

**WPŁYW MODYFIKATORA FAZY RUCHOMEJ
NA SELEKTYWNOŚĆ ROZDZIELENIA
W ODWRÓCONYM UKŁADZIE FAZ
WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII
CIECZOWEJ**

INFLUENCE OF MOBILE PHASE MODIFIER
ON SEPARATION SELECTIVITY IN REVERSED PHASE
HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Beata Misiołek*, Anna Klimek-Turek, Tadeusz H. Dzido

*Zakład Chemii Fizycznej, Katedra Chemii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin*

**e-mail: beata.misiolek@umlub.pl*

Abstract

Wstęp

1. Wpływ modyfikatora fazy ruchomej na retencję substancji
2. Makroskopowe teorie wyjaśniające zmiany retencji i selektywności w RP HPLC
 - 2.1. Teoria solwofobowa
 - 2.2. Teoria uwzględniająca mechanizm podziałowy substancji pomiędzy fazę ruchomą i stacjonarną
 - 2.3. Teoria Jarońca i współautorów
3. Wpływ składu fazy ruchomej na selektywność wynikającą z kształtu cząsteczek substancji rozdzielanych w układach RP HPLC
4. Wpływ procesu solwatacji fazy stacjonarnej na selektywność rozdzielania
5. Wpływ rodzaju i stężenia modyfikatora fazy ruchomej na selektywność rozdzielania
6. Wyjaśnienie zmian selektywności poprzez oddziaływania międzycząsteczkowe w strefie fazy stacjonarnej

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Beata Misiółek, absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W 2010 roku rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Obecnie zajmuje badaniami nad mechanizmem selektywności rozdzielania substancji w odwróconym układzie faz wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Anna Klimek-Turek, absolwentka Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. W 2010r. uzyskała stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych. Obecnie pracuje w Zakładzie Chemii Fizycznej Katedry Chemii UM w Lublinie. Zajmuje się zagadnieniami optymalizacji rozdzielania substancji biologicznie aktywnych metodą chromatografii cieczowej.

Tadeusz H. Dzido, prof. nadzw. Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, urodzony w 1950 r., ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie w 1973 r. Uzyskał stopnie naukowe: doktora n. chemicznych – 1980 r., doktora habilitowanego n. chemicznych – 2003 r., oraz tytuł profesora n. farmaceutycznych – 2012 r. Jest kierownikiem Zakładu Chemii Fizycznej Katedry Chemii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Własne zainteresowania badawcze: mechanizm retencji i selektywności rozdzielania substancji, głównie biologicznie aktywnych, w chromatografii cieczowej (HPLC, TLC/HPTLC), mechanizm migracji i selektywności rozdzielania stref substancji w elektrochromatografii planarnej, optymalizacja warunków rozdzielania wspomnianymi technikami, analiza farmaceutyczna i biomedyczna z wykorzystaniem technik chromatograficznych, konstrukcje komór do chromatografii cienkowarstwowej, elektrochromatografii planarnej i ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej (PPEC). Autor/współautor 90 prac naukowych, 25 patentów. Jest jednym z redaktorów *Journal of Planar Chromatography*, należy do Naukowego Komitetu Redakcyjnego *Acta Chromatographica*.

ABSTRACT

High performance liquid chromatography (HPLC) is an instrumental analytical technique, which is widely used for a separation and determination of a mixture of components in many samples (e.g. of biomedical, pharmaceutical, food, and environmental origin). Despite several decades of the development of this technique, some aspects of the chromatographic process are still open to questions. This is particularly related to mechanisms of retention and selectivity of a separation. Improvement of the separation selectivity can be achieved by a change of the stationary phase type and qualitative and/or quantitative composition of the mobile phase. The replacement of the stationary phase does not ensure a smooth change of selectivity and retention, however, it generates additional costs of analysis. Therefore, the optimal conditions of chromatographic separation can be easily obtained by the change of a composition of the mobile phase, i.e. the type and/or concentration of its modifier (organic solvent).

This paper presents an overview of approaches to explanation and interpretation of an influence of mobile phase composition on the retention and separation selectivity in liquid chromatography systems with particular emphasis on modifier type of eluent in the reversed phase high performance liquid chromatography (RP HPLC).

Keywords: retention of solutes, separation selectivity, the effect of modifier on selectivity, reversed phase high performance liquid chromatography, HPLC, RP HPLC
Słowa kluczowe: retencja substancji, selektywność rozdzielania, wpływ modyfikatora na selektywność, wysokosprawną chromatografię cieczową z odwróconym układem faz, HPLC, RP HPLC

WPROWADZENIE

Efektywne rozdzielenie składników próbki badanej za pomocą metod chromatograficznych jest zależne od odpowiednio dobranych warunków prowadzenia procesu separacji. Parametrem opisującym zdolność układu chromatograficznego do separacji składników mieszaniny jest rozdzielczość. Zależy ona od selektywności, retencji i sprawności danego układu chromatograficznego w sposób określony równaniem Purnella:

$$R_s = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k}{k + 1} \times \sqrt{N} \quad (1)$$

Człon
retencyjny

↓

Człon selektywności Człon sprawnościowy

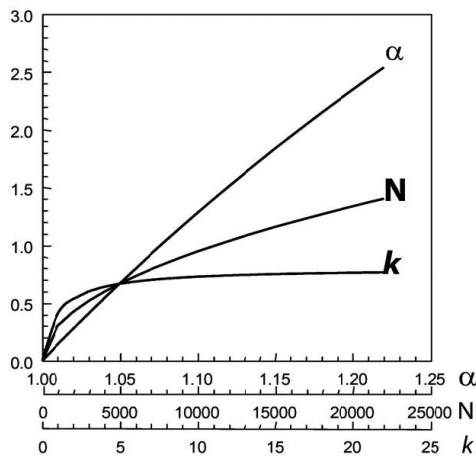
gdzie:

α – współczynnik rozdzielania,

k – współczynnik retencji,

N – liczba półek teoretycznych.

Spośród wymienionych wielkości, największy wpływ na rozdzielczość ma współczynnik rozdzielania α , co prezentuje Rysunek 1 [1]:



Rysunek 1. Wpływ parametrów: retencji, selektywności i sprawności układu na rozdzielczość, R_s [1]

Figure 1. Influence of retention, selectivity and efficiency of the resolution, R_s [1]

Selektywność charakteryzuje wzajemne oddziaływania cząsteczek substancji rozdzielanych z elementami faz ruchomej i stacjonarnej. Parametr ten w największym stopniu zależy od chemicznej budowy analitów, ale także od rodzaju i właściwości obu faz. Miarą selektywności jest współczynnik rozdzielania, α , którego wartość równa jest stosunkowi współczynników retencji lub stosunkowi zredukowanych czasów retencji dwóch sąsiednich stref (pików) substancji:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_0}{t_{R_1} - t_0} \quad (2)$$

t_{R_1}, t_{R_2} – czasy retencji dwóch sąsiednich stref (pików) substancji,
 t_0 – czas retencji substancji nie zatrzymywanej.

Możliwość zmiany selektywności rozdzielania (wartości współczynnika rozdzielania różnej od jedności) jest podstawowym i nadrzędnym celem w każdej metodzie chromatograficznej, gdyż ułatwia uzyskanie całkowitego rozdzielania składników mieszaniny. W przypadku osiągnięcia odpowiedniej wartości α , symetryczność i szerokość pików, a także czas prowadzonego procesu mogą nie być już tak istotne.

Współczynnik rozdzielania może być także wyrażany poprzez stosunek stałych podziału bądź innych parametrów chromatograficznych:

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} = \frac{V'_{R_2}}{V'_{R_1}} \quad (3)$$

gdzie:

K – stała podziału,

V'_R – zredukowana objętość retencji,

1 i 2 – indeksy odpowiadające substancjom 1 i 2.

W chromatografii cieczowej, termodynamiczny sposób opisu współczynnika rozdzielania jest następujący:

$$\ln \alpha = \frac{\Delta(\Delta G)}{RT} \quad (4)$$

ΔG – entalpia swobodna związana z transportem substancji z fazy ruchomej do stacjonarnej,

R – stała gazowa,

T – temperatura w skali Kelvina.

Z powyższej zależności wynika, iż wartość $\ln \alpha$ przedstawia różnicę między wartościami entalpii swobodnej przeniesienia dwóch różnych substancji z fazy ruchomej do stacjonarnej.

Selektywność rozdzielania substancji zależy od oddziaływań międzycząsteczkowych w fazie stacjonarnej w przypadku układów idealnych. Natomiast w przypadku układów rzeczywistych, należy również uwzględnić wpływ rodzaju i składu fazy ruchomej na procesy takie jak: jonizacja, solwatacja itp. [2].

1. WPŁYW MODYFIKATORA FAZY RUCHOMEJ NA RETENCJĘ SUBSTANCJI

Najbardziej popularnym podejściem opisującym retencję substancji w układzie faz odwróconych wysokosprawnej chromatografii cieczowej (RP HPLC) było zastosowanie równań:

$$\log k = \text{const.} + n (\% \text{H}_2\text{O}) \quad (5)$$

lub

$$\ln k = \ln k_w - C \varphi \quad (6)$$

k_w – współczynnik retencji substancji, gdy fazą ruchomą jest czysta woda,

C – stała (współczynnik kierunkowy),

φ – ułamek objętościowy modyfikatora w eluencie.

Te zależności w równoważnej postaci zostały zaproponowane przez Soczewińskiego i Wachtmeistera [3] do układów podziałowych chromatografii bibułowej, a później przez Snydera [4–6] do układów RP HPLC. Opisują one $\log k$ jako liniową funkcję stężenia organicznego modyfikatora w fazie ruchomej. Współczynnik C może być używany do określania siły elucyjnej rozpuszczalnika, w sposób opisany poniższym równaniem:

$$C = \log k_w - \log k_s \quad (7)$$

k_s – wartość k substancji, gdy $\varphi = 1$.

Wartość k_w można zastosować do określania charakteru hydrofobowego substancji.

Wadą tego równania jest fakt, że może być stosowane do opisu retencji w stosunkowo wąskim zakresie stężenia modyfikatora. Bardziej dokładne opisywanie związku pomiędzy danymi eksperymentalnymi retencji substancji i składem ilościowym fazy ruchomej obserwuje się przy zastosowaniu równania wielomianowego drugiego stopnia [7, 8].

$$\log k = A \varphi^2 + B \varphi + C \quad (8)$$

gdzie:

A, B, C – stałe

Równanie posiada trzy parametry dopasowania i dlatego dokładniej opisuje zależność retencja vs skład eluentu. W literaturze można znaleźć przykłady wielu równań opisujących zależność retencja vs skład fazy ruchomej [9–11]. Jednak żadne z nich nie przedstawia tej zależności w sposób idealny

i nie bierze pod uwagę efektów drugorzędowych, mających również istotny wpływ na retencję, takich jak np. wolne grupy silanolowe.

2. MAKROSKOPOWE TEORIE WYJAŚNIAJĄCE ZMIANY RETENCJI I SELEKTYWNOŚCI W RP HPLC

2.1. TEORIA SOLWOFOBOWA

Teoria ta rozpatruje retencję i selektywność układu chromatograficznego jako funkcję zależną od kilku parametrów:

- napięcia powierzchniowego fazy ruchomej,
- oddziaływań typu dipol–dipol między polarnymi grupami rozdzielanych związków i cząsteczkami składników eluentu.

Twórcy tej teorii, Horvath i in. [12–16] uważają, że głównym czynnikiem mającym wpływ na mechanizm retencji i zmiany selektywności w odwróconym układzie faz chromatografii cieczowej, są oddziaływania międzycząsteczkowe w fazie ruchomej. Teoria ta opiera się na analizie energii tych oddziaływań i, z uwagi na bardzo wysokie napięcie powierzchniowe wody, skupia się na efekcie hydrofobowym fazy ruchomej wobec substancji rozdzielanych. Zakłada się, że w fazie ruchomej powstaje przestrzeń (luka) o wielkości cząsteczki substancji zatrzymywanej. Powstanie luki związane jest z pewną wartością energii swobodnej, która ma decydujący wpływ na wielkość retencji. Korzystniejsze energetycznie dla substancji apolarnej jest zmniejszenie powierzchni eksponowanej wobec wodnego rozpuszczalnika, a zatem zachodzi przemieszczenie jej do węglowodorowej fazy stacjonarnej. Zdolność fazy ruchomej do utworzenia luki zależy od jej napięcia powierzchniowego. Przyczyną powstania luki mogą też być oddziaływania, na które będą miały wpływ parametry takie jak: gęstość energii kohezji, parametr solwofobowy Abrahama i współautorów [12, 17]. Poniższe równanie pokazuje, że teoria solwofobowa przewiduje liniową zależność między $\log k$ i stężeniem organicznego modyfikatora w fazie ruchomej [16]:

$$\ln k = A + B\mathcal{D} + C\gamma + D(\kappa^e - 1) V^{2/3} \gamma + E + \ln(RT/P_0 V) \quad (9)$$

γ – napięcie powierzchniowe fazy ruchomej,

A – stała zależna od parametrów kolumny

\mathcal{D} – funkcja zależna od stałej dielektrycznej rozpuszczalnika

B, C, D, E – stałe równania, zależne od rodzaju eluentu,

κ – współczynnik korygujący wartość napięcia powierzchniowego,

$\ln(RT/P_0 V)$ – człon opisujący entropię kondensacji.

Powyższe równanie przewiduje także wzrost retencji substancji o cząsteczkach obojętnych w obecności soli, redukcję retencji substancji o cząsteczkach zdysocjo-

wanych, liniową zależność $\log k$ od odwrotności temperatury w skali bezwzględnej (nachylenie jest proporcjonalne do entalpii solwatacji). Nie pozwala natomiast na przewidywanie zmian retencji w zależności od gęstości pokrycia fazy stacjonarnej łańcuchami alkilowymi, oraz od długości tych łańcuchów. W podejściu tym nie są uwzględnione interakcje cząsteczek substancji z wolnymi grupami silanowymi.

2.2. TEORIA UWZGLĘDNIAJĄCA MECHANIZM PODZIAŁOWY SUBSTANCJI POMIĘDZY FAZĘ RUCHOMĄ I STACJONARNĄ

Teoria ta bierze pod uwagę wpływ fazy stacjonarnej na retencję i w pewnym stopniu rozwiązuje niewyjaśnione zagadnienia modelu solwofobowego [18, 19] (Rys. 2). Proces podziału substancji pomiędzy dwie fazy składa się z 3 głównych etapów: wytworzenia luki w fazie stacjonarnej, przeniesienia cząsteczki do tej luki z fazy ruchomej, zamknięcia luki w fazie ruchomej. Kontrolowany jest przez różnice oddziaływań cząsteczki substancji z fazą ruchomą i stacjonarną i opisany jest równaniem [20]:

$$\frac{1}{\varphi_B} \ln \frac{k}{k_0} = (X_{SB} - X_{SA} - X_{AB}) + \varphi_B (X_{AB}) \quad (10)$$

gdzie:

$(X_{SB} - X_{SA} - X_{AB})$ – parametry opisujące wzajemne oddziaływanie cząsteczek:

S – substancji,

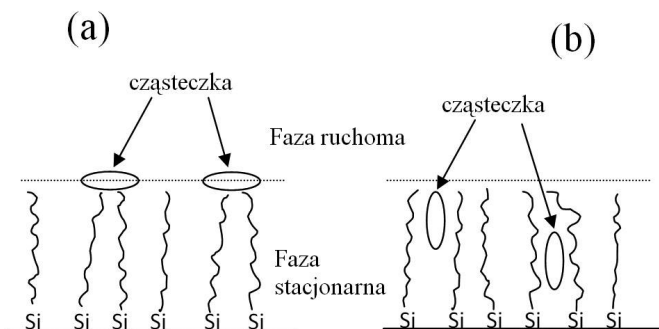
A – wody,

B – organicznego modyfikatora,

φ_B – ułamek objętościowy modyfikatora w eluencie,

k – współczynnik retencji substancji,

k_0 – wartość współczynnika retencji substancji, gdy fazą ruchomą jest czysta woda



Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie roli fazy stacjonarnej w modelach solwofobowym (a) i podziałowym (b) retencji substancji w odwróconym układzie faz chromatografii cieczowej [8]

Figure 2. Diagram showing the role of the stationary phase in retention of substances in reversed phase liquid chromatography in the solvophobic (a) and partition (b) models [8]

2.3. TEORIA JAROŃCA I WSPÓLAUTORÓW

Kolejną teorią wyjaśniającą zmiany retencji i selektywności jest teoria Jarońca i współautorów, która zakłada, że proces chromatograficznego rozdzielania składa się z dwóch etapów. W pierwszym etapie powierzchnia międzyfazowa, utworzona na granicy fazy stacjonarnej i ruchomej wzbogaca się w cząsteczki modyfikatora. Proces ten zależy od składu fazy ruchomej oraz od rodzaju fazy stacjonarnej. Drugi etap polega na podziale chromatografowanych substancji między fazę ruchomą i powierzchnię międzyfazową [21].

3. WPLYW SKŁADU FAZY RUCHOMEJ NA SELEKTYWNOŚĆ WYNIKAJĄCĄ Z KSZTAŁTU CZĄSTECZEK SUBSTANCJI ROZDZIELANYCH W UKŁADACH RP HPLC

Selektywność związaną z oddziaływaniami międzycząsteczkowymi substancji w fazie stacjonarnej można rozpatrywać w trzech aspektach:

- selektywność hydrofobowa – związana z fragmentami niepolarnymi cząsteczek (np. względem grupy metylenowej),
- selektywność polarna – wynika z oddziaływań jonowych, dipolarnych i/lub wiązań wodorowych z powierzchniowymi grupami silanolowymi,
- selektywność wynikająca z kształtu cząsteczek substancji rozdzielanych (ang. *shape selectivity*).

Jak wiadomo, w odwróconym układzie faz wysokosprawnej chromatografii cieczowej, jako fazy stacjonarne najczęściej stosuje się adsorbenty na bazie żelu krzemionkowego, którego powierzchnia jest modyfikowana chemicznie, np. łańcuchami węglowodorów alifatycznych o długości mierzonej liczbą atomów węgla równej najczęściej 8 lub 18 (odpowiednie oznaczenie C8 i C18).

Na selektywność, ze względu na kształt cząsteczek, ma wpływ wiele czynników: typ fazy stacjonarnej, długość związanych łańcuchów alifatycznych, gęstość pokrycia ligandami, porowatość żelu krzemionkowego, temperatura układu oraz skład fazy ruchomej [22]. Uważa się jednak, że największy wpływ na selektywność ze względu na kształt cząsteczek, ma stopień uporządkowania łańcuchów węglowodorowych fazy stacjonarnej [22].

W 1983 Martire i Boehm [23] zaproponowali model tzw. „oddychającej” powierzchni. Wg nich wnikanie organicznego modyfikatora pomiędzy łańcuchy węglowodorowe fazy stacjonarnej jest przyczyną zmiennej struktury warstwy powierzchniowej, co z kolei wpływa na selektywność układu chromatograficznego oraz retencję substancji, których cząsteczki posiadają różną budowę przestrzenną. Uważają oni, że największy wpływ kształtu cząsteczek na selektywność rozdzielania oraz retencję substancji ma miejsce wtedy, gdy cząsteczki tych analitów mają strukturę sztywnych prętów, a najmniejszą gdy mają postać elastycznych łańcuchów.

Sander i Wise postulowali w swoich pracach, że zmiana stężenia organicznego modyfikatora fazy ruchomej wywiera pewien wpływ na selektywność związaną z kształtem cząsteczek w układach z monomerycznymi jak i polimerycznymi fazami stacjonarnymi [24]. Wyniki ich badań dowodzą, że w przypadku rozdzielania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, poprawa selektywności rozdzielania następuje wraz ze zmniejszeniem zawartości modyfikatora w eluencie. Najwyraźniej jest to widoczne w przypadku użycia monomerycznych faz stacjonarnych w układzie z metanolem [24].

Ci sami autorzy [25, 26] opracowali tzw. model szczelinowy, opisujący selektywność rozdzielania ze względu na kształt cząsteczek. W modelu tym przestrzeń pomiędzy łańcuchami węglowodorowymi fazy stacjonarnej jest traktowana jako luka, do której mogą wnikać cząsteczki substancji chromatografowanych. Molekuły o płaskiej strukturze mają zdolność do głębszego wnikania pomiędzy łańcuchy niż cząsteczki o bardziej rozgałęzionej budowie. Dlatego te pierwsze będą charakteryzowały się zwiększoną retencją od tych drugich. Opierając się na tym modelu, Limsavarn i Dorsey [22] doszli do następujących wniosków: im większa jest powierzchnia i gęstość pokrycia łańcuchami węglowodorowymi fazy stacjonarnej oraz im te łańcuchy są dłuższe, tym sztywniejsza jest ich struktura, a szczeliny mogące pomieścić molekuły rozdzielanych związków są głębsze, dzięki czemu można uzyskać poprawę selektywności rozdzielania w stosunku do izomerów różniących się kształtem cząsteczek.

Jako, że składnikami fazy stacjonarnej są nie tylko związane ligandy niepolarne, ale również resztkowe grupy silanolowe oraz zaadsorbowane cząsteczki wody i organicznego modyfikatora, można zauważyć, że niezwykle znaczący wpływ na strukturę tej warstwy ma skład fazy ruchomej, a także rodzaj i stężenie modyfikatora.

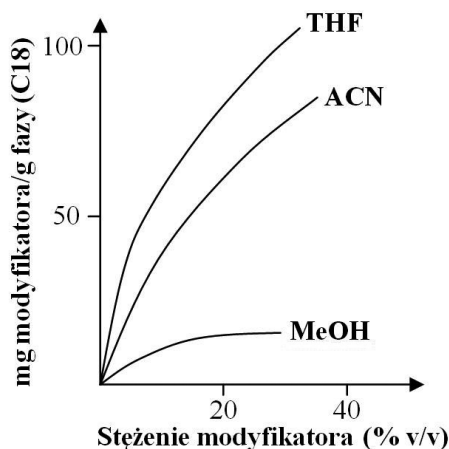
Wg Dorsey'a i Cole'a [27], ilość organicznego modyfikatora zaadsorbowanego przez fazę stacjonarną zwiększa się wraz ze wzrostem gęstości pokrycia powierzchni tego adsorbentu ligandami węglowodorowymi, aż do krytycznej wartości $3,0 \mu\text{mol}/\text{m}^2$.

Uporządkowanie łańcuchów węglowodorowych na powierzchni fazy stacjonarnej jest głównym czynnikiem mającym wpływ na retencję i selektywność w przypadku rozdzielania substancji o cząsteczkach mających postać sztywnych łańcuchów [22].

4. WPŁYW PROCESU SOLWATACJI FAZY STACJONARNEJ NA SELEKTYWNOŚĆ ROZDZIELENIA

Wiadome jest, iż faza stacjonarna jest solwatowana przez składniki eluentu. Łańcuchy alkilowe, związane z powierzchnią żelu krzemionkowego, nie tworzą fazy posiadającej właściwości odpowiedniego węglowodoru alifatycznego. Wykazują one ograniczone ruchy cząsteczkowe. Jeden koniec łańcucha jest nieruchomo połączony z powierzchnią żelu, a drugi może podlegać hydrofobowemu wypieraniu, bądź zwilżaniu przez wodną fazę ruchomą, w zależności od jej składu [28–30]. Duże stężenie

wody w fazie ruchomej powoduje ulokowanie się łańcuchów węglowodorowych bliżej powierzchni żelu. Składniki organiczne eluentu, w wyniku sorpcji w/na fazie stacjonarnej, penetrują jej strefę, doprowadzając w ten sposób do znacznej modyfikacji struktury łańcuchów alkilowych [31–33]. Stopień sorpcji rozpuszczalników organicznych, zwykle stosowanych w chromatografii cieczowej, rośnie w kolejności metanol (MeOH), acetonitryl (ACN), tetrahydrofuran (THF) [34].



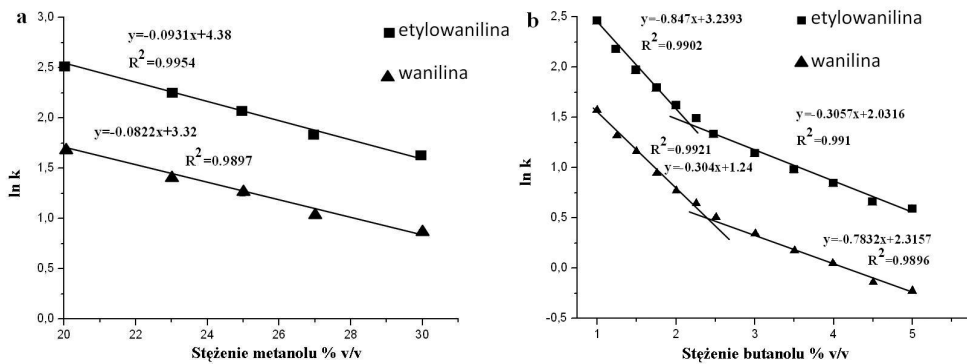
Rysunek 3. Izotermy adsorpcji organicznych modyfikatorów na fazie stacjonarnej typu C18 [34]

Figure 3. Adsorption isotherms of organic modifiers on a C18 stationary phase [34]

Jest kilka poglądów na temat oddziaływań międzycząsteczkowych rozdzielanych substancji ze składnikami eluentu w obszarze fazy stacjonarnej. Jeden z poglądów przedstawia wpływ sorbujących się cząsteczek składników fazy ruchomej na zmiany właściwości fazy stacjonarnej. Twórcy tego podejścia [35–41] zwracają uwagę na bardzo ważny proces solwatacji fazy stacjonarnej przez składniki eluentu, gdyż powoduje to zmianę selektywności rozdzielania. Na proces solwatacji można wpływać poprzez zmianę stężenia lub typu organicznego modyfikatora fazy ruchomej.

Lavine i współpracownicy badali zależności między solwatacją fazy stacjonarnej a selektywnością rozdzielania w układach RP HPLC [42]. W swoich eksperymentach zastosowali *n*-alkohole o krótkich i średnio długich łańcuchach, jako modyfikatory fazy ruchomej: metanol, *n*-propanol, *n*-butanol i *n*-pentanol. Mieszaniną testową był zestaw 6 pochodnych waniliny. W celu porównania retencji i selektywności zastosowanych układów posłużyli się wspomnianym wcześniej równaniem Snydera-Soczewińskiego (7).

Po sporządzeniu zależności $\ln k = f(\varphi)$ dla układów z wymienionymi wyżej modyfikatorami fazy ruchomej, okazało się, że dla wszystkich alkoholi, poza metanolem, zależności te składały się z dwóch prostoliniowych części (Rys. 4). Największe różnice nachylenia obu prostych wystąpiły dla butanolu. Układ z tym właśnie modyfikatorem okazał się również najbardziej selektywny, przy jednoczesnym zapewnieniu najkrótszych czasów retencji testowanych substancji.



Rysunek 4. Zależności $\ln k = f(\varphi)$ otrzymane dla etylowaniliny i waniliny w układach z adsorbentem typu C18 i fazą ruchomą metanol-woda (a) oraz butanol-woda (b) [42]

Figure 4. $\ln k = f(\varphi)$ obtained for ethyl vanillin and vanillin in systems with a C18 adsorbent and mobile phase methanol-water (a) and butanol-water (b) [42]

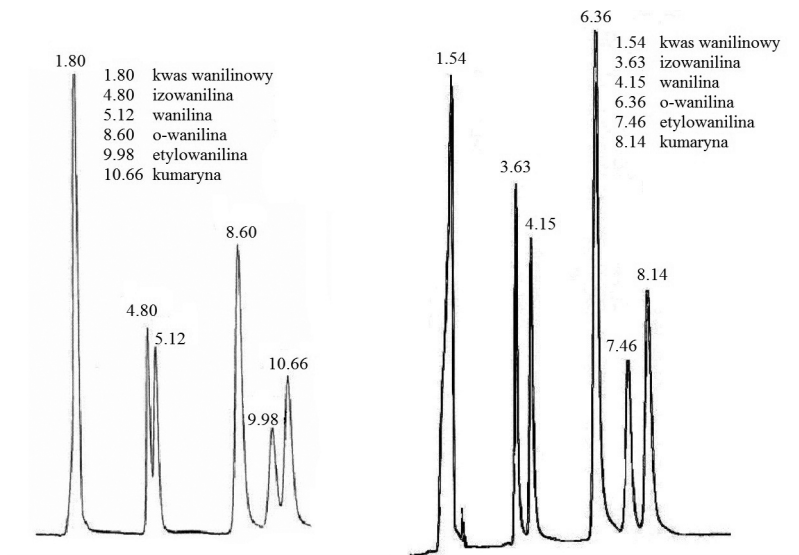
Otrzymane przez autorów wyniki potwierdziły fakt, iż wraz ze wzrostem hydrofobowości modyfikatora, może wzrastać selektywność rozdzielania w układzie z fazą stacjonarną C18, podczas gdy jednocześnie ulega zmniejszeniu retencja substancji chromatografowanych.

Autorzy sugerują, że stężenie butanolu (2,25%), przy którym następuje przecięcie się prostych na rysunku, wskazuje na pojawienie się zmian strukturalnych fazy stacjonarnej. Pierwsza część zależności (dla niższego stężenia alkoholu) najprawdopodobniej odpowiada jednoczesnym zmianom w fazie ruchomej i stacjonarnej. Natomiast prosta przy wyższym stężeniu alkoholu ma kształt klasyczny, który jest wynikiem oddziaływań butanolu z fazą związaną, dzięki czemu zapewnia większe uporządkowanie powierzchni, tym samym zwiększając selektywność rozdzielania układu chromatograficznego. W przypadku, gdy łańcuchy alkilowe fazy stacjonarnej nie są wystarczająco solwatowane, zmniejsza się powierzchnia kontaktu substancji z fazą stacjonarną. Wraz ze wzrostem hydrofobowości modyfikatora, powierzchnia kontaktu fazy związanej z cząsteczkami substancji wzrasta, z powodu wzrastającej solwatacji przez organiczny rozpuszczalnik.

Lavine i współpracownicy uważają, że różnice stopnia solwatacji fazy stacjonarnej butanolem i metanolem mogą być dobrym wyjaśnieniem zmian selektywności, mających miejsce w układach z tymi modyfikatorami.

W celu wyjaśnienia skrócenia czasu retencji składników mieszaniny testowej, przy jednoczesnym zapewnieniu najlepszej selektywności rozdzielania, Lavine i współautorzy powołują się na prace Felistyn'a i Cantwell'a [39]. Postulują oni w swoich pracach, że butanol może sorbować się w warstwie międzyfazowej faza ruchoma-ligandy C18. Taka sytuacja może mieć miejsce przy niskich stężeniach tego modyfikatora, a jego wpływ na retencję opiera się na współzawodniczeniu z substancją rozdzielaną o miejsce w obszarze międzyfazowym. Podejście to można zastosować do innych alkoholi – modyfikatorów, z tym, że wraz ze wzro-

stem hydrofobowości wzrasta zdolność tego modyfikatora do wypierania analitu z obszaru międzyfazowego. I to właśnie zjawisko, wg autorów [42], jest najbardziej prawdopodobną przyczyną skrócenia czasu retencji badanych substancji w układzie z butanolem i wodą w porównaniu do układu z metanolem i wodą (Rys. 5).



Rysunek 5. Chromatogramy pochodnych waniliny uzyskane przy zastosowaniu układów HPLC z fazą stacjonarną typu C18 i eluentem metanol-woda (25 : 100, po lewej) i butanol : woda (2,25 : 97,75, po prawej) [42]

Figure 5. Chromatograms of derivatives of vanillin obtained using HPLC system with a C18 stationary phase and eluent methanol-water (25: 100, left) and butanol: water (2.25: 97.75, right) [42]

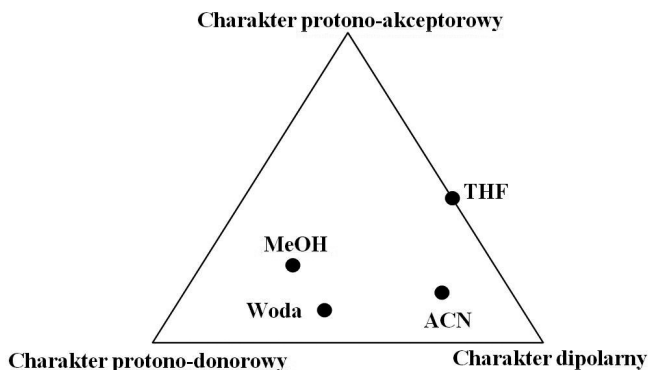
Podobne podejście jak w powyżej opisanej pracy, Lavine i Ding wykorzystali badając retencję imidaclopridu (środek owadobójczy) i produktów jego rozkładu [43]. Rozpuszczalnikiem, który zapewnił najlepsze rozdzielanie substancji, przy jednoczesnym najkrótszym czasie separacji, była wodna faza ruchoma o zawartości 0,4% *n*-pentanolu i 0,2% kwasu octowego.

Autorzy wnioskują, iż istnieją sytuacje, w których faza ruchoma, składająca się praktycznie z samej wody, może być najlepszym wyborem przy chromatograficznym rozdzielaniu (w układach RP) niektórych, rozpuszczalnych w wodzie kongenerów.

5. WPLYW RODZAJU I STĘŻENIA MODYFIKATORA FAZY RUCHOMEJ NA SELEKTYWNOŚĆ ROZDZIELENIA

Wpływ organicznego składnika fazy ruchomej na zmianę selektywności rozdzielania substancji jest przedmiotem wielu badań, czego dowodem są liczne pozycje literaturowe [42, 44–49]. Każdy modyfikator charakteryzuje się inną zdolnością

do pewnych typów oddziaływań międzycząsteczkowych. Na poniższym diagramie (Rys. 6), zwanym od nazwiska jego autora, trójkątem selektywności Snydera, przedstawiony jest udział tych oddziaływań dla najpopularniejszych modyfikatorów, stosowanych w odwróconym układzie faz HPLC.



Rysunek 6. Schemat przedstawiający zdolność modyfikatorów, najczęściej stosowanych w odwróconym układzie faz HPLC (MeOH – metanol, ACN – acetonitryl, THF – tetrahydrofuran), do różnych rodzajów oddziaływań międzycząsteczkowych [13]

Figure 6. Diagram showing ability of the modifiers, typically used in reversed phase HPLC (MeOH – methanol, ACN – acetonitrile, THF – tetrahydrofuran) to different types of intermolecular interactions [13]

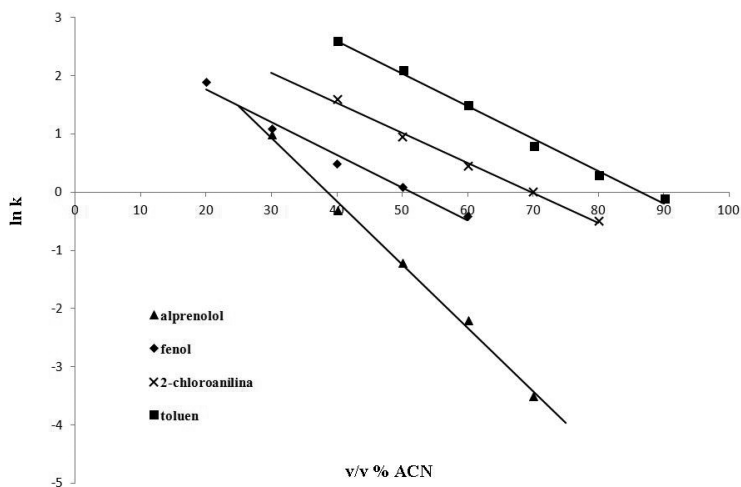
Modyfikatory te różnią się między sobą zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych. Metanol wykazuje wysoką zdolność do oddziaływań zarówno protonodonorowych jak i protonoakceptorowych, w przeciwieństwie do acetonitrylu, który te właściwości przejawia w bardzo małym stopniu. Acetonitryl charakteryzuje się za to największym momentem dipolowym spośród modyfikatorów wymienionych na powyższym rysunku. Metanol również wykazuje dość silne właściwości dipolowe. Natomiast tetrahydrofuran posiada cząsteczkę o największej objętości, szczególnie części niepolarnej, która zapewnia zwiększenie udziału oddziaływań dyspersyjnych w porównaniu do metanolu i acetonitrylu. THF charakteryzuje się najsłabszymi właściwościami dipolarnymi, prawie nie wykazuje zdolności protonodonorowych, lecz posiada większe właściwości protonoakceptorowe niż ACN.

W przypadku, gdy jedna faza ruchoma nie zapewnia optymalnej selektywności rozdzielania danej mieszaniny, należy zmienić jej modyfikator. Dzięki takiemu zabiegowi uzyskuje się zmianę udziału poszczególnych oddziaływań w mechanizmie retencji substancji, co często powodować może inną kolejność elucji badanych związków. Wadą tej procedury jest skokowa zmiana selektywności.

Tanaka i współautorzy [50] badali wpływ organicznych składników fazy ruchomej: MeOH, ACN i THF na selektywność rozdzielania, związaną z oddziaływaniami międzycząsteczkowymi polarnymi i niepolarnymi, tzw. selektywność polarną i hydrofobową, w odwróconym układzie faz wysokosprawnej chromatografii cieczowej. W swoich eksperymentach, jako fazy stacjonarne wykorzystali adsorbenty

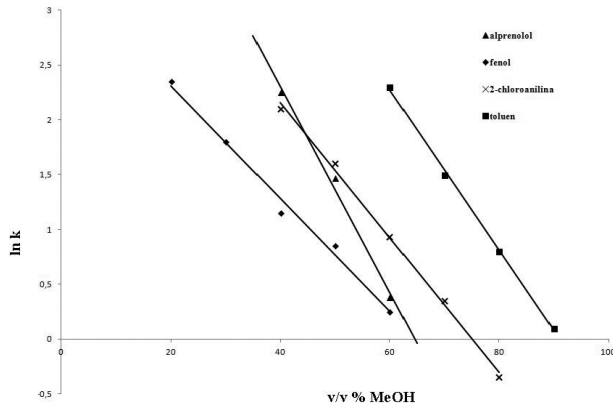
C18 o różnym stopniu pokrycia. W celu ograniczenia wpływu nieprzereagowanych grup silanolowych na badanie zależności między selektywnością i składem fazy ruchomej, użyli faz stacjonarnych o największym stopniu pokrycia. Grupę substancji testowych stanowiły jednofunkcyjne węglowodory aromatyczne z polarnymi i niepolarnymi podstawnikami. Selektywność badanych związków porównywali stosując korelacje retencji substancji, $\log k_1$ vs $\log k_2$, gdzie indeksy 1 i 2 oznaczają układy z różnymi modyfikatorami. Autorzy zwrócili uwagę na niezwykle silny wpływ rodzaju i stężenia modyfikatorów na selektywność polarną i hydrofobową, szczególnie w przypadku, gdy porównywane były układy z MeOH i THF.

Kolejny z przykład, zmian selektywności wraz ze zmianą modyfikatora, został przedstawiony przez Kazakiewiczza i LoBrutto [2]. Zaprezentowali oni rozdzielanie mieszaniny składającej się z następujących substancji: toluen, alprenolol ($pK_A = 9$ – stosunkowo silna zasada), 2-chloroanilina ($pK_A = 2,5$ – słaba zasada) i fenol ($pK_A = 10$ – słaby kwas), w układzie złożonym z kolumny C18 oraz przy wykorzystaniu faz ruchomych o różnym stężeniu składników organicznych: metanolu i acetonitrylu. Otrzymane wyniki przedstawione są na Rysunkach 7 i 8.



Rysunek 7. Retencja ($\ln k$) substancji w funkcji stężenia acetonitrylu; kolumna C18, faza ruchoma ACN + bufor pH 4,5, przepływ 1 ml/min, $T = 30^\circ\text{C}$ [2]

Figure 7. Retention ($\ln k$) of the substances as a function of the concentration of acetonitrile; C18 column, mobile phase ACN + buffer pH 4.5, flow 1 ml/min, $T = 30^\circ\text{C}$ [2]



Rysunek 8. Retencja ($\ln k$) substancji w funkcji stężenia metanolu; kolumna C18, faza ruchoma MeOH + bufor pH 4,5, przepływ 1 ml/min, $T = 30^\circ\text{C}$ [2]

Figure 8. Retention ($\ln k$) of the substances as a function of the methanol concentration; C18 column, mobile phase MeOH + buffer pH 4.5, flow 1 ml/min, $T = 30^\circ\text{C}$ [2]

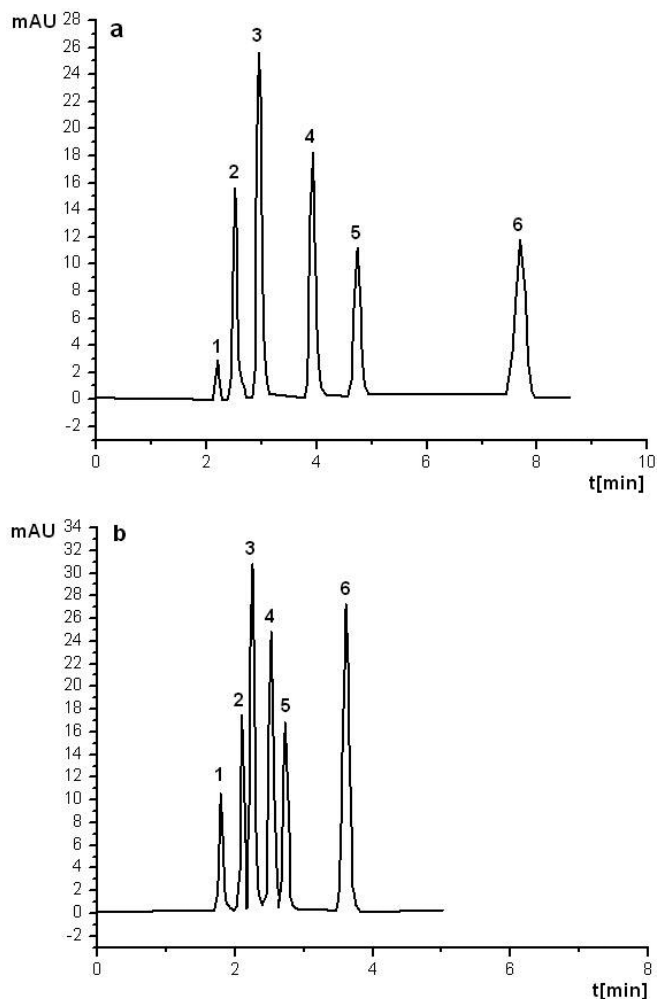
Z wykresów tych wynika, iż wpływ obu modyfikatorów na retencję badanych substancji i ich selektywność rozdzielania jest zróżnicowany. Kolejność retencji fenolu, toluenu i chloroaniliny w układzie z ACN jest taka sama jak w układzie z MeOH. Jednakże retencja alprenololu w układzie z metanolem rośnie względem fenolu i 2-chloroaniliny w porównaniu do układu z acetonitrylem. Ten zróżnicowany wpływ obu modyfikatorów na retencję jest odzwierciedlony w istotnych zmianach selektywności rozdzielania tych substancji.

Zmiany selektywności wraz ze zmianą modyfikatora mogą również wynikać z odmiennej adsorpcji każdego z modyfikatorów na/w fazie stacjonarnej [51, 52], a co za tym idzie, innego stopnia uporządkowania tej fazy. Dlatego selektywność rozdzielania substancji, różniących się kształtem ich cząsteczek, będzie inna, gdy w fazie ruchomej zamieniony zostanie np. metanol na tetrahydrofuran.

Zmianę selektywności można także otrzymać poprzez dodanie do fazy ruchomej małej ilości trzeciego składnika tak, aby uzyskać niewielkie jego stężenie (ok. 10%). Dzięki zastosowaniu układów trójskładnikowych możliwa jest płynna zmiana retencji i selektywności [53]. Takie podejście może jednak dostarczać pewnych problemów związanych z interpretacją wyników. Metody optymalizacji rozdzielania opierają się zwykle na użyciu izoeluotropowych faz ruchomych, w których kolejny ich roztwór ma taką samą siłę elucyjną, lecz inny modyfikator, co często pozwala uzyskać inną selektywność. W celu dobrania odpowiednich rozpuszczalników należałoby posługiwać się wyżej opisanym trójkątem selektywności. Aby otrzymać jak największe różnice selektywności rozdzielania, powinno się wybierać rozpuszczalniki leżące blisko różnych wierzchołków tego trójkąta.

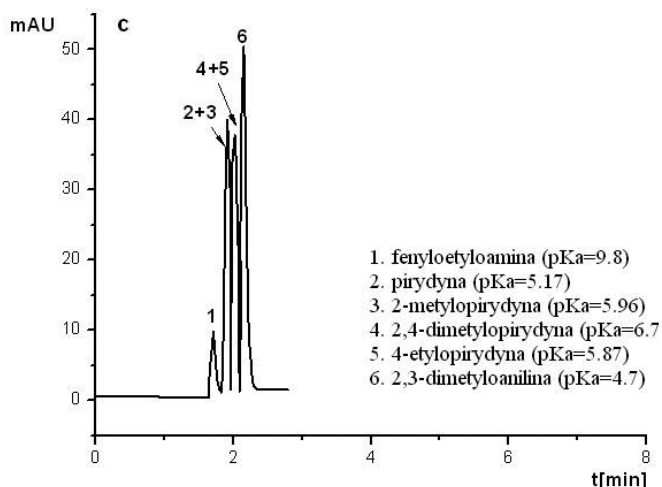
Retencję substancji można opisać jako równowagę jej dystrybucji między fazami ruchomą i stacjonarną [2]. Stała równowagi, K , charakteryzująca ten proces jest proporcjonalna do współczynnika retencji, k . Rodzaj i skład fazy ruchomej nie

mają wpływu na selektywność rozdzielania substancji tylko w układach idealnych, gdyż nie występują wtedy efekty równowag drugorzędowych. Odmienna sytuacja ma miejsce, gdy rozdzielaniu poddawana jest mieszanina substancji o cząsteczkach dysocjujących, szczególnie, gdy ich wartości pK się różnią. Wówczas zmiana stężenia organicznego składnika w fazie ruchomej może mieć znaczny wpływ na selektywność rozdzielania. Wraz ze zmianą stężenia modyfikatora może zmieniać się pH fazy ruchomej, co skutkuje zróżnicowanym stopniem jonizacji rozdzielanych substancji. Jest to przyczyną zmian selektywności, co można zaobserwować porównując chromatogramy na Rysunku 9, oraz analizując wartości parametru α przedstawione w Tabeli 1.



Rysunek 9. Chromatogramy (a) – 30% ACN, (b) – 50% ACN, (c) – 80% ACN [2]

Figure 9. Chromatograms (a) – 30% ACN, (b) – 50% ACN, (c) – 80% ACN [2]



Rysunek 9. Ciąg dalszy
Figure 9. Continuation

Tabela 1. Wpływ składu ilościowego eluentu na selektywność rozdzielania substancji jak na Rysunku 9 [2]
Table 1. Influence of eluent composition on separation selectivity of the substances as in Figure 9 [2]

%v/v ACN	$\alpha = k_2/k_1$				
	1 i 2	2 i 3	3 i 4	4 i 5	5 i 6
30%	1,36	1,36	1,59	1,31	1,86
50%	1,61	1,18	1,29	1,17	1,62
80%	1,29	1,00	1,37	1,00	1,21

Znaczne zmiany selektywności rozdzielania wraz ze zmianą składu ilościowego fazy ruchomej mogą występować w przypadku, gdy cząsteczki rozdzielanych substancji różnią się liczbą grup funkcyjnych, ich rozmieszczeniem, wielkością, zdolnością do oddziaływań dipolarnych, dyspersyjnych i tworzenia wiązań wodorowych. Wyrazem tego jest, często wykazywane przez te układy, zróżnicowane nachylenie zależności retencja–skład fazy ruchomej. Zmiany selektywności rozdzielania dokonują się jako wynik zróżnicowania udziału oddziaływań międzycząsteczkowych substancji ze składnikami obu faz układu chromatograficznego w zależności od stężenia rozpuszczalnika organicznego eluentu.

W przypadku, gdy analizowaną mieszaninę stanowi grupa substancji o podobnych właściwościach, możliwości zmian selektywności, poprzez zmianę stężenia organicznego modyfikatora, są ograniczone, ponieważ zwiększenie stężenia składnika eluentu nie zmienia rodzaju interakcji, wpływa jedynie na ich intensywność. Kolejnym przykładem badań nad wpływem składu fazy ruchomej na selektywność rozdzielania w układach RP HPLC jest praca Wysockiej [54]. Autorka poddała badaniom serię nitroalkanów i alkilobenzenów. Układ chromatograficzny składał

się z metanolu i acetonitrylu jako organicznych modyfikatorów w szerokim zakresie stężenia oraz monomerycznych faz stacjonarnych C18 o gęstości pokrycia ligandami od 1,74 do 4,4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. Autorka badała, w jaki sposób oddziaływania substancji z adsorbentem są zależne od składu fazy ruchomej. W swoim podejściu oparła się na analizie przebiegu równania van't Hoffa, które opisuje stan termodynamiczny układu.

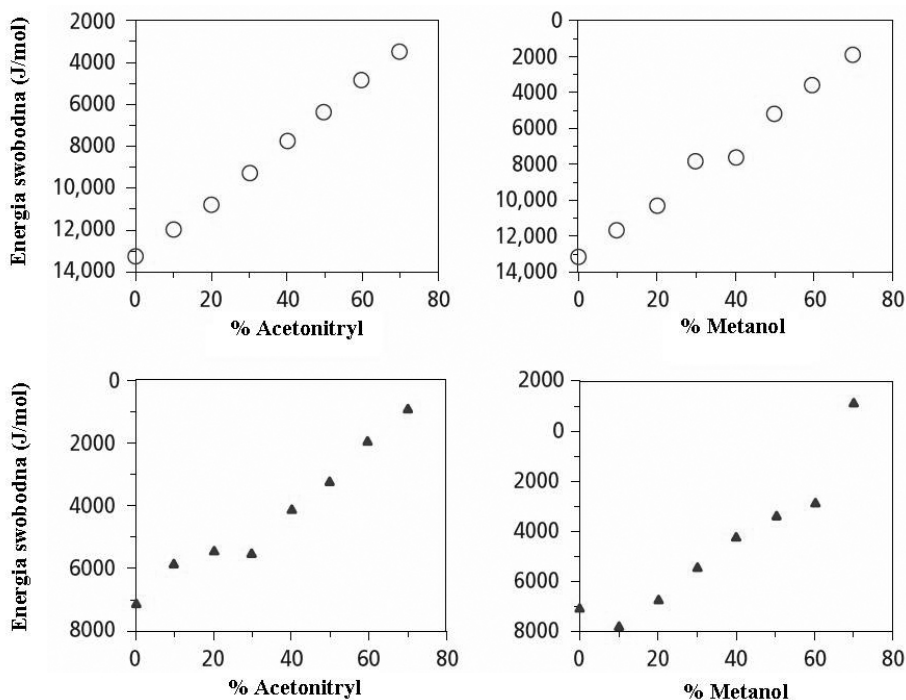
$$\ln k = - \frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \Phi \quad (11)$$

gdzie:

ΔH^0 – standardowa entalpia przeniesienia substancji z fazy ruchomej do stacjonarnej,

ΔS^0 – standardowa entropia przeniesienia substancji z fazy ruchomej do stacjonarnej,

Φ – stosunek objętości faz: stacjonarnej do ruchomej



Rysunek 10. Energia swobodna podziału substancji w funkcji stężenia modyfikatorów (ACN i MeOH) w elucje dla benzenu (koła) i nitropropan (trójkąty) [54]

Figure 10. Free energy of solute partitioning versus a percentage of organic modifier in mobile phase (ACN and MeOH) for benzene (circles) and nitropropane (triangles) [54]

Zakładając, że Φ jest stałe, oraz że zależność van't Hoffa ma przebieg liniowy (przyjmuje się, że entalpia nie zmienia się w badanym zakresie temperatur), wtedy

ta zależność umożliwia wygodne i łatwe przeprowadzenie obliczeń termodynamicznych, dotyczących siły napędowej rozdzielania chromatograficznego. To z kolei może dostarczyć informacji o mechanizmie retencji substancji w odwróconym układzie faz chromatografii cieczowej. Z otrzymanych zależności wynikało, że entalpia i entropia przeniesienia substancji z fazy ruchomej do stacjonarnej nie są liniową funkcją stężenia obydwu modyfikatorów w całym zakresie. Natomiast energia swobodna podziału substancji (ΔG) miała charakter liniowy przy stężeniu organicznych rozpuszczalników powyżej 20% (Rys. 10).

Autorka zauważyła, iż przy stężeniu modyfikatora większym niż 20%, faza stacjonarna była nasycona rozpuszczalnikiem i retencja rosła w sposób liniowy. Wynik ten był wyraźniejszy dla faz stacjonarnych o większej gęstości pokrycia ligandami C18 i alkilobenzenów o dłuższych łańcuchach. To zwiększenie retencji autorka wyjaśniła entropowym wypieraniem substancji z fazy stacjonarnej. Przyczyną tego było słabe solwatowanie łańcuchów alkilowych przez rozpuszczalnik, i co za tym idzie, zmniejszenie udziału oddziaływań cząsteczek chromatografowanych substancji ze składnikami strefy powierzchni adsorbentu. Zwiększenie retencji było wyraźniejsze dla szeregu homologicznego alkilobenzenów, ponieważ związki te są bardziej hydrofobowe niż nitroalkany. Autorka zaobserwowała większe zmiany retencji w przypadku układu z metanolem, który charakteryzuje się mniejszą zdolnością do solwatowania łańcuchów alkilowych niż acetonitryl. Natomiast pierwszy modyfikator ma dużą tendencję do tworzenia wiązań wodorowych. Autorka dowiodła w swojej pracy, że acetonitryl bardziej efektywnie solwatuje łańcuchy alkilowe niż metanol, a optymalne jego stężenie zapewniające całkowite zwilżenie fazy stacjonarnej oraz dobrą solwatację łańcuchów alkilowych, wyniosło około 20%.

Zdolność ACN do efektywnej solwatacji łańcuchów alkilowych wykazali w swoich pracach również Buszewski i in. [55]. Udowodnili, że acetonitryl silniej adsorbuje się na oktadecylowych fazach stacjonarnych w porównaniu do metanolu, co jest związane z faktem, iż ma on większą moc elucyjną niż MeOH.

6. WYJAŚNIENIE ZMIAN SELEKTYWNOŚCI POPRZEZ ODDZIAŁYWANIA MIĘDZYCZĄSTECZKOWE W STREFIE FAZY STACJONARNEJ

Opublikowane przez autorów niniejszego artykułu, prace dotyczące wpływu modyfikatora na selektywność rozdzielania różnych grup substancji, uwzględniają oddziaływania międzycząsteczkowe składników fazy stacjonarnej układu chromatograficznego z cząsteczkami substancji rozdzielanych, a pomijają oddziaływania w fazie ruchomej [51, 53, 56, 57]. W ramach drugiej poddano badaniom chromatograficznym węglowodory aromatyczne z różnymi, pojedynczymi polarnymi grupami funkcyjnymi [53]. Badania prowadzono w układach faz odwróconych, z wykorzystaniem adsorbentów typu C4 i C18 oraz dwu i trójskładnikowych eluentów. W kolejnej pracy [56] analizowano związki aromatyczne głównie z dwiema

grupami funkcyjnymi oraz szereg pochodnych aromatycznych i alifatycznych z jedną grupą polarną.

W ostatniej ze wspomnianych prac porównano stałe podziału benzenu i jego ośmiu pochodnych z różnymi polarnymi grupami funkcyjnymi, otrzymane dla układów gaz–ciecz [57]. Fazę ciekłą stanowiły wodne roztwory rozpuszczalników organicznych o stężeniach podobnych do tych, stosowanych często w odwróconych układach faz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (48,4% oraz 67,5% metanolu; 29,7% oraz 49,1% acetonitrylu; 29,7% oraz 49% tetrahydrofuranu). Porównano wartości stałej podziału badanych substancji dla różnych układów gaz–ciecz. Sporządzono zależności $\log K_1$ vs $\log K_2$, gdzie K_1 i K_2 są stałymi podziału substancji odpowiednio w układach 1 i 2. Charakteryzowały się one wysokimi wartościami współczynnika korelacji, $R > 0,995$ [57]. Natomiast nachylenie prostych korelacyjnych było bardzo zbliżone do 1,0. Obserwacje te dowodzą, iż selektywność podziału substancji we wspomnianych układach (gaz–ciecz) nie jest zależna od rodzaju zastosowanego modyfikatora w badanym zakresie stężeń. Wnioski wysnute z tych obserwacji posłużyły do wyjaśniania zmian selektywności rozdzielania węglowodorów aromatycznych z polarnymi grupami funkcyjnymi, chromatografowanych w układach RP HPLC [51, 52, 56, 58]. Gdy jest zmieniany rodzaj modyfikatora w eluencie, przy rozważaniach zmian selektywności badanych związków można brać pod uwagę tylko oddziaływania substancji w fazie stacjonarnej, natomiast pomija się oddziaływania w fazie ruchomej, co pozwala na znaczne uproszczenie zagadnienia interpretacji zmian selektywności.

W swych rozważaniach autorzy uwzględnili również właściwości składników układu chromatograficznego [51]. Woda, główny komponent fazy ruchomej, determinuje jej właściwości. Energia kohezji wody wynosi 554 cal/cm^3 i jest ona znacznie wyższa niż wartości tego parametru, zmierzone dla organicznych modyfikatorów. Można, zatem wywnioskować, że to woda jest odpowiedzialna za hydrofobowe wypieranie cząsteczek substancji z fazy ruchomej.

Jak wiadomo, w obszarze fazy stacjonarnej można wyróżnić następujące składniki: łańcuchy węglowodorowe, grupy silanolowe, wodę oraz pozostałe składniki eluentu (modyfikator, gdy eluent jest dwuskładnikowy). Dwa pierwsze komponenty nie zmieniają swojej ilości w fazie stacjonarnej. Stężenie wody w fazie stacjonarnej można przyjąć za stałe w dość szerokim zakresie jej składu ilościowego w fazie ruchomej. Można, zatem sugerować, iż to właśnie organiczny modyfikator obecny w fazie stacjonarnej odpowiada za zmiany selektywności, gdy porównujemy układy z różnymi rozpuszczalnikami.

Potwierdzeniem powyższych rozważań są zależności termodynamiczne, które zastosowano do tego typu układów [51].

Standardowa entalpia swobodna jest wyrażona jako:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (12)$$

Zmianę entalpii swobodnej substancji w układzie chromatograficznym można określić jako różnicę energii solwatacji [16].

$$\Delta G = \Delta G_{slv,S} - \Delta G_{slv,M} \quad (13)$$

$\Delta G_{slv,S}$ – energia solwatacji substancji w fazie stacjonarnej,

$\Delta G_{slv,M}$ – energia solwatacji substancji w fazie ruchomej.

Można zapisać [17]:

$$\Delta G_{slv} \approx \Delta G_{CAV} + \Delta G_{INT} \quad (14)$$

ΔG_{CAV} – zmiana entalpii swobodnej związana z utworzeniem wolnego miejsca dla cząsteczki.

ΔG_{INT} – zmiana entalpii swobodnej związana z oddziaływaniami z otaczającymi ją innymi cząsteczkami w odpowiedniej fazie.

Z powyższych założeń wynika, że:

$$\Delta G = \Delta G_{CAV,S} + \Delta G_{INT,S} - \Delta G_{CAV,M} - \Delta G_{INT,M} \quad (15)$$

$$\Delta G_1 = \Delta G_{CAV,S,1} + \Delta G_{INT,S,1} - \Delta G_{CAV,M,1} - \Delta G_{INT,M,1} \quad (16)$$

$$\Delta G_2 = \Delta G_{CAV,S,2} + \Delta G_{INT,S,2} - \Delta G_{CAV,M,2} - \Delta G_{INT,M,2} \quad (17)$$

Indeksy 1 i 2 oznaczają odpowiednio układy chromatograficzne z modyfikatorami 1 i 2. Po odjęciu stronami dwóch ostatnich równań otrzymuje się wyrażenie, określające zmiany retencji między dwoma chromatograficznymi układami z modyfikatorami 1 i 2.

$$\begin{aligned} \Delta(\Delta G) &= (\Delta G_{CAV,S,2} - \Delta G_{CAV,S,1}) + \\ &+ (\Delta G_{INT,S,2} - \Delta G_{INT,S,1}) - (\Delta G_{CAV,M,2} - \Delta G_{CAV,M,1}) - \\ &- (\Delta G_{INT,M,2} - \Delta G_{INT,M,1}) \end{aligned} \quad (18)$$

Jest ono analogiczne do równania:

$$\Delta(\Delta G^0) = \Delta G_2^0 - \Delta G_1^0 = -RT \ln (K_2/K_1) \quad (19)$$

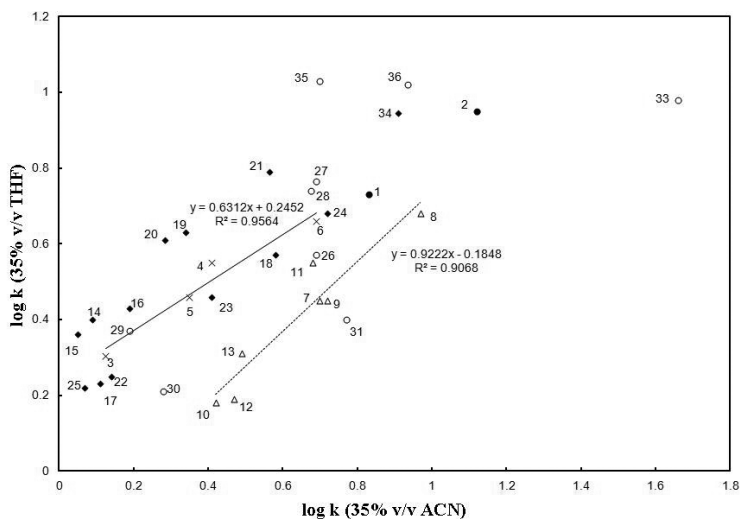
Człon $(\Delta G_{CAV,S,2} - \Delta G_{CAV,S,1})$ redukuje się, gdyż wartości energii potrzebne do utworzenia wolnego miejsca na cząsteczkę substancji w fazie stacjonarnej w układzie z eluentem, zawierającym modyfikator 1 i 2, są podobne.

Dodatkowo, sorpcja modyfikatora z eluentu, zawierającego dość wysokie stężenie wody, do fazy stacjonarnej zwiększa się w kolejności odwrotnej do energii kohezji czystych rozpuszczalników. Ponadto energia potrzebna do utworzenia wol-

nego miejsca dla cząsteczki substancji w węglowodorowej fazie stacjonarnej jest dużo mniejsza od energii niezbędnej do wywołania takiego efektu w wodnej fazie ruchomej. Można przyjąć, że człon $(\Delta G_{CAVM,2} - \Delta G_{CAVM,1}) - (\Delta G_{INT,M,2} - \Delta G_{INT,M,1})$ jest w przybliżeniu równy zeru dla określonych stężeń modyfikatorów w fazach ruchomych bądź przyjmuje stałą wartość w przypadku odpowiednio dużych zawartości wody w fazie ruchomej (zawartości, jakie najczęściej stosuje się w układach RP HPLC). Po powyższych uproszczeniach, różnicę entalpii swobodnych substancji między dwoma układami, zawierającymi różne modyfikatory, można przedstawić w postaci wyrażenia:

$$\Delta(\Delta G) = \Delta G_{INT,S,2} - \Delta G_{INT,S,1} \quad (20)$$

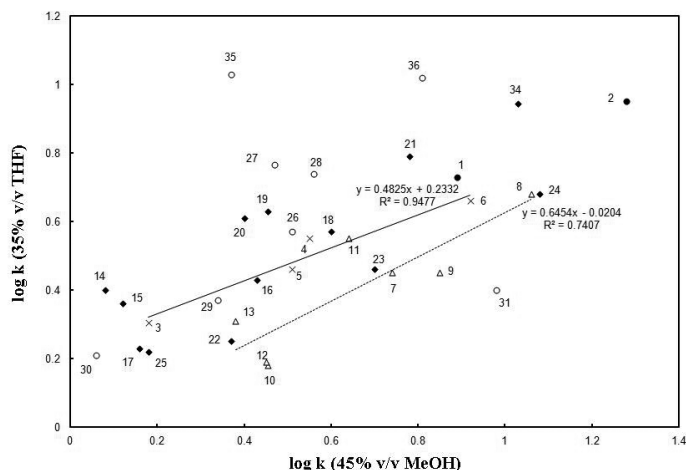
Autorzy opisywanego podejścia wnioskują, iż zmiana modyfikatora w fazie ruchomej prowadzi do innych udziałów poszczególnych typów oddziaływań cząsteczkowych w fazie stacjonarnej, co ma konsekwencje dotyczące zmian selektywności rozdzielania. Oznacza to, że zmiany selektywności mogą być wyjaśniane poprzez oddziaływania cząsteczkowe substancji z organicznymi składnikami eluentu, znajdującymi się w strefie fazy stacjonarnej. Poza tym, uporządkowanie łańcuchów alkilowych adsorbentu zależy od modyfikatora i może być przyczyną zmian selektywności rozdzielania, związanych ze zróżnicowanym kształtem cząsteczki. Fakt ten wiąże się bezpośrednio z czynnikiem entropowym mechanizmu retencji procesu chromatograficznego.



Rysunek 11. Korelacja $\log k$ (35% THF) i $\log k$ (35% ACN) dla związków aromatycznych: x – monofenole; Δ – związki aromatyczne z jedną grupą elektrodonorową; • – węglowodory aromatyczne; ◆ – związki aromatyczne z dwiema polarnymi grupami; o – związki aromatyczne z dwiema lub trzema grupami elektrodonorowymi [51].

Figure 11. Plot of $\log k$ (35% THF) against $\log k$ (35% ACN) for aromatic compounds: x – monophenols; Δ – aromatic compounds with one electron-donor group; • – aromatic hydrocarbons; ◆ – aromatic compounds with two polar groups; o – aromatic compounds with two or three electron-donor groups [51]

Jako przykład takiej interpretacji autorzy podają zmiany selektywności, które mają miejsce przy porównywaniu retencji aromatycznych pochodnych węglowodorowych, posiadających polarne grupy funkcyjne. Korelacje retencji tych związków wskazują na duże różnice selektywności. Bardzo wyraźnie jest to widoczne przy porównywaniu układów: metanol–tetrahydrofuran i acetonitryl–tetrahydrofuran (Rys. 11 i 12).



Rysunek 12. Korelacja $\log k$ (35% THF) i $\log k$ (45% MeOH) dla związków aromatycznych: x – monofenole; Δ – związki aromatyczne z jedną grupą elektrodonorową; • – węglowodory aromatyczne; ♦ – związki aromatyczne z dwiema polarnymi grupami; o – związki aromatyczne z dwiema lub trzema grupami elektrodonorowymi [51]

Figure 12. Plot of $\log k$ (35% THF) against $\log k$ (35% ACN) for aromatic compounds: x – monophenols; Δ – aromatic compounds with one electron-donor group; • – aromatic hydrocarbons; ♦ – aromatic compounds with two polar groups; o – aromatic compounds with two or three electron-donor groups [51]

W przypadku zamiany modyfikatora fazy ruchomej na inny, można zaobserwować różnice selektywności rozdzielania substancji. Są one wynikiem oddziaływań tych związków z organicznym składnikiem eluentu, zawartym w fazie stacjonarnej. W układach z tetrahydrofuranem zauważa się większą retencję substancji posiadających jedną grupę protonodonorową niż tych, które mają grupę elektrodonorową w porównaniu do układów z metanolem i acetonitrylem. Ilustruje to wzajemne położenie linii korelacyjnych dla substancji, będących odpowiednio donorami (linia ciągła) i akceptorami protonu (linia przerywana na Rys. 11 i 12). Jak wiadomo, zarówno MeOH jak i THF mają tendencję do tworzenia wiązań wodorowych z cząsteczkami substancji o właściwościach protonodonorowych. Jednak sorpcja pierwszego modyfikatora w niepolarniej fazie stacjonarnej jest dużo mniejsza niż drugiego [34, 47]. Dlatego też w układzie z tetrahydrofuranem substancje z grupami protonodonorowymi, wykazują wzrost retencji w stosunku do substancji z grupami protonoakceptorowymi w porównaniu do układu z metanolem.

Z porównania układów z metanolem i acetonitrylem wynika, że związki, których cząsteczki posiadają grupy protonodonorowe, charakteryzują się zwiększeniem retencji w układzie z pierwszym modyfikatorem w porównaniu do układu z drugim w stosunku do substancji nie mających zdolności do oddziaływań jako donor protonu.

Dzieje się tak, gdyż to właśnie metanol posiada większe zdolności protonoakceptorowe niż acetonitryl. Aczkolwiek to różnicowanie jest mniejsze niż dla porównywanych par układów z THF i MeOH lub z THF i ACN. Rozpatrując układy z tetrahydrofuranem zauważono wzrost retencji substancji, których cząsteczki posiadały dwie grupy protonodonorowe (np. dihydroksynaftaleny, punkty dla 1,5-dihydroksynaftalenu i 1,7-dihydroksynaftalenu, odpowiednio o numerach 14 i 16 na Rys. 11 i 12), w stosunku do związków z jedną grupą fenolową (fenol – punkt nr 3, Rys. 11 i 12) względem układów z metanolem i szczególnie z acetonitrylem. Taki efekt jest wyjaśniany wzrostem prawdopodobieństwa wystąpienia wiązania międzycząsteczkowego typu mostka wodorowego, gdy cząsteczki posiadają większą liczbę grup zdolnych do takich oddziaływań. Natomiast związki o cząsteczkach rozgałęzionych, cechują się zmniejszeniem retencji w stosunku do związków o cząsteczkach nierozgałęzionych w układzie z tetrahydrofuranem w porównaniu do układu z acetonitrylem lub metanolem. Da się to zaobserwować na przykładzie izomerów strukturalnych węglowodorów alifatycznych [51]. Retencja n-butanolu jest zwiększona w stosunku do izo-butanolu w układzie z THF ($\alpha = 1,31$) w porównaniu do układów z ACN ($\alpha = 1,02$) i MeOH ($\alpha = 1,02$) [59]. Spadek retencji 1,2-dinitrobenzenu, którego płaska struktura jest zaburzona przez efekt *orto* dwóch grup nitrowych (punkt nr 26, Rys. 11 i 12), względem 1,4-dinitrobenzenu (punkt nr 27, Rys. 11 i 12) w układzie z tetrahydrofuranem w porównaniu do układu z metanolem i acetonitrylem potwierdza tę interpretację. Spośród wspomnianych wyżej modyfikatorów, to właśnie THF najsilniej porządkuje strukturę łańcuchów alkilowych fazy stacjonarnej. Prowadzi to do zmniejszonego entropowego wnikańia rozgałęzionych molekuł do obszaru fazy stacjonarnej w układzie chromatograficznym zawierającym ten organiczny rozpuszczalnik [51]. Opisane podejście posłużyło do wyjaśniania zmian selektywności rozdzielania grupy nitrobenzenów. Z uwagi na wzrost retencji tych związków wraz z liczbą grup nitrowych w cząsteczce, nie można jej tłumaczyć posługując się teorią solwofobową. Porównując 1,3,5- trinitrobenzen (punkt nr 35, Rys. 11 i 12) z 1,2- dinitrobenzen (nr 26, Rys. 11 i 12) oraz nitrobenzenem (nr 11, Rys. 11 i 12) w układzie z tetrahydrofuranem, najwyższą retencję obserwuje się dla pierwszej z tych substancji. Grupa nitrowa ma dwa spolaryzowane wiązania – na atomie azotu jest zmniejszona gęstość elektronowa, a na atomach tlenu zwiększona. Cząsteczka THF posiada wiązanie eterowe ze zwiększoną gęstością elektronową na atomie tlenu, a zmniejszoną na sąsiednich atomach węgla. Ugrupowania te są kwadrupolami. Dochodzi do silnego przyciągania elektrostatycznego między tymi cząsteczkami, szczególnie gdy płaszczyzny grup O-N-O i C-O-C ustawiają się równolegle. Dzięki temu im więcej grup nitrowych występuje w cząsteczce substancji, tym bardziej zwiększa się energia jej oddziały-

wania z tetrahydrofuranem. Dlatego te oddziaływania, szczególnie mające miejsce w fazie stacjonarnej, mogą posłużyć do wyjaśnienia wzrostu retencji nitrobenzenów w układzie chromatograficznym z tetrahydrofuranem [60]. Natomiast w przypadku układów z metanolem, retencja nitropochodnych jest zgodna z teorią solwofobową. Podobnych przykładów zmian selektywności, wyjaśnianych poprzez oddziaływania, przede wszystkim, ze składnikiem organicznym zawartym w fazie stacjonarnej, jest więcej [51]. Ilustrują one możliwość prostej interpretacji zmian selektywności w przypadku zmian modyfikatora w fazie ruchomej. Podejście to umożliwia przewidywanie zmian selektywności rozdzielania substancji tylko na podstawie oddziaływań międzycząsteczkowych w fazie stacjonarnej, dzięki czemu dobór właściwego składu fazy ruchomej staje się łatwiejszy.

PODSUMOWANIE

Przedstawione powyżej wybrane zależności potwierdzają ogromną złożoność zjawisk występujących podczas prowadzenia procesu chromatograficznego rozdzielania substancji w układach RP HPLC. Dlatego tak ważne jest zrozumienie czynników wpływających na zmiany retencji i selektywności w tych układach, co bardzo ułatwia dobór optymalnych warunków separacji składników różnych próbek techniką RP HPLC.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K. Butchart, M. Woodfuff, *Sep. Sci. Eur.*, 2009, **1**, 17.
- [2] Kazakevich Y., Lo Brutto R., *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, Wiley John & Sons, 2007.
- [3] E. Soczewiński, C.A. Wachtmeister, *J. Chromatogr.*, 1987, **23**, 243.
- [4] L.R. Snyder, M.A. Quarry, *J. Liq. Chromatogr.*, 1987, **10**, 1789.
- [5] L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant, *J. Chromatogr. A*, 1979, **165**, 3.
- [6] L.R. Snyder, M.A. Stadalius, Cs. Horváth (Ed.), *High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives*, vol. 4, Academic Press, New York, 1986.
- [7] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, R. Tijssen, L. De Galan, *J. Chromatogr. A*, 1978, **149**, 519.
- [8] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. De Galan, *J. Chromatogr. A*, 1983, **282**, 107.
- [9] T. Kowalska, *Chromatographia*, 1990, **30**, 298.
- [10] M. Jaroniec, J.A. Jaroniec, *J. Liquid Chromatogr.*, 1984, **7**, 393.
- [11] M. Borówko, M. Jaroniec, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1983, **1**, 363.
- [12] R. Kaliszan, *Structure and Retention In Chromatography. A Chemometric Approach*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1997.
- [13] C. Horvath, W. Melander, *J. Chromatogr. Sci.*, 1977, **15**, 393.
- [14] B.A. Bidlingmeyer, *J. Chromatogr. Sci.*, 1980, **18**, 525.
- [15] A. de Juan, G. Fonrodona, E. Casassas, *Trends Anal. Chem.*, 1997, **16**, 52.
- [16] C. Horvath, W. Melander, I. Molnar, *J. Chromatogr.*, 1976, **125**, 129.
- [17] M.H. Abraham, P.L. Grelier, R.A. Mc.Giil, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2, 1988, 339.
- [18] J.G. Dorsey, K.A. Dill, *Chem. Rev.*, 1989, **89**, 331.

- [19] V. David, A. Medvedovici, *Revue Roumaine de Chimie*, 2005, **50**, 837.
- [20] C.E. Poole, S.K. Poole, *Chromatography today*, Elsevier, Amsterdam 1991.
- [21] M. Jaroniec, *J. Chromatogr. A*, 1993, **656**, 37.
- [22] L. Limsavarn, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1102**, 143.
- [23] D.E. Martire, R.E. Boehm, *J. Phys. Chem.*, 1983, **87**, 1045.
- [24] L.C. Sander, S.A. Wise, *J. Chromatogr. A*, 1993, **656**, 335.
- [25] L.C. Sander, M. Pursch, S.A. Wise, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 4821.
- [26] L.C. Sander, K.A. Lippa, S.A. Wise, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **382**, 646.
- [27] A. Cole, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 16.
- [28] E. Katz, *Handbook of HPLC*, Marcel Dekker Inc., 1998.
- [29] R.K. Gilpin, *J. Chromatogr. A*, 1993, **656**, 217.
- [30] K. Gilpin, M. Jaroniec, S. Lin, *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 2092.
- [31] B. Buszewski, R. K. Gilpin, M. Jaroniec, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 1997, **39**, 673.
- [32] R. Nasuto, L. Kwietniewski, J.K. Różyło, *J. Chromatogr. A*, 1997, **762**, 27.
- [33] M. Jaroniec, *J. Chromatogr. A*, 1996, **722**, 19.
- [34] M. McCormick, B.L. Karger, *Anal. Chem.*, 1980, **52**, 2249.
- [35] R.M. McCormick, B.L. Karger, *J. Chromatogr. A*, 1980, **199**, 259.
- [36] K.G. Wahlund, I.J. Beijersten, *J. Chromatogr.*, 1978, **149**, 313.
- [37] K.G. Wahlund, I. Beijersten, *Anal. Chem.*, 1982, **54**, 128.
- [38] N. Felitsyn, F. Cantwell, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 1031.
- [39] N. Felitsyn, F. Cantwell, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 1862.
- [40] L. Tan, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A*, 1997, **775**, 1.
- [41] L. Glavina, F. Cantwell, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 3299.
- [42] B.K. Lavine, J.P. Ritter, S. Peterson, *J. Chromatogr. A*, 2002, **946**, 83.
- [43] T. Ding, B.K. Lavine, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 9221.
- [44] L. Szepesy, *J. Chromatogr. A*, 2002, **960**, 69.
- [45] A. Sandi, L. Szepesy, *J. Chromatogr. A*, 1999, **845**, 113.
- [46] M. Rosés, X. Subirats, E. Bosch, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 1756.
- [47] P. Vajda, S. Bocian, B. Buszewski, A. Felinger, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 1954.
- [48] S. Bocian, J. Soukup, M. Matyska, J. Pesek, P. Jandera, B. Buszewski, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1245**, 90.
- [49] J.L. Rafferty, J.I. Siepmann, M.R. Schure, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 2203.
- [50] N. Tanaka, H. Goodell, B.L. Karger, *J. Chromatogr. A*, 1978, **158**, 233.
- [51] T.H. Dzido, T.E. Kossowski, D. Matosiuk, *J. Chromatogr. A*, 2002, **947**, 167.
- [52] A. Klimek-Turek, T.H. Dzido, H. Engelhardt, *LCGC Europe*, 2008, **21**, 33.
- [53] T.H. Dzido, H. Engelhardt, *Chromatographia*, 1994, **39**, 67.
- [54] J. Wysocki, *LCGC North America*, 2001, **19**.
- [55] S. Bocian, P. Vajda, A. Felinger, B. Buszewski, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1204**, 35.
- [56] T.H. Dzido, H. Engelhardt, *Chromatographia*, 1994, **39**, 51.
- [57] T.H. Dzido, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 2000, **23**, 2773.
- [58] A. Klimek-Turek, T.H. Dzido, *Adsorption*, 2010, **16**, 287.
- [59] A.P. Goldberg, E. Nowakowska, P.E. Antle, L.R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 1984, **316**, 241.
- [60] P. Urbanowicz, T. Kupka, R. Wrzalik, K. Pasterny, *J. Mol. Struct.*, 1999, **482-483**, 409.

