu, rozdzielonych na kolumnie wypełnionej słabym kationitem.

Tabela V-5

Objętości retencji, V_R , rozpuszczalności w wodzie, w 20 °C, soli potasowych, S , ciepła ich tworzenia, Q , oraz promienie jonowe (w przypadku tiocyjanku - suma promieni składowych), R_i , anionów niektórych halogenków. Kolumna: Dionex HPIC-CS5 (250 x 4 mm śr. wew.), faza ruchoma - 0,5 mM H_2SO_4 .

Anion	V_R [ml]	S [g/100ml]	R_i [Å]	Q [kcal]
Cl ⁻	2,6	34,7	1,81	104,3
Br ⁻	3,0	65,2	1,95	94,027
I ⁻	9,3	144	2,16	78,758
SCN ⁻	14,5	217	2,52	54,24

Z równania (3.31) wynika, że retencję można również zwiększyć poprzez zmniejszenie stałej dysocjacji grup funkcyjnych złoże. Jako tego typu złoże można użyć po prostu silikażel [15, 16]. Charakteryzuje się on słabymi własnościami kationo-wymiennymi [98 - 101]. Jego wolne grupy kwasowe wpływają na retencję nawet w układzie chromatografii faz odwróconych [102]. Wartość jego pK_a wynosi 7,1 (w wodzie prowadzi to do $pH \approx 5$), a punkt izoelektryczny ok. 2 [100, 103]. Przykładowe chromatogramy alifatycznych kwasów tłuszczowych otrzymane na kolumnie silikażelowej przedstawione zostały na Rys. 5.15 [16].



Rys. 5.15. Rozdział alifatycznych kwasów tłuszczowych na silikażelu [16]. Oznaczone kwasy: 1 - mrówkowy, 2 - propionowy i 3 - walerianowy, stężenie próbki - 1 mM, objętościowa szybkość przepływu - 0,5 ml/min., kolumna: LiChrosorb Si 100, 5 μ m, 150 x 4 mm śr. wew., detektor - UV-210 nm, faza ruchoma: (a) - woda, (b) - 0,1 mM H_2SO_4 .

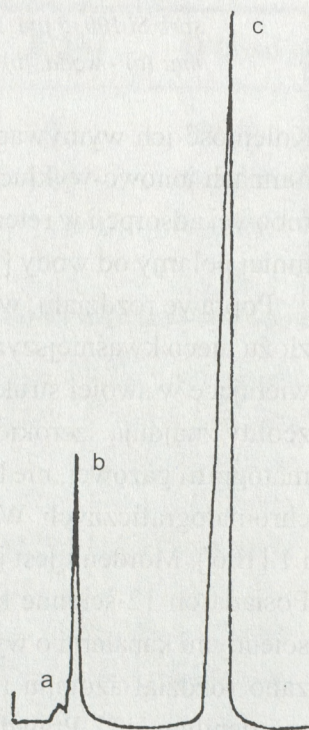
Kolejność ich wymywania jest analogiczna jak na komercyjnych kolumnach jonowo-wykluczających. Sugeruje to ponownie udział hydrofobowej adsorpcji w retencji. Spowodowane jest to tym, że silikażel jest mniej polarny od wody [104].

Poprawę rozdzielania, w stosunku do silikażelu, można by uzyskać na złożu nieco kwaśniejszym. Założyłem, że możliwości takie oferują, zawierające w swojej strukturze glin, zeolity [105]. Chociaż syntetyczne zeolity znajdują szerokie zastosowanie jako sита cząsteczkowe w chromatografii gazowej, nie były one dotąd stosowane w innych technikach chromatograficznych. Wyjątkiem jest tu rozdzielanie cukrów na zeolitach X i Y [106]. Mordenit jest jednym z lepiej poznanych kwaśnych zeolitów. Posiada on 12-ścienne kanały o wymiarach 6,7 x 7,0 Å połączone 8-ściennymi kanałami o wymiarach 2,9 x 5,7 Å [107]. Na Rys. 5.16 pokazano rozdzielanie azotanu i azotynu uzyskane na kolumnie wypełnionej mordenitem [17]. Prawdopodobnie ze względu na wymiary swoich ka-

nałów mordenit okazał się wyjątkowo selektywny dla tych właśnie anionów. Pozostałe przebadane przeze mnie aniony nieorganiczne i kwasy organiczne wymywane były w objętości martwej kolumny. Kwasowość mordenitu może być zmieniana w szerokim zakresie poprzez zmianę stosunku Si/Al , co stwarza możliwość uzyskania nowych selektywnych wypełnień.

W chromatografii jonowo-wykluczającej zwykle wykorzystywane są kationity z przeciwjonem wodorowym H^+ . Okazało się, że retencja kwasów karboksylowych zmniejsza się dla różnych form jonowych wymieniając w porządku: $K^+ > Cs^+ > NH_4^+ > Na^+ > Li^+ > H^+$ [48]. Jest to odwrotna sekwencja, z wyjątkiem jonu amoniowego, w stosunku do promieni ich uwodnionych promieni. Prawdopodobnie większe kationy silniej oddziałują ze złożem, blokują powierzchnię dla hydrofobowej adsorpcji i zmieniają objętość wewnętrzną kolumny. Wyjątkowo dobrą selektywność rozdziału cukrów uzyskuje się na żywicy w formie wapniowej Ca^{2+} [51, 70]. Przypuszczalnie związane jest to z oddziaływaniem jonów wapnia z niewiązącymi orbitalami tlenu w cukrach.

Rys. 5.16. Rozdział 1 mM roztworu 1 - NO_3^- i 2 - NO_2^- na 70 mm kolumnie wypełnionej mordenitem [17]. Szybkość przepływu - 0,5 ml/min., faza ruchoma - 1 mM H_2SO_4 , detektor - UV-200 nm. Kolejność elucji: (a) - zanieczyszczenia, 2,13 min., (b) - NO_3^- , 2,66 min. i (c) - NO_2^- , 11,37 min.



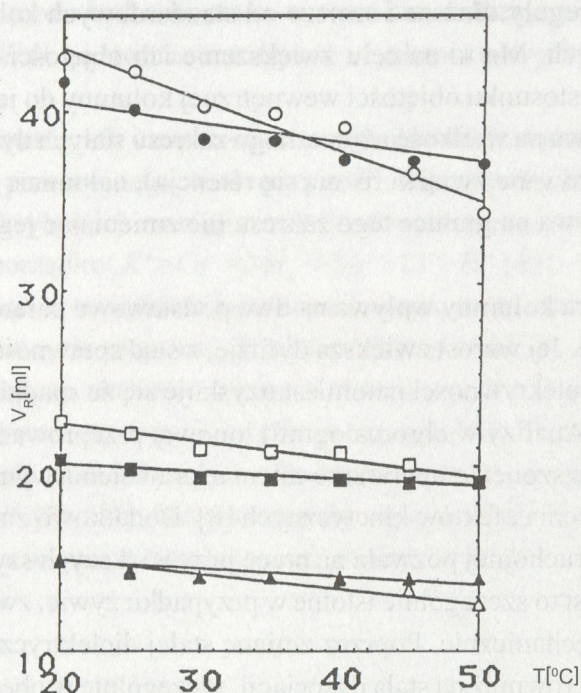
5.4. Budowa kolumny i jej temperatura

Komercyjnie dostępne kolumny do chromatografii jonowo-wykluczającej są z reguły dłuższe i szersze od standardowych kolumn chromatograficznych. Ma to na celu zwiększenie ich objętości wewnętrznych. Zmiana stosunku objętości wewnętrznej kolumny do jej objętości martwej wpływa na wielkość użytecznego zakresu stałych dysocjacji (w których analizowane związki różnią się retencją), natomiast sprawność kolumny wpływa na granice tego zakresu nie zmieniając jego szerokości [33].

Temperatura kolumny wpływa na dwa podstawowe parametry chromatograficzne. Jej wzrost zwiększa dyfuzję, a stąd sprawność kolumny. Zwiększenie selektywności natomiast uzyskuje się ze spadkiem temperatury [108]. Analizy w chromatografii jonowej przeprowadza się czasami w podwyższonej temperaturze celem usprawnienia wymiany jonowej i zmniejszenia efektów kinetycznych [8]. Dodatkowo zmniejszenie lepkości fazy ruchomej pozwala na pracę przy większych szybkościach przepływu. Jest to szczególnie istotne w przypadku żywic, zwykle mniej odpornych mechanicznie. Poprzez zmianę stałej dielektrycznej temperatura wpływa również na stałą dysocjacji, szczególnie w obecności rozpuszczalnika organicznego [109]. Największy wpływ zmiany temperatury wywierają jednak na hydrofobową adsorpcję.

Przeprowadzone przeze mnie badania nad wpływem temperatury na retencję w chromatografii jonowo-wykluczającej miały na celu porównanie jej wpływu na hydrofobową adsorpcję i inkluzję z β -cyklodekstryną [38]. Okazało się, że wzrost temperatury zmniejszał retencję analizowanych związków (Rys. 5.17). Z jednej strony spowodowane jest to zmniejszaniem się stałej adsorpcji [110 - 113], co prowadzi do zmniejszenia retencji. Z drugiej zaś ze zmniejszeniem również stałej inkluzji [114, 115], co zgodnie z równaniami (5.2 i 5.3) prowadzi jednak do wzrostu retencji. Ponieważ oba efekty działają przeciwnie obserwowany doświadczalnie spadek retencji oznacza, że dominującym jest wpływ temperatury na adsorpcję. Tłumaczy to też mniejsze nachylenia przedstawionych na Rys. 5.17 zależności objętości retencji od temperatury uzyskanych dla faz ruchomych nie zawierających cyklodekstryny niż

dla zawierających ją. Zmniejszenie inkluzji ze wzrostem temperatury prowadzi też do mniejszej zależności retencji od stężenia cyklodekstryny w fazie ruchomej obserwowane w wyższych temperaturach (Rys. 5.12).



Rys. 5.17. Zależność objętości retencji od temperatury kolumny [38]. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 5.12. Badane związki: (▲, △) - fenol, (■, □) - kwas nikotynowy i (●, ○) - 2,5-dimetylofenol. Otwarte symbole oznaczają fazę ruchomą bez cyklodekstryny, zamknięte z jej 6 mM stężeniem.

Zależność termodynamicznej stałej równowagi, K , od temperatury opisuje równanie:

$$(5.14) \quad \ln K = -\Delta G^0/RT = -\Delta H^0/RT + \Delta S^0/T,$$

gdzie ΔG^0 - standardowy potencjał termodynamiczny, ΔH^0 - zmiana standardowej entalpii i ΔS^0 - zmiana standardowej entropii.

Korzystając z modelu opisanego w rozdziale 5.2.4 (Rys. 5.10, równanie 5.2) wyznaczyć można obie stałe równowagi, adsorpcji i inkluzji (dokładny opis znaleźć można w pracy [38]). Z liniowej zależności $\ln K$ (gdzie K oznacza stałą adsorpcji lub inkluzji) od $1/(RT)$ można wyznaczyć wartości ΔH^0 i ΔS^0 dla obu procesów (Tabela V-6).

Tabela V-6

Wyznaczone wartości ΔH^0 i ΔS^0 badanych związków. Warunki: kolumna - BioRad Aminex HPX-87H, faza ruchoma - CD i 1 mM H_2SO_4 w MeOH + H_2O (30+70)% obj./obj. Zmiany entalpii i entropii wyrażone są odpowiednio w kJ/mol i J/mol K. Indeksy h i c oznaczają odpowiednio adsorpcję i inkluzję.

Próbka	ΔH^0_h	ΔS^0_h	R^2	ΔH^0_c	ΔS^0_c	R^2
fenol	-36,1	-11,6	0,992	-9,9	2,0	0,967
kwask nikotynowy	-15,6	-2,5	0,991	-9,9	1,1	0,997
dimetylofenol	-10,7	-0,1	0,991	-9,2	0,3	0,992

Z Tabeli V-6 wynika, że dla adsorpcji otrzymano ujemne wartości zarówno dla zmian entalpii jak i entropii. Im bardziej ujemne są zmiany entalpii tym efektywniejsze jest przenoszenie masy do warstwy adsorpcyjnej [115]. Zgodnie z oczekiwaniami otrzymano również ujemne wartości zmian entropii. Wyjaśnić je można utratą stopni swobody ruchu zaadsorbowanych cząsteczek.

Również dla inkluzji otrzymano ujemne zmiany entalpii. Warto tu zauważyć, że są one znacznie mniejsze niż w przypadku adsorpcji. Oznacza to, że badane związki silniej oddziałują z żywicą niż z cyklodekstryną. Nieco zaskakujące okazały się dodatnie zmiany entropii kompleksowania. Podobne wyniki uzyskał Mohseni i Hurtubise dla chromatografii w układzie faz odwróconych [115]. Oznaczają one silniejsze oddziaływanie badanych związków z fazą ruchomą, niż z cyklodekstryną. Dodatkowo zaobserwować tu można, że zmiany entropii zmniejszały się ze wzrostem podstawników co prawdopodobnie spowodowane jest utrudnieniami rotacji wewnątrz cząsteczki gospodarza.

Wzrost temperatury prowadzi do zmniejszenia lepkości fazy ruchomej, co przyspiesza procesy dyfuzji i przemieszczania się substancji. Zmniejszenie lepkości prowadzi również do zmniejszenia czasu trwania analizy. Wzrost temperatury prowadzi również do zmniejszenia lepkości fazy stałej, co przyspiesza procesy dyfuzji i przemieszczania się substancji. Zmniejszenie lepkości prowadzi również do zmniejszenia czasu trwania analizy.

Substancja	k'	ΔH_c (kJ/mol)	k'	ΔH_c (kJ/mol)
fenol	0.987	-0.9	0.992	-11.0
kwasa mlekowego	0.997	-0.5	0.991	-2.5
dimetylofenol	0.992	-0.3	0.991	-0.1

Wzrost temperatury prowadzi do zmniejszenia lepkości fazy ruchomej, co przyspiesza procesy dyfuzji i przemieszczania się substancji. Zmniejszenie lepkości prowadzi również do zmniejszenia czasu trwania analizy. Wzrost temperatury prowadzi również do zmniejszenia lepkości fazy stałej, co przyspiesza procesy dyfuzji i przemieszczania się substancji. Zmniejszenie lepkości prowadzi również do zmniejszenia czasu trwania analizy.

Wzrost temperatury prowadzi do zmniejszenia lepkości fazy ruchomej, co przyspiesza procesy dyfuzji i przemieszczania się substancji. Zmniejszenie lepkości prowadzi również do zmniejszenia czasu trwania analizy. Wzrost temperatury prowadzi również do zmniejszenia lepkości fazy stałej, co przyspiesza procesy dyfuzji i przemieszczania się substancji. Zmniejszenie lepkości prowadzi również do zmniejszenia czasu trwania analizy.

6. ZASTOSOWANIA

Chromatografię jonowo-wykluczającą opisuje się jako znajdującą zastosowanie głównie w analizie kwasów słabych i o pośredniej mocy oraz cukrów [8]. Ostatnio wykazano również możliwość efektywnego rozdziału tą techniką mocnych kwasów (anionów) [11, 12, 14, 17], zasad (głównie amin) [32, 78, 153, 154], aminokwasów [155], białek [47], alkoholi [51, 156] oraz aldehydów [157]. Związki te oznaczane były w różnych próbkach: wodzie morskiej, wodzie mineralnej, płynach biologicznych, żywności, winie, detergentach, ściekach *etc.* (patrz Tabela VI-1).

Niewątpliwie w dalszym ciągu największe zastosowania technika ta znajduje w analizie kwasów karboksylowych. Zwykle do detekcji wykorzystuje się wówczas detektory fotometryczne w zakresie długości fal 250-280 nm dla kwasów aromatycznych i 200-220 nm dla kwasów alifatycznych. Na Rys. 6.1 pokazano przykład analizy kwasu benzoowego w musztardzie [31]. Zaobserwować na nim można dobry jego rozdział od związków nieorganicznych. Z kolei niezdysonowane związki organiczne nie były wykrywane przez zastosowany detektor elektrokinetyczny. Na Rys. 6.2 natomiast zobrazowano rozdział kwasów w białym winie australijskim [35]. Na uwagę zasługuje fakt, że przygotowanie obu próbek polegało jedynie na odfiltrowaniu z nich części stałych. Olbrzymią zaletą tej techniki jest bowiem możliwość analizy skomplikowanych układów bez potrzeby wcześniejszego ich przygotowania. Stąd znajduje ona zastosowanie w analizie kwasów karboksylowych np. w próbkach biologicznych (Tabela VI-1).

Drugą często analizowaną, metodą chromatografii jonowo-wymiennej, klasą związków są słabe kwasy nieorganiczne i ich sole (Tabela VI-1). Dostyc interesującą metodę opracowano w analizie boranów [86, 87]. Polialkohole dodane do fazy ruchomej tworzą z nimi kompleksy usprawniające rozdział i detekcję konduktometryczną.

Tabela VI-1

Przykłady praktycznego zastosowania chromatografii jonowo-wykluczającej

Próbka	Związek(i)a	Kolumna	Eluent^b	Detektor^c	Lit.
Musztarda	kwasy benzoesowy	LiChrosorb KAT	woda	EK	31
Wino	kwasy alifatyczne	Aminex HPX-87H	1 mM CSA	UV, P(Cu)	35
Woda deszczowa	kwasy karboksylowe	Dionex HPICE-AS2	2 mM HCl	C	116
Lód arktyczny	kwasy karboksylowe	Aminex HPX-87H	5 mM MSA	UV-200	117
Mocz	kwasy karboksylowe	Aminex HPX-87H	25 mM H ₂ SO ₄	UV-200	118
Krew	kwasy karboksylowe	Dionex HPICE-AS1	10 mM HCl	C	119
Mleko	kwasy tłuszczowe	Aminex HPX-87H	10 mM H ₂ SO ₄	UV-210	70
Woda mineralna	As(V), As(III)	Aminex HPX-87H	10 mM H ₃ PO ₄	A	72
Woda morska	DMSO	Aminex HPX-87H	5 mM H ₃ PO ₄	UV	120
Detergenty	fosforany	Hitachi 2613	dioksan-woda	K	57
Rozp. organiczne	woda	Aminex 50W-X4	MeOH, H ₂ O, HCl	C	121
Woda morska	aniony nieorganiczne	Dionex B-1	2,4 mM CO ₃ ²⁻	C	25
Powietrze	kwasy tłuszczowe	Wescan ion exclusion	0,25 mM H ₂ SO ₄	C	122
Ścieki	octany, węglany	YEW SCX-252	2 mM H ₂ SO ₄	C	123
Lateks	kwasy alifatyczne	Dionex AS-1	1 mM HCl	C	124
Kaprolaktam	kw. octowy, propionowy	Dionex ion exclusion	0,1 mM HCl	C	125
Poliuretany	kwasy alifatyczne	Dionex ion exclusion	0,1 mM HCl	C	126
Żywność mrożona	siarczyny	Wescan ion exclusion	5 mM H ₂ SO ₄	A (Pt)	127
Piwo, sake	kwasy alifatyczne	TSK SCX	1 mM H ₂ SO ₄	C	51
Piwo	glicerol, etanol	Dionex AS-1	0,1 mM HClO ₄	A(pulsac.)	128
Szynka	azotyiny	Polypore H	20 mM H ₂ SO ₄	A(Pt)	26
Mleko	laktatoza, glukoza	TSK-gel SCX	0,1 mM H ₃ BO ₃	C, UV-200	129
Mleko	jodki	Dionex AS-1	0,01 mM NaNO ₃	A(Ag)	130
Kawa	fosforany, kw. tłuszczowe	Dionex ICE	10 mM HCl	C	131
Ziemiaki, papryka	siarczyny	Wescan 269-051	5 mM H ₂ SO ₄	A	132

Syrop klonowy	kwasy alifatyczne	Dionex ion exclusion	0,05 mM HCl	C	133
Osocze krwi	kw. org. i nieorg., sole	Dionex ICE	bufory wodne	C	134
Wątroba, płuca	estry	Dionex AS-1	1 mM HCl	C	135
Sok trzuskowy	kwasy karboksylowe	Dionex AS-1	woda	C	136
Leki	kwasy, alkohole, cukry	Dionex AS-1	25 mM H ₂ SO ₄	RI	137
Pasta do zębów	fluorki	Wescan ion exclusion	3 mM H ₂ SO ₄	C	138
Paracetamol	octany	Dionex ion exclusion	0,1 mM HCl	C	139
Kapiel galwaniczna	kw. cytrynowy, mlekowy	Wykonanie własne	1 mM HCl	C	140
Pomidory	kwasy tłuszczowe	AS ₅	FBA, pH 2,8	C	141
Cukier techniczny	kwasy tłuszczowe	HPICE-AS1	roztwory kwasów	C	142
Kosmetyki	alkanoloaminy	PS/DVB (OH ⁻)	2% gliceryna	UV 200	143
Sądownicze	kwasy karboksylowe	Waters Ion Exclusion	1 mM OSA	C	46
Woda kranowa	krzemiany	ion exclusion	rozcieżcz. HClO ₄	CL	144
Ścieki	kwasy alifatyczne	IonPac - AS ₅	0,9 mM PFBA	C tlum.	145
Osocze/mocz	TCEOH	Aminex A-5 (K ⁺)	10mM K ₂ SO ₄ /KOH	RI	146
Fanta	kwasy karboksylowe	Aminex HPX-87H	1 mM CSA	UV-210	68
Ziemia	borany	Wescan ion exclusion	0,3 M D-sorbitol	C	86
Powietrze	dwutlenek azotu	Wescan HS	5 mM H ₂ SO ₄	A (Pt)	147
Mocz	kwasy karboksylowe	Interaction ORH-801	10 mM H ₂ SO ₄	UV-254	148
Krew, osocze	fluorki	Wescan anion excl.	2 mM H ₂ SO ₄	C	138
Osocze	kw. walpurowy	Dionex ICE	0,5 mM H ₂ CO ₃	C	149
Mocz	kw. moczowy, szczawiowy	Wydac SCX	bufor pH 2.8	A	150
Tkanka mózgowa	kw. N-acetyloasparaginowy	Interaction ION 300	0,5 mM H ₂ SO ₄	UV-215	151
Komórki nowotwor.	mleczany	IonPac ICE AS1	0,5 OSA.	C	152

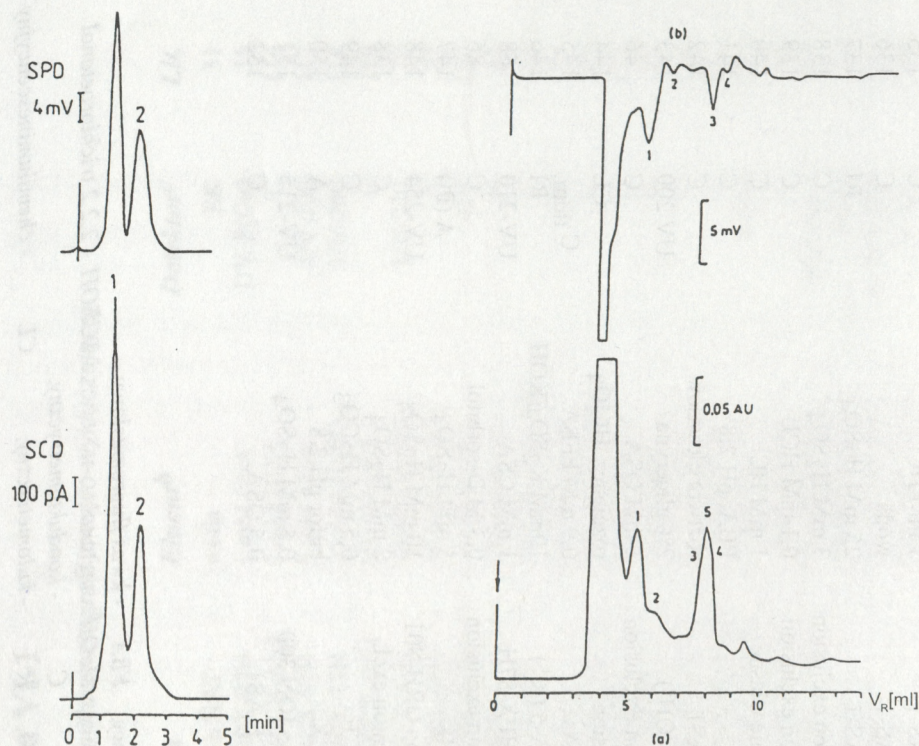
a DMSO - dimetylosulfotlenek

b CSA - kwas kamfosulfonowy, MSA - kwas metanosulfonowy, FBA - kwas fluoromasłowy,

OSA - kwas oktanosulfonowy, PFBA - kwas perfluoromasłowy, MeOH - metanol, TCEOH - 2,2,2 trichloroetanol

c EK - elektrokinetyczny, P - potencjometryczny, C - konduktometryczny,

A - amperometryczny, RI - pom. wsp. zał. światła, K - kulometryczny, CL - chemiluminescencyjny



Rys. 6.1. Rozdział kwasu benzoowego (2) od związków jonowych (1) obecnych w musztardzie [31]. Kolumna: LiChrosorb KAT, faza ruchoma - woda, detekcja elektrokinetyczna z zastosowaniem detektorów pomiaru prądu (SCD) i potencjału (SPD) przepływu.

Rys. 6.2. Chromatogram białego wina australijskiego [35]. Kolumna: BioRad HPX-87H, faza ruchoma - 1 mM CSA, detekcja: (a) - fotometryczna UV-210 nm i (b) - potencjometryczna na elektrodzie Cu, zidentyfikowane kwasy: 1 - winowy, 2 - maleinowy, 3 - mlekowy, 4 - bursztynowy, 5 - nieznan.

W chromatografii jonowo-wykluczającej do oznaczania alkoholi często stosuje się wodne roztwory mocnych kwasów jako fazę ruchomą. Stevens i wsp. [121] odwrócili tę sytuację i zastosowali alkoholową fazę ruchomą do analizy wody. Dodanie do niej kwasu siarkowego pozwoliło na pośrednią detekcję konduktometryczną. Detekcję tej metody usprawniono następnie dodając do metanolowej fazy ruchomej aldehydu cynamonowego [158]. Obecność wody cofała reakcję aldehydu z metanolem, a jej katalizatorem było złoże chromatograficzne.

7. DETEKCJA

Generalnie, w chromatografii jonowo-wykluczającej mogą być stosowane wszystkie typy detektorów używanych w wysokosprawnej chromatografii ciekowej i chromatografii jonowej (Tabela VI-1). Specyficzną cechą IEC jest to, że fazy ruchome są w niej rozcieńczonymi roztworami mocnych kwasów i zasad, a często nawet jest to po prostu czysta woda. Są to korzystne warunki dla detektorów: konduktometrycznego, potencjometrycznego i elektrokinetycznego.

W chromatografii jonowo-wykluczającej, podobnie jak w całej chromatografii jonowej, najczęściej używanym pozostaje w dalszym ciągu detektor konduktometryczny. Jest on komercyjnie dostępny, łatwy w obsłudze i daje stabilną linię odniesienia. Chociaż pierwszy tego typu detektor opisano na początku lat pięćdziesiątych [159] dopiero jednak rozwój chromatografii jonowej upowszechnił tę technikę. Wykrywalność detekcji konduktometrycznej można poprawić zmniejszając przewodnictwo fazy ruchomej. Można to osiągnąć poprzez użycie kolumn tłumiących [145]. Jest to jednakże rzadko stosowana metoda w chromatografii jonowo-wykluczającej.

Zwykle, jak to zostało opisane w rozdziale 5.2.1, w celu polepszenia rozdziału stosuje się rozcieńczone roztwory mocnych kwasów i zasad jako fazy ruchome. Czasami są nimi po prostu czyste rozpuszczalniki [31]. Okazało się, że bardzo dobre warunki dla omawianej detekcji zapewniają również bardzo rozcieńczone roztwory związków parujących, bez buforów (rozdział 5.2.3). Ze względu na to, że są to związki o stosunkowo dużych wymiarach, ich roztwory charakteryzują się mniejszym przewodnictwem niż roztwory kwasów i zasad nieorganicznych. Niskie przewodnictwo fazy ruchomej można również uzyskać stosując roztwory polialkoholi i cukrów (rozdział 5.2.2). Poprawę wykrywalności kwa-

sów karboksylowych, na omawianym detektorze, można uzyskać poprzez ich konwersję do znacznie bardziej zjonizowanych soli [23] lub zasad [160].

Zwykle w konduktometrii pomiary są wykonywane przy zastosowaniu szybkozmiennego pola elektrycznego. Ma to zabezpieczyć elektrody przed depolaryzacją i wydzielaniem się na nich produktów reakcji. Prosty w konstrukcji konduktometryczny detektor stałoprądowy [31, 79, 80] charakteryzował się porównywalnym progiem detekcji z komercyjnie dostępnymi, znacznie droższymi detektorami zmiennoprądowymi. Otrzymano na nim liniową zależność prądu od przyłożonego potencjału aż do wartości 50 V. Konstrukcja celi detektora (kapilara szklana) zapewniała bardzo dużą liniową szybkość przepływu fazy ruchomej. Prawdopodobnie powodowało to szybkie wymywanie ewentualnych produktów reakcji.

Pierwszy detektor potencjometryczny skonstruowany został przez Kamińskiego pod koniec lat czterdziestych [161]. Przez długi czas technika ta nie była rozwijana. Do tej pory detektory te nie są dostępne komercyjnie. W przepływowej analizie wstrzykowej (FIA) stosowana jest dosyć powszechnie detekcja potencjometryczna oparta na elektrodach jonoselektywnych. Zbyt duża ich selektywność czyni je jednak mało przydatnymi w chromatografii. Bardzo uniwersalny okazał się prosty detektor oparty na elektrodzie wykonanej po prostu z oczyszczonego kawałka drutu z miedzi. [35, 64]. Potencjał jego zmieniały wszystkie związki utleniające lub redukujące układ Cu^{2+}/Cu lub, choćby w niewielkim stopniu, kompleksujące jony miedzi.

Możliwość przesuwania elektrod w strumień przepływającej fazy ruchomej i poza niego stworzyła możliwość łatwej zamiany funkcji elektrod (z elektrody odniesienia na pracującą i na odwrót) [162]. Wyprowadzone przez autora równanie [35] pozwoliło powiązać wysokość piku, ΔE , ze stężeniem analizowanej próbki, c_{max} :

$$(7.1) \quad \Delta E = -29 \lg \left(1 + \frac{K_L c_{max}}{1 + K_B c_b} \right),$$

gdzie K_L i K_B - stałe kompleksowania jonów miedzi odpowiednio przez próbkę i składnik buforu.

Dokładne wyprowadzenie równania (7.1) znaleźć można w pracy [35]. Wynika z niego, że wykrywalność detektora można poprawić stosując jako bufor związki słabo kompleksujące miedź w możliwie małym stężeniu. Takie dogodne warunki dla tej detekcji stwarza właśnie chromatografia jonowo-wykluczająca. Ostatnio, z powodzeniem, zastosowane zostały w tej technice elektrody wykonane z tlenku wolframu [163] i kobaltu [164].

Innym detektorem dla którego występują korzystne warunki w chromatografii jonowo-wykluczającej jest detektor elektrokinezy [31, 79, 80, 165, 166]. Pozwala on na pomiar prądu lub potencjału przepływu. W dogodnych warunkach jego wykrywalność porównywalna jest z detektorem konduktometrycznym [31].

W rozdziale 6 wspomniano, że jednym z zastosowań chromatografii jonowo-wykluczającej jest analiza cukrów. W połączeniu z detekcją amperometryczną na elektrodzie złotej jest to w chwili obecnej najlepsza metoda ich analizy [8].

Wzrost wartości współczynnika przesunięcia R_F z $0,15$ do $0,25$ przy zmianie pH z $4,5$ na $5,5$ jest spowodowany zmianą stopnia jonizacji substancji badanej. Wzrost wartości współczynnika przesunięcia R_F z $0,15$ do $0,25$ przy zmianie pH z $4,5$ na $5,5$ jest spowodowany zmianą stopnia jonizacji substancji badanej. Wzrost wartości współczynnika przesunięcia R_F z $0,15$ do $0,25$ przy zmianie pH z $4,5$ na $5,5$ jest spowodowany zmianą stopnia jonizacji substancji badanej.

Wzrost wartości współczynnika przesunięcia R_F z $0,15$ do $0,25$ przy zmianie pH z $4,5$ na $5,5$ jest spowodowany zmianą stopnia jonizacji substancji badanej. Wzrost wartości współczynnika przesunięcia R_F z $0,15$ do $0,25$ przy zmianie pH z $4,5$ na $5,5$ jest spowodowany zmianą stopnia jonizacji substancji badanej.

Możliwość przesunięcia substancji badanej w kierunku większych wartości współczynnika przesunięcia R_F jest spowodowana zmianą stopnia jonizacji substancji badanej. Wzrost wartości współczynnika przesunięcia R_F z $0,15$ do $0,25$ przy zmianie pH z $4,5$ na $5,5$ jest spowodowany zmianą stopnia jonizacji substancji badanej.

$$(7)$$

8. SKOROWIDZ SYMBOLI

- a_i - aktywność i -tego składnika,
 A - pole powierzchni cząsteczki,
 A_S - pole powierzchni cząsteczki
rozpuszczalnika,
 c_b - stężenie buforu,
 c_{bm} - sumaryczne stężenie obu postaci buforu
na poszczególnych półkach fazy
ruchomej,
 c_{bs} - sumaryczne stężenie obu postaci buforu
na poszczególnych półkach fazy
stacjonarnej,
 c_{bs}^o - początkowe stężenie buforu w fazie
stacjonarnej,
 c_D - stężenie cyklodekstryny,
 c_f - stężenie grup funkcyjnych złoża,
 c_i - stężenie wstrzykiwanej próbki,
 c_m - sumaryczne stężenia obu postaci próbki
na poszczególnych półkach fazy
ruchomej,
 c_{max} - stężenie w maksimum piku,

- c_s - sumaryczne stężenia obu postaci próbki na poszczególnych półkach fazy stacjonarnej,
 F - stała Faraday'a,
 i - krok czasowy,
 j - kolejny numer półki,
 k' - współczynnik pojemności,
 k_d - współczynnik podziału na danej półce,
 k_s^e - stała charakteryzująca rozpuszczalnik,
 K - stała równowagi,
 K_a - stała dysocjacji kwasowej,
 K_b - stała dysocjacji buforu,
 K_B - stała kompleksowania miedzi przez bufor,
 K_L - stała kompleksowania miedzi przez próbkę,
 K_d - współczynnik podziału,
 K_f - stała dysocjacji grup funkcyjnych złoża,
 K_H - stała adsorpcji Henry'ego,
 K_p - współczynnik podziału niezdisocjowanej postaci kwasu,
 K_2 - druga stała dysocjacji,
 K_3 - stała inkluzji,
 m - masa próbki na danej półce,
 m_b - masę buforu na danej półce,
 M - indeks oznaczający fazę ruchomą,
 M_i - masa cząsteczkowa,

- N - sprawność kolumny (ilość półek),
 N_a - liczba Avogadry,
 p - prawdopodobieństwo przebywania cząsteczki próbki w fazie ruchomej,
 pK_a - logarytm ze stałej dysocjacji kwasowej,
 pK_b - logarytm ze stałej dysocjacji zasadowej,
 P_N^r - prawdopodobieństwo, że cząsteczka po r krokach znajduje się w N celce,
 q - prawdopodobieństwo przebywania cząsteczki próbki w fazie stacjonarnej,
 Q - ciepło tworzenia,
 r - liczba kroków w metodzie Craiga,
 r_i - ilość substancji tworzącej się lub powstającej w jednostce czasu,
 R - uniwersalna stała gazowa,
 R_i - promień jonowy,
 s - indeks oznaczający fazę stacjonarną,
 S - rozpuszczalność w wodzie, w 20 °C,
 T - temperatura,
 u - liniowa szybkość przepływu,
 z_i - wartościowość,
 v_A - objętość warstwy adsorpcyjnej na jednej półce,
 v_M - objętości fazy ruchomej na jednej półce,
 v_S - objętości fazy stacjonarnej na jednej półce,
 v_i - objętość próbki,

V_A	-	objętość szkieletu żywicy złoża,
V_M	-	objętość martwa kolumny,
V_P	-	objętość pików,
V_R	-	objętość retencji,
V_S	-	objętość wewnętrzna kolumny,
α	-	stała eksperymentalna,
β	-	stała eksperymentalna,
ΔE	-	wysokość pików w detektorze potencjometrycznym,
ΔG	-	potencjał termodynamiczny,
ΔG^0	-	standardowy potencjał termodynamiczny,
ΔH^0	-	zmiana standardowej entalpii,
ΔS^0	-	zmiana standardowej entropii,
$\gamma_{F^-}^s$	-	współczynnik aktywności zdysocjowanych grup funkcyjnych złoża w fazie stacjonarnej,
$\gamma_{H^+}^s$	-	współczynnik aktywności jonów wodorowych w fazie stacjonarnej,
ν	-	współczynnik stechiometryczny,
$\bar{\mu}_i$	-	potencjał elektrochemiczny,
μ_i^0	-	standardowy potencjał chemiczny,
φ	-	potencjał wewnętrzny.
ρ_i	-	gęstość,
σ	-	napięcie powierzchniowe.

9. SKOROWIDZ SKRÓTÓW

- A* - detektor amperometryczny,
ACN - acetonitryl,
B⁻ - zdysocjowana postać kwasu
użytego jako bufor,
CD - β -cyklodekstryna,
CL - detektor chemiluminescencyjny,
CSA - kwas kamfosulfonowy,
DMSO - dwumetylosulfotlenek,
EK - detektor elektrokinetyczny,
EtOH - etanol,
F⁻ - zdysocjowana postać kwasowych
grup funkcyjnych złoza,
FBA - kwas fluoromasłowy,
HB - niezdisocjowa postać kwasu
użytego jako bufor,
HF - niezdisocjowana postać kwasowych
grup funkcyjnych złoza,
HPLC - wysokosprawna chromatografia
cieczowa,
HR - niezdisocjowana postać
analizowanego kwasu,
IC - chromatografia jonowa,
IEC - chromatografia
jonowo-wykluczająca,

- MeOH* - metanol,
MSA - kwas metanosulfonowy,
OSA - kwas oktanosulfonowy,
P - detektor potencjometryczny,
PFBA - kwas perfluoromasłowy,
PTFE - policzterofluoroetylen,
R⁻ - zdysocjowana postać
analizowanego kwasu,
RI - detektor pomiaru współczynnika
załamania światła,
SCD - detektor pomiaru prądu przepływu,
SPD - detektor pomiaru potencjału przepływu,
TBABr - bromek tetrabutylamoniumowy,
TCEOH - 2,2,2-trichloroetanol.

10. LITERATURA

- 1 M.S. Tswett, *Warsaw Soc. Nat. Sci., Biol. Sect.*, **14**, No. 6 (1903).
- 2 M.S. Tswett, *Ber.deut. bot. Ges.*, **24**(1906)234, 316, 384.
- 3 A.J.P. Martin i R.L.M. Synge, *Biochem. J.*, **35**(1941)1358.
- 4 J.F.K. Huber i J. Hulsmann, *Anal. Chem. Acta.*, **38**(1967)305.
- 5 W.E. Cohn, *Science*, **109**(1949)377.
- 6 R.M. Wheaton i W.C. Bauman, *Ind. Eng. Chem.*, **45**(1953)228.
- 7 H. Small, T.S. Stevens i W.C. Bauman, *Anal. Chem.*, **47**(1975)1801.
- 8 P.R. Haddad i P.E. Jackson, *Ion Chromatography: Principles and Applications*, (*J. Chromatogr. Lib.*, 46), Elsevier Sci. Publ., Amsterdam 1990.
- 9 B.K. Głód, *Acta Chromatogr.*, **6**(1996)101.
- 10 B.K. Głód, *Chem. Anal.*, **39**(1994)399.
- 11 B.K. Głód, *Acta Chromatogr.*, **7**(1997)13.
- 12 B.K. Głód, *Neurochem. Research*, **22**(1997)1237.
- 13 W. Rieman, *Chromatography: Columnar Liquid-Solid Ion-Exchange Processes*, w *Treatise on Analytical Chemistry*, I.M. Kalthoff, P.J. Elving i E.B. Sandell, red., Interscience Publishers, New York 1968, str. 1521-92.
- 14 K. Tanaka, K. Ohta, J.S. Fritz, S. Matsushita i A. Miyanaga, *J. Chromatogr. A*, **671**(1994)239.
- 15 K. Ohta, K. Tanaka i P.R. Haddad, *J. Chromatogr. A*, **739**(1996)359.
- 16 B.K. Głód i G. Perez, w przygotowaniu.
- 17 B.K. Głód, G. Perez i A.A.G. Tomlinson, *J. Chromatogr. A*, **760**(1997)292.
- 18 K. Šlais, *J. Chromatogr.*, **469**(1989)223.
- 19 O. Shipigun i Y.A. Zolotow, *Ion Chromatography in Water Analysis*, Wiley, New York.

- 20 R.E. Smith, *Ion Chromatography Applications*, CRC Press, Boca Raton.
- 21 J. Weiss, *Handbook of Ion Chromatography*, E.L. Johnson, red., Dionex, Sunngvale.
- 22 P.E. Buell i J.E. Girard, *Ion Chromatography*, J.G. Tarter, red., Dekker, New York, str. 157-190.
- 23 W. Rich, F. Smith, L. McNeil i T. Sidebottom, w *Advances in Ion Chromatography*, vol. 2, P. Jandik i R.M. Cassidy, red., Ann Arbor 1990.
- 24 M. Gjerde i H. Mehra, w *Advances in Ion Chromatography*, vol. 1., P. Jandik i R.M. Cassidy, red., Century International, Medfield 1990.
- 25 W. Rich, F. Smith, L. McNeil i T. Sidebottom, w *Ion Chromatographic Analysis of Environmental Pollutants*, vol. II, E. Sawicki i J.D. Mulik, red., Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, MI, 1979, str. 17.
- 26 H.-J. Kim i Y.-K. Kim, w *Advances in Ion Chromatography*, vol I, P. Jandik i R.M. Cassidy, red., Century International Inc., Franklin, MA, 1989, str. 391.
- 27 D.P. Lee i A.D. Lord, *LC.GC*, **5**(1987)261
- 28 J.S. Fritz, *J. Chromatogr.*, **546**(1991)111.
- 29 G.L.Zhao i G.L. Wan, *Mater. Eng. (NY)*, **9**(1995)65.
- 30 K. Tanaka, T. Ishizuka i H. Sunahara, *J. Chromatogr.*, **174**(1979)153.
- 31 B.K. Głód i W. Kemula, *J. Chromatogr.*, **366**(1986)39.
- 32 P.R. Haddad, F. Hao i B.K. Głód, *J. Chromatogr. A*, **671**(1994)3.
- 33 B.K. Głód, A.K. Piasecki i J. Stafiej, *J. Chromatogr.*, **457**(1988)43.
- 34 B.K. Głód i J. Stafiej, *J. Chromatogr.*, **654**(1993)197.
- 35 B.K. Głód, P.R. Haddad i P.W. Alexander, *J. Chromatogr.*, **589**(1992)209.
- 36 B.K. Głód i W. Kemula, w *Postępy chromatografii i innych metod rozdzielania*, Wyd. UMCS, Lublin 1985, str. 117-124.
- 37 B.K. Głód, P.R. Haddad i P.W. Alexander, *Acta Chromatogr.*, **3**(1994)23.
- 38 B.K. Głód, P.W. Alexander, Z.L. Chen i P.R. Haddad, *Anal. Chim. Acta.*, **306**(1995)267.
- 39 B.K. Głód i G. Perez, *J. Liquid Chromatogr.*, **20**(1997)1005.
- 40 B.K. Głód w *Wprowadzenie do wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, B.K. Głód, red., Wyd. IChF-PAN, Warszawa 1992, str 41-50.
- 41 D. De Vault, *J. Am. Chem. Soc.*, **65**(1943)532.

- 42 R. Nowakowski w *Wprowadzenie do wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, B.K. Głód, red., Wyd. IChF-PAN, Warszawa 1992, str 7-14.
- 43 Y. Marcus i A.S. Kertes, *Ion Exchange and Solvent Extraction of Metal Complexes*, Wiley, London 1969.
- 44 S. Mafé, P. Ramírez, A. Tanioka i J. Pellicer, *J. Phys. Chem. B*, **101**(1997)1851.
- 45 B.K. Głód, wyniki niepublikowane.
- 46 L.A. Kaine, J.B. Crowe i K.A. Wolnik, *J. Chromatogr.*, **602**(1992)141.
- 47 D. Corradini, R. Filippetti i C. Corradini, *J. Liquid Chromatogr.*, **16**(1993)3393.
- 48 K. Kihara, S. Rokushika i H. Hatano H., *J. Chromatogr.*, **410**(1987)103.
- 49 G.L. Zhao i L.N. Liu, *Chromatographia*, **32**(1991)453.
- 50 E. Papp i P. Keresztes, *J. Chromatogr.*, **506**(1990)157.
- 51 K. Tanaka i J.S. Fritz, *J. Chromatogr.*, **409**(1987)271.
- 52 H.P. Bipp, K. Fisher, D. Bieniek i A. Kettrup, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **357**(1997)321.
- 53 E. Perez-Paya, L. Braco, C. Abad i A. Campos, *J. Chromatogr.*, **548**(1991)93.
- 54 K. Tanaka i J.S. Fritz, *J. Chromatogr.*, **361**(1986)151.
- 55 H. Waki, K. Tsuruta i Y. Tokunaga, *J. Liquid Chromatogr.*, **8**(1985)2105.
- 56 A.L. Medved, A.A. Ivanov i O.A. Shpigun, *J. Anal. Chem.*, **52**(1997)39.
- 57 K. Tanaka i T. Ishizuka, *J. Chromatogr.*, **190**(1980)7.
- 58 K. Tanaka, T. Ishizuka i H. Sunahara, *J. Chromatogr.*, **177**(1979)227.
- 59 C. Horvath, W. Melander i I. Molnar, *J. Chromatogr.*, **125**(1976)129.
- 60 O. Sinanoglu, *Advan. Chem. Phys.*, **12**(1967)283.
- 61 O. Sinanoglu, *Chem. Phys. Lett.*, **1**(1967)340.
- 62 S.V. Galushko, *J. Chromatogr.*, **552**(1991)91.
- 63 G.A. Harlow i D.H. Morman, *Anal. Chem.*, **36**(1964)2438.
- 64 B.K. Głód, P.W. Alexander, P.R. Haddad i Z.L. Chen, *J. Chromatogr.*, **699**(1995)31.
- 65 B.K. Głód, P.R. Haddad i P.W. Alexander, *J. Chromatogr.*, **595**(1992)149.
- 66 B.K. Głód i I. Resiak, dane nieopublikowane.
- 67 W. Maruszak, *praca magisterska*, Wyd. Chemii UW, 1995.

- 68 B.K. Głód, w przygotowaniu.
- 69 B.K. Głód, V Ogólnopolska Konferencja Chromatograficzna, Katowice-Szczyrk, 12-14.06.1996.
- 70 T. Jupille, M. Gray, B. Black i M. Gould, *Am. Lab.*, **13**(1981)80.
- 71 K. Fisher, H.P. Bipp, D. Bieniek i A. Kettrup, *J. Chromatogr.*, **706**(1995)361.
- 72 E.C.V. Butler, *J. Chromatogr.*, **450**(1988)353.
- 73 J. Morris i J.S. Fritz, *Anal. Chem.*, **66**(1994)2390.
- 74 F. Hao, B.K. Głód i P.R. Haddad, dane nieopublikowane.
- 75 H.J. Kim i Y.K. Kim, *Anal. Chem.*, **61**(1989)3245.
- 76 Z. El Rassi i Cs. Horvath, *J. Liquid Chromatogr.*, **9**(1986)3245.
- 77 K. Tanaka, K. Ohta, J.S. Fritz, Y.S. Lee i S.B. Shim, *J. Chromatogr.*, **706**(1995)385.
- 78 K. Tanaka, K. Ohta i J.S. Fritz, *J. Chromatogr.*, **739**(1996)317.
- 79 B.K. Głód i W. Kemula, *Nauch. apparat.*, **1**(1986)101.
- 80 B.K. Głód i W. Kemula, *J. Electroanal. Chem.*, **226**(1987)227.
- 81 W. Kemula, B.K. Głód i W. Kutner, *J. Liquid Chromatogr.*, **6**(1983)1823.
- 82 W. Kemula, B.K. Głód i W. Kutner, *J. Liquid Chromatogr.*, **6**(1983)1837.
- 83 A. Tilly-Melin, Y. Askemark, K.G. Wahlund i G. Schill, *Anal. Chem.*, **51**(1979)976.
- 84 T. Okada, *J. Chromatogr.*, **538**(1991)341.
- 85 T. Okada, *Anal. Chem.*, **60**(1988)1666.
- 86 H.C. Mehra, K.D. Huysmans i W.T. Frankenberger, *J. Chromatogr.*, **508**(1990)265.
- 87 T. Okada i T. Kuwamoto, *Anal. Chem.*, **58**(1986)1375.
- 88 W.S. Kim, C.L. Geraci i R.E. Kupel, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **41**(1980)334.
- 89 K. Kimura i T. Shono, *Stud. Org. Chem. (Amsterdam)*, **45**(1992)198.
- 90 K. Uekama, F. Hryayama, S. Naou, N. Matsuo i T. Irie, *Chem. Pharm. Bull.*, **261**(1978)3477.
- 91 D. Sybilska w *Ordered Media in Chemical Separations (A.C.S. Symposium Series, No. 342)*, W.L. Hinze i D.W. Armstrong, red, American Chemical Society, Washington DC, 1987, str. 218.
- 92 D. Sybilska, J. Lipkowski i J. Wojciechowski, *J. Chromatogr.*, **253**(1988)95.
- 93 J.C. Villegas-Febres i W. Olivares, *J. Mol Struct.*, **287**(1993)275.

- 94 P. Walser, *J. Chromatogr.*, **439**(1988)155.
- 95 L.M. Warth, J.S. Fritz i J.O. Naples, *J. Chromatogr.*, **462**(1989)165.
- 96 T.S. Stevens i M.A. Langhorst, *Anal. Chem.*, **54**(1982)950.
- 97 *Handbook of Chemistry and Physics*, C.D. Hodgman, red., Chem. Rubber Publ. Co., Cleveland, 1988.
- 98 R.L. Smith i D.J. Pietrzyk, *Anal. Chem.*, **56**(1984)610.
- 99 G.B. Cox i R.W. Stout, *J. Chromatogr.*, **384**(1987)315.
- 100 K.K. Unger, *Porous Silica (J. Chromatogr. Libr., 16)*, Elsevier, Amsterdam 1979, str.130.
- 101 D.L. Gugger, J.H. Stanton, B.N. Irby, B.L. McConnell, W.W. Cummings i R.W. Maatman, *J. Phys. Chem.*, **681**(1964)757.
- 102 G.B. Cox, *J. Chromatogr. A*, **656**(1993)353.
- 103 M.L. Hair i W. Hertl, *J. Phys. Chem.*, **74**(1970)91.
- 104 W. Gołkiewicz, J. Kuczyński i L. Jasiak, *Chem. Anal. (Warsaw)*, **36**(1991)209.
- 105 C.R.A. Catlow, in *Modelling of Structure and Reactivity in Zeolites*, C.R.A. Catlow, ed., Academic Press, London 1992.
- 106 R. Schöllner, W.D. Einicke, i B. Gläsner, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **89**(1993)1871.
- 107 J. Das, Y.S. Bhat, A.I. Bhardwaj i A.B. Halgeri, *Appl. Catal. A: General*, **116**(1994)71.
- 108 L.R. Snyder i J.J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons Inc., New York 1979.
- 109 K. Tanaka i H. Sato, *Bunseki Kagaku*, **27**(1978)95.
- 110 W.R. Melander, A. Nahum i Cs. Horvath, *J. Chromatogr.*, **185**(1979)129.
- 111 W.R. Melander, D.E. Cambell i Cs. Horvath, *J. Chromatogr.*, **158**(1978)215.
- 112 J. Chmielowiec i H. Savitzky, *J. Chromatogr. Sci.*, **17**(1979)245.
- 113 L.C. Snyder i L.R. Field, *Anal. Chem.*, **52**(1980)2009.
- 114 J.C. Harrison i M.R. Effink, *Biopolymers*, **219**(1982)1153.
- 115 R.M. Mohseni i R.J. Hurtubise, *J. Chromatogr.*, **537**(1991)61.
- 116 S.R. Bachman i M.E. Peden, *Water Air Soil Pollut.*, **33**(1987)129.
- 117 P.R. Haddad i P.E. Jackson, *J. Chromatogr.*, **447**(1988)155.

- 118 D.N. Buchanan i J.G. Thoene, *Anal. Biochem.*, **124**(1982)108.
- 119 W.E. Rich i E.L. Johnson, *Eur. Pat. Appl.*, EP. 38720(1981).
- 120 J.P. Ivey i P.R. Haddad, *J. Chromatogr.*, **391**(1987)309.
- 121 T.S. Stevens, K.M. Chritz i H. Small H, *Anal. Chem.*, **59**(1987)1716.
- 122 C. Rosenberg, W. Winiwarter, M. Gregori, G. Pech, V. Casensky i H. Puxbaum, *Fres. Z. Anal. Chem.*, **331**(1988)1.
- 123 T. Murayama, T. Kubota, Y. Hanaoka, S. Rokushika, K. Kihara i H. Hatano, *J. Chromatogr.*, **435**(1988)417.
- 124 R.C. Crafts, *Polymer Testing*, **5**(1985)193.
- 125 H. Müller, W. Nielinger i A. Horbach, *Agnew. Makromol. Chem.*, **108**(1982)1.
- 126 J. Von Unterrichter-Worthman i F. Quella, *Kunststoffe*, **74**(1984)682.
- 127 H.-J. Kim i Y.-K. Kim, *J. Food Sci.*, **51**(1986)1360.
- 128 R.D. Rocklin, *LC*, **1**(1983)504.
- 129 J.F. Lawrence, *Chromatographia*, **24**(1987)45.
- 130 Dionex Application Note 38.
- 131 G.M. Bauer, *Lebensm.-Biotechnol.*, **1**(1985)18.
- 132 J.H. Nguyen, H.-J. Kim i D.T. Gjerde, *Am. Lab.*, **May**(1988)12.
- 133 B.J. Shevenell i W.C. Shortle, *Phytopathology*, **76**(1986)132.
- 134 W.E. Rich, E. Johnson, L. Lois, B.E. Stafford, P.M. Kabra i L.J. Marton, w L.J. Kabra i L.J. Marton, red., *Liquid Chromatography in Clinical Analysis*, Humana, Clifton, NJ, 1981, str. 393
- 135 A.R. Dahl, S.C. Miller i J. Petridou-Fischer, *Toxicology Lett.*, **36**(1987)129.
- 136 J.R. Kreling i J. DeZwaan, *Anal. Chem.*, **58**(1986)3028.
- 137 G. Iwinski i D.R. Jenke, *J. Chromatogr.*, **392**(1987)397.
- 138 J. Behnert, P. Behrend i A. Kipplinger, *LaborPraxis*, **9**(1985)38.
- 139 B. Kreilgard i F.M. Anderson, *Arch. Pharm. Chem., Sci. Ed.*, **12**(1984)85.
- 140 C. Pohland, *Sth. Afr. J. Sci.*, **80**(1984)208.
- 141 B. Daubert, M. Guerere i J. Estienne, *Ann. Falsif. Expert. Chim. Toxicol.*, **83**(1990)401.
- 142 C.A. Accorsi i G. Blo, *J. Chromatogr.*, **555**(1991)65.

- 143 M. Fukui, H. Koniski, K. Ohta i K. Tanaka, *Bunseki Kagaku*, **41**(1992)T27.
- 144 H. Sakai, T. Fujiwara i T. Kumamaru, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**(1993)3401.
- 145 K. Fisher, C. Corsten, P. Leidman, D. Bieniek i A. Kettrup, *Chromatographia*, **38**(1994)43.
- 146 H. Itoh, S. Ikeda i N. Ichinose, *Analyst*, **119**(1994)409.
- 147 H-J. Kim i Y.K. Kim, *Anal. Chem.*, **61**(1989)1485.
- 148 D.J. Woo i J. R. Benson, *Am. Clin. Prod. Rev.*, **January**(1984)20.
- 149 H. Itoh, Y. Shinbori i N. Tamura, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **59**(1986)997.
- 150 W.J. Mayer, J.P. Mcarthy i M.S. Greenberg, *J. Chromatogr. Sci.*, **17**(1979)656.
- 151 D.S. Dunlop, D.M. Mc Hale i A. Lajtha, *Brain Research*, **580**(1992)44.
- 152 M.R. Stratford, C.S. Parkins, S.A. Everett, M.P. Dennis, M. Stubbs i S.A. Hill, *J. Chromatogr. A*, **706**(1995)459.
- 153 A. Hidayat, D.B. Hibbert i P.W. Alexander, *Talanta*, **44**(1997)239.
- 154 H.J.K. Hoffman i N.E. Lee, *J. Liquid Chromatogr.*, **17**(1994)4273.
- 155 P.P. Halarnkar i D.A. Schooley, *Comp. Biochem. Physiol. B*, **110B**(1995)357.
- 156 T.R.I. Cataldi, D. Centozzone i E. Desimoni, *Food Chem.*, **55**(1996)17.
- 157 T.R.I. Cataldi, C. Campa i D. Centozzone, *Anal. Chem.*, **67**(1995)3740.
- 158 N.E. Fortier i J.S. Fritz, *J. Chromatogr.*, **462**(1989)323.
- 159 A.T. James, A.J.P. Martin i S.S. Randal, *Biochem. J.*, **49**(1951)393.
- 160 K. Tanaka i J.S. Fritz, *Anal. Chem.*, **59**(1987)708.
- 161 B. Kamiński, *Bull. Acad. Polon. A*, **7**(1948)127.
- 162 P.W. Alexander, B.K. Głód i P.R. Haddad, *J. Chromatogr.*, **589**(1992)201.
- 163 Z.L. Chen, P.W. Alexander i P.R. Haddad, *Anal. Chim. Acta*, **338**(1997)41.
- 164 Z.L. Chen, P. Gierson i M.A. Adams, *Analyst*, w druku.
- 165 N. Ando, Y. Tanizaki i F. Hasegawa, *US Pat.*, 3 352 643 (1967).
- 166 M. Krejčí i K. Šlais, *Czech Pat.*, 184 097 (1975).
- 152 M.R. Stratford, C.S. Parkins, S.A. Everett, M.P. Dennis, M. Stubbs i S.A. Hill, *J. Chromatogr. A*, **706**(1995)459.

- 153 A. Hidayat, D.B. Hibbert i P.W. Alexander, *Talanta*, **44**(1997)239.
- 154 H.J.K. Hoffman i N.E. Lee, *J. Liquid Chromatogr.*, **17**(1994)4273.
- 155 P.P. Halarnkar i D.A. Schooley, *Comp. Biochem. Physiol. B*, **110B**(1995)357.
- 156 T.R.I. Cataldi, D. Centozone i E. Desimoni, *Food Chem.*, **55**(1996)17.
- 157 T.R.I. Cataldi, C. Campa i D. Centozone, *Anal. Chem.*, **67**(1995)3740.
- 158 N.E. Fortier i J.S. Fritz, *J. Chromatogr.*, **462**(1989)323.
- 159 A.T. James, A.J.P. Martin i S.S. Randal, *Biochem. J.*, **49**(1951)393.
- 160 K. Tanaka i J.S. Fritz, *Anal. Chem.*, **59**(1987)708.
- 161 B. Kamieński, *Bull. Acad. Polon. A*, **7**(1948)127.
- 162 P.W. Alexander, B.K. Głód i P.R. Haddad, *J. Chromatogr.*, **589**(1992)201.
- 163 Z.L. Chen, P.W. Alexander i P.R. Haddad, *Anal. Chim. Acta*, **338**(1997)41.
- 164 Z.L. Chen, P. Gierson i M.A. Adams, *Analyst*, w druku.
- 165 N. Ando, Y. Tanizaki i F. Hasegawa, *US Pat.*, 3 352 643 (1967).
- 166 M. Krejčí i K. Šlais, *Czech Pat.*, 184 097 (1975).

11. SUMMARY

Ion Exclusion Chromatography (IEC) finds application in the separation of a wide range of small, neutral or partially ionized molecules. In IEC, the strong as well as weak electrolytes are eluted unseparated, the first at the beginning and the latter at the end of the elution. The retention volumes of the remaining electrolytes are found to be proportional to their dissociation constant values. The dead and inner volumes of the chromatographic column can be determined from the observed dependence of retention volumes on dissociation constant values. The retention mechanism is described by the analytical equations and by the results obtained from the computer simulation of the column performance (using global thermodynamic and chromatographic equations or the Craig method). The mixed retention mechanism involving hydrophobic adsorption and screening effect is observed for weak electrolytes and aromatic compounds. Aromatic compounds are found to be retained almost solely by a reverse-phase mechanism involving interaction of the solute with the unfunctionalized regions of the stationary phase. The purpose of this paper is to survey the field. Using theoretical and experimental approaches, I show how different parameters can influence ion-exclusion solute retention. This retention is affected by the physicochemical parameters of the solute, sorbent, stationary and mobile phases. Shortly the applications and detectors used in this technique are also discussed.

- 51 A. Hájek, *et al.*
- 52 B.L.K. Fung, *et al.*
- 53 P.P. Hájek, *et al.*
- 54 11004192555

II. SUMMARY

- 55 N.E. Foster, *et al.*
- 56 A. T. James, *et al.*

Ion Exchange Chromatography (IEC) has been used in the separation of a mixture of small, neutral, partially ionized molecules. In IEC, the strong as well as weak electrolytes are eluted sequentially, the first at the beginning and the last at the end of the elution. The retention volumes of the remaining electrolytes are found to be proportional to their dissociation constant values. The dead and free volumes of the chromatographic column can be determined from the observed dependence of retention volumes on the retention constant values. The retention mechanism is described by the mixed retention model and by the results obtained from this model simulation of the column performance (using global thermodynamic and electrostatic equations of the Craig method). The mixed retention mechanism involving hydrophobic adsorption and retention effect is observed for weak electrolytes and aromatic compounds. Aromatic compounds are found to be retained almost solely by a reverse-phase mechanism involving interaction of the solute with the unfunctionalized regions of the stationary phase. The purpose of this paper is to survey the field using theoretical and experimental approaches to show how different parameters can influence ion-exclusion solute retention. This retention is affected by the physicochemical parameters of the solute, solvent, stationary and mobile phases. Shortly the applications and detectors used in this technique are also discussed.

12. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W ZAKRES ROZPRAWY

1. **B.K. Glód, A.K. Piasecki, J. Stafiej**, *Numerical Simulation of the Chromatographic Column Performance in Ion Exclusion Chromatography*, *J. Chromatogr.*, 457(1988)43
2. **B.K. Glód, P.R. Haddad, P.W. Alexander**, *Potentiometric Detection of Carboxylic Acids and Inorganic Anions in Ion-Exclusion Chromatography Using Camphorsulfonic Acid as Eluent*, *J. Chromatogr.*, 589(1992)209.
3. **B.K. Glód, P.R. Haddad, P.W. Alexander**, *Ion-Exclusion Chromatography Using Mobile Phases Containing β -cyclodextrin*, *J. Chromatogr.*, 595(1992)149.
4. **B.K. Glód, J.W. Stafiej**, *Model for Mixed Ion Exclusion - Adsorption Retention Mechanism in Ion Exclusion Chromatography*, *J. Chromatogr.*, 654(1993)197.
5. **P.R. Haddad, F. Hao, B.K. Glód**, *Factors Affecting Retention of Basic Solutes in Ion-Exclusion Chromatography Using an Anion-Exchange Column*, *J. Chromatogr. A*, 671(1994)3.
6. **B.K. Glód**, *Retention Mechanism of Ion-Exclusion Chromatography*, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 39(1994)399. R
7. **B.K. Glód, P.R. Haddad, P.W. Alexander**, *Retention Volume of Acidic Compounds in Ion-Exclusion Chromatography*, *Acta Chromatogr.*, 3(1994)23.
8. **B.K. Glód, P.W. Alexander, P.R. Haddad, Z.L. Chen**, *Potentiometric Detection Using a Metallic Copper Electrode in Reversed-*

Phase and Ion Exclusion Chromatography with Eluents Containing Ion Interaction Reagents, **J. Chromatogr.**, 699(1995)31.

9. **B.K. Głód, P.W. Alexander, Z.L. Chen, P.R. Haddad**, *Thermodynamic Investigation of Sample Retention Mechanism in Ion-Exclusion Chromatography with Inclusion Compound in the Mobile Phase*, **Anal. Chim. Acta.**, 306(1995)267.
10. **B.K. Głód**, *A New Concept of Retention Mechanism in Ion Exclusion Chromatography*, **Acta Chromatogr.**, 6(1996)101.
11. **B.K. Głód, G. Perez, A.A.G. Tomlinson**, *Use of Mordenite Columns in Ion-Exclusion Chromatography*, **J. Chromatogr. A**, 760(1997)292.
12. **B.K. Głód, G. Perez**, *Retention of Acidic Aromatic Compounds in Ion Exclusion Chromatographic Separations*, **J. Liquid Chromatogr.**, 20(1997)1005.
13. **B.K. Głód**, *Principles and Applications of Ion Exclusion Chromatography*. **Acta Chromatogr.**, 7(1997)13. R
14. **B.K. Głód**, *Ion Exclusion Chromatography. Parameters Influencing Retention*, **Neurochem. Research**, 22(1997)1237. R

• **B.K. Głód, G. Perez**, *The Influence of Hydrophobic Adsorption on the Retention in Different Modes of Ion-exclusion Chromatography*, w przygotowaniu.

• **B.K. Głód, G. Perez**, *A Rapid Analysis of Aromatic and Aliphatic Acids in Beverages*, w przygotowaniu.

• **B.K. Głód, G. Perez**, *Application of Small Capacity Cation Exchangers in Ion-exclusion Chromatography*, w przygotowaniu.

• **Z.L. Chen, B.K. Głód**, *Indirect Photometric Detection of Carboxylic Acids Separated by Ion-exclusion Chromatography with Aromatic Carboxylic Acids Eluent*, w przygotowaniu.

