

## CAMERA SEPARATORIA

Volume 8, Number 2 / December 2016, pp. 92-104

### Marian KAMIŃSKI

Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. Gabriela Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Polska  
e-mail: [markamin@pg.gda.pl](mailto:markamin@pg.gda.pl)

## Wspomnienie o profesorze Andrzeju Stołyhwo

### *In memory of professor Andrzej Stołyhwo*

Moja znajomość, a potem, w pewnym sensie współpraca, z wówczas - dr inż. Andrzejem Stołyhwo (AS) datuje się od roku 1973, gdy został recenzentem mojej magisterskiej pracy dyplomowej pt. *Opracowanie modelu bez-pompowego chromatografu cieczowego i sprawdzenie działania jego prototypu*, („modelu stołowego” - jak wtedy słusznie zauważył p. Doktor; prototyp powstał już po obronie tej pracy magisterskiej), tzn., w istocie - modułu zasilania eluentem kolumny HPLC, opartego o zbiornik eluentu w formie węzownicy, wytłaczanego do kolumny pod ciśnieniem sprężonego azotu, regulowanym za pomocą reduktora ciśnienia, pod nadciśnieniem w zakresie do 100 bar. Kandydatura dr inż. Andrzeja Stołyhwo na recenzenta tej pracy dyplomowej, zaproponowana przez Promotora, doc. dr hab. inż. Jerzego S. Kowalczyka (JSK), była w pełni uzasadniona. Już wtedy funkcjonował w Zakładzie Technologii Tłuszczów Jadalnych Instytutu Chemii i Technologii Organicznej i Żywności Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej prototyp „multi-gradientowego” bez-pompowego aparatu chromatograficznego, opracowany przez dr inż. Andrzeja Stołyhwo, oparty o sześć kwasoodpornych zbiorników z poziomymi wkładkami przeciwydyfuzyjnymi, każdym ze zbiorników, z innym składnikiem tworzonego eluentu, oraz z proporcjonującym zaworem pneumatycznym. Ten aparat (*niestety, nie zachował się*) był przeznaczony przede wszystkim do rozdzielania tłuszczów i ich pochodnych w warunkach normalnych układów faz (NP-HPLC). Zdolny był do tłoczenia do kolumny HPLC eluentu o programowanym składzie pod nadciśnieniem do 60 bar. Był to wówczas pierwszy chyba na świecie aparat chromatograficzny umożliwiający tworzenie „wielostopniowego” programu elucji za pomocą mieszania różnych par cieczy, każda o innym składniku, lub o różnych obu składnikach, o zmieniającej się sile elucyjnej i lub zmieniającym się charakterze oddziaływań sorpcyjnych, zgodnie z teoretycznym modelem oddziaływań adsorpcyjnych Soczewińskiego – Snydera.

Pamiętam też z tego okresu gorące spory pomiędzy - wówczas, dr inż. Andrzejem Stołyhwo, a - wtedy, doc. dr hab. inż. Jerzym S. Kowalczykiem na temat maksymalnego ciśnienia pracy aparatury HPLC. Pierwszy utrzymywał, że dla zapewnienia koniecznej selektywności rozdzielania w warunkach NP-HPLC wystarczy ciśnienie 60, ew., do 100 bar, uzupełnione wielostopniowym programowaniem składu eluentu, drugi, że trzeba dążyć do maksymalizacji ciśnienia pracy aparatury HPLC, a programowanie składu eluentu, jest potrzebne tylko w celu optymalizacji rozdzielania.

Pamiętam też ich spory w rodzaju: AS - „... tylko odpowiedni skład eluentu i program elucji może zapewnić rozdzielanie trudnych do rozdzielania mieszanin (przede wszystkim – lipidów – dopisek autora) o podobnych strukturach molekularnych”; JSK – „... czego nie da się rozdzielić w warunkach izokratycznych, to z pewnością nie da się tego dokonać z elucją gradientową!”

Dzisiaj wiemy, że obaj mieli tylko częściowo rację, zwłaszcza, uwzględniając warunki RP, HILIC, jonowymienne, a także optymalne warunki rozdzielania aminokwasów, peptydów, czy białek, albo ogólnie przyjęte zasady rozdzielania w proteomice, czy metabolomice!

Nota bene, publikacyjny dorobek p. prof. Andrzeja można w znacznym stopniu zaliczyć dzisiaj do kategorii wkładu do rozwoju metabolomiki i nazwać go jednym z prekursorów tego – już dzisiaj w stanie zaawansowanym – obszaru wiedzy. Ś.P. Andrzej by pewnie protestował, twierdząc, że jego badania i prace dotyczyły wyłącznie szeroko rozumianej technologii, w tym, przede wszystkim rozdzielania oraz analityki składników tłuszczów i lipidów, a nie metabolomiki(?).

Gdybym miał w sposób lapidarny podsumować aktywność i wkład Ś.P. Profesora Andrzeja Stołyhwo dla rozwoju wysokosprawnej chromatografii, przede wszystkim – cieczowej, należałoby napisać – **zaangażowany wizjoner, wybitny eksperymentator, świetny inżynier, wybitny nauczyciel akademicki, przekonujący popularyzator wiedzy, nielubiący publikować rezultatów swych dokonań**, którego okres swej największej aktywności przypadł na bardzo niesprzyjający okres II-giej połowy lat 70-tych oraz na lata 80-te i 90-te ubiegłego wieku.

Najważniejsze dokonania prof. Andrzeja, dotyczące rozwoju aparatury, detekcji oraz metodyk analitycznych technikami HPLC, GC, SFC szczególnie w badaniach i technologii „lipidów”, w tym przede wszystkim – tłuszczów i produktów ich konwersji, można pogrupować oraz lapidarnie zrelacjonować w następujący sposób:

1. Opracowanie w latach 70-tych ubiegłego wieku wspomnianej bez-pompowej, multi-gradientowej aparatury z proporcjonowaniem składu cieczy po stronie wysokiego ciśnienia, do rozdzielania złożonych mieszanin, zwłaszcza lipidów, tłuszczów i ich pochodnych, w warunkach NP-HPLC;
2. Opracowanie w tym samym okresie nowej generacji detektora płomieniowo – jonizacyjnego do cieczonej chromatografii z transportem eluatu na powierzchni splecionej linki bez końca (FID-LC);
3. Opracowanie w okresie lat 80-tych ubiegłego wieku laserowego detektora rozproszenia światła (LLSD), który został udoskonalony przez podczas stażu we Francji w ośrodku prof. Guiochone'a oraz, jak napisał w swej pracy habilitacyjnej pt. **„Separacja i detekcja w chromatografii cieczonej lipidów”**, opublikowanej w roku 1986 – tym przez Politechnikę Gdańską, opatentowany, bez jego współautorstwa, na terenie ważniejszych krajów ówczesnej Unii Europejskiej oraz w USA, do dzisiaj jest produkowany, będąc systematycznie ulepszany. Po powrocie Profesora do Polski wersja pierwotna tego detektora była też produkowana w Polsce w niedużej serii w latach 90-tych ubiegłego wieku. Osobiście do dzisiaj stosuję dwa egzemplarze tego detektora – pierwotny prototyp z roku 1984 oraz jeden z egzemplarzy „produkcyjnych”, z roku 1997. Bardzo jestem z obu zadowolony ;
4. Intensywne badania nad opracowaniem optymalnych procedur rozdzielania grupowego i „szczegółowego” acylo-gliceroli oraz innych składników roślinnych i zwierzęcych olejów i tłuszczów naturalnych, a także, olejów i tłuszczów jadalnych poddanych różnym procesom technologicznym i użytkowym. Część wyników tych badań była przedmiotem publikacji, a ich podsumowanie – przedmiotem jednej z części Jego pracy habilitacyjnej „obronionej” na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej w dziedzinie Nauk Technicznych, dyscyplina – Technologia Chemiczna.
5. Potem te badania były kontynuowane przez niego i jego zespół, szczególnie dla olejów z nasion wiesiołka oraz z nasion „amarantusa”, a także w stosunku do mleka kobiecego. Ostatnie stało się przedmiotem rozprawy doktorskiej wykonanej pod jego opieką i promotorstwem;
6. Szczególne znaczenie miała i posiada do dzisiaj, opracowana przez Niego technologia wytwarzania bardzo bogatego w kwasy tłuszczowe „omega 3” na zimno tłoczonego i bez-ekstrakcyjnie rafinowanego oleju z wiesiołka, stanowiącego substytut diety opracowany od strony technologii przemysłowej przez firmę AGROPHARM przy ścisłej współpracy z prof. Andrzejem Stołyhwo, osobiście, produkowany pod handlową nazwą „OPEAROL”. Jest wytwarzany do dzisiaj pod tą samą nazwą przez ADAMED, będący obecnie właścicielem AGROPHARMU. Te prace zaowocowały też sympozjami organizowanymi przez niego we współpracy z AGROPHARM. W tzw. Materiałach z tych Sympozjów opublikował wiele swych wyników badań, związanych szeroko z charakterystyką składników oleju z wiesiołka dziwnego oraz bliższą charakterystykę oleju znajdującego się w specyfiku OPAROL. Te badania nie zostały gdzie indziej opublikowane. Za zgodą ADAMED, za co dziękuję! – kopie kilku z tych prac zostały umieszczone w niniejszym numerze **Camera Separatoria**. Mam nadzieję, że w ten sposób zostanie rozpowszechniona idea Profesora Andrzeja, dotycząca rozdzielania i oznaczania składników olejów i tłuszczów jadalnych, sformułowana jeszcze w Jego pracy habilitacyjnej, która brzmi ona mniej więcej w ten sposób:

**„Jeśli chcesz oznaczyć szczegółowy skład olejów jadalnych i ich pochodnych – zastosuj co najmniej dwu-wymiarową chromatografię cieczową (2D-LC). Najpierw dokonaj rozdzielania grupowego w warunkach NP-HPLC z elucją gradientową oraz z bezwodnymi składnikami eluentu. Kolejno rozdzielaj poszczególne grupy na indywidualia z zastosowaniem wysokosprawnych kolumn HPLC o wysoce hydrofobowej powierzchni sorpcyjnej w warunkach elucji gradientowej z bezwodnymi składnikami eluentu. Jeśli – dodatkowo – chcesz zbadać skład pod względem chiralności indywiduali – zastosuj w trzecim wymiarze rozdzielania (3D-HPLC) – chiralną fazę stacjonarną, zwłaszcza o związanych chemicznie cyklo-dekstrynach oraz elucję izokratyczną z bezwodnym, co najmniej dwuskładnikowym eluentem. Dodatkowo, w przypadku potrzeby uzyskania informacji o izomerach „cis / trans”, zastosuj do rozdzielania warunki NP-HPLC, z kolumną posiadającą jony  $Ag^+$  na powierzchni sorpcyjnej”.**

Nie z własnej winy, nie zdążył w pełni wprowadzić tej idei do codziennej praktyki. Jednakże, **analizując światowy dorobek publikacyjny ostatnich lat, można stwierdzić, że była to prekursorska idea!**

7. Należy także przypomnieć prekursorskie jego prace nad ekstrakcją nadkrytyczną (SFE) i chromatografią z nadkrytycznym eluentem (SFC), w tym, nad opracowaniem prototypowej aparatury SFE / SFC w skali semi-preparatywnej – tu także w zastosowaniach w rozdzielaniu i analizie tłuszczów i produktów ich konwersji. Finałem tych prac była kolejna rozprawa doktorska, co w konsekwencji pozwoliło na uzyskanie tytułu naukowego profesora.

Niestety, w krótkim czasie potem, Profesor Andrzej musiał opuścić naszą Politechnikę Gdańską i przeniósł się do SGGW. Wówczas pracowałem w LOTOS SA i tylko sporadycznie bywałem w PG, w celu prowadzenia wykładu i dla konsultacji, z doktorantami. Często zdarzało się mi być ok. 21-23 choć na chwilę w moim pokoju – laboratorium, by coś zabrać, lub pozostawić na jutro. Praktycznie zawsze wiśniowy Audi Prof. Andrzeja stał na parkingu przed budynkiem „Chemia C”, w którym mieściło się jego laboratorium - tak przed moim przyjazdem, jak i bardzo często po moim wyjeździe do domu!

Nie znam bliższych szczegółów problemu, który spowodował konieczność jego odejścia z Politechniki Gdańskiej. Podobno jego winą było pozbawienie PG należnych korzyści finansowych z produkcji oleju OPEAROL, w uruchomieniu produkcji, którego PG z pewnością w niczym Jemu nie pomogła(?) Cóż, „jeśli nie wiadomo o co chodzi – chodzi o pieniądze”(?!)

Okres jego pracy w Warszawie jest mi już bardzo mało znany, więc, nie mogę się na ten temat wypowiadać. Wiem tylko, że do śmierci miał żal do określonych osób z PG. W jednym w e-maili napisanych do mnie, już po powrocie z Warszawy, podczas emerytury oraz po poważnej kolejnej chorobie serca, wyraził to m.in., w następujący sposób:

*„PANIMARIANIE,  
z PAVLEM BYLIŚMY RAZEM NA STAŻU U PROF GUIOCHON W ECOLE  
POLYTECHNIQUE POD PARYZEM ON BYŁ ENTUZJASTĄ  
TECHNIKI GRADIENTOWEJ. BARDZO MIŁY SYMPATYCZNY I I UPRZEJMY  
PEPIK TAM WŁAŚNIE POWSTAŁ MÓJ PIERWSZY DETEKTOR  
LLSD DO GRADIENTOWEJ LC OPARTY O POMIAR NATĘŻENIA ROZPROSZONEGO  
PROMENIA LASERA . micro detektor UV PAVLA BYŁ BARDZO KŁOPOTLIWY W  
UŻYCIU I MIAŁ ZBYT DUŻĄ OBJĘTOŚĆ DO BARDZO WYSOKOSPRAWNYCH  
KOLUMN  
TRIACYLOGLICEROLE TAG O RÓŻNYM ROZSTAWIENIU kt w czasteczce TAG  
DAJĄ SIĘ DOBRZE ROZDZIELAĆ NA SILVER SILICA LOADED COLUMNS  
TECHNIKĄ GRADIENTU SKOKOWEGO ORAZ IZOMERY kt o konfiguracji trans  
Pavla moglibyśmy zaprosić na lato do gdanska zakwaterowanie w hotelu aSYST W  
JELITKOWIE PRZY PLAŻY.  
OSOBIŚCIE już czuję się znacznie lepiej i bardzo chciałbym wrócić na PG z której  
zostałem wylany NA ZBITY PYSK. MOŻE PROF HUPKA MA JAKIŚ ETAT????  
ŁĄCZĘ POZDROWIENIA  
Andrzej STOŁYHWO”*

Na koniec chciałbym też przypomnieć prof. Andrzeja, jako zaangażowanego i pracującego z pasją Nauczyciela Akademickiego, potrafiącego w sposób zrozumiały przekazać studentom trudną „materię”, analityki technicznej i procesowej lipidów i tłuszczów oraz produktów ich konwersji, technikami i metodami klasycznymi oraz z zastosowaniem GC i HPLC, a także podkreślić, że był to nie tylko „**rasowy**” naukowiec, inżynier oraz innowator, ale i niezwykle Nauczyciel.

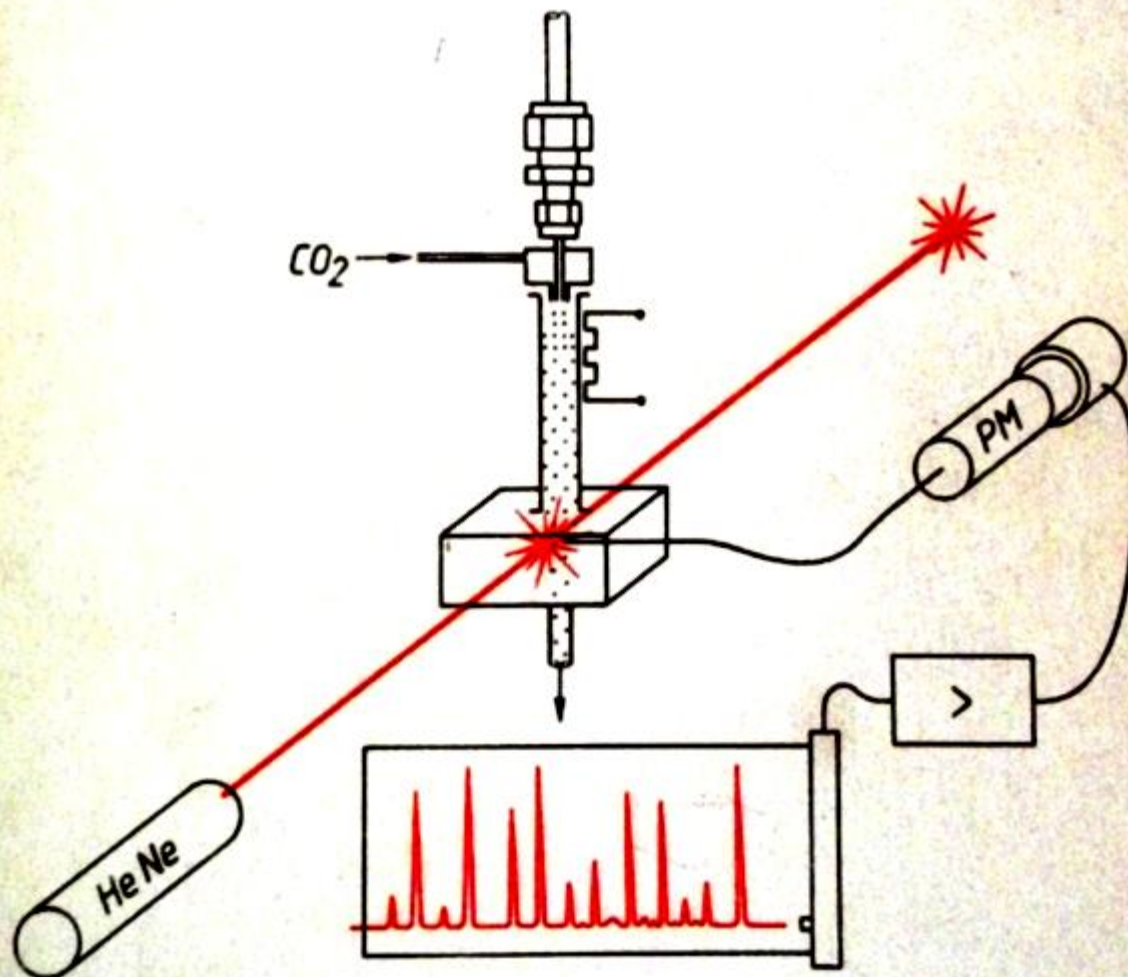
**Wielka szkoda, że nie ma go już wśród nas!**

**PS**

Poniżej strona tytułowa oraz wybrane fragmenty pracy habilitacyjnej dr inż. Andrzeja Stołyhwo, ilustrujące – wówczas prekursorskie w skali światowej Jego idee i dokonania z tego okresu pracy.

Andrzej Słóyhwo

# SEPARACJA I DETEKCJA W CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ LIPIDÓW



Gdańsk 1986

## Separacja i detekcja w chromatografii cieczowej lipidów

### Streszczenie

Pętle zależności, jakie występują pomiędzy procesem separacji i współczesnymi technikami detekcyjnymi nazwane "syndromem separacji i detekcji" drastycznie ograniczają swobodę wyboru parametrów separacji a tym samym i wykorzystanie w analizie lipidów zalet, jakie tkwią w samej istocie metody chromatografii cieczowej /HPLC/.

Opisano własne rozwiązania techniczne uniwersalnych detektorów /FID I, LLSD/ do HPLC a także wielorozpuszczalnikowe systemy do programowania składu fazy ruchomej. Szczególną uwagę poświęcono parametrom użytkowym i mechanizmowi działania nowego, Aerozolowego Laserowego Detektora Promieniowania Rozproszonego /LLSD/, który jest niewrażliwy na zmianę składu fazy ruchomej i może być stosowany z dowolnymi rozpuszczalnikami w technice elucji gradientowej. Detektor reaguje na wszystkie relatywnie nietlotne substancje a jego sygnał praktycznie nie zależy od natury wykrywanych składników.

LLSD rozбивa syndrom separacji i detekcji i tym samym otwiera pole do pełnego wykorzystania zalet HPLC do analizy lipidów. Próg wykrywalności LLSD wynosi 22 ng, objętość martwa - 0,1 - 0,2  $\mu$ l, stała czasowa poniżej 0,5 s.

Opisane systemy zastosowano do analizy naturalnych mieszanin lipidów. Lipidy czerowych ciałek krwi rozdzielono /FID I/ na 28 klas, odtłuszczoną lecytynę sojową /LLSD/ na 18 klas.

Poprzez rozbicie syndromu separacji i detekcji LLSD umożliwił rozwinięcie sposobów separacji, identyfikacji i kwantyfikacji naturalnych mieszanin triacylogliceroli, co ilustrują chromatogramy olejów roślinnych jak np. oliwkowego, rzepakowego i innych.

## The Separation and Detection in HPLC of Lipids

### Summary

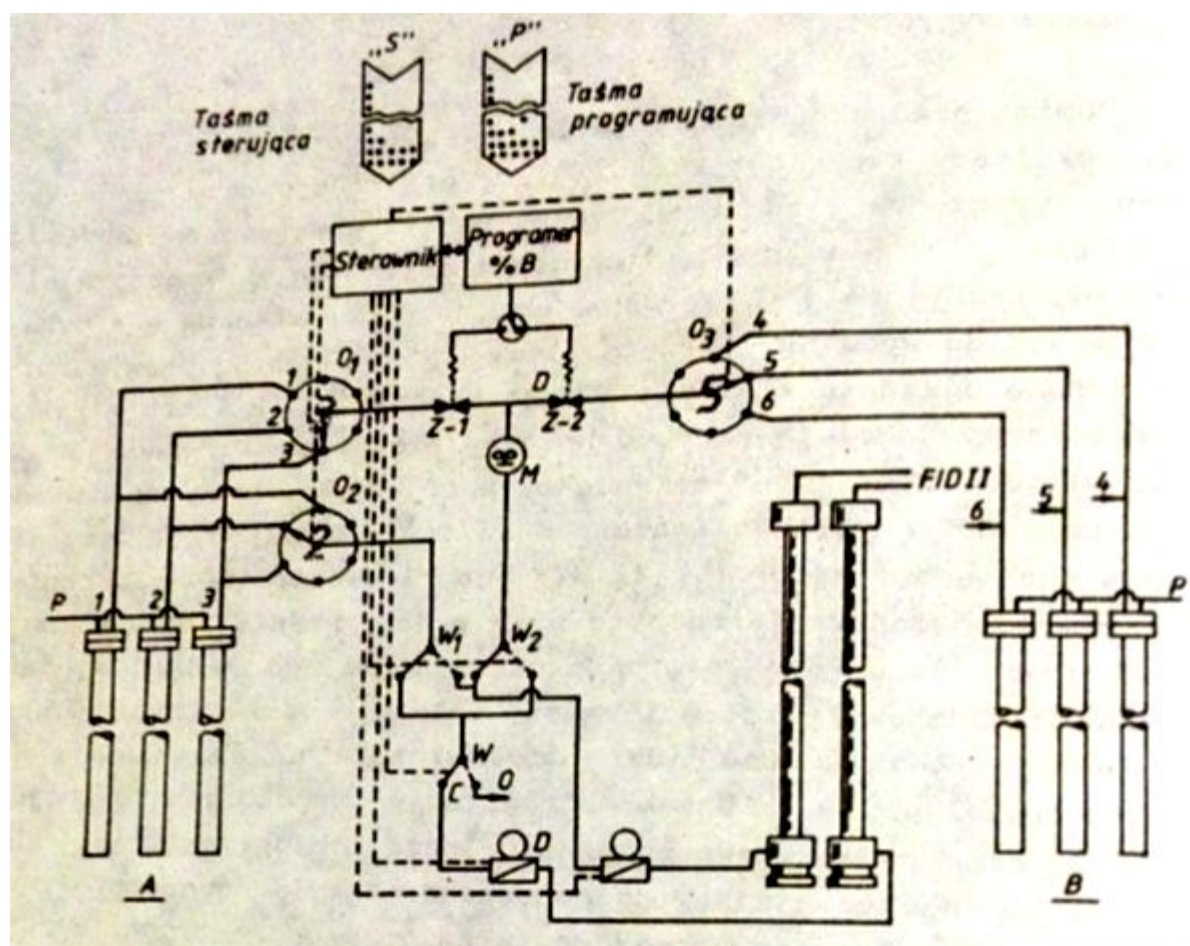
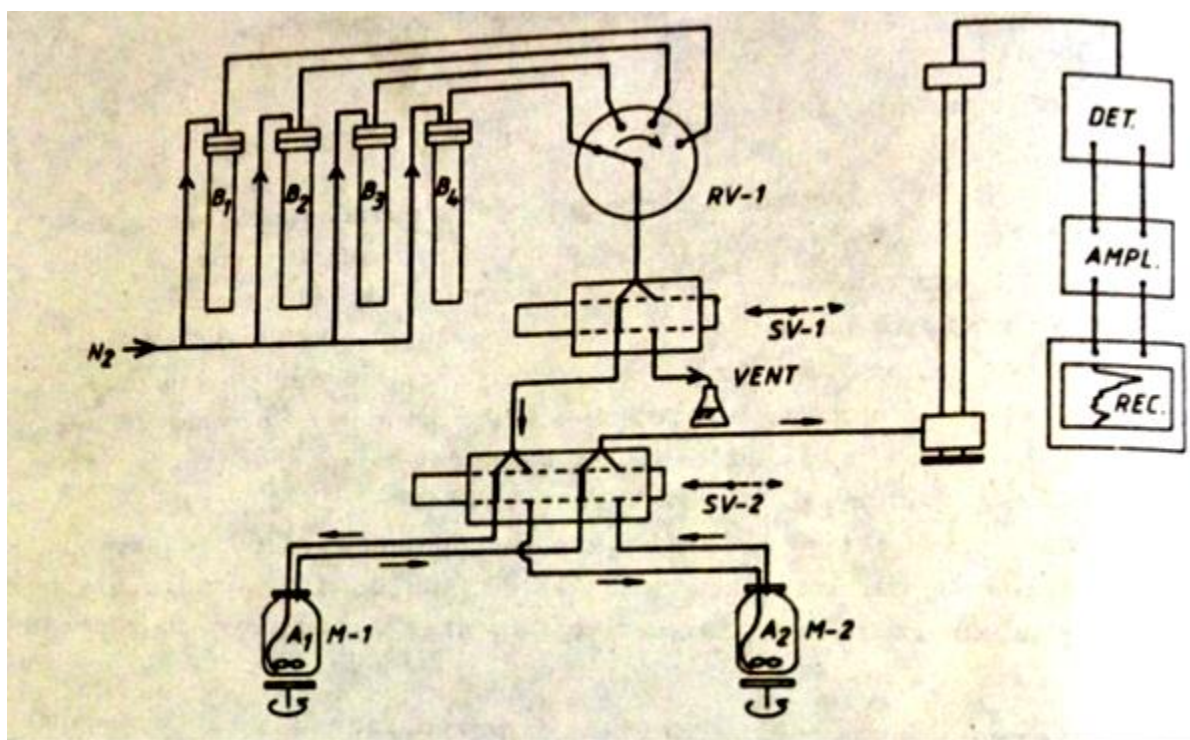
The separation and detection syndrome is the main reason limiting application of HPLC in the analysis of lipids. In order to break the syndrome, the detectors /transport FID, LLSD/ and a solvent programming systems were designed. The principle of operation, parameters and mechanisms of the signal development of the Laser Light Scattering Detector /LLSD/ are described. The signal of LLSD is totally independent on the mobile phase composition changes if volatile solvents are used in gradient elution systems.

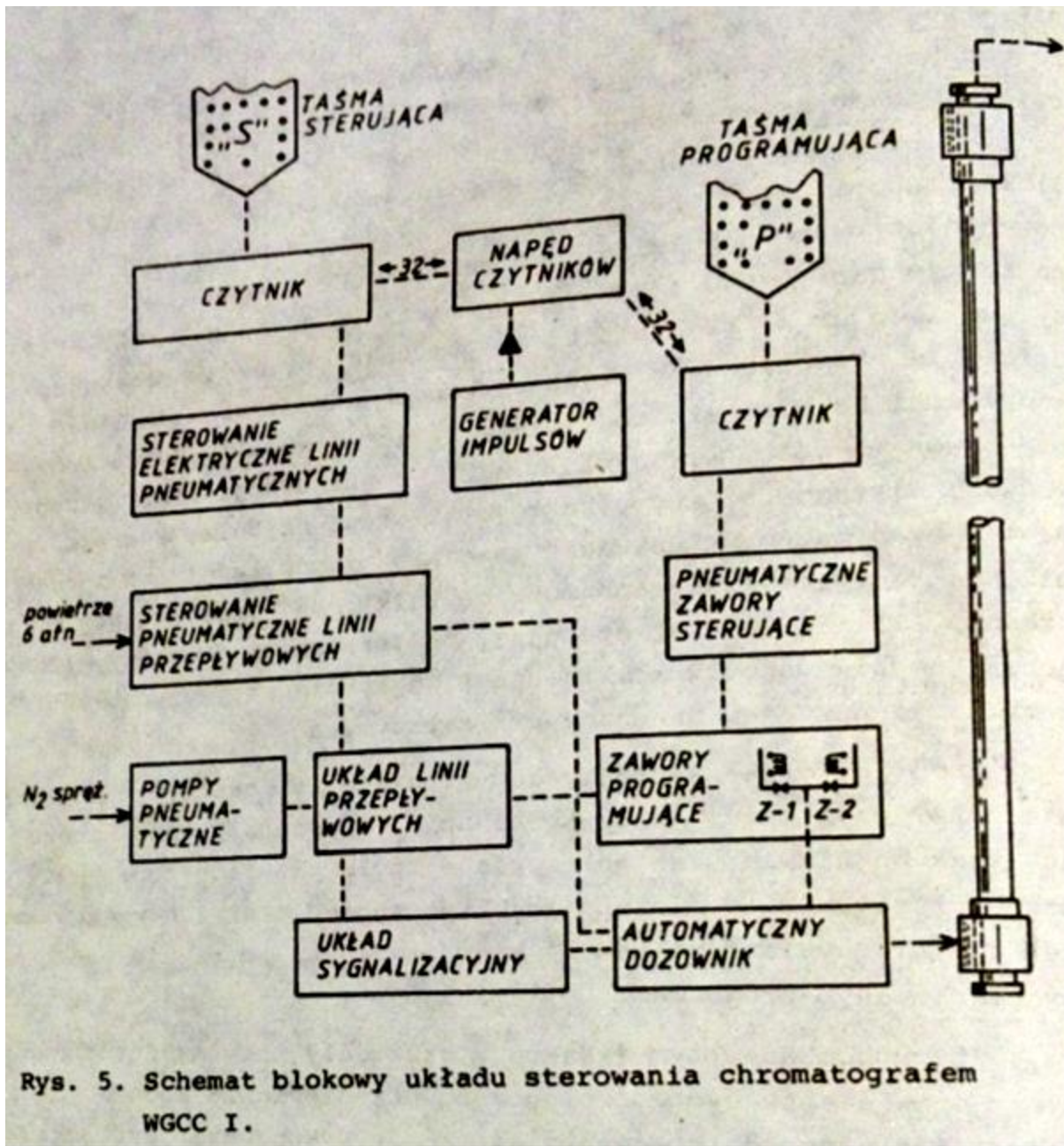
Any relatively non-volatile compounds may be detected with similar response factors. The limit of detection of LLSD is 22 nanograms; void volume: 0,1 - 0,2 microliters and time constant - below 0,5 s.

The FID, LLSD and a solvent programming systems of own design, were applied to the analysis of natural lipid mixtures.

The lipids of red blood cells were separated into 28 classes /FID/; the commercial soybean lecithine into 18 classes /LLSD/.

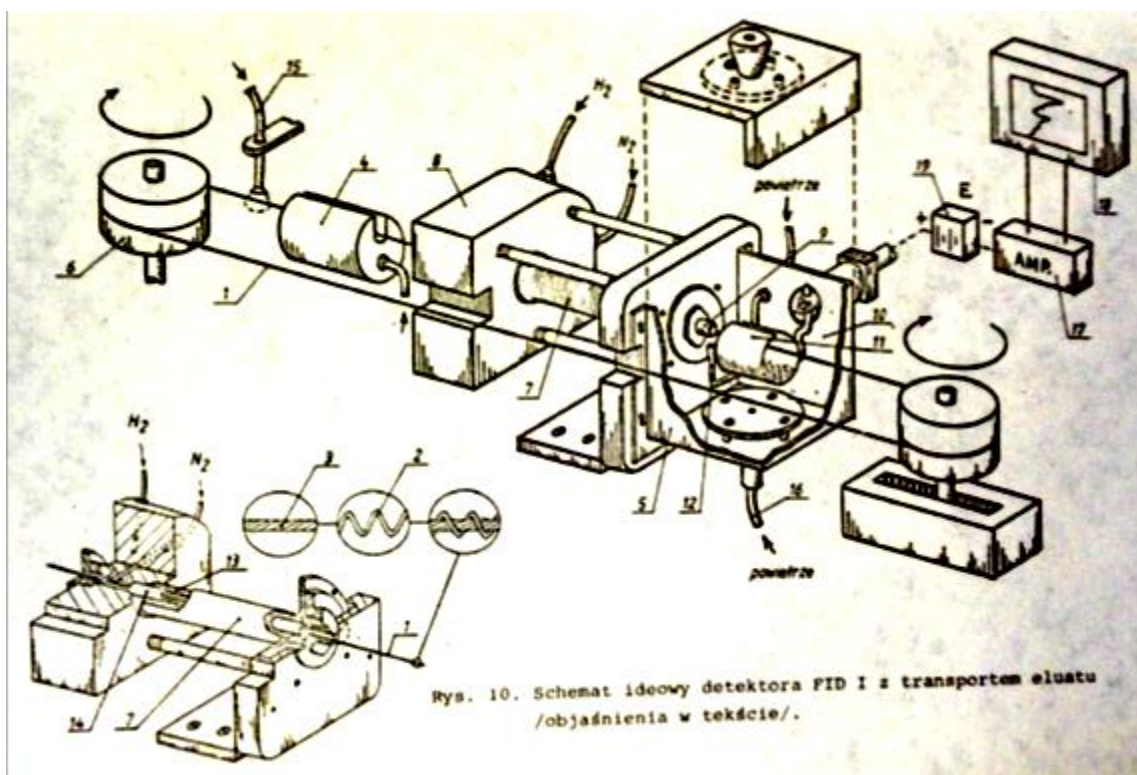
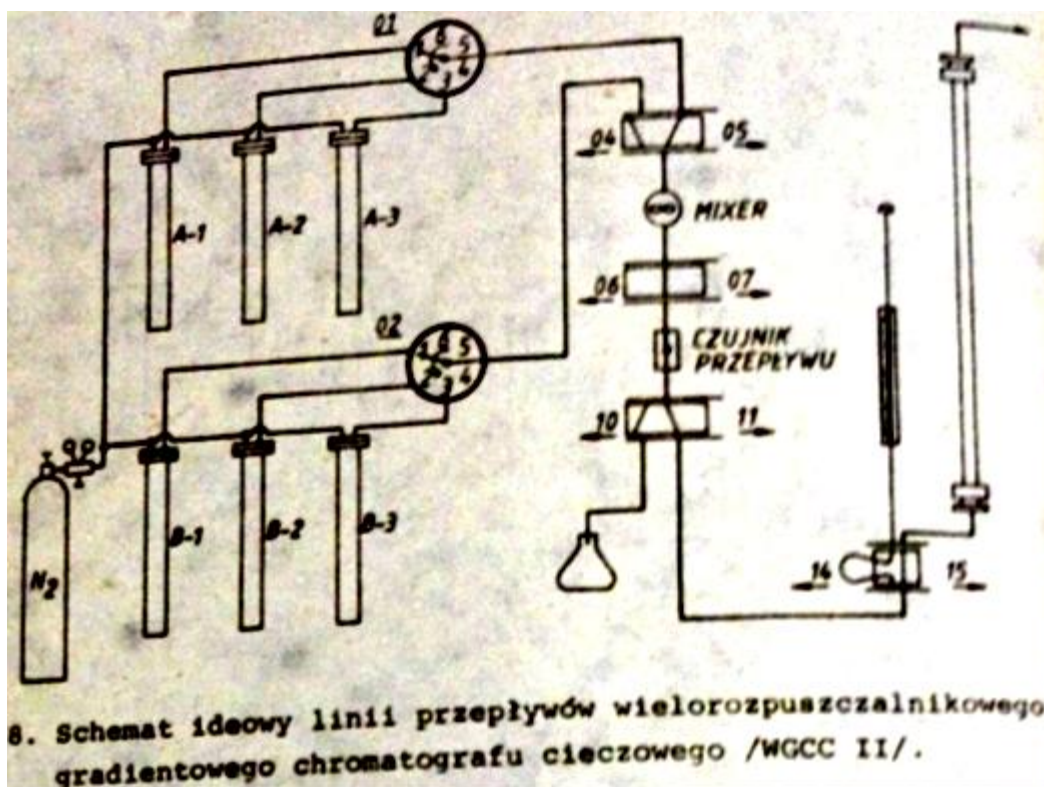
The properties of LLSD enabled several improvements in the separation, identification and quantitation of triacyloglycerols /TAG/. Wxamples of the analysis of TAG s with the use of LLSD of several natural oils and fats are described.

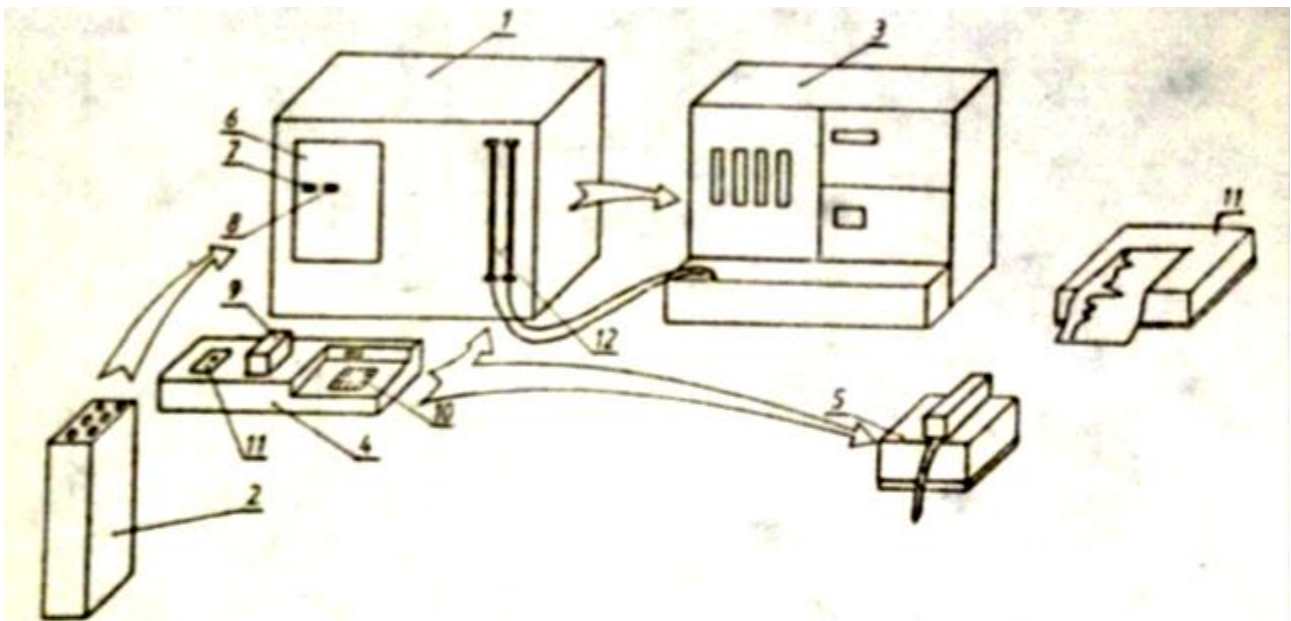




Rys. 5. Schemat blokowy układu sterowania chromatografem WGCC I.





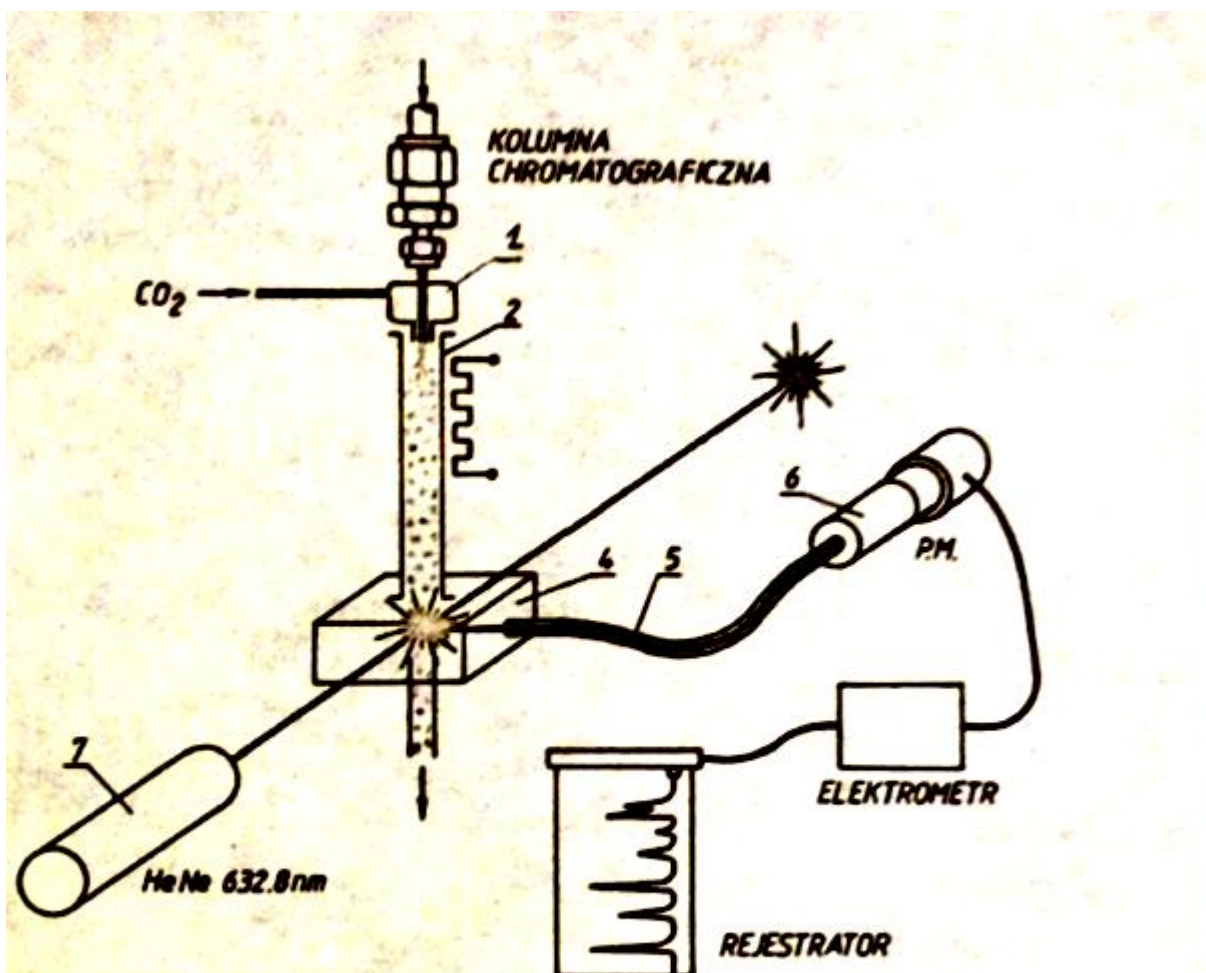


7. Wzajemne usytuowanie bloków funkcjonalnych wielorozpuszczalnikowego gradientowego chromatografu cieczonego /WGCC II/

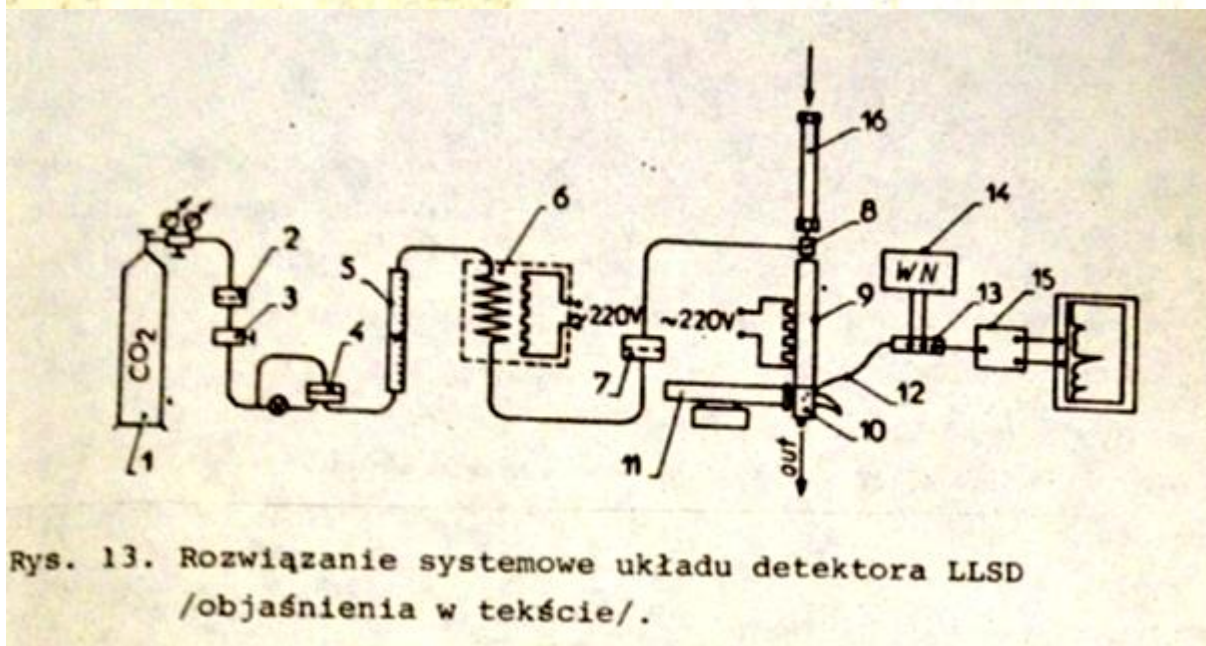
/1/ separator, /2/ zestaw ciśnieniowych zbiorników z rozpuszczalnikami, /3/ detektor płomieniowy jonizacyjny z transportem eluatu, /4/ pulpit sterowania chromatografem, /5/ perforator, /6/ tablica sygnalizacyjna, /7/ cyfrowy wskaźnik  $\%$  rozpuszczalnika polarnego B w fazie ruchomej, /8/ cyfrowy wskaźnik natężenia przepływu fazy ruchomej z rozdzielczością co  $0,01 \text{ cm}^3/\text{min.}$ , /9/ czytnik taśmy perforowanej, /10/ klawiatura kontaktowa do ręcznego sterowania chromatografem, /11/ drukarka z wydrukiem podstawy czasu analizy, natężenia przepływu fazy ruchomej i  $\%$  B w fazie ruchomej, /12/ kolumna chromatograficzna, /13/ rejestrator.

Schematy ideowe układów - bez-pompowego „wielorozpuszczalnikowego gradientowego” aparatu chromatograficznego z programowaniem składu eluentu, z wykorzystaniem proporcjonowania oraz pneumatycznego sterowania zaworami proporcjonującymi – wersja I-sza – WCC I / wersja II-ga - WCC II, a także, schemat ideowy płomieniowo – jonizacyjnego detektora LC-FID z transportem eluatu w formie linki bez końca – opracowania autorstwa S.P. prof. Andrzeja Stołyhwo.

Systems schematic diagrams - a non-pump "multi-solvent gradient" chromatography system with eluent composition programming, with the use of proportioning and pneumatic control of proportioning valves – 1<sup>st</sup> version - WCC I / 2<sup>nd</sup> version - WCC II, and also schematic diagram of flame- ionization LC-FID detector with eluate transport in the form of endless string - developed by prof. Andrzej Stołyhwo.



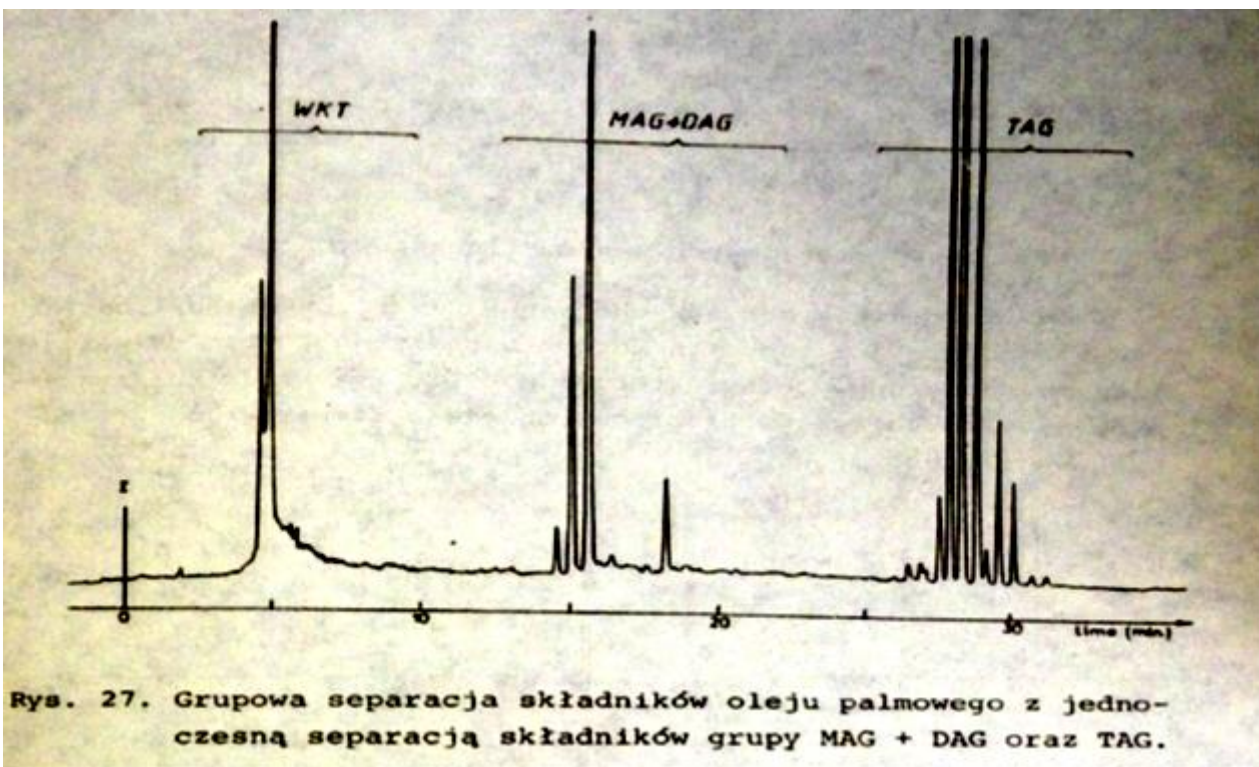
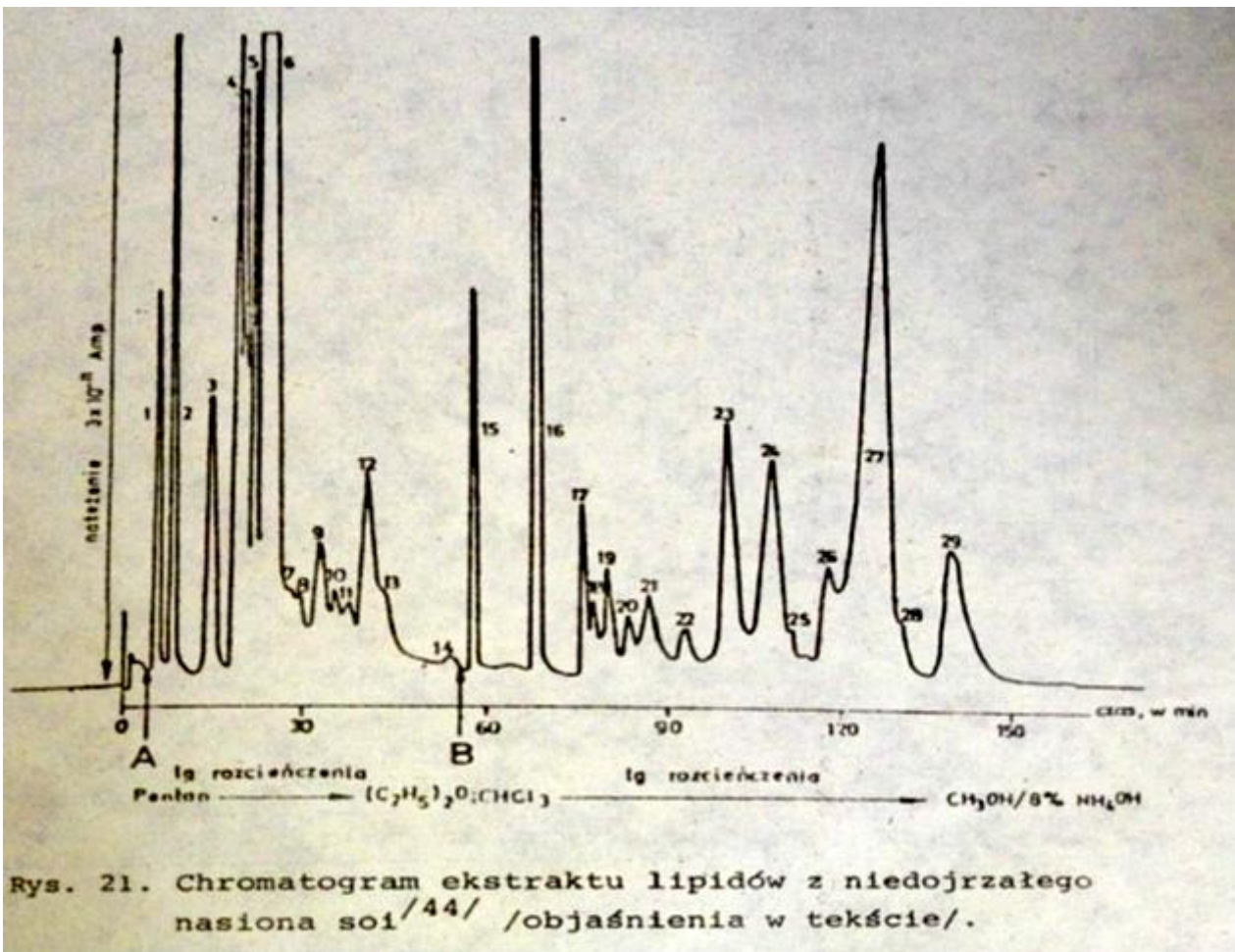
. Schemat ideowy bloku przetwornika pomiarowego LLSD /objaśnienia w tekście/.



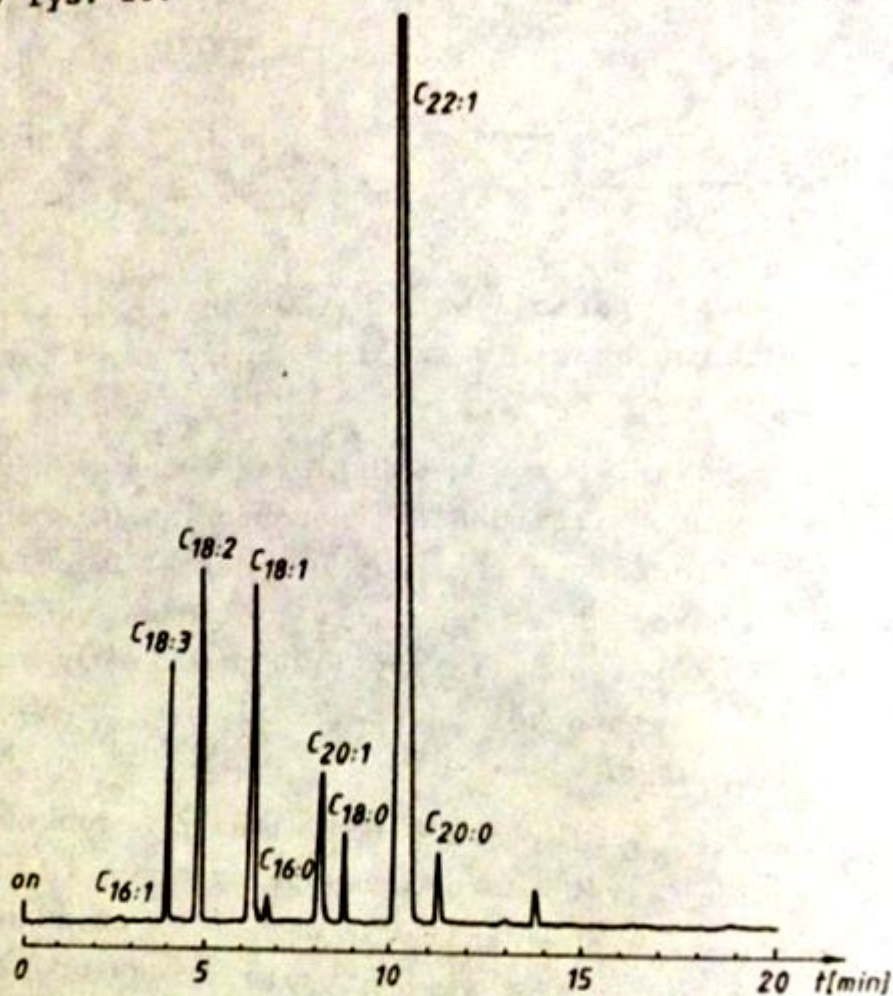
Rys. 13. Rozwiązanie systemowe układu detektora LLSD /objaśnienia w tekście/.

Ilustracje dotyczące odparowującego laserowego detektora rozproszenia światła (Evaporative Laser Light Scattering Detector – E-LLSD), opracowanego przez prof. Andrzeja Stołyhwo, we współpracy z jego Zespołem.

Illustrations concerning of Evaporative Laser Light Scattering Detector (E-LLSD), developed by prof. Andrzej Stołyhwo, in cooperation with his research group.



Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych jest od lat rutynowo opanowaną techniką chromatografii gazowej. W/w analizie można wykonywać także techniką HPLC. Przykład: analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego /wysokoerukowego/ rys. 28.



Rys. 28. Separacja estrów metylowych kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego /wysokoerukowego/.

Parametry separacji: ZGPM, LLSD, kolumna: 25 cm  $\varnothing$  2,2 mm., Lichrosorb RP-18 5  $\mu\text{m}$ ., faza ruchoma; 0,3 ml  $\text{min}^{-1}$  B - aceton,

Przykłady chromatogramów zamieszczonych w pracy habilitacyjnej prof. A Stołyhwo. Detekcja z zastosowaniem FID-LC oraz E-LLSD.

Examples of chromatograms presented in the habilitation - thesis of prof. A Stołyhwo. Detection using FID-LC and E-LLSD.