

Instytut Chemii UMCS  
Zakład Chemii Fizycznej  
Kierownik: prof. dr Andrzej Waksmundzki

Jan K. RÓŻYŁO

**Niektóre problemy optymalizacji warunków rozdziału mieszanin  
w chromatografii cieczowej z wymuszonym przepływem ciekłej fazy  
ruchomej**

Some Problems of the Optimisation of the Separation Conditions  
of Mixtures Using Liquid Chromatography

Некоторые вопросы оптимализации условий раздела смесей  
в жидкостной хроматографии

W pracowniach naukowo-badawczych chemicznych, biologicznych czy klinicznych, a także w technologicznych procesach przemysłowych zawsze potrzebna jest informacja o chemicznym składzie mieszanin substancji, z którymi mamy do czynienia. W tym celu drobinę różnych składników mieszaniny muszą być najpierw rozdzielone przed ich późniejszą identyfikacją. Jedną z najbardziej wydajnych pod tym względem metod jest obecnie chromatografia cieczowa. Ma ona ogromną przewagę nad innymi metodami w przypadku rozdziału mieszanin substancji nielotnych [1, 2]. Na przykład do niedawna polimery były rozdzielane prawie wyłącznie przy pomocy elektroforezy oraz zwykłej chromatografii kolumnowej. Obecnie chromatografia cieczowa przy wymuszonym przepływie fazy ruchomej (CC) umożliwia rozdział dużych ilości mieszanin w stosunkowo prosty sposób [3]. Te złożone mieszaniny zawierają podobne składniki, różniące się tylko funkcyjnością, wielkością drobin lub obu tymi parametrami łącznie. Właściwą selektywność rozdziału można tu osiągnąć przez zastosowanie różnych procesów, takich jak adsorpcja, podział, wymiana jonowa, sączenie molekularne. Szczególne przypadki rozdziału mieszanin wymagają czasem jednoczesnego stosowania tych procesów. Osiąga się to przez zastosowanie kolumn z różnymi wypełnieniami, przejawiającymi własności adsorpcji, wymiany jonowej czy podziału [4]. Mi-



mo że chromatografia cieczowa jest dziedziną znaną, stan wiedzy o możliwości optymalizacji układów chromatograficznych w takich przypadkach jest jeszcze niewielki, chociaż są to czynniki w dużym stopniu wpływające na efektywność rozdzielania mieszanin.

Wszystkie rodzaje chromatografii cieczowej doprowadzają do rozdzielania mieszanin w pewnych optymalnych warunkach, które zależne są z jednej strony od własności samej aparatury pomiarowej, a z drugiej — od własności układu chromatograficznego, tj. wypełnienia kolumny, i własności fazy ruchomej. Zagadnienie poprawienia efektywności rozdzielania mieszanin substancji sprowadza się więc do opracowania nowych typów kolumn i nowych rodzajów wypełnień oraz poznania podstawowych parametrów wpływających na ich rozdział. Podobnych parametrów poznanych dla chromatografii gazowej czy kolumnowej nie można tu stosować z uwagi na specyfikę metody chromatografii cieczowej z wymuszonym przepływem fazy ruchomej. Na przykład w wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej obserwuje się 100 razy większe lepkości cieczy niż gazów w porównywalnych warunkach. Również współczynniki dyfuzji substancji są tu  $10^5$  razy mniejsze niż w gazach. Czynniki te będą więc w jakiś sposób wpływały na procesy podstawowe decydujące o rozdziale, zmieniając ogólnie znane prawidłowości [5].

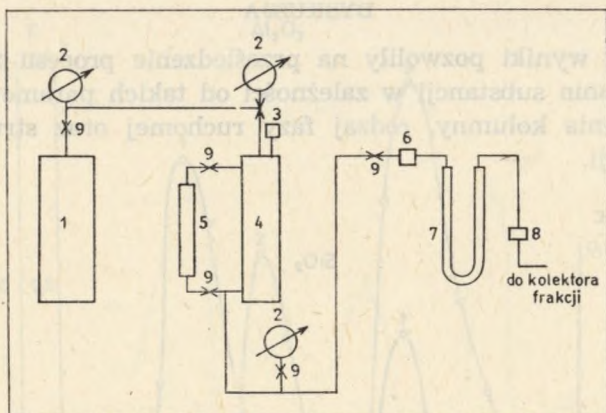
Ukazujące się obecnie publikacje naukowe oraz problematyka wielu sympozjów naukowych z tego zakresu wskazują na wzrastające znaczenie tej metody nie tylko pod względem analitycznym, ale również technologicznym rozdzielania mieszanin. Wiele firm na świecie produkuje coraz nowsze wyposażenie do tej metody. Wraz z jej rozwojem powstaje także szereg problemów natury teoretycznej, związanych z optymalizacją układów chromatograficznych [6].

Celem przedstawionej pracy było zbadanie pewnych parametrów wpływających na rozdział mieszanin metodą chromatografii cieczowej z wymuszonym przepływem fazy ruchomej, takich jak rodzaj wypełnienia kolumn pojedynczych i podwójnych, rodzaj stosowanej fazy ruchomej, a także struktury substancji w analizowanej mieszaninie.

#### CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Przedstawione wyżej problemy badano stosując chromatograf cieczowy własnej konstrukcji, wykonany ze stali kwasoodpornej, wytrzymałej na podwyższone ciśnienie. Chromatograf ten, którego schemat przedstawiony jest na ryc. 1, zaopatrzony był w zbiornik 10 l fazy ruchomej oraz kolumny w kształcie litery U. Podczas pomiaru stosowano ciśnienie rzędu 3 atm. Przepływ fazy ruchomej uzyskiwano przez tłoczenie gazu (azo-





Ryc. 1. Schemat chromatografu cieczowego; 1 — butla z gazem, 2 — manometry, 3 — dozownik fazy ruchomej, 4 — zbiornik fazy ruchomej, 5 — ciecowskaz, 6 — dawkomierz, 7 — kolumna, 8 — detektory, 9 — zawory

tu) do zbiornika z rozpuszczalnikiem. Przy takim ciśnieniu szybkość wypływu rozpuszczalnika była równa 5 ml/min. Jako najbardziej uniwersalne stosowano detekcję refraktometryczną i spektrofotometryczną [1]. Rozdzielanymi substancjami modelowymi były: anilina oraz o- i m-nitroanilina — związki, których wartości energii adsorpcji wynoszą: 6,6; 7,2; 7,5 odpowiednio [7]. Z wyliczeń [7] wynika, że najsilniej adsorbującym się izomerem na  $\text{SiO}_2$  powinna być m-nitroanilina. Jako wypełnienie kolumn stosowano żel krzemionkowy 100—200 mesh firmy Merck oraz tlenek glinowy do chromatografii firmy Schuchard. Kolumny napełniano żelem krzemionkowym w ilości 13 g oraz tlenkiem glinowym w ilości 26 g. W przypadku kolumn łączonych stosowano wypełnienie jak wyżej. Kolumny były zwilżane rozpuszczalnikiem przed dozowaniem próbek. Do dozownika dawano 1,5 molowe roztwory badanych substancji w ilości 1 ml.

Fazami ruchomymi były następujące rozpuszczalniki organiczne: benzen, toluen, chloroform i metanol. Rozpuszczalniki te posiadają różną zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, a więc różną zdolność oddziaływania z drobinami rozdzielanych substancji oraz stosowanymi adsorbentami.

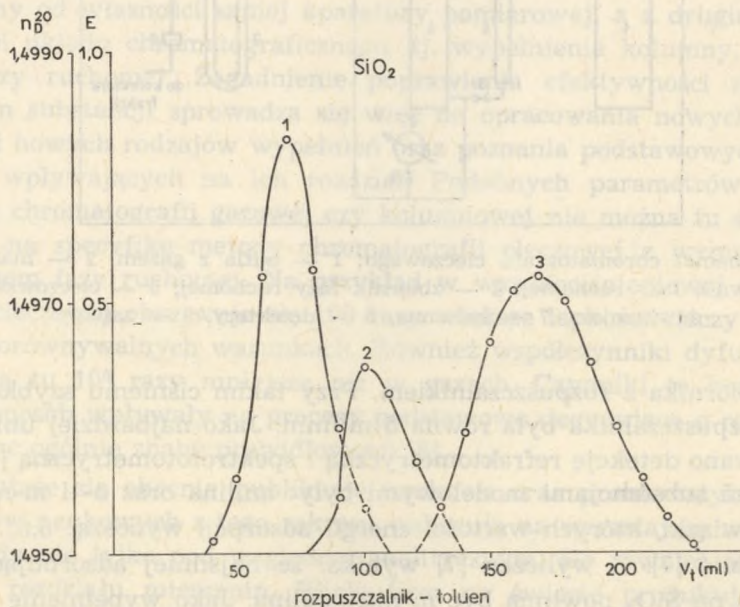
Czas analizy trwał przeciętnie ok. 30 min. Wszystkie pomiary prowadzono w standardowej temp.  $24^\circ\text{C}$ .

Wyniki pomiarów przedstawiono w postaci wykresów, na których na osi rzędnych odkładano wartości współczynnika załamania światła  $n_D^{20}$  roztworu lub współczynnika ekstynkcji  $E$ , a na osi odciętych odkładano objętości wycieku w mililitrach.



## DYSKUSJA

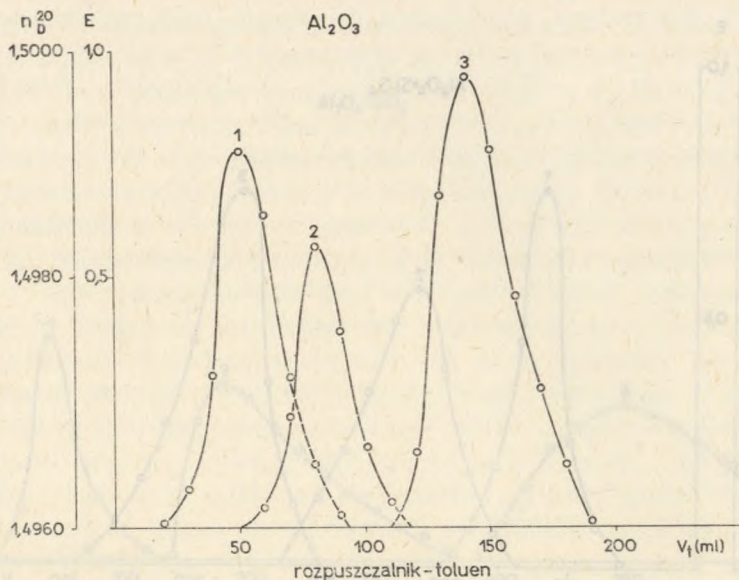
Otrzymane wyniki pozwoliły na prześledzenie procesu rozdziału badanych mieszanin substancji w zależności od takich parametrów, jak rodzaj wypełnienia kolumny, rodzaj fazy ruchomej oraz struktura badanych substancji.



Ryc. 2. Chromatograficzny rozdział mieszaniny aniliny i jej pochodnych na żelu krzemionkowym przy zastosowaniu jako fazy ruchomej toluenu; 1 — anilina, 2 — o-nitroanilina, 3 — m-nitroanilina

Podczas rozdzielania mieszaniny aniliny, o-nitroaniliny i m-nitroaniliny przy zastosowaniu do wypełnienia kolumny żelu krzemionkowego oraz toluenu jako fazy ruchomej uzyskano pewne zróżnicowanie pików poszczególnych substancji (ryc. 2). Objętości wycieku ( $V_t$ ) aniliny, o-nitroaniliny i m-nitroaniliny były równe odpowiednio 75, 100 i 170 ml. Dość niewielkie zróżnicowanie rozdzielania aniliny od o-nitroaniliny, co wynika z podobnych energii adsorpcji tych dwóch substancji.

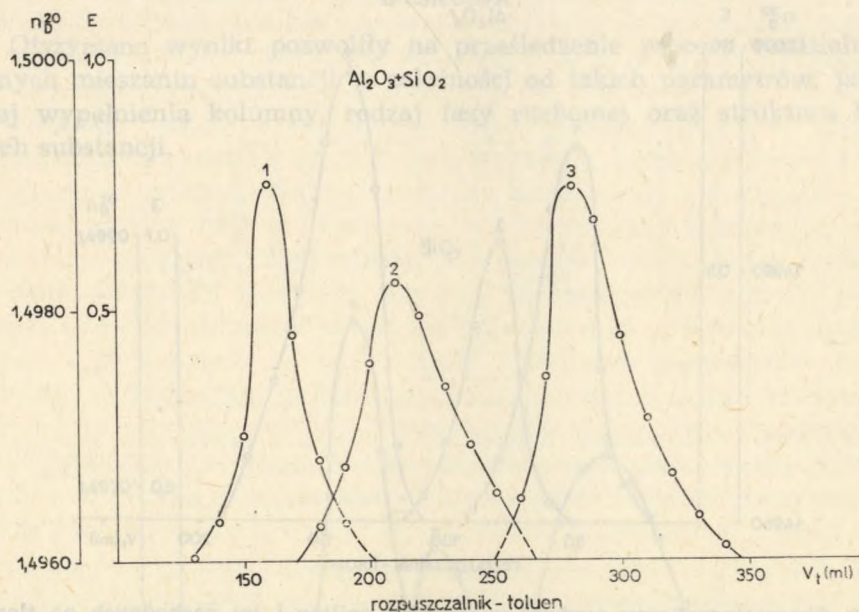
Z rozdzielania mieszaniny aniliny, o- i m-nitroanilin, uzyskanego na tlenku glinowym, wynika, że piki odpowiadające poszczególnym substancjom analizowanej mieszaniny są mniej rozmyte i wyraźnie odgraniczone (ryc. 3). Objętości wycieku aniliny, o- i m-nitroanilin równały się odpowiednio: 50, 75 i 150 ml. Te objętości wycieku są więc niższe niż w przypadku stosowania  $SiO_2$  do wypełnienia kolumny, co świadczy, że rodzaj wypełnienia odgrywa w tym przypadku dużą rolę.



Ryc. 3. Chromatograficzny rozdzał mieszaniny aniliny i jej pochodnych na tlenku glinowym przy zastosowaniu jako fazy ruchomej toluenu; oznaczenia patrz ryc. 2

Wypełnienia kolumn chromatograficznych jednego rodzaju są stosowane bardzo często w rozdzałach mieszanin substancji metodą chromatografii cieczowej z wymuszonym przepływem fazy ruchomej, ale w pewnych przypadkach łączne stosowanie zestawu kilku wypełnień o różnych zdolnościach adsorpcyjnych powinno dawać lepszą selektywność rozdzału. W tym celu postanowiono zbadać efektywność rozdzału mieszaniny powyższych trzech substancji na adsorbencie mieszanym, złożonym z tlenku glinowego i żelu krzemionkowego przy zastosowaniu, tak jak w poprzednich przypadkach, toluenu jako fazy ruchomej. Wykonano to w ten sposób, że pierwsza kolumna była wypełniona tlenkiem glinowym, a następna — żelem krzemionkowym. Wstępny rozdzał mieszaniny następował na  $Al_2O_3$ , a w dalszym etapie selektywność układu ulegała zwiększeniu na  $SiO_2$  (ryc. 4). Otrzymano dość wyraźne rozsuniecie pików odpowiadających poszczególnym substancjom, zwłaszcza oddzielenie pików odpowiadającego anilinie od pików o-nitroaniliny. Otrzymane piki substancji są dość symetryczne i stosunkowo mało rozmyte. Jednak z powodu większej ilości adsorbentu (łącznej), którą w tym przypadku zastosowano, objętość wycieku  $V_t$  jest znacznie większa niż w poprzednich przypadkach i dla aniliny, o- i m-nitroanilin wynosi odpowiednio: 170, 220 i 270 ml. Kolejność pojawiania się substancji w wycieku nie uległa zmianie.





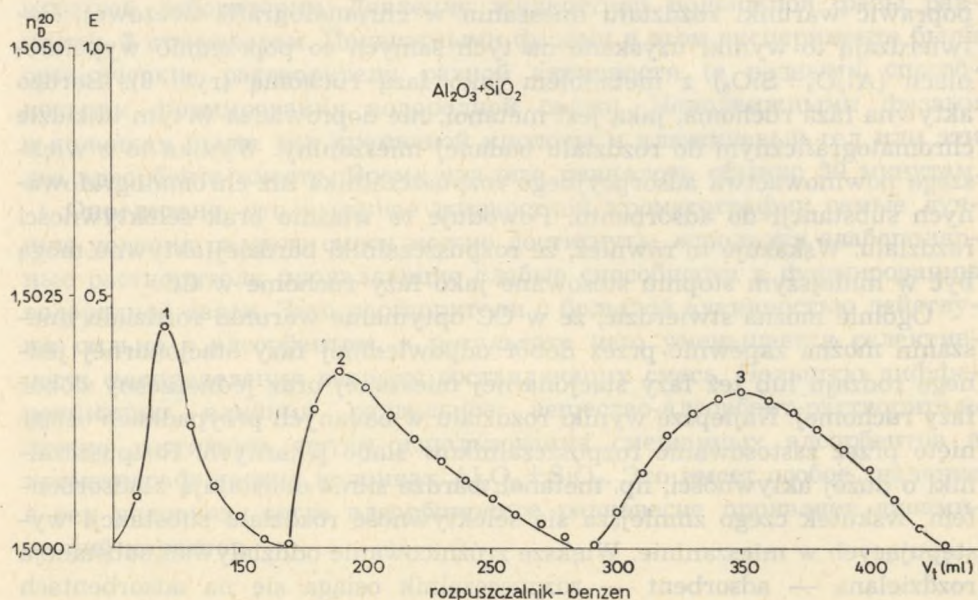
Ryc. 4. Chromatograficzny rozdział mieszaniny aniliny i jej pochodnych na adsorbencie mieszanym  $Al_2O_3 + SiO_2$  przy zastosowaniu jako fazy ruchomej toluenu; oznaczenia patrz ryc. 2

Przeprowadzone badania wykazały, że w pewnych przypadkach stosowanie wypełnień mieszanych doprowadza do polepszenia efektywności rozdziału mieszanin substancji, nawet przy stosowaniu tej samej fazy rochomej.

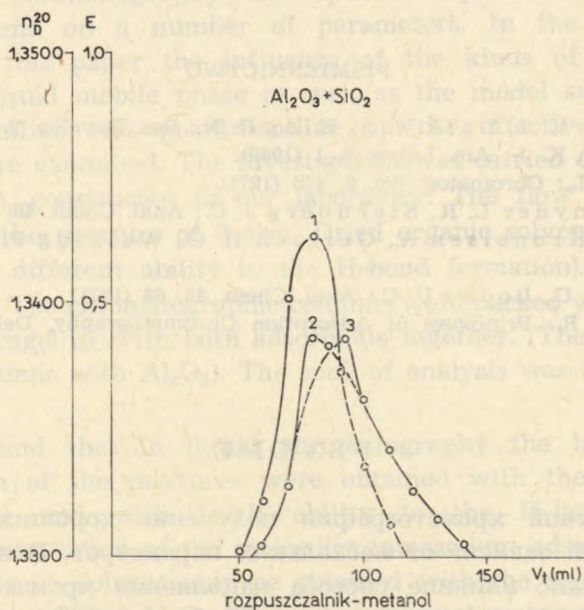
W adsorpcyjnej chromatografii cieczowej rodzaj rozpuszczalnika również odgrywa dużą rolę w optymalizacji rozdziałów mieszanin. W związku z tym rozdział chromatograficzny prowadzono przy zastosowaniu adsorbentu mieszanego  $Al_2O_3 + SiO_2$  łącznie. Jako fazy ruchome stosowano benzen i metanol. Mniej polarny i mniej aktywny rozpuszczalnik, jakim jest benzen w porównaniu na przykład z toluenem, daje bardzo dobry wynik rozdziału mieszaniny substancji występującej w próbce (ryc. 5).

Uzyskano w tym przypadku wyraźne odgraniczenie pików, są one jednak bardziej rozmyte niż uzyskiwane poprzednio, co można tłumaczyć mniejszą aktywnością rozpuszczalnika i w związku z tym — większymi oddziaływaniami cząsteczek chromatograficznych substancji z adsorbentem. Objętości wycieku  $V_t$  w obecnym przypadku są większe i dla aniliny, o- i m-nitroaniliny wynoszą odpowiednio: 75, 200 i 350 ml.

Otrzymane wyniki wskazują, że przez odpowiednią kombinację wypełnień w kolumnach oraz dobór fazy ruchomej można w dużym stopniu



Ryc. 5. Chromatograficzny rozdział mieszaniny aniliny i jej pochodnych na adsorbencie mieszanym  $\text{Al}_2\text{O}_3 + \text{SiO}_2$  przy zastosowaniu jako fazy ruchomej benzenu; oznaczenia patrz ryc. 2



Ryc. 6. Chromatograficzny rozdział mieszaniny aniliny i jej pochodnych na adsorbencie mieszanym  $\text{Al}_2\text{O}_3 + \text{SiO}_2$  przy zastosowaniu jako fazy ruchomej metanolu; oznaczenia patrz ryc. 2



poprawić warunki rozdziału mieszanin w chromatografii cieczowej. Potwierdzają to wyniki uzyskane na tych samych co poprzednio wypełnieniach ( $\text{Al}_2\text{O}_3 + \text{SiO}_2$ ) z metanolem jako fazą ruchomą (ryc. 6). Bardzo aktywna faza ruchoma, jaką jest metanol, nie doprowadza w tym układzie chromatograficznym do rozdziału badanej mieszaniny. Wynika to z większego powinowactwa adsorpcyjnego rozpuszczalnika niż chromatografowanych substancji do adsorbentu. Powoduje to właśnie brak selektywności rozdziału. Wskazuje to również, że rozpuszczalniki bardziej aktywne mogą być w mniejszym stopniu stosowane jako fazy ruchome w CC.

Ogólnie można stwierdzić, że w CC optymalne warunki rozdziału mieszanin można zapewnić przez dobór odpowiedniej fazy stacjonarnej jednego rodzaju lub też fazy stacjonarnej mieszanej oraz jednoczesny dobór fazy ruchomej. Najlepsze wyniki rozdziału w badanych przypadkach osiągnięto przez zastosowanie rozpuszczalników słabo polarnych. Rozpuszczalniki o dużej aktywności, np. metanol, bardzo silnie oddziałują z adsorbentem, wskutek czego zmniejsza się selektywność rozdziału substancji występujących w mieszaninie. Większe zróżnicowanie oddziaływań substancja rozdzielana — adsorbent — rozpuszczalnik osiąga się na adsorbentach mieszanych. Jest to szczególnie ważne w tych przypadkach, kiedy mamy do czynienia z dynamicznym ustalaniem się równowagi adsorpcyjnej w chromatografii cieczowej z wymuszonym przepływem fazy ruchomej.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Bombaugh K. J., Dark W. A., King R. N.: Res. Develop. **9**, 28 (1968).
2. Bombaugh K. J.: Am. Labor. **6**, 1 (1969).
3. Waters J. L.: Chromatog. Sci. **9**, 428 (1971).
4. Kwok J., Snyder L. R., Sternberg J. C.: Anal. Chem. **40**, 118 (1968).
5. Halasz J., Kroneisen A., Gerlach H. O., Walking P.: Z. anal. Chem. **234**, 81 (1968).
6. Martire D. C., Locke D. C.: Anal. Chem. **43**, 68 (1971).
7. Snyder L. R.: Principles of Adsorption Chromatography, Dekker, New York 1968.

#### РЕЗЮМЕ

В жидкостной хроматографии получение хороших результатов раздела смесей зависит от нескольких параметров. В настоящей работе исследовано влияние способа наполнения хроматографических колонок а также жидкостной подвижной фазы на эффективность раздела смеси анилина, о-нитроанилина и п-нитроанилина. Эти исследования проведено, используя жидкостный хроматограф изготовленный



в нашей лаборатории. Давление жидкостной подвижной фазы равнялось 3 атмосферам. Подвижными фазами в этом эксперименте были органические растворители разной активности (с разными способностями формирования водородной связи). Неподвижными фазами в колонках были: гел кремневой кислоты и алюминиевый гел или эти два адсорбента вместе. Время анализа равнялось обычно 30 минутам.

Определено, что в случае жидкостной хроматографии самые лучшие условия раздела смеси можно достигнуть, используя слабополярные растворители проявляющие слабые способности в формированию водородной связи. Зато растворители с большой активностью действуют сильно с адсорбентом, в результате чего уменьшается селективность распределения веществ составляющих смесь. Большую дифференциацию влияния раздельное вещество-адсорбент-растворитель можно достигнуть путём использования смешанных адсорбентов в хроматографических колонках  $\text{Al}_2\text{O}_3 + \text{SiO}_2$ . Это имеет особое значение в тех условиях, когда адсорбционное равновесие проявляет динамический характер.

#### SUMMARY

In liquid chromatography the optimal separation conditions of mixtures depend on a number of parameters. In the investigations presented in this paper the influence of the kinds of supports and the kind of liquid mobile phase as well as the model substances: aniline, o-nitroaniline and m-nitroaniline on the effectiveness of their separation were examined. The investigation was carried out by a liquid chromatograph, constructed in our laboratory. The flow of the mobile phase was at the pressure of 3 atm. Dried organic solvents of different activity (with different ability to the H-bond formation) were used as mobile phases. The chromatographic columns were packed with aluminium oxide and silicagel or with both adsorbents together. (The columns with  $\text{SiO}_2$  + the columns with  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). The time of analysis was 30 min. on the average.

It was found that in liquid chromatography the best results of the separation of the mixtures were obtained with the use of weak polar solvents and with small ability to the H-bond formation. The high differentiation of the molecular interaction: adsorbent — separated substance — solvent may be obtained with the use of the mixed column packings:  $\text{SiO}_2 + \text{Al}_2\text{O}_3$ . The above parameters are very important in the case when adsorption equilibrium has dynamic character.



