

**RÓŻNE OBLCZA WODNEJ FAZY RUCHOMEJ
W CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ**

**MISCELLANEOUS ASPECTS OF THE AQUEOUS
MOBILE PHASE IN LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Mikołaj Dembek, Szymon Bocian*

*Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki, Wydział Chemii Uniwersytet
Mikołaja Kopernika w Toruniu ul. Gagarina 7, 87-100
e-mail: bocian@chem.umk.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Właściwości wody w chromatografii cieczowej

2. Woda w stanie podkrytycznym

3. PALC – *Per Aqueous Liquid Chromatography*

4. Wykorzystanie wody w temperaturze pokojowej


Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Mgr inż. Mikołaj Dembek – w 2017 roku uzyskał tytuł zawodowy magistra chemii w Katedrze Chemii Materiałów, Adsorpcji i Katalizy Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W 2019 roku uzyskał tytuł zawodowy inżyniera materiałów współczesnych technologii w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Obecnie wykonuje doktorat w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky (promotor - dr hab. Szymon Bocian) o tematyce związanej z zastosowaniem czystej wody jako fazy ruchomej w technikach chromatografii cieczowej. Jest autorem 4 publikacji naukowych, w tym jedna w produkcji.




 <https://orcid.org/0000-0002-2222-0421>



Dr hab. Szymon Bocian, prof. UMK – w 2011 roku uzyskał stopień doktora nauk chemicznych (promotor- prof. dr hab. Bogusław Buszewski) a w 2016 roku uzyskał stopień doktora habilitowanego. Rozprawa habilitacyjna została nagrodzona przez Komitet Chemii Analitycznej PAN. Obecnie pracuje jako profesor uniwersytetu w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Jest laureatem Stypendium "Start" Fundacji na rzecz Nauki Polskiej oraz Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców. Autor 64 publikacji z zakresu chromatografii cieczowej, syntezy faz

stacjonarnych do chromatografii cieczowej i opisu zjawisk powierzchniowych zachodzących w układzie chromatograficznym.



 <https://orcid.org/0000-0003-3936-447X>

ABSTRACT

Nowadays analytical chemistry, and especially chromatographic techniques, are becoming more and more popular, for example in the pharmaceutical industry [1]. Due to the increasing number of analyses, the amount of chromatographic waste is also increasing. They are harmful and toxic both to the environment and to humans. Therefore, there is a need to search for new solutions, apparatus and materials to achieve the so-called "green chromatography" [1]. Such a goal can be achieved by various methods. The most popular are miniaturization of analyses to reduce the amount of waste, reduction of analysis time, replacement of solvents with biodegradable ones, or application of aquatic conditions of analysis [2]. The following paper deals with the issue of using only water as a mobile phase for analysis in liquid chromatography. This mainly involves the use of appropriate conditions, materials and equipment. A change in the conditions of the analysis affects, first of all, the changes in the properties of water which is a mobile phase. When the temperature increases dielectric constant, viscosity and polarity of the water decreases. Optimizing these properties can allow successful separation using only water as a mobile phase [3, 4]. The following article also deals with the issue of the relatively new PALC [5] (*per aqueous liquid chromatography*) technique (see Fig. 3) and the analysis with the use of pure water as an eluent at room temperature, thanks to the use of polar-embedded and polar-endcapped stationary phases [6]. The latter technique is the most desirable, because it does not require the application of unusual conditions of chromatographic analysis, and at the same time fits perfectly into the assumptions of "green chromatography". The promising results of these techniques give a forward-looking view of liquid chromatography as an environmentally friendly technique.

Keywords: liquid chromatography, pure water, *per aqueous liquid chromatography*, polar-embedded stationary phases

Słowa kluczowe: chromatografia cieczowe, czysta woda, wodna chromatografia cieczowa, fazy stacjonarne z wbudowanymi grupami polarnymi

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACN	– acetonitryl
ANP LC	– chromatografia cieczowa w normalnym układzie faz z wykorzystaniem wody (ang. <i>aqueous normal phase liquid chromatography</i>)
HILIC	– chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych (ang. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>)
HTLC	– wysokotemperaturowa chromatografia cieczowa (ang. <i>high-temperature liquid chromatography</i>)
ODS	– krzemionka z dołączonymi oktadecylowymi łańcuchami alkilowymi (ang. <i>octadecyl silica</i>)
PALC	– wodna chromatografia cieczowa (ang. <i>per aqueous liquid chromatography</i>)
PHW-LC	– chromatografia cieczowa z wykorzystaniem gorącej wody pod ciśnieniem (ang. <i>pressurized hot water liquid chromatography</i>)
PIPAAm	– poli(N-izopropylakryloamid)
PS-DVB	– polistyren-diwinylbenzen
RP LC	– chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz (ang. <i>reversed phase liquid chromatography</i>)
SBWC	– chromatografia z wykorzystaniem wody w stanie podkrytycznym (ang. <i>subcritical water chromatography</i>)
SHWC	– chromatografia z wykorzystaniem przegrzanej wody (ang. <i>superheated water chromatography</i>)
WRP-LC	– chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz w warunkach tylko wodnych (ang. <i>water-only reversed phase liquid chromatography</i>)

WPROWADZENIE

W ostatnich latach coraz mocniej wzrasta zainteresowanie i nacisk na ekologiczność życia, a w tym również procesów produkcji, wykorzystania materiałów oraz usuwania odpadów. Wiąże się to bezpośrednio z większą świadomością ludzi w zakresie dbania o środowisko. W naukach chemicznych spowodowało to powstanie nowej poddziedziny jaką jest „zielona chemia”. Sformułowanie to zostało użyte po raz pierwszy w 1999 roku przez Anastas’a [7]. "Zielona chemia" skupia się przede wszystkim na opracowaniu procesów, materiałów, narzędzi oraz utylizacji odpadów, tak aby miały one jak najmniej szkodliwy wpływ na środowisko naturalne oraz na zdrowie ludzi. Działania głównie kierunkują się w stronę poprawienia gospodarki procesowej, redukcję lub eliminację ilości produkowanych odpadów, a także ograniczenie ryzyka i zagrożeń w wielkoskalowych procesach przemysłowych, gdyż te mają największy wpływ na środowisko [1]. Zmniejszenie ilości odpadów wiąże się również z chemią analityczną, w tym z odpowiednim przygotowaniem próbek oraz wykonywaniem analiz chromatograficznych [8].

Opracowanie procesów i produktów jak najbardziej przyjaznych dla środowiska może odbywać się z zachowaniem tzw. 12 zasad zielonej chemii [9]. Skupiają się one przede wszystkim na wdrażaniu produktów i procesów jak najbardziej „zielonych”. Jak w większości procesów wieloparametrowych muszą być podejmowane decyzje i kompromisy, tak, aby jak najlepiej dostosować te działania do możliwości i okoliczności procesów.

Ze względu na powszechność technik chromatograficznych w analizach chemicznych wyłoniła się również poddziedzina „zielonej chemii” jaką jest „zielona chromatografia”. Główne założenia wprowadzane w ramach jej zasad to:

- redukcja ilości zużywanych rozpuszczalników organicznych w analizach,
- wprowadzenie czystej wody jako jedynego składnika fazy ruchomej,
- stosowanie ekologicznych, biodegradowalnych rozpuszczalników [2].

Rozpuszczalniki powszechnie stosowane w chromatografii cieczonej w odwróconym układzie faz, takie jak acetonitryl, metanol, izopropanol, tetrahydrofuran oraz dodatki tj. kwas trifluorooctowy, który jest wysoce ekotoksyczny i powoli rozkłada się w środowisku, są głównym źródłem powstawania szkodliwych odpadów. Biorąc pod uwagę „zieloną chromatografię”, należy je zastąpić alternatywnymi, przyjaznymi dla środowiska zamiennikami. Dlatego ważne jest znalezienie technik chromatograficznych, w których wyżej wymienione rozpuszczalniki są zastępowane mniej toksycznymi, takimi jak na przykład etanol [10] (etanol przypisywany jest do rozpuszczalników "zielonych" ze względu na jego niską toksyczność i ewentualną syntezę ze źródeł odnawialnych, ale głównie dlatego, że jego obecność w przyrodzie ma niewielki wpływ na środowisko), woda [11, 12], woda w stanie podkrytycznym [3, 4], czy ciekły dwutlenek węgla [13].

1. WŁAŚCIWOŚCI WODY W CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

Woda w chromatografii cieczowej wykorzystywana jest w bardzo wysokich ciśnieniach oraz przy stałym przepływie przez ściśle upakowaną w kolumnie fazę stacjonarną. Wpływa to na szereg zmian w jej właściwościach, a co za tym idzie, na zmiany w jej oddziaływaniach z fazą stacjonarną i analitami. Ze względu na wieloparametrowość analiz chromatografii cieczowej, czyli zmiany w ciśnieniu, prędkości przepływu, temperaturze analizy oraz polarności fazy ruchomej i fazy stacjonarnej, a także rozpuszczalności i polarności analitów, każdy z tych parametrów w mniej lub bardziej znaczący sposób wpływa na właściwości wody. Dzięki znajomości tych zmian można w odpowiedni sposób optymalizować właściwości wody w zależności od potrzeb. Mimo, iż takie działania są wykonalne, rzadko są praktykowane ze względu na zbyt dużą ilość czynników [3, 4].

Optymalizacja właściwości fazy ruchomej bazuje przede wszystkim na wpływie na retencję, sprawność oraz rozdzielczość podczas analizy. Podstawowym sposobem wpływania na zmiany we właściwościach fazy ruchomej jest dodatek do wody modyfikatora organicznego. Wpływa to przede wszystkim na polarność fazy ruchomej, dzięki czemu, dobierając odpowiedni skład, możemy dopracowywać metodę rozdzielania. Jednakże założenia „zielonej chromatografii” dążą do redukcji lub całkowitej eliminacji rozpuszczalników organicznych w analizach chromatograficznych. Jednym z wyżej już wymienionych działań jest wykorzystanie czystej wody jako jedyne składnika fazy ruchomej w chromatografii cieczowej. Poprzez operowanie takimi parametrami jak temperatura czy polarność fazy stacjonarnej możliwe jest przeprowadzanie analiz w czystej wodzie [2–4].

W standardowo prowadzonych warunkach rozdzieleń chromatograficznych w układzie odwróconych faz chromatografii cieczowej RP LC (ang. *Reversed Phase Liquid Chromatography*), czy chromatografii cieczowej oddziaływań hydrofilowych HILIC (ang. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*), woda jest zbyt polarnym rozpuszczalnikiem, aby mogła być stosowana samodzielnie jako eluent. Jednakże prowadzenie analiz w warunkach podwyższonej temperatury znacząco wpływa na właściwości wody. Taka technika bazuje na wykorzystaniu czystej wody w stanie podkrytycznym, czyli poniżej 374°C i 218 atm. [14–17].

W ostatnich latach, stosunkowo nową techniką jest PALC (ang. *Per Aqueous Liquid Chromatography*), która w dużej mierze bazuje na technice HILIC. W podstawach zakłada ona, iż w wysoce wodnych, a więc w polarnych warunkach hydrofilowa powierzchnia krzemionki, w wyniku zwiększonej aktywności grup siloksanowych, zmienia swój charakter na mniej polarny. Dzięki temu istnieje możliwość rozdzielania szeregu związków polarnych przy zastosowaniu wysokiej

zawartości wody (powyżej 90%) w fazie ruchomej lub całkowicie wodnych warunków [5, 18–20].

Ostatnim opisanym w tym artykule podejściem do osiągnięcia „zielonej chromatografii” poprzez zastosowanie czystej wody w chromatografii cieczowej jest wykorzystanie odpowiednio przygotowanych faz stacjonarnych pozwalających na rozdzielanie substancji zarówno polarnych jak i niepolarnych. Fazy stacjonarne z wbudowanymi grupami polarnymi (ang. *polar-embedded*) oraz z grupami polarnymi dołączonymi na etapie wtórnej silanizacji (ang. *polar-endcapped*), pozwalają na osiągnięcie mieszanego mechanizmu retencji. Jest to swoistego rodzaju udoskonalenie faz oktadecylowych (ODS – ang. *octadecylsilica*, C18), będących fazami niepolarnymi, poprzez wprowadzenie polarnych grup funkcyjnych. Sprawia to, iż na poziomie retencji analitu, w zależności od jego polarności, oddziałuje on z częścią polarną lub niepolarną związanej fazy stacjonarnej. Równocześnie poprawia to zwilżalność powierzchni fazy stacjonarnej przy stosowaniu czystej wody jako fazy ruchomej [21].

2. WODA W STANIE PODKRYTYCZNYM

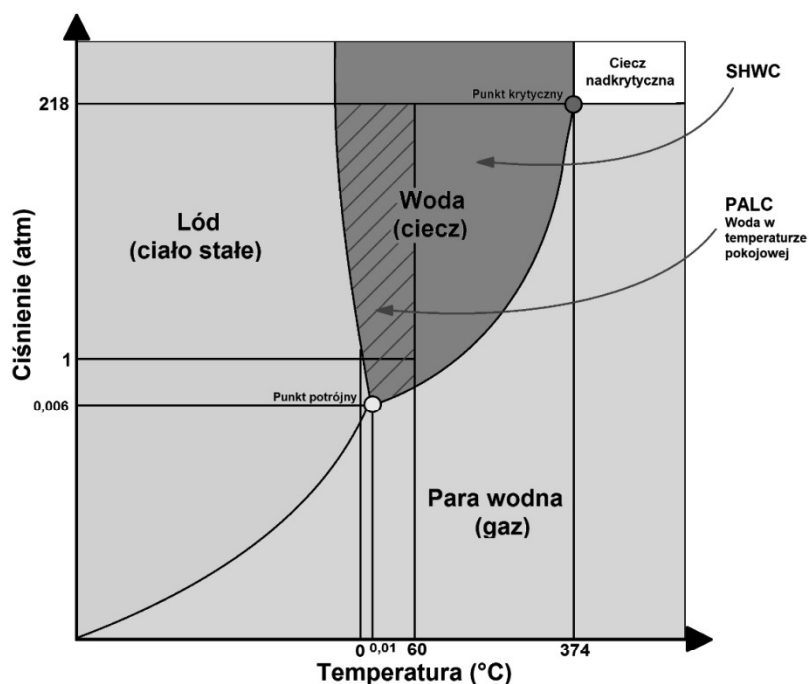
Stosowanie tak silnie polarnego rozpuszczalnika jakim jest woda jako jedyne eluentu podczas analiz chromatograficznych może prowadzić do uzyskiwania zbyt długich czasów retencji (w przypadku układu RP LC) lub zbyt krótkich, wiążących się jednocześnie z bardzo małą rozdzielczością (w przypadku układu HILIC). Dobór odpowiednich warunków analizy może pozwolić na ominięcie tego problemu. Woda w podwyższonej temperaturze posiada znacząco inne właściwości, niż woda w temperaturze bliskiej temperaturze pokojowej [4].

Wysoka temperatura okazuje się być pojęciem nie do końca zdefiniowanym. Zazwyczaj dla wody określana jest jako „wyższa niż temperatura pokojowa” oraz „wyższa niż temperatura wrzenia jednego ze składników fazy ruchomej”, jednakże można się spotkać w literaturze z bardziej dokładnymi określeniami, takimi jak „wyższa niż 100°C”, czy też „w zakresie 40°C do 200°C” [14, 22]. Zainteresowanie związane z temperaturą jako kluczowym parametrem w chromatografii cieczowej jest wciąż niewielkie i nie pojawiają się w rutynowej pracy laboratoryjnej. Ograniczeniem tych technik może być brak dostępnych na rynku urządzeń, takich jak termostaty kolumn do chromatografów cieczowych, które mogą osiągać i utrzymywać wysoką temperaturę (do 200°C) oraz ograniczona ilość stabilnych termicznie faz stacjonarnych, np. PRP-1 [23], PS-DVB [24]. Mimo to, w ostatnich dwóch dekadach temat ten cieszył się coraz większym zainteresowaniem, co można zaobserwować w kilku opublikowanych pracach przeglądowych [3, 4, 14, 15, 22, 25–28]. Duże spektrum parametrów fizykochemicznych, na które wpływa

temperatura, może wpływać zniechęcająco dla analityków. Często wspomniany jest jedynie wpływ temperatury na spadek lepkości fazy ruchomej. Inne ważne efekty, takie jak spadek siły elucyjnej względem analitów polarnych, wzrost dyfuzji oraz zmiana selektywności i stopnia dysocjacji związków jonowych często nie są brane pod uwagę. Prowadzi to do zmiany wniosków dotyczących manipulowania temperaturą jako parametrem, iż rzeczywiste zalety i wady analizy wysokotemperaturowej nie są całkowicie poznane [14].

Woda w stanie podkrytycznym posiada temperaturę i ciśnienie nieprzekraczające punktu krytycznego, czyli 374°C i 218 atm. [16]. Diagram fazowy wody został zamieszczony na Rysunku 1. Operując wodą w podwyższonej temperaturze, należy zapewnić odpowiednie ciśnienie, tak aby znajdowała się ona w stanie ciekłym. Techniki chromatograficzne wykorzystujące taką fazę ruchomą nie mają jednolicie uściślonej nazwy, a w literaturze pojawia się wiele określeń, między innymi "*Subcritical Water Chromatography*" (SBWC), "*Chromatography in very hot water*", "*Superheated Water Chromatography*" (SHWC) [14], "*High Temperature Liquid Chromatography*" (HTLC), czy "*Pressurized Hot Water Liquid Chromatography*" (PHW-LC) [15, 16]. W polskiej literaturze nie spotkamy się z innym określeniem niż wysokotemperaturowa chromatografia cieczowa, czy chromatografia wodna w stanie podkrytycznym, jednakże nie będziemy podejmować się tłumaczenia powyższych określeń, gdyż w większości odnoszą się one do tych samych warunków, czyli użycia wodnej fazy ruchomej znajdującej się w podwyższonej temperaturze i ciśnieniu, nie przekraczającym punktu krytycznego.

Czysta woda może być użyta jako jedyny eluent w wysokotemperaturowej chromatografii cieczowej głównie ze względu na zmianę jej względnej przenikalności elektrycznej (daw. stałej dielektrycznej) wraz z temperaturą. Przy zmianie temperatury z 25°C do 200°C, względna przenikalność elektryczna wody spada z 85 do 35 (Rys. 2). Sprawia to, iż woda zaczyna zachowywać się jak rozpuszczalnik organiczny. Dzięki temu woda może stać się niezwykle skutecznym rozpuszczalnikiem dla substancji organicznych o niskiej polarności [29]. Pozwala to również na prowadzenie analiz chromatograficznych w całkowicie "zielonych" warunkach dla stabilnych termicznie analitów i faz stacjonarnych [22].

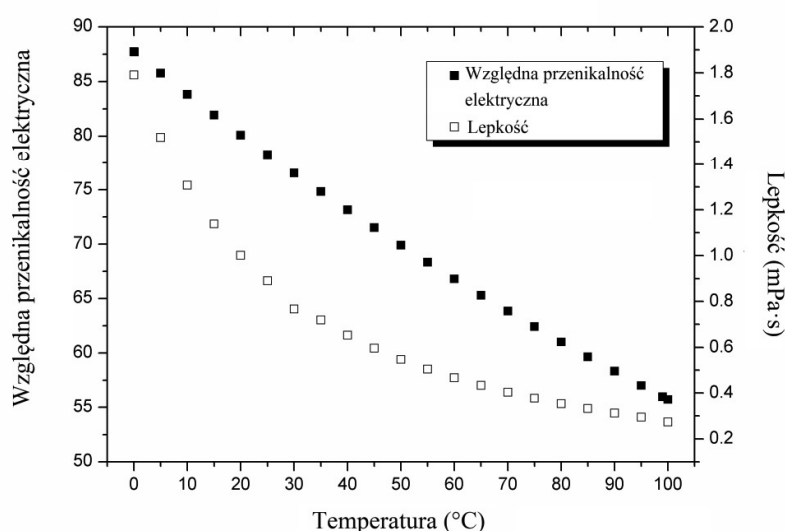


Rysunek 1. Diagram fazowy wody pozwalający na odczytanie wartości punkty potrójnego i krytycznego. Umieszczone zostały również zakresy temperatury i ciśnienia dla omawianych w tym artykule technik

Figure 1. Water phase diagram allowing to read triple point and critical point. There can be seen also temperature and pressure ranges for all of the techniques discussed in this article

W temperaturze pokojowej, w typowych układach chromatograficznych, woda jest zbyt polarna, aby mogła być efektywnym eluentem. Jednak wraz ze wzrostem temperatury można zaobserwować drastyczny spadek polarności wody. Wysoka wartość temperatury w punkcie krytycznym wody pozwala na wybór szerokiego spektrum wartości temperatury i ciśnienia do prowadzenia analiz. Tak unikalne właściwości wody w stanie podkrytycznym zapewniają zatem łatwo dostrajane parametry, takie jak względna przenikalność elektryczna, napięcie powierzchniowe i lepkość, które zmniejszają się wraz ze wzrostem temperatury wody. Nie oznacza to jednak, że rozpuszczalniki są optymalizowane względem jednego parametru, np. względnej przenikalności elektrycznej, ponieważ ten pojedynczy parametr nie wpływa ani na selektywność, ani na siłę elucyjną. Konieczne jest uwzględnienie wszystkich zmieniających się parametrów wraz ze zmianą temperatury fazy

ruchowej, jak również ich tendencji do zmiany - zwiększenia lub zmniejszenia. Ciśnienie ma niewielki wpływ na te parametry, dopóki woda pozostaje w fazie ciekłej. W ten sposób woda w stanie podkrytycznym może imitować tradycyjne rozdzielanie w układzie RP LC z rozpuszczalnikami organicznymi jako modyfikatorami. Dodatkowo stała dysocjacji wody wzrasta o trzy rzędy wielkości przy podwyższeniu temperatury z 25°C do 250°C. Dalszy wzrost temperatury powoduje spadek stałej dysocjacji [22].



Rysunek 2. Przedstawienie zmiany względnej przenikalności elektrycznej oraz lepkości wody od temperatury. W obu przypadkach można zaobserwować spadek tych właściwości

Figure 2. Presentation of the change in dielectric constant and viscosity of water against temperature. In both cases, a decrease in these properties can be observed

Zmiana temperatury analizy może zastąpić zmianę stężenia rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej lub całkowicie go wyeliminować. Bowermaster i McNair [30] stwierdzili, że zmiana stężenia metanolu o 1% odpowiada zmianie temperatury o 3,75°C. Chen i Horváth [31] stwierdzili podobny efekt w przypadku acetonitrylu. Wzrost ACN (acetonitrylu) o 1% odpowiada wzrostowi temperatury o 5°C. Podobne wyniki uzyskał Tran i współ. [32]. Kondo i Yang [23], którzy przeprowadzili serię doświadczeń, w których wykazano, że zmiana temperatury odpowiada zmianie stężenia danego rozpuszczalnika organicznego w zależności od warunków i zastosowanej kolumny. Przykładowo, wzrost temperatury o 3,5°C odpowiada około 1% wzrostowi stężenia metanolu w fazie ruchomej metanol-woda, gdy zastosowano fazę na nośniku polistyren-diwinylbenzen (Hamilton PRP-1). Zmiana temperatury pomiędzy 5°C a 8°C była podobna do zmiany stężenia

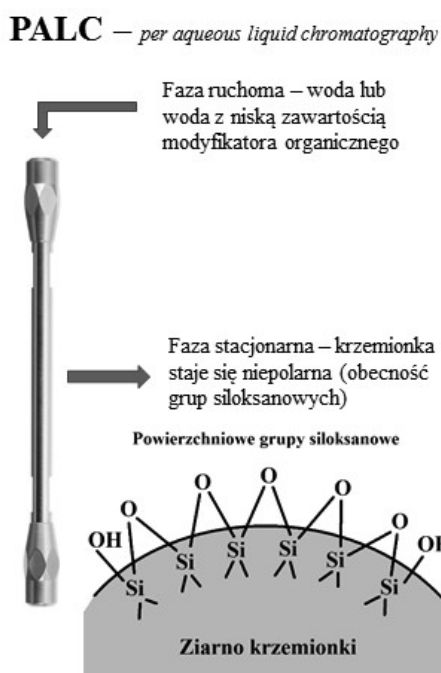
acetonitrylu o 1% w mieszaninie acetonitryl-woda. Jednak zastosowanie kolumny Zorbax RX-C18 daje wzrost stężenia metanolu o 1% równoważny wzrostowi temperatury o 2°C, natomiast taka sama zmiana stężenia acetonitrylu odpowiada wzrostowi temperatury o 3°C. W powyższym doświadczeniu porównano czas retencji trzech związków: pirogalolu, rezorcyny i katecholu [23].

Chociaż w przypadku SBWC nie poznano pełnego zakresu zastosowań i możliwości, technika ta powinna działać w odniesieniu do substancji o pełnym spektrum polarności. W niskich temperaturach analizy technika ta sprawdza się dla związków polarnych, dla umiarkowanie polarnych substancji w średnich temperaturach i dla substancji niepolarnych w wysokich temperaturach, jeśli faza stacjonarna jest stabilna w tym zakresie temperatur. Podział ten jest związany również z wpływem temperatury na adsorpcję analitu. Adsorpcja analitów jest redukowana wraz ze wzrostem temperatury, ale zmiana ta zależy od ich polaryzacji. Jednocześnie zmniejsza się również lepkość wody. Niższa lepkość fazy ruchomej spowodowana podwyższoną temperaturą daje niskie ciśnienie zwrotne, co pozwala na wykonanie rozdzielania techniką SBWC przy znacznie wyższym przepływie. Dzięki temu można uzyskać krótszy czas rozdzielania, anality będą mniej narażone na wysoką temperaturę, dzięki czemu zminimalizuje to degradację analitów. Dlatego degradacja analitów nie stanowi większego problemu przy zastosowaniu technik separacji w SBWC dla substancji o niskiej masie cząsteczkowej [22].

Pionierami w rozdzielaniu przy użyciu techniki SBWC byli Smith i Burgess, którzy przeprowadzili badania wykorzystując wodę podgrzaną do temperatury 210°C w celu rozdzielania serii fenoli, parabenów i barbituranów na fazie polistyrenowo-diwinylbenzenowej (PS-DVB) [33]. Wykazano, że współczynniki retencji systematycznie zmniejszają się wraz ze wzrostem temperatury. Przeprowadzono również porównanie rozdzielania z wykorzystaniem przegrzanej wody z konwencjonalnymi warunkami chromatografii w odwróconym układzie faz. Jako odpowiednik wody o temperaturze 180°C zastosowano mieszaninę acetonitryl-woda w stosunku 20:80. Rozdzielenia przeprowadzono w celu wykazania, że woda w warunkach podkrytycznych może być wykorzystywana do analizy serii związków charakteryzujących się szerokim zakresem polarności. Nie obserwowano utleniania i degradacji rozpuszczalników i fazy oraz hydrolizy grupy estrowej. W tych warunkach stwierdzono niskie ciśnienie zwrotne, około 15 barów. Podsumowując, autorzy stwierdzają, iż porównanie konwencjonalnej chromatografii w odwróconym układzie faz oraz wykorzystanie przegrzanej wody jako jedynego eluentu fazy ruchomej potwierdza, że SHWC oferuje dobrą rozdzielczość i pozwala na otrzymanie krótszych czasów analizy [33]. Bez wątplenia jest też procesem bardziej ekologicznym ze względu na wyeliminowanie rozpuszczalników organicznych.

3. PALC – *PER AQUEOUS LIQUID CHROMATOGRAPHY*

Chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych pozwala na rozdzielenie głównie związków polarnych. Obecnie najczęściej stosowanym modyfikatorem organicznym w analizach HILIC jest acetonitryl a najprostszą fazą stacjonarną jest niemodyfikowana krzemionka. Podobny układ stanowi ANP LC, czyli normalny układ faz z zastosowaniem wody jako składnika fazy ruchomej. Wpływ obecności wody w fazie ruchomej na kolumny krzemionkowo-wodorkowe z wykorzystaniem techniki ANP LC (ang. *Aqueous Normal Phase Liquid Chromatography*) został opisany po raz pierwszy przez Pesek'a i współ. [34, 35]. Badania Bidlingmeyera były pierwszymi, w których czysta krzemionka była wykorzystywana do oddzielania amin w HILIC, a także badano zastosowanie fazy ruchomej z dużą zawartością wody [36]. Badania udowodniły, że przy dużej zawartości wody krzemionka staje się niepolarna ponieważ grupy siloksanowe, zwiększając swoją aktywność, przyczyniając się do hydrofobowego charakteru powierzchni krzemionki [37] (Rys. 3) Hydrofilowy charakter przypisuje się wolnym silanolom, które w zależności od pH mogą ulegać dysocjacji.



Rysunek 3. Przedstawienie warunków pracy dla techniki PALC wraz z zobrazowaniem grup siloksanowych występujących na powierzchni krzemionki

Figure 3. Presentation of conditions of work for PALC technique together with visualization of siloxane groups occurring on the surface of silica

Zastosowanie czystej wody sprawia, że polarna krzemionka w HILIC nabiera charakteru niepolarnego. Użycie terminu "odwrócony HILIC" sugeruje zastosowanie techniki RP LC. Dlatego też dos Santos Pereira i współ. wprowadzili nową nazwę, *per aqueous liquid chromatography* (PALC), aby odróżnić tę metodę od HILIC, RP LC i ANP LC [5]. Początkowo wykorzystywano dwie sprzężone kolumny Zorbax-Rx-SIL do oznaczania aminokwasów w cieczach biologicznych. Wyznaczono krzywe czasów retencji w funkcji stężenia ACN, na którym wykazano, iż po spadku czasu retencji związanym ze zmniejszaniem się zawartości ACN można następnie zaobserwować wzrost czasów retencji z istotnymi zmianami w selektywności. Wykazano również, że rozdzielenie amin katecholowych, które nie powiodło się w standardowym HILIC [18], zostało przeprowadzone z powodzeniem przy użyciu PALC otrzymując doskonały kształt piku i wysoką sprawność [38, 39].

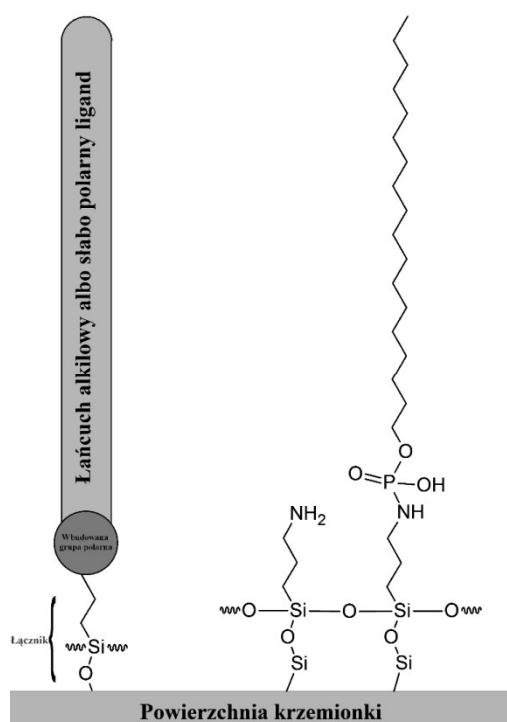
W kolejnych latach badano technikę PALC dla różnych faz stacjonarnych, polarnych analitów i dodatków jonowych do fazy ruchomej. Wykonano między innymi analizy przy użyciu faz modyfikowanych polisacharydami [19], nanocząstkami węgla [20] oraz nadal stosując czystą krzemionkę (Zorbax-Rx-SIL) [40]. Analizy PALC są również wykorzystywane jako uzupełnienie analiz RP-LC, głównie ze względu na ich pozytywne aspekty środowiskowe i ekonomiczne. Kolumna krzemionkowa z dołączonymi cząsteczkami czerwieni Congo (Sil-CR) została wykorzystana do oznaczenia czterech rodzajów amin biogennych oraz pięciu zasad i nukleotydów [41]. Wyniki wykazały, że analiza PALC w tym przypadku daje lepsze rozdzielanie niż zastosowanie techniki HILIC, w której stosuje się wysokie stężenia acetonitrylu.

Metoda PALC jest stosunkowo nową techniką, obejmującą ostatnią dekadę. Jej rozwój obserwuje się jednak głównie w kontekście techniki analitycznej konkurującej z HILIC, a także ze względu na jej zalety ekonomiczne i ekologiczne. Badania nad syntezą nowych faz stacjonarnych stosowanych w PALC oraz rozdzielanie grup związków polarnych i hydrofilowych będą najprawdopodobniej głównym nurtem kierującym rozwój tej metodyki.

4. WYKORZYSTANIE WODY W TEMPERATURZE POKOJOWEJ

Zastosowanie w pełni wodnej fazy ruchomej w temperaturze pokojowej jest najkorzystniejszą formą, jeśli chodzi o przyjazną dla środowiska chromatografię cieczową. W przybliżeniu warunki otoczenia są rozumiane jako analizy wykonywane w temperaturach poniżej 60 °C. Zaproponowano nową podkategorie dla takich analiz –wodna chromatografia cieczowa z w odwróconym układzie faz (WRP-LC – ang. *Water-only Reversed Phase Liquid Chromatography*) [42].

Badania nad rozdzielaniem w takich warunkach prowadzone są już od ponad trzech dekad [43]. Zadowalające wyniki osiągnięto przede wszystkim dzięki zastosowaniu modyfikacji powierzchni krzemionki, np. poprzez dołączanie do nośnika krótszych łańcuchów alkilowych o charakterze hydrofobowym (C-8). W późniejszych badaniach potwierdzono jednak, że wysoce polarna faza ruchoma sprzyja dużej aktywności powierzchniowych silanoli, które wpływają na mechanizm rozdzielania. Zastosowanie krótkich łańcuchów alkilowych (do 4 atomów węgla) pozwala na uzyskanie stabilnych faz stacjonarnych ze względu na ich dużą gęstość pokrycia na powierzchni nośnika. Przyłączenie dłuższych łańcuchów powoduje zmniejszenie gęstości pokrycia, a przy niskiej zawartości rozpuszczalnika organicznego (poniżej 5-10%), następuje spadek solwatacji fazy i powoduje tendencję opadania związanych ligandów do powierzchni nośnika fazy stacjonarnej [44, 45].



Rysunek 4. Schematyczne przedstawienie budowy faz stacjonarnych z wbudowanymi grupami polarnymi. Zamieszczona jest również przykładowa budowa fazy Amino-P-C18 [46]
 Figure 4. Schematic representation of the structure of polar-embedded stationary phase. An example of the Amino-P-C18 phase structure is also included [46]

W celu zmniejszenia wpływu wolnych silanoli na retencję stosowane są fazy stacjonarne z wbudowanymi grupami polarnymi oraz fazy stacjonarne z dołączonymi grupami polarnymi na etapie wtórnej silanizacji. Fazy stacjonarne z wbudowanymi grupami polarnymi na etapie wtórnej silanizacji otrzymuje się w dwóch etapach. W pierwszym etapie wiązane są długie łańcuchy, np. łańcuchy alkilowe. W drugim etapie nieprzereagowane silanole są modyfikowane specyficznym odczynnikiem. Fazy stacjonarne z wbudowanymi grupami polarnymi otrzymuje się przez wprowadzenie polarnej grupy funkcyjnej pomiędzy powierzchnie krzemionki a hydrofobowy ligand, co pozwala na lepszą solwatację przez wodę w warunkach silnie hydrofilowych. Ogólny schemat budowy fazy tego typu wraz z przykładami został zamieszczony na Rysunku 4. Zaletą tych faz jest to, iż mogą być one stosowane w układzie RP LC, oferując inną selektywność względem związków polarnych w porównaniu ze standardowymi alkilowymi fazami stacjonarnymi, możliwość pracy w warunkach wysoce wodnych, nawet do 100% zawartości wody oraz ograniczony wpływ silanoli, co sprzyja zmniejszeniu ogonowania pików chromatograficznych [6, 45–56].

Przeprowadzono wiele prac pokazujących możliwość rozdzielania substancji o szerokim zakresie polarności, wykorzystujących czystą wodę w temperaturze otoczenia jako fazę ruchomą. Buszewski i współ. w 1994 r. wykazali możliwość rozdzielania grupy alkiloanilin za pomocą chemicznie związanej fazy alkiloamidowej [57]. Kilkakrotnie zaproponowano zastosowanie kolumny ODS modyfikowanej jonową substancją powierzchniowo czynną do rozdzielania nukleozydów i zasad azotowych jako cząsteczek reprezentatywnych dla typowych polarnych związków organicznych [58–60]. Rozdzielenie związków o różnej hydrofobowości prowadzono przy użyciu krzemionki modyfikowanej poli(N-izopropylodakrylamidem) (krzemionka modyfikowana PIPAAm). Zbadano również wpływ temperatury na rozdzielczość. W użytym układzie siłą napędową retencji w podwyższonej temperaturze okazały się być oddziaływania hydrofobowe pomiędzy molekułami analitu, a polimerowymi łańcuchami znajdującymi się na powierzchni fazy stacjonarnej. Wykazano, że również w temperaturze pokojowej istnieje możliwość efektywnego rozdzielania steroidów [61]. Kolejną polimerową fazą stacjonarną wykorzystywali Šatínský i współ. do oznaczania analitów o różnej polarności [62]. Zastosowana faza pozwoliła na przeprowadzenie analiz w czystej wodzie, sprawiając, iż metody przez nich wykorzystane całkowicie wpisywały się w założenia „zielonej chromatografii”. Kiridena i współ. wykorzystali opracowaną przez siebie fazę stacjonarną z wbudowanymi grupami polarnymi (SynergiTM Hydro-RP) wykonując analizy w temperaturze pokojowej i temperaturze podwyższonej (nie przekraczającej 65 °C) [63].

Najnowsze badania potwierdzają zastosowanie faz stacjonarnych z wbudowanymi grupami polarnymi do rozdzielania związków polarnych zarówno w HILIC, jak i RP LC. Poprzez dobór odpowiednich grup polarnych możliwe jest uzyskanie faz stacjonarnych, które będą efektywne w temperaturze pokojowej, dając rozsądne czasy retencji. Ważne jest, aby faza stacjonarna spełniała trzy podstawowe wymagania. Pierwszym z nich jest obecność grup polarnych i hydrofobowych pozwalających na uzyskanie specyficznych właściwości powierzchni fazowej. Drugim jest umożliwienie selektywnej adsorpcji cząsteczek analitu. Ostatnim wymaganiem jest umożliwienie, aby cząsteczki wody wymywały anality w różnym czasie, uzyskując współczynniki retencji między 1 a 10 oraz odpowiednie czasy retencji [6, 46].

Bocian i Krzemińska w swojej najnowszej pracy opublikowali wyniki, które przedstawiają udane rozdzielanie serii zasad azotowych, nukleozydów i alkaloidów purynowych, z wykorzystaniem całkowicie wodnej fazy ruchomej. Temperatura wykonywania analiz wynosiła 30°C. Jako fazy stacjonarne wykorzystano fazę N,O-dialkylfosforoamidową [51] oraz fazy z wbudowanymi grupami estrowymi [46]. Ponieważ są to kolejne badania wykazujące udane rozdzielanie w czystej wodzie, wyniki te potwierdzają, że zastosowanie faz stacjonarnych z wbudowanymi grupami polarnymi pozwala na rozdzielanie mieszanin w jednoskładnikowej wodnej fazie ruchomej w temperaturze pokojowej [6].

Większość badań wykorzystujących czystą wodę jako jedyny składnik fazy ruchomej jest ukierunkowana na wykorzystanie faz stacjonarnych z wbudowanymi grupami polarnymi lub faz stacjonarnych z dołączonymi grupami polarnymi na etapie wtórnej silanizacji. Pracują one nie tylko w standardowych warunkach technik RP LC i HILIC, ale również w warunkach 100% wodnych w temperaturze pokojowej. Badania nad rozwojem kolejnych faz tego typu z pewnością pozwolą na optymalizację rozdzielania w wodnych warunkach w chromatografii cieczowej.

UWAGI KOŃCOWE

Metody analityczne przedstawione w niniejszym opracowaniu dowodzą, że rozdzielanie analitów z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej przy użyciu czystej wody jako fazy ruchomej jest osiągalne. Istnieją różne podejścia, ale wszystkie oparte są na wyborze warunków analizy, fazy stacjonarnej lub ewentualnych dodatków do fazy ruchomej. Zmiana warunków opiera się na wzroście temperatury, dzięki czemu zmieniają się właściwości fizyczne i chemiczne wody. Występują zmiany jej polarności, względnej przenikalności elektrycznej, lepkości, napięcia powierzchniowego i wielu innych właściwości. Zmienia się również rozpuszczalność hydrofobowych analitów, które w temperaturze pokojowej mogą być nierozpuszczalne w tak silnie polarnym rozpuszczalniku. Faza stacjonarna musi posiadać odpowiednie

właściwości, w szczególności stabilność w warunkach wodnych i podwyższonej temperaturze (szczególnie przy użyciu SHWC) oraz selektywność w odniesieniu do mieszanin związków o różnej polarności. W tym celu opracowuje się szereg faz stacjonarnych opartych na krzemionce, węglu, polimerach lub tlenkach metali. Niniejsza praca pokazuje, że warto poszukiwać metod analitycznych HPLC, które będą wpisywać się w założenia „zielonej chromatografii”, dbając zarówno o nieszkodliwość dla środowiska jak i ludzi.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] C.J. Welch, N. Wu, M. Biba, R. Hartman, T. Brkovic, X. Gong, R. Helmy, W. Schafer, J. Cuff, Z. Pirzada, L. Zhou, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2010, **29**, 667.
- [2] K. Krzemińska, S. Bocian, *Analityka*, 2017, **XVIII**, 22.
- [3] R.M. Smith, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1184**, 441.
- [4] Y. Yang, *J. Sep. Sci.*, 2007.
- [5] A. dos Santos Pereira, F. David, G. Vanhoenacker, P. Sandra, *J. Sep. Sci.*, 2009, **32**, 2001.
- [6] S. Bocian, K. Krzemińska, *Green Chem. Lett. Rev.*, 2019, **12**, 69.
- [7] P.T. Anastas, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1999, **29**, 167.
- [8] M. Tobiszewski, A. Mechlińska, B. Zygmunt, J. Namieśnik, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2009.
- [9] P.T. Anastas, M.M. Kirchhoff, *Acc. Chem. Res.*, 2002, **35**, 686.
- [10] K. Chen, F. Lynen, M. De Beer, L. Hitzel, P. Ferguson, M. Hanna-Brown, P. Sandra, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 7222.
- [11] M. Furusawa, K. Kishida, *LC-GC North Am.*, 2004, **22**, 1092.
- [12] N. Furusawa, E. Tsumatani, *LC-GC Eur.*, 2012, **25**, 292.
- [13] A.S. Pereira, A.J. Girón, E. Admasu, P. Sandra, *J. Sep. Sci.*, 2010, **33**, 834.
- [14] S. Heinisch, J.L. Rocca, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 642.
- [15] D. Guillarme, S. Heinisch, *Sep. Purif. Rev.*, 2005, **34**, 181.
- [16] D. Guillarme, S. Heinisch, J.Y. Gauvrit, P. Lanteri, J.L. Rocca, *J. Chromatogr. A*, 2005, **1078**, 22.
- [17] K. Hartonen, M.L. Riekkola, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2008, **27**, 1.
- [18] D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1193**, 85.
- [19] Y. Li, J. Li, T. Chen, X. Liu, H. Zhang, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 1503.
- [20] Y. Li, L. Xu, T. Chen, X. Liu, Z. Xu, H. Zhang, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **726**, 102.
- [21] R.E. Majors, *LCGC North Am.*, 2013, **31**, 522.
- [22] T. Greibrokk, T. Andersen, *J. Chromatogr. A*, 2003, **1000**, 743.
- [23] T. Kondo, Y. Yang, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **494**, 157.
- [24] I.D. Wilson, *Chromatographia*, 2000, **52**, S28.
- [25] C.V. McNeff, B. Yan, D.R. Stoll, R.A. Henry, *J. Sep. Sci.*, 2007, **30**, 1672.
- [26] G. Vanhoenacker, P. Sandra, *J. Sep. Sci.*, 2006, **29**, 1822.
- [27] J.W. Dolan, *J. Chromatogr. A*, 2002, **965**, 195.
- [28] J.W. Coym, J.G. Dorsey, *Anal. Lett.*, 2004, **37**, 1013.
- [29] S.B. Hawthorne, Y. Yang, D.J. Miller, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 2912.
- [30] J. Bowermaster, H.M. McNair, *J. Chromatogr. Sci.*, 1984, **22**, 165.
- [31] M. Hong Chen, C. Horváth, *J. Chromatogr. A*, 1997, **788**, 51.
- [32] J.V. Tran, P. Molander, T. Greibrokk, E. Lundanes, *J. Sep. Sci.*, 2001, **24**, 930.
- [33] R.M. Smith, R.J. Burgess, *Anal. Commun.*, 1996, **33**, 327.
- [34] J.J. Pesek, M.T. Matyska, M.T.W. Hearn, R.I. Boysen, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 1140.
- [35] J.J. Pesek, M.T. Matyska, S.M. Fischer, T.R. Sana, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1204**, 48.

- [36] B.A. Bidlingmeyer, J.K. Del Rios, J. Korpl, *Anal. Chem.*, 1982, **54**, 442.
- [37] K.K. Unger, 'Porous Silica', Elsevier, Amsterdam, 1979, vol. 16.
- [38] F. Gritti, A. dos Santos Pereira, P. Sandra, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 683.
- [39] F. Gritti, A. dos Santos Pereira, P. Sandra, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 8496.
- [40] A. Kumar, J.P. Hart, D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 3854.
- [41] Y. Zhang, Y. Zhang, G. Wang, W. Chen, P. He, Q. Wang, *Analyst*, 2016, **141**, 1083.
- [42] M.D. Foster, R.E. Synovec, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 2838.
- [43] L.F. Colwell, R.A. Hartwick, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1986, **9**, 304.
- [44] I. Rustamov, T. Farcas, F. Ahmed, F. Chan, R. LoBrutto, H.M. McNair, Y.V. Kazakevich, *J. Chromatogr. A*, 2001, **913**, 49-63.
- [45] R.E. Majors, M. Przybyciel, *LCGC Eur.*, 2002, 2.
- [46] K. Krzemińska, S. Bocian, *Analyst*, 2018, **143**, 1217.
- [47] B. Buszewski, P. Jandera, S. Bocian, P. Janas, T. Kowalkowski, *J. Chromatogr. A*, 2015, **1429**, 198.
- [48] S. Bocian, B. Buszewski, *J. Sep. Sci.*, 2014, **37**, 3435.
- [49] S. Bocian, M. Skoczylas, I. Goryńska, M. Matyska, J. Pesek, B. Buszewski, *J. Sep. Sci.*, 2016, **39**, 4369.
- [50] S. Studzińska, S. Bocian, L. Sיעińska, B. Buszewski, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2017, **1060**, 36.
- [51] S. Bocian, A. Nowaczyk, B. Buszewski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **404**, 731.
- [52] K. Krzemińska, M. Dembek, S. Bocian, *J. Sep. Sci.*, 2018, **41**, 4296.
- [53] S. Bocian, K. Krzemińska, B. Buszewski, *Analyst*, 2016, **141**, 4340.
- [54] S. Bocian, A. Nowaczyk, B. Buszewski, *Talanta*, 2014, **131**, 684.
- [55] J. Walczak, P. Pomastowski, S. Bocian, B. Buszewski, *J. Chromatogr. A*, 2016, **1432**, 39.
- [56] S. Bocian, B. Buszewski, *Talanta*, 2015, **143**, 35.
- [57] B. Buszewski M. Jaroniec R.K. Gilpin, *J. Chromatogr. A*, 1994, **668**, 293.
- [58] W. Hu, K. Hasebe, H. Haraguchi, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 1998, **21**, 1387.
- [59] W. Hu, K. Hasebe, D.M. Reynolds, H. Haraguchi, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **353**, 143.
- [60] T. Umemura, K.I. Tsunoda, A. Koide, T. Oshima, N. Watanabe, K. Chiba, H. Haraguchi, *Anal. Chim. Acta*, 2000, **419**, 87.
- [61] H. Kanazawa, T. Sunamoto, Y. Matsushima, A. Kikuchi, T. Okano, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 5961.
- [62] D. Šatínský, I. Brabcová, A. Maroušková, P. Chocholouš, P. Solich, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, **405**, 6105.
- [63] W. Kiridena, C.F. Poole, W.W. Koziol, *Chromatographia*, 2003, **57**, 703.

Praca wpłynęła do Redakcji 20 listopada 2019 r.