



## Chromatografia w dwóch odsłonach (cz. I)

# Podstawy chromatografii, czyli co było

Rajmund Michalski\*

Szacuje się, że pod koniec XIX wieku w środowisku obecnych było około 300 000 związków chemicznych. Później w związku z gwałtownym rozwojem przemysłu i skokiem cywilizacyjnym liczba ta gwałtownie wzrosła i obecnie (lipiec 2013 rok) według danych CAS ilość ta przekracza już 65 000 000!!! Wśród tych związków tylko niewielki procent stanowią te, które można uważać za obojętne lub nieszkodliwe dla zdrowia człowieka. Wiele z nich jest szkodliwych dla organizmów żywych nawet w bardzo niskich stężeniach, w związku z czym zmieniają się regulacje prawne dotyczące rodzaju i dopuszczalnych stężeń analitów w różnego rodzaju matryc [1]. Na szczęście postęp w chemii analitycznej związany z rozwojem nowych metod i technik pomiarowych, a także sposobami przygotowania próbek do analizy spowodował, że obecnie możemy oznaczać niemalże wszystko wszędzie, tj. potrafimy wykrywać substancje występujące nawet na poziomach stężeń  $10^{-15}$  i to także w próbkach o złożonej matrycy. Pytanie tylko czy naprawdę zawsze warto tym się zajmować? Czy ponoszone koszty są adekwatne do osiągniętych celów?

Obecnie obserwujemy szybki rozwój nowych metod i technik analitycznych, co z jednej strony podyktowane jest potrzebami (bezpieczeństwo zdrowotne i dane toksykologiczne), a z drugiej – właśnie niemalże nieograniczonymi możliwościami analitycznymi. Różne anality wykrywane i oznaczane są w próbkach spożywczych, klinicznych, przemysłowych czy środowiskowych. Analitami najczęściej oznaczanymi w próbkach środowiskowych są: WWA (wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne), BTEX (benzen, toluen, etylobenzen, ksyleny), THM (trihalometany), LZO (lotne związki organiczne), PCB (polichlorobifenyle), pestycydy, fenole, dioksyny i dibenzofurany, nieorganiczne aniony (min.  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ) i kationy (min.  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  oraz metale i metaloidy (min. Co, Ni, Cu, Fe, Zn, Cd, Pb, As, Cr, Mn, Ba, Rb, Sr, Ag, Tl, V, U, Bi, Mo, Sb). Spośród wielu różnych metod i technik analitycznych czołowe miejsce zajmuje chromatografia, która ze względu na swoje zalety jest powszechnie stosowana zarówno w laboratoriach kontrolno-pomiarowych, jak i naukowo-badawczych. Ocenia się, że chro-

matografy gazowe i cieczowe są najpopularniejszymi przyrządami badawczymi w laboratoriach na całym świecie. W niniejszym dwuczęściowym artykule krótko zostanie opisana historia chromatografii i jej zastosowania w minionych 50 latach (część I), oraz najnowsze rozwiązania i tendencje rozwojowe ze szczególnym uwzględnieniem tegorocznej wystawy Pittcon 2013 w USA (część II).

Chromatografia jako metoda rozdzielania znana jest od początku XX wieku, kiedy to biochemik z Uniwersytetu Warszawskiego – Michał Semenowicz Cwiet rozdzielił barwniki roślinne wykorzystując w tym celu kolumnę wypełnioną węglanem wapnia. W celu opisanie nowej opracowanej przez siebie metody greckimi słowami oznaczającymi „barwę” (grec. κρωμα) i „zapis” (grec. γραφω) utworzył nowe słowo – „chromatografia” oznaczające „zapisywanie barw”. Po tym historycznym wydarzeniu nastąpił kilkudziesięcioletni impas w rozwoju chromatografii i dopiero w latach 40. i 50. ubiegłego wieku wrócono na szeroką skalę do tego odkrycia.

Obecnie metody chromatograficzne, ze względu na możliwość szybkiego rozdzie-

lania i oznaczania substancji w próbkach o złożonych matrycach, należą do najbardziej rozpowszechnionych metod instrumentalnych w chemii analitycznej.

Chromatografia to fizykochemiczna metoda rozdzielania mieszanin w wyniku ich różnego podziału między fazą ruchomą i nieruchomą. Jeżeli fazą ruchomą jest gaz, to mamy do czynienia z chromatografią gazową (ang. *Gas Chromatography*, GC), a gdy jest nią ciecz – chromatografią cieczową (ang. *Liquid Chromatography*, LC). Jeżeli fazą ruchomą jest płyn w stanie nadkrytycznym, to taki rodzaj chromatografii nazywamy chromatografią nadkrytyczną (ang. *Supercritical Fluid Chromatography*, SFC) [2]. Ze względu na mechanizm oddziaływań rozdzielanych substancji z fazą ruchomą i fazą stacjonarną, metody chromatograficzne można podzielić przykładowo na [3]:

1. Chromatografię adsorpcyjną, w której w normalnym układzie faz (NP) wykorzystuje się oddziaływanie polarnych grup funkcyjnych rozdzielanych składników z polarnymi centrami aktywnymi obecnyymi na powierzchni fazy stacjonarnej. Z kolei w układzie faz odwróconych (RP) faza

stacjonarna jest niepolarna, a faza ruchoma polarna.

2. Chromatografię podziałową, w której o rozdzielaniu decyduje różnica współczynników podziału składników mieszaniny pomiędzy dwie fazy ciekłe, tj. pomiędzy ciekłą fazą ruchomą i ciekłą fazą stacjonarną osadzoną na nośniku.

Wykorzystywanie różnych faz ruchomych i stacjonarnych – odmiennych, co do fizykochemicznej natury oddziaływań powodujących rozdzielanie chromatograficzne, doprowadziło do powstania wielu różnych technik chromatograficznych wymienionych powyżej, z których największe znaczenie mają: chromatografia gazowa (GC), wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) i chromatografia cienkowarstwowa (ang. *Thin Layer Chromatography*, TLC).

Chromatografia gazowa to metoda analityczna wykorzystująca efekt rozdzielania z użyciem obojętnego gazu (np. He) jako fazy ruchomej, oraz porowatego ciała stałego lub filmu polimeru organicznego jako fazy stacjonarnej. Chromatografia gazowa stosowana jest przede wszystkim do analiz składu złożonych mieszanin związków chemicznych, zwłaszcza lotnych związków organicznych. Metodą tą można analizować substancje, które w warunkach chromatografowania mają postać gazów lub par, co w praktyce oznacza, że ich temperatury wrzenia nie przekraczają 350-400°C. Ocenia się, że metodą

chromatografii gazowej można rozdzielać i oznaczać około 20% znanych związków chemicznych.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa, to odmiana chromatografii cieczowej, stosowana głównie do analiz próbek zawierających nie-lotne, wielkocząsteczkowe związki chemiczne. Metodą HPLC można analizować znacznie więcej substancji niż metodą GC. Skład fazy ciekłej i rodzaj fazy stacjonarnej jest uzależniony od składu badanych próbek oraz typu oddziaływań wykorzystywanych do rozdzielania analitów.

O ile do oznaczania związków organicznych dominującymi metodami rozdzielania są chromatografia gazowa i wysokosprawna chromatografia cieczowa, w przypadku oznaczania substancji nieorganicznych dominuje metoda chromatografii jonowej. Jest to odmiana wysokosprawnej chromatografii cieczowej stosowana do rozdzielania i oznaczania anionów i kationów, a także innych substancji po ich wcześniejszym przeprowadzeniu w formy jonowe [4]. W literaturze spotkać można także określenie chromatografia jonowymienna (ang. *Ion-Exchange Chromatography*, IEC), która różni się od chromatografii jonowej, chociaż obydwie powyższe rodzaje chromatografii oparte są na znanych od dawna procesach wymiany jonowej.

Z kolei w chromatografii cienkowarstwowej wykorzystuje się jako fazę stacjonarną cienką warstwę porowatego

sorbentu oraz ciecz jako fazę ruchomą. Metoda ta jest cenniejsza ze względu na prostotę i szybkość oraz niskie koszty. W chromatografii cienkowarstwowej stosowane są na ogół te same sorbenty, co w kolumnowej chromatografii cieczowej (najczęściej modyfikowany żel krzemionkowy). Rozdział chromatograficzny prowadzi się w specjalnej, zamkniętej komorze, zawierającej eluent i atmosferę nasyconą jego parami. Do wizualizacji efektów rozdziału wykorzystywane są specjalne reagenty, tworzące ze związkami organicznymi barwne związki.

Warto w tym miejscu wspomnieć o metodach szeroko rozumianej elektroforezy kapilarnej, stosowanej również do analizy anionów i kationów. Obecnie terminem elektroforeza kapilarna (ang. *Capillary Electrophoresis*, CE), określa się techniki elektromigracyjne, takie jak: kapilarna elektroforeza strefowa (ang. *Capillary Zone Electrophoresis*, CZE), kapilarne ogniskowanie izoelektryczne (ang. *Capillary Isoelectric Focusing*, CIEF), żelowa elektroforeza kapilarna (ang. *Capillary Gel Electrophoresis*, CGE) oraz izotachoforeza kapilarna (ang. *Capillary Isotachopheresis*, CITP). Czasami dodaje się do tego również micelną elektrokinezytyczną chromatografię kapilarną (ang. *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*, MECC) [5].

Metody chromatograficzne są powszechnie stosowane zarówno na skalę preparatywną, jak i analityczną. Za

prace związane z metodami chromatograficznymi wielokrotnie przyznawano nagrody Nobla. Najważniejsze z nich to nagrody za prace dotyczące elektroforezy i chromatografii adsorpcyjnej (A. Tiselius, rok 1948) oraz za rozwój teorii chromatografii podziałowej (A.J.P. Martin i R.L.M. Synge, rok 1952). Pierwszy komercyjny chromatograf gazowy z detektorem cieplno-przewodnościowym pojawił się na rynku w roku 1955, a wysokosprawny chromatograf cieczowy około 10 lat później. Warto w tym miejscu dodać, że pierwszy w Polsce wysokociśnieniowy chromatograf cieczowy skonstruował w połowie lat 60. XX wieku pracownik Politechniki Gdańskiej – prof. J.S. Kowalczyk. Problematykę nomenklatury chromatograficznej uporządkowano i opisano w „Słowniku chromatografii i elektroforezy”, pod redakcją Witkiewicza i Heptera wydanym przez PWN w roku 2004 [6], którego nowe wydanie ukaże się na rynku wkrótce.

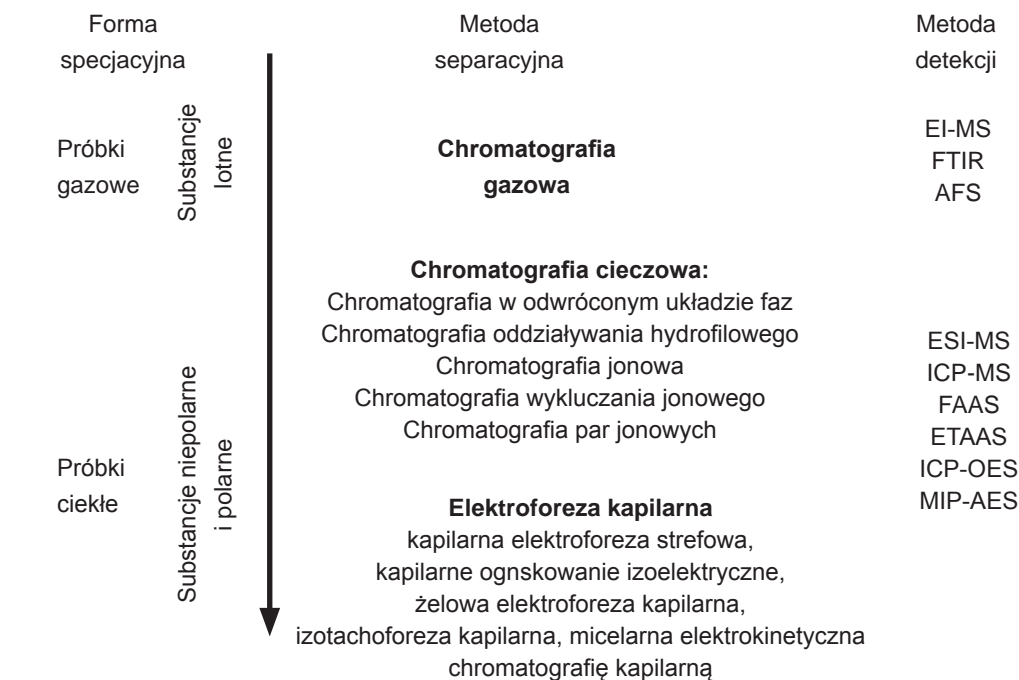
Informacje wynikające z danych toksykologicznych wymagają ciągłego obniżania granic wykrywalności analitów do ekstremalnie niskich poziomów stężeń, co spowodowało, że dotychczas stosowane metody analityczne nie zawsze spełniały te wymagania. W związku z tym łączy się różne metody separacyjne i metody detekcji, co określane jest ogólną nazwą metody łączone. Odpowiednia technika łączona powinna być selektywna wobec oznaczanych analitów, czuła w szerokim zakresie



stężeń i powinna umożliwiać możliwie jak najlepszą identyfikację oznaczanych substancji. Wybór odpowiedniej techniki łączonej powinien być uwarunkowany naturą analitu, łatwością połączenia różnych metod, wymaganą czułością oznaczeń oraz dostępnością urządzeń.

W badaniach analitów w formie gazowej dominuje chromatografia gazowa, ze względu na wysoką sprawność rozdzielania i możliwość osiągnięcia bardzo niskich granic wykrywalności. Jednakże wiele interesujących z punktu widzenia analizy specyjnej form pierwiastków nie występuje w stanie lotnym i nie da się ich przekształcić do tej postaci np. poprzez reakcje derywatywacji. Są to praktycznie wszystkie kompleksy koordynacyjne metali śladowych, ale także liczne związki metaloorganiczne (zawierające kowalencyjnie związany metal lub metaloid). Dla wszystkich tych form, najczęstszym wyborem są kolumnowe techniki rozdzielania w fazie ciekłej, takie jak wysokosprawna chromatografia cieczowa w różnych odmianach czy elektroforeza kapilarna. Wynika to z łatwości ich połączenia w układzie on-line oraz różnorodności mechanizmów rozdzielania i dostępności faz ruchomych, co pozwala na zachowanie oznaczonej formy w stanie niezmienionym.

Do najczęściej stosowanych metod detekcji w technikach łączonych należą: spektrometria mas (ang. *Mass Spectroscopy*, MS), spektrometria mas z plazmą indukcyjnie sprzężo-



Rys.1. Przykładowe techniki łączone stosowane w analizie specyjnej

ną (ang. *Inductively Coupled Plasma Mass Spektrometry*, ICP-MS), płomieniowa atomowa spektrometria absorpcyjna (ang. *Flame Atomic Absorption Spektrometry*, FAAS), elektrotermiczna atomowa spektrometria absorpcyjna (ang. *Electrothermal Atomic Absorption Spektrometry*, ET AAS), atomowa spektrometria fluorescencyjna (ang. *Atomic Fluorescence Spektrometry*, AFS), spektrometria emisji optycznej ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ang. *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy*, ICP-AES), mikrofalowo indukowana plazma z atomową spektrometrią absorpcyjną (ang. *Microwave Inducted Plasma Atomic Emission Spektrometry*, MIP AES), spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. *Fourier Transform Infra-red Spektrometry*, FTIR) oraz

spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR).

Najszybciej techniki łączone wprowadzono poprzez połączenie chromatografii gazowej z różnymi detektorami, tworząc takie układy jak: GC-AAS (ang. *Gas Chromatography – Atomic Absorption Spektrometry*), GC-AES (ang. *Gas Chromatography – Emission Atomic Spektrometry*), GC-MS (ang. *Gas Chromatography – Mass Spektrometry*), czy GC-ICP-MS-TOF, (ang. *Gas Chromatography – Inductively Coupled Plasma – Mass Spektrometry – Time of Flight Mass Spektrometry*). Ze względów technicznych nieco później na rynku pojawiły się układy wykorzystujące do rozdzielania analizowanych substancji metody chromatografii cieczowej, takie jak przede wszystkim: HPLC-ICP-MS

(ang. *High Performance Liquid Chromatography – Inductively Coupled Plasma – Mass Spektrometry*) HPLC-MS (ang. *High Performance Liquid Chromatography – Mass Spektrometry*) [7].

Techniki łączone tak jak i wszystkie inne mają swoje zalety i ograniczenia. Do tych pierwszych należy precyzja oznaczeń i ekstremalnie niskie granice oznaczalności, a do ograniczeń koszty analiz związane z niedostępnością odpowiedniej aparatury oraz wysokie wymagania do personelu obsługującego tak złożone zestawy analityczne.

Na rysunku 1. przedstawiono przykładowe możliwości wykorzystania technik łączonych w analizie specyjnej.

\* Prof. Rajmund Michalski, Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska PAN, Zabrze; e-mail: michalski@ipis.zabrze.pl