

Chemia Analityczna

Chromatografia

Tłumaczyła: inż. Karolina Hierasimczyk

Korekta:

dr hab. inż. Waldemar Wardencki, prof. nadzw. PG

prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik

Część I

Co to jest chromatografia?

Katedra Chemii Analitycznej

Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska

2002

SPIS TREŚCI

Wprowadzenie	I/3
1. Co to jest chromatografia?	I/4
1.1. Proces chromatograficzny	I/5
1.2. Podział metod chromatograficznych	I/8
1.3. Co to jest chromatografia gazowa?	I/18
2. Terminy i definicje	
2.1. Czas retencji (t_R)	
2.2. Współczynnik retencji (k)	
2.3. Indeks retencji (I)	
2.4. Współczynnik rozdzielenia	
2.5. Teoretyczna liczba pól (N) lub sprawność kolumny	
2.6. Rozdzielczość (R_S)	
2.7. Stosunek faz (β)	
3. Kolumny kapilarne do chromatografii gazowej	
3.1. Fazy stacjonarne	
3.1.1. Polisiloksany	
3.1.2. Glikole polietylenowe	
4. Gazy nośne	
5. Dozowniki	
5.1. Dozowniki wykorzystujące odparowanie	
5.2. Dyskryminacja związków dozowanych	
5.3. Opłukiwanie membrany	
5.4. Dozowanie na kolumnę typu „Megabore”	
5.5. Dozowniki z dzieleniem strumienia gazu (<i>split</i>)	
5.6. Dozownik bez podziału strumienia gazu	
6. Detektory w GC	
6.1. Detektor ciepłno-przewodnościowy (TCD)	
6.2. Detektor płomieniowo – jonizacyjny (FID)	
6.3. Detektor wychwytu elektronów (ECD)	
6.4. Detektor azotowo fosforowy (NPD)	
6.5. Detektor płomieniowo – fotometryczny (FPD)	
6.6. Detektor fotojonizacyjny (PID)	
6.7. Spektrometr mas (MS)	
7. Analiza ilościowa	

Wprowadzenie

Celem niniejszej pracy było przygotowanie materiałów w języku polskim z zakresu chromatografii gazowej. Autorem pracy w języku angielskim jest Profesor Carlos Lopez pracujący na hiszpańskim Uniwersytecie de Antioquia. W swojej pracy wyczerpująco opisał metodę chromatografii gazowej oraz zamieścił schematy rysunków szczegółowo przedstawiające istotę poszczególnych etapów związanych z tą techniką.

Zapytany o pozwolenie na wykorzystanie i przetłumaczenie swojej pracy Profesor Lopez odpisał, iż materiały umieszczone w Internecie są ogólnodostępne.

Obecnie materiały te można znaleźć na stronie internetowej o następującym adresie:

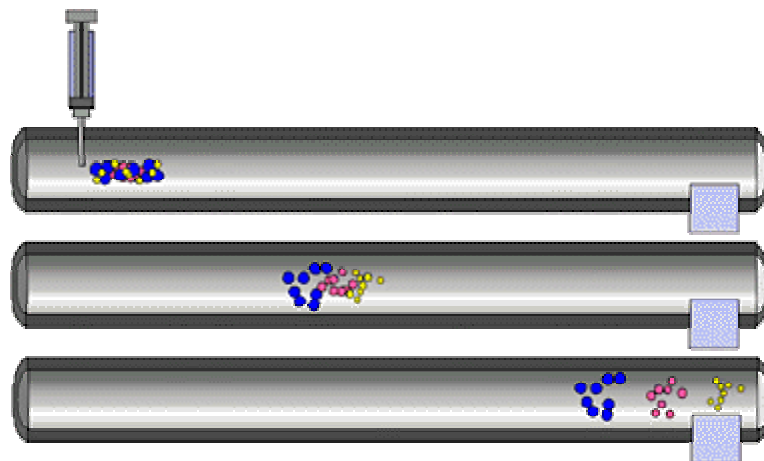
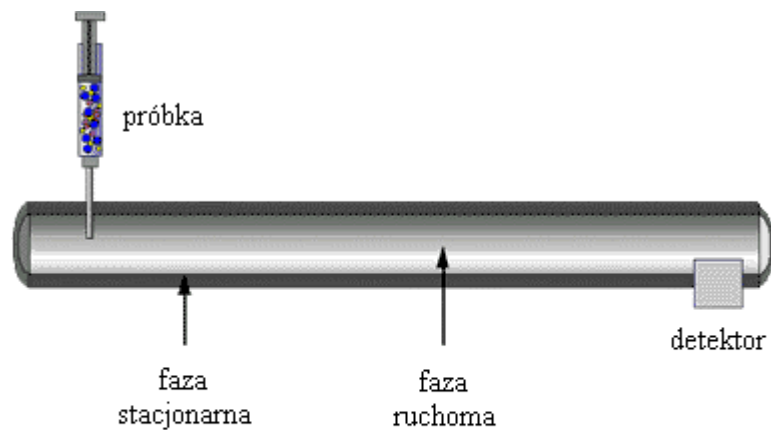
<http://matematicas.udea.edu.co/~carlopez/chromatography1/chrompage13.html>

Na stronie internetowej o następującym adresie można znaleźć także inne materiały autorstwa Profesora Lopez'a poświęcone różnym technikom chromatograficznym:

<http://matematicas.udea.edu.co/~carlopez/ing2/cromato.html>

Swoją pracę Profesor Lopez umieścił na stronach web w wersji hiszpańskiej oraz angielskiej. Została więc przetłumaczona z języka angielskiego na potrzeby polskich studentów.

Co to jest chromatografia?



Definicja

Technika rozdzielania składników mieszaniny na podstawie względnych ilości każdej z substancji podzielonej pomiędzy poruszającym się strumieniem płynu, zwanym **fazą ruchomą** i sąsiadującą **fazą stacjonarną**.

Fazą ruchomą może być gaz, ciecz lub substancja w stanie nadkrytycznym, podczas gdy fazą stacjonarną jest substancja stała albo ciekła. Kinetyczny ruch cząsteczek prowadzi do nieustannej wymiany substancji pomiędzy oboma fazami. Jeżeli, dla danej substancji, podział jest bardziej korzystny dla poruszającej się fazy stacjonarnej, cząsteczki spędzą większość czasu migrując ze strumieniem tej fazy i będą oddzielone od innych składników, których cząsteczki są dłużej zatrzymane przez fazę stacjonarną.

Dla poszczególnych substancji, stosunek czasu spędzonego w obszarze fazy ruchomej i stacjonarnej jest równy stosunkowi ich stężenia w tych obszarach, i określany jest jako **stała podziału** (w przypadku fazy stałej często stosowany jest termin izoterma adsorpcji).

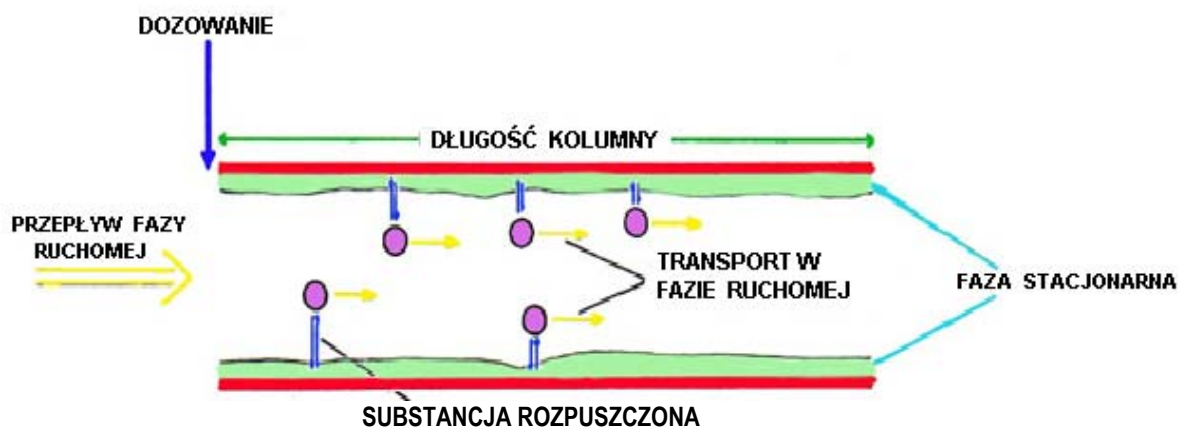
Badana mieszanina jest wprowadzona do układu w postaci wąskiej strefy (punkt wyjściowy), po czym substancje są transportowane z różną szybkością zgodnie z kierunkiem przepływu fazy ruchomej.

Siłą napędową migrującej substancji jest poruszająca się faza ruchoma, a siłą przytrzymującą jest powinowactwo substancji do fazy stacjonarnej; kombinacja obu tych sił, kontrolowana przez analityka, prowadzi do rozdzielenia składników mieszaniny na poszczególne substancje.

1.1. Proces chromatograficzny

Stała podziału K_D

Każdy proces chromatograficzny oparty jest na podziale składników pomiędzy dwie fazy. Gdy próbka znajduje się w kolumnie, składniki próbek natychmiast ulegają podziałowi pomiędzy fazę stacjonarną (stałą lub ciekłą) lub fazę ruchomą (gaz, ciecz lub substancja w stanie nadkrytycznym). Faza ruchoma będzie przenosić przez kolumnę zadozowaną mieszaninę zawierającą różne składniki. Różne substancje będą różnorodnie oddziaływać z fazą stacjonarną w zależności od ich struktury cząsteczkowej.



Podział substancji opisuje współczynnik podziału K_D , definiowany jako stosunek masy substancji w równych objętościach fazy ruchomej i stacjonarnej.

$$K_D = \frac{\text{masa substancji w jednostce objętości fazy stacjonarnej}}{\text{masa substancji w jednostce objętości fazy ruchomej}} = \frac{C_s}{C_m}$$

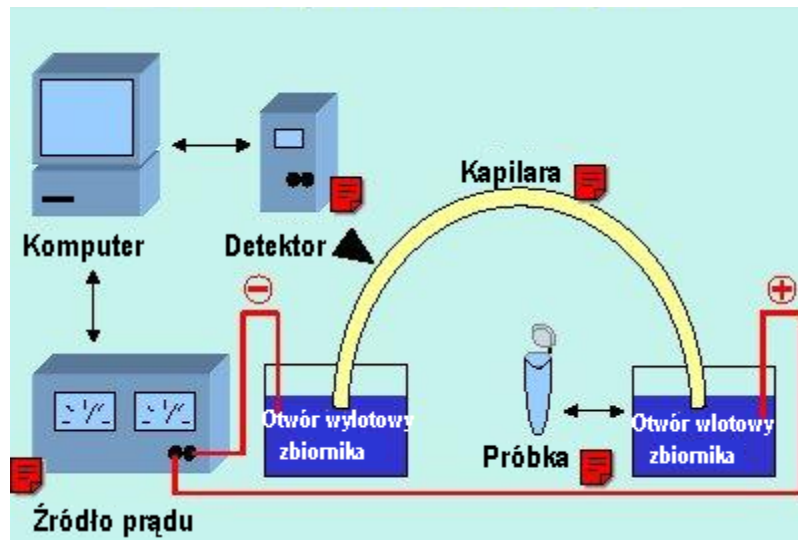
K_D jest stałą równowagi, która zależy tylko od badanej substancji, fazy ciekłej i temperatury. Jej wartość nie zależy od rodzaju kolumny. Transport substancji przez kolumnę odbywa się tylko w nieustannie poruszającej się z tą samą prędkością fazie ruchomej.

Całkowity czas jaki substancja spędza w kolumnie jest jej czasem retencji (t_R).

Im dłużej analizowana substancja przebywa w fazie ruchomej, tym szybciej wymywana jest z kolumny, a czas retencji jest krótki. Związki, które oddziałują z fazą ciekłą w większym stopniu dłużej pozostają w kolumnie i ich czas retencji jest także dłuższy. Oddziaływanie związków z fazą stacjonarną, która w rzeczywistości określa czas retencji zależy od struktury cząsteczkowej, szczególnie od rodzaju i liczby obecnych grup funkcyjnych ale także od geometrii cząsteczek.

Chromatografia jest jedną z kilku technik separacyjnych określanych jako migracja różnicująca z wąskiego początkowego pasma. Elektroforeza jest inną techniką z tej grupy. W tym przypadku siłą napędową jest pole elektryczne, które wywiera odmienne siły na różne ładunki jonowe poszczególnych substancji. Siłą przytrzymującą jest lepkość nie poruszającego się rozpuszczalnika. Kombinacja tych sił powoduje ruch jonów charakterystyczny dla każdej substancji rozpuszczonej.

PODSTAWOWE ELEMENTY ELEKTROFOREZY KAPILARNEJ



Chromatografia znajduje liczne zastosowania w dziedzinie biologii i chemii. Jest szeroko stosowana w badaniach biochemicznych jako metoda służąca do separacji i identyfikacji związków chemicznych pochodzenia biologicznego. W przemyśle naftowym technika ta umożliwia analizę skomplikowanych mieszanin węglowodorowych.

Jako metoda separacyjna, chromatografia ma liczne zalety w porównaniu do starszych technik rozdzielania np. krystalizacji, ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika i destylacji. Pozwala na separację wszystkich składników chemicznych mieszanin wieloskładnikowych bez potrzeby posiadania rozległej wiedzy o liczbie lub względnej ilości obecnych substancji oraz ich rodzaju. Jest uniwersalna ponieważ umożliwia rozdzielanie cząsteczek o różnych rozmiarach, począwszy od wirusów zbudowanych z milionów atomów do najmniejszych ze wszystkich cząsteczek - cząsteczek wodoru, zawierających tylko dwa atomy; co więcej, może być zastosowana przy małych lub dużych ilościach próbek.

Dzięki niektórym rodzajom chromatografii można wykrywać substancje obecne na poziomie pikogramów (10^{-12} gram), czyniąc metodę znakomitą techniką do oznaczania śladowych ilości, szeroko stosowaną do wykrywania chlorowanych pestycydów w materiałach biologicznych i środowisku, w sądownictwie oraz przy wykrywaniu narkotyków w przypadku nadużyte i w terapii. Jej możliwości rozdzielcze są nieporównywalne do innych metod separacyjnych.

1.2. Podział metod chromatograficznych

Metody chromatograficzne klasyfikuje się według następujących kryteriów:

- geometrii układu
- rodzaju operacji
- mechanizmu zatrzymywania i retencji
- rodzaju faz

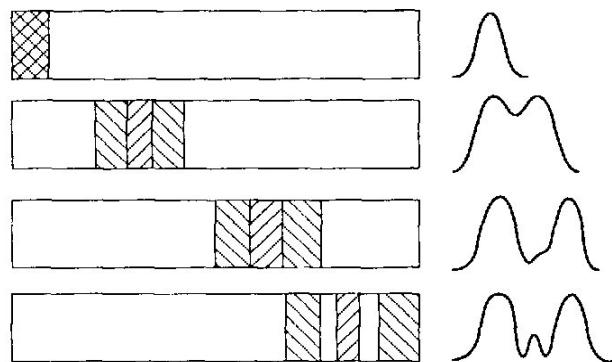
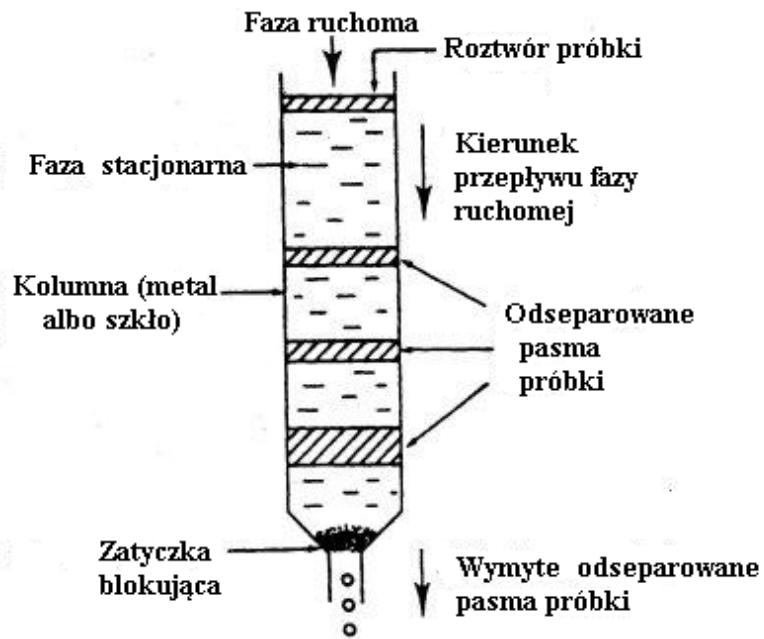
Geometria

Kolumna chromatograficzna

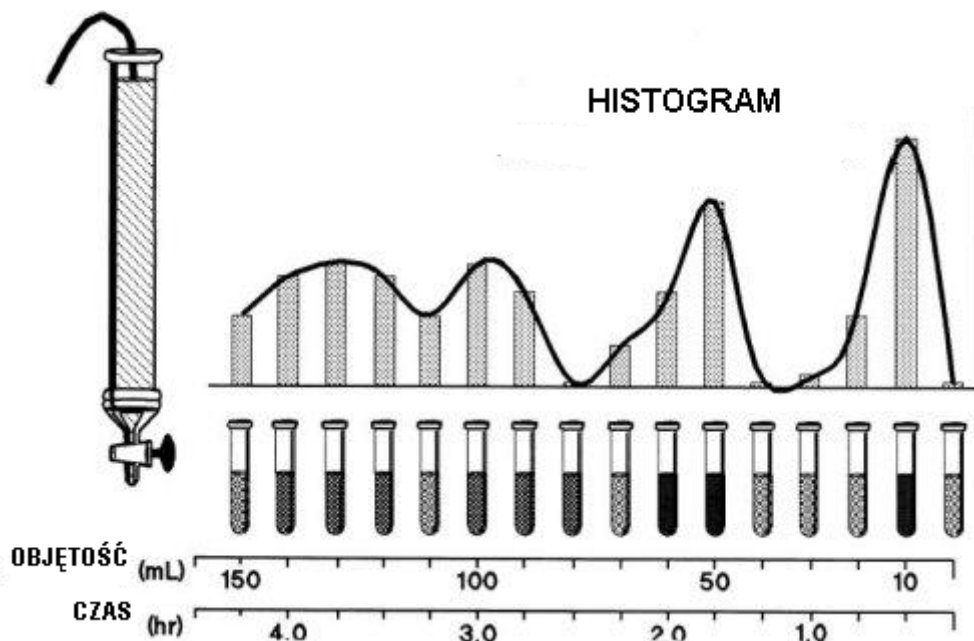
W układzie chromatograficznym faza ruchoma i stacjonarna umieszczone są w taki sposób, aby migracja składników trwała dłużej wzdłuż niż w poprzek.

Istnieją dwie podstawowe geometrie: kolumnowa i planarna. W wersji kolumnowej faza stacjonarna znajduje się w rurce zwanej kolumną. Kolumna z wypełnieniem zawiera cząstki, które albo stanowią albo podtrzymują fazę stacjonarną a faza ruchoma przepływa przez kanaliki przestrzeni międzyziarnowej.

Teoria wykazała, że lepsze rezultaty osiąga się stosując bardzo małe cząsteczki, które jednocześnie zapewniają dodatkową pożądaną cechę, a mianowicie że kanaliki są bardzo wąskie. Wpływ przenoszenia masy w fazie ruchomej na rozmycie pasma (piku) zostanie w ten sposób zredukowany (dyskusja na temat przenikania masy i rozmycia pików, efektywności i rozdzielczości oraz teoretyczne rozważania poniżej).



Wyidealizowany proces separacji w chromatografii gazowej z trzema składnikami (dwa główne i jeden uboczny).



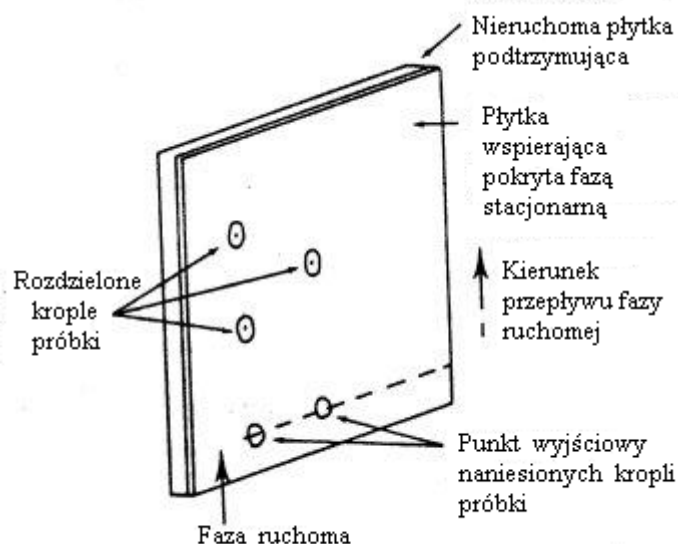
Jeżeli faza stacjonarna będzie miała formę cienkiej powłoki albo warstwy, zredukuje to rozmycie pasma spowodowane przenoszeniem masy do fazy stacjonarnej. Cząstki porowate, jako adsorbenty albo nośniki cieczy, mogą mieć głębokie pory, z których niektóre mogą obejmować całą cząstkę. Przyczynia się to do rozmycia pasma.

Efekty te mogą być zmniejszone poprzez zastosowanie mikrocząstek ponieważ w ten sposób zostają zmniejszone kanaliki. Alternatywnie, jako wypełnienie można zastosować nieprzepuszczalne makrocząstki, takie jak kulki szklane, pokryte cienką warstwą mikrocząstek. Są to: warstwy porowate, powierzchniowo porowate, albo wypełnienia adhezyjne. W przypadku zmniejszenia wielkości cząstek, zmniejszona musi być także średnica kolumny. Ostatecznie, ilość fazy stacjonarnej jest mniejsza i wielkość próbki musi zostać zredukowana. Metody detekcji powinny więc odpowiadać bardzo małym rozmiarom badanej substancji, a także niezbędne jest większe ciśnienie do tego aby faza ruchoma przepływała przez kolumnę. Skrajnym przypadkiem są mikrokolumny, np. kolumna o długości 35 cm i średnicy wewnętrznej 320 μm wypełniona cząstkami o średnicy 2 μm .

Innym rozwiązaniem jest pokrycie wewnętrznej ścianki rurki ze stali nierdzewnej lub stopionej krzemionki o małej średnicy, fazą stacjonarną. Są to kolumny kapilarne (otwarte). Pokrycie może mieć formę cieczy lub ciała stałego. W przypadku gdy fazą ruchomą jest gaz, długa i cienka warstwa fazy stacjonarnej pozwala na uzyskanie lepszych rezultatów. Kolumny takie ze względu na mały opór przepływu wymagają urządzeń wspomagających przepływ

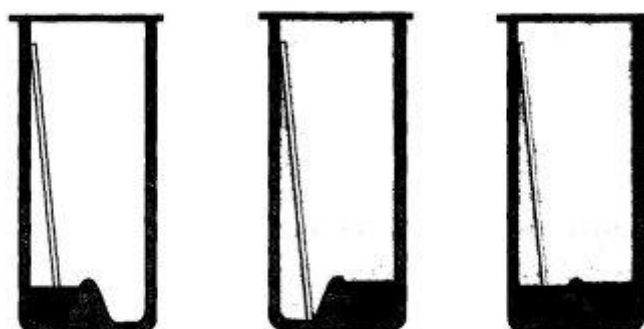
strumienia gazu. Kolumny, w których stosuje się ciecz jako fazę ruchomą są krótsze i wymagają dużego ciśnienia wspomagającego przepływ strumienia gazu.

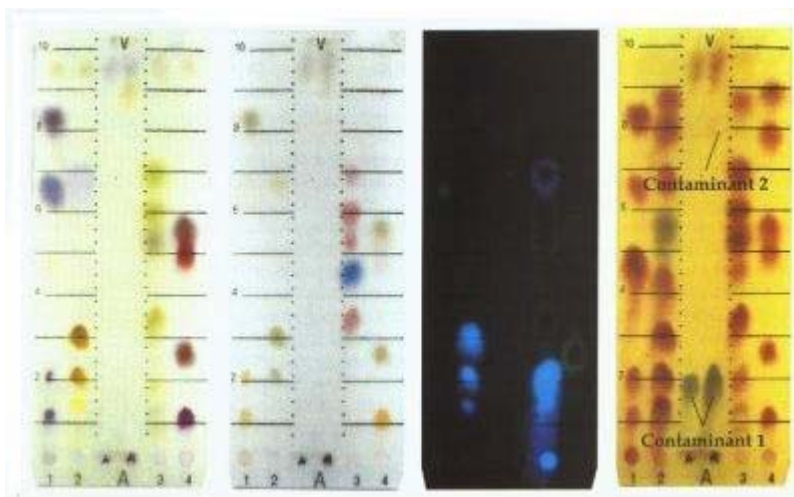
Chromatografia planarna



Komora z dwoma rowkami. Tylko rowek, w którym płytka jest umiejscowiona musi być wypełniony rozpuszczalnikiem gdy równowaga nie jest planowana. Standardowe warunki przed-równowagowe są wtedy gdy płytka umiejscowiona jest w pustym korytku, podczas gdy rozpuszczalnik albo jakakolwiek inna kondycjonowana ciecz znajduje się w innym. Rozwijanie rozpoczyna się po dodaniu rozpuszczalnika do rowka z płytką.

Standaryzacja wstępnej równowagi jest możliwa dla płytki z pustym rowkiem, podczas gdy rozpuszczalnik lub każda inna kondycjonowana ciecz znajduje się w drugim rowku.





Colin F. Poole "**Planar chromatography at the turn of the century**, Journal of Chromatography A 1999, 856:1-2:399-427

W tym rozwiązaniu faza stacjonarna skonfigurowana jest jako warstwa dwuwymiarowa. W chromatografii bibułowej warstwa lub wąski pasek bibuły służy jako faza stacjonarna. W chromatografii cienkowarstwowej cienka powłoka fazy stacjonarnej złożonej z cząstek ciała stałego związanych razem siłą mechaniczną ze spoiwem, takim jak siarczan wapniowy, pokrywa szklaną albo plastikową płytkę. Jeden koniec płytki zanurzony jest w zbiorniku z fazą ruchomą, która, wskutek sit kapilarnych, porusza się przez złoże prostopadle do powierzchni fazy ruchomej. Taki ruch kapilarny jest porównywany do dyfuzji substancji rozpuszczonej w fazie ruchomej pod kątem prostym w stosunku do drogi migracji, więc substancja rozpuszczona ograniczona jest do wąskiej dróżki.

Techniki separacyjne

Rozdzielenie składników próbki może być osiągnięte z wykorzystaniem jednej z trzech technik: analizę czołową, rozwijanie przez rugowanie albo rozwijanie elucyjne.

Analiza czołowa

Ciecz lub mieszaninę gazów wprowadza się do kolumny z wypełnieniem stałym. Mieszanina pełni rolę fazy ruchomej, a separacja zależy od oddziaływania z fazą stacjonarną i przestoczenia się każdego ze składników mieszaniny w sorbat (zobacz poniższy rysunek).

Gdy wypełnienie kolumny zostanie nasycone (np. gdy większa ilość składników nie może już być zaabsorbowana), mieszanina przepływa wtedy w jej pierwotnym składzie. Na początku, gdy metodę tę zaczęto stosować, mierzono zmiany stężenia na czole kolumny; stąd nazwa „analiza czołowa”. Najslabiej sorbowane składniki przechodziły przez kolumnę jako pierwsze i były jedynymi składnikami otrzymanymi w „czystej” formie. Rysunek przedstawia zapis rozdzielania techniką analizy czołowej dla czteroskładnikowej próbki.

Analiza czołowa wymaga „wypukłych” izoterm podziału. Wynikiem tego są piki o ostrych czołach i dobrze uformowanych stopniach. Rysunek wskazuje problemy analityczne związane z analizą czołową – trudno jest obliczyć początkowe stężenia próbki. Można jednak określić liczbę składników w próbce. Jeżeli izotermy są liniowe, strefy mogą zostać rozproszone. Przyczyną tego mogą być trzy ważne procesy: niejednorodność wypełnienia, duże efekty dyfuzji i nieosiągalność równowagi sorpcji.

Rozwijanie przez rugowanie

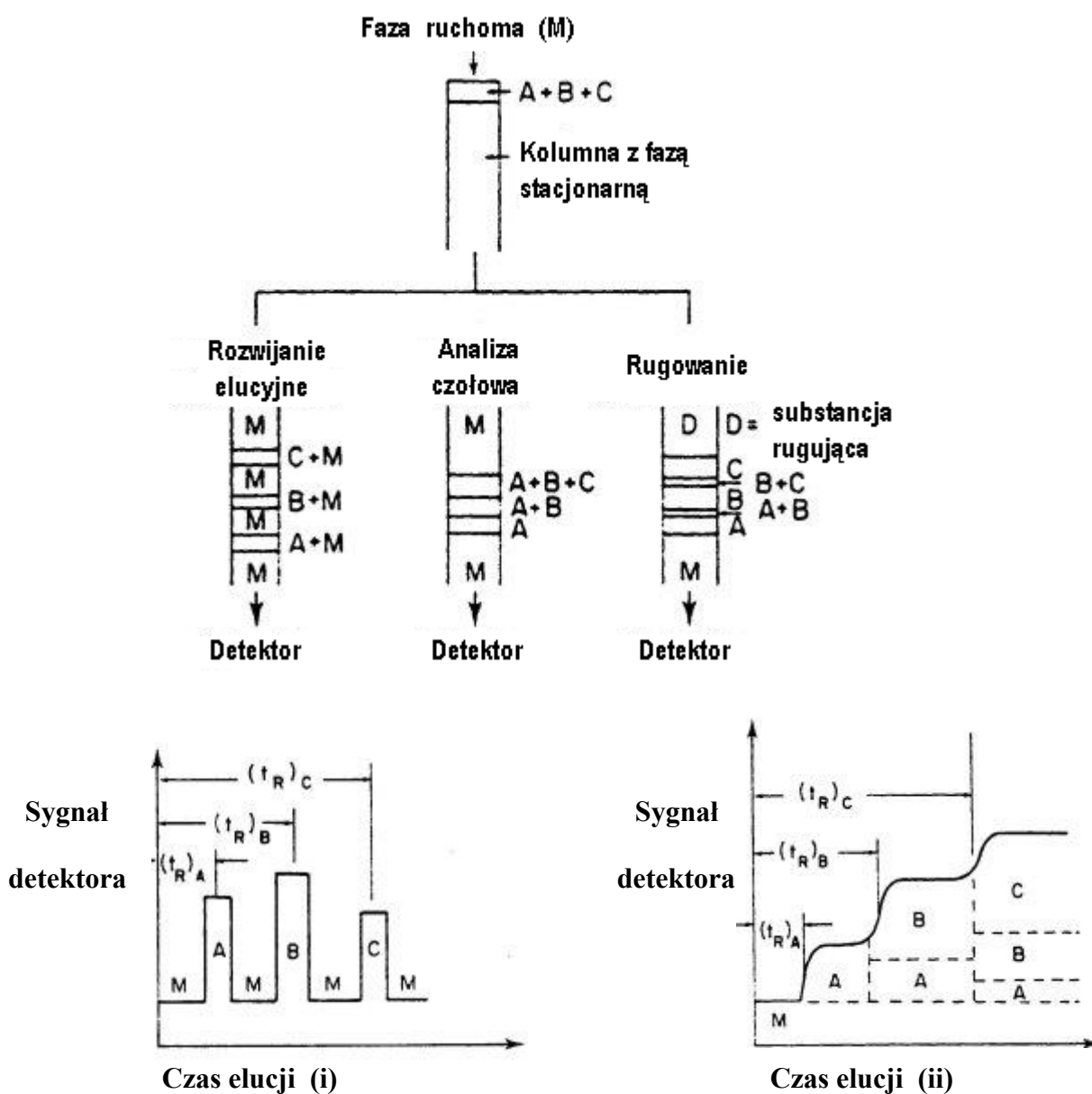
W technice tej substancja rugująca znajduje się w fazie ruchomej, która może być cieczą lub gazem (zobacz rysunki). Podstawowy wymóg stanowi faza ruchoma, która powinna być bardziej sorbowana niż inne składniki próbki. Zawsze otrzymuje się pojedyncze czyste pasma pierwszego składnika próbki. W dodatku, dla każdego z rozwijanych związków zawsze istnieje nachodząca strefa, co stanowi zaletę tej techniki nad analizą czołową. Wadą, z analitycznego punktu widzenia jest to, iż pasma składników nie są oddzielone strefą czystej fazy ruchomej. Wysokości są stosowane do identyfikacji składników, podczas gdy długość jest proporcjonalna do ilości składnika (zobacz rysunek).

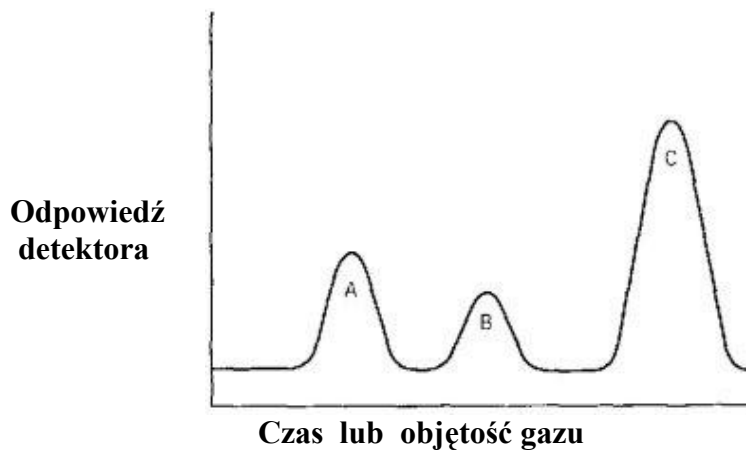
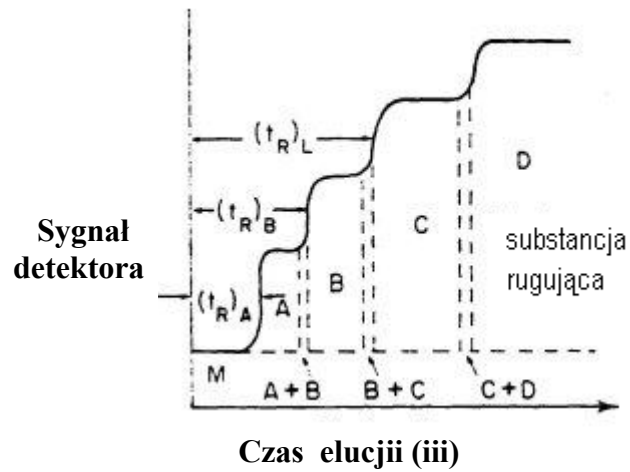
Podobnie jak w analizie czołowej, technika rugowania wymaga „wypukłych” izoterm. Gdy warunki równowagi zostaną spełnione, wzrost długości kolumny jest nieużyteczny w tej technice ponieważ separacja zależy bardziej od warunków równowagi niż od wymiarów kolumny.

"Development of simultaneous purification methodology for multiple synthetic peptides by reversed-phase sample displacement chromatography", Volume 893, Issue 1, Date 29-Sep-2000 Journal of Chromatography A, D.L. Husband, C.T. Mant, R.S. Hodgespp 81-94

Rozwijanie elucyjne

W technice tej, składniki A i B poruszają się wzdłuż kolumny ze stałym wypełnieniem z szybkością określoną przez ich retencję. Jeżeli różnice sorpcji są znaczne albo kolumna jest dość długa, możliwa jest całkowita separacja składników A i B. Gdy eluent dodawany jest w sposób ciągły kolumnę opuszczają odseparowane obszary lub pasma. Wadą techniki jest bardzo długi okres czasu potrzebny na usunięcie silnie zasorbowanych składników. Trudności te mogą być pokonane przez wzrost temperatury kolumny podczas procesu separacji. Rysunek przedstawia typowy chromatogram dla tej techniki. Maksimum pików na odciętej umożliwi identyfikację składników, i obszar pod pikami jest miarą ilości każdego ze składników.





Chromatogram różnicowy uzyskany w trakcie rozwijania elucyjnego.
Kolejność zatrzymywania: $C > B > A$.

Klasyfikacja w zależności od rodzaju fazy ruchomej

Tabela: Powszechnie stosowane fazy w technikach separacyjnych.

Technika	Faza ruchoma	Faza stacjonarna
Chromatografia gazowa	Gaz (hel, azot, lub wodór)	Lepka ciecz, np. skwalan, glikol polietylenowy, siloksan polimetylu. Stała substancja (adsorbent), np. krzemionka, sita molekularne, tlenek glinowy i porowate polimery. Faza umieszczona jest w szklanej lub metalowej kolumnie.

Chromatografia cieczowa	Woda lub organiczne rozpuszczalniki takie jak metanol, acetonitryl, propanol, lub heksan.	Krzemionka w stanie stałym lub polimer taki jak wielocukry, lub polistyren umieszczone w kolumnie wykonanej ze stali nierdzewnej.
Elektroforeza kapilarna	Elektrolit lub roztwór buforowy	Kolumna kapilarna wypełniona buforem, poddana przyłożonemu napięciu, które powoduje migrację naładowanych cząstek.
Chromatografia z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym	Dwutlenek węgla w stanie nadkrytycznym; może zawierać modyfikatory takie jak metanol. Można także zastosować pentan, heksan, sześćfluorek siarki i izopropanol.	Modyfikowane krzemionki lub polimery stosowane jako wypełnienia kolumny, usieciowane siloksany polimetylu w kolumnie kapilarnej.
Chromatografia jonowa	Roztwory wodnych kwasów, zasad i soli. Roztwory te niekiedy modyfikowane są mieszaninami wody i rozpuszczalników organicznych takich jak acetonitryl albo metanol.	Żywica jonowymienna, alkilowo-wiązane żywice krzemionki porowatej, - styren – polimery diwinylobenzenowe.
Chromatografia bibułowa i cienkowarstwowa (Chromatografia cienko-warstwowa)	Mieszanina rozpuszczalników takich jak heksan/aceton, chloroform/octan etylu, octan etylu-metanol, butanol/kwas octowy/woda, lub, metanol/acetonitryl.	Warstwy pokrywające: żel krzemionkowy, tlenek glinu, celuloza, poliamid, materiał wymieniający jony osadzony na szkle, plastikowe płytki, lub folia aluminiowa.

Tabela: Rodzaje próbek i przedziały czułości

Technika	Rodzaj analizowanej próbki	Zakres czułości
Chromatografia gazowa: bardzo wszechstronna i szeroko stosowana	Ciało stałe, ciecz, lub gazowe lotne organiczne lub nieorganiczne gazy trwałe	ppt lub ng/l do poziomu % lub g/l
Chromatografia cieczowa: technika analityczna do rozdzielania składników nielotnych.	Lotne i nielotne ciecze organiczne, nieorganiczne, i związki biologiczne, polimery, związki chiralne, termicznie nietrwałe związki, małe jony, i makrocząsteczki.	ppb lub µg/l do poziomu % lub g/l
Elektroforeza kapilarna: analiza dużych biocząsteczek wymagających próbki tylko w nanolitrach.	Ciekle polarne i niepolarne związki, niektóre pierwiastki, organiczne jonowe i niejonowe związki, nieorganiczne kationy i aniony, makrocząsteczki i związki chiralne.	ppb lub µg/l do poziomu % lub g/l
Chromatografia z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym: podobny zakres jak GC lub LC, oprzyrządowanie bardziej skomplikowane.	Ciało stałe, ciecz lub gaz, termicznie nietrwałe i nielotne anality podobnie jak większość próbek analizowanych w GC i LC.	ppb lub µg/l do poziomu % lub g/l
Chromatografia jonowa: Ułatwia separację jonów nieorganicznych i organicznych oraz cząstek podatnych na jonizację.	Ciekle nieorganiczne kationy lub aniony, kwasy organiczne, aminy, aminokwasy, węglowodany, i kwasy nukleinowe.	ppb lub µg/l do poziomu % lub g/l
Chromatografia bibułowa i cienkowarstwowa: prosta, ekonomiczna alternatywa dla LC z jednoczesną analizą wielu próbek.	Takie samo jak w chromatografii cieczowej.	ppb lub µg/l do poziomu % lub g/l
Frakcjonowanie polem: nowa, już pojawiająca się technika.	Takie same jak w chromatografii cieczowej, ale więcej makrocząsteczek.	ppb lub µg/l do poziomu % lub g/l

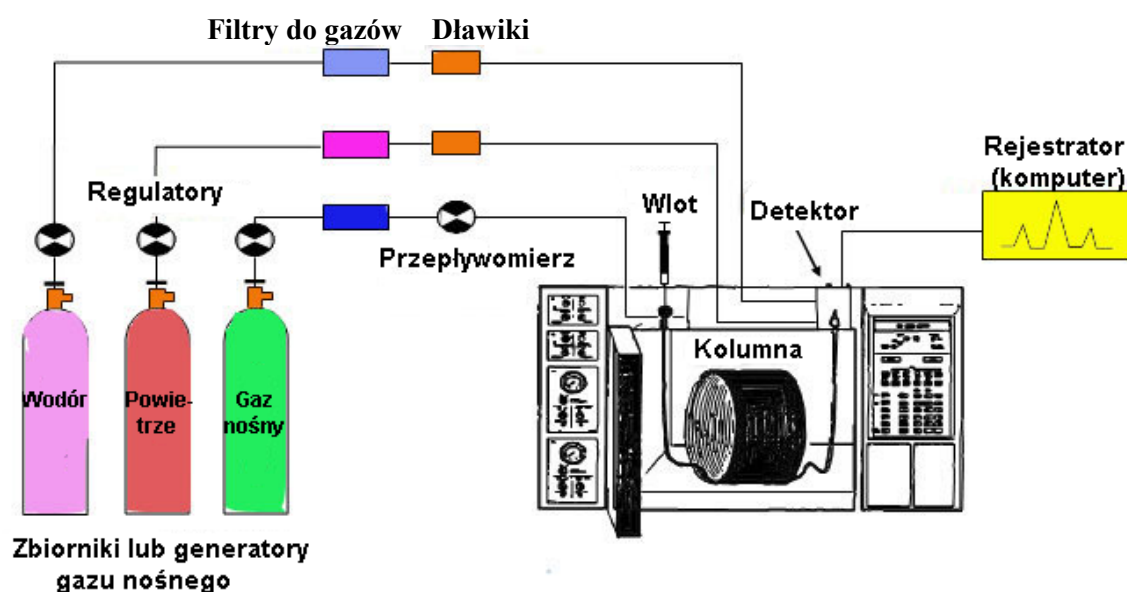
1.3. Co to jest chromatografia gazowa?

Chromatografia polega na rozdzieleniu mieszaniny związków (substancji) na pojedyncze składniki. Poprzez rozdzielenie próbki na poszczególne składniki, łatwiej można zidentyfikować (analiza jakościowa) oraz określić ilość (analiza ilościowa) różnych związków znajdujących się w próbce.

Znane są liczne techniki chromatograficzne i odpowiadające im wyposażenie analityczne. Jedną z tych technik jest chromatografia gazowa (GC). Szacuje się, że 10 – 20% znanych związków może być wykrywana za pomocą chromatografii gazowej. Związki, które mogą być analizowane z wykorzystaniem tej metody muszą charakteryzować się wystarczającą trwałością termiczną i odpowiednią lotnością. Jeżeli wszystkie albo niektóre cząstki składników znajdują się w fazie gazowej lub w postaci pary w 400-450 °C albo poniżej tej temperatury, i nie rozkładają się w tej temperaturze, prawdopodobnie mogą być analizowane metodą chromatografii gazowej.

Główne elementy podstawowego układu GC przedstawiono na Rysunku 1. Do chromatografu gazowego dostarczany jest gaz lub gazy odznaczające się wysoką czystością. Jeden z gazów (nazywany gazem nośnym) płynie przez kolumnę do dozownika a następnie do detektora. Próbka wprowadzona jest do dozownika strzykawką albo zewnętrznym urządzeniem dozującym. Dozownik ogrzewany jest zazwyczaj do temperatury 150 – 250 °C, co powoduje odparowanie lotnych składników próbki. Odparowane składniki przenoszone są do kolumny za pomocą gazu nośnego.

Rysunek 1. Podstawowe elementy układu GC



Temperatura kolumny utrzymana jest przez termostat. Składniki przenoszone są przez kolumnę w stopniu określonym przez ich właściwości fizyczne, a także w zależności od temperatury i zastosowanej kolumny. Badane substancje przepływają przez kolumnę z różną szybkością. Związki, które przepływają najszybciej, opuszczają kolumnę (eluują) jako pierwsze po czym w odpowiedniej kolejności wymywane będą pozostałe składniki. Każdy składnik, który opuści kolumnę wprowadzany jest do detektora.

Detektor reaguje na poszczególne składniki próbki i wytwarza odpowiedni sygnał elektroniczny. Wielkość wytworzonego sygnału zapisana jest w systemie danych a następnie wykreślona na chromatogramie, który przedstawia zależność wielkości pików do czasu wymycia składników.

Idealny chromatogram zawiera nie zachodzące na siebie, rozmieszczone blisko piki. Piki nakładające się na siebie nazywane są pikami koelującymi. Czas wymywania oraz wielkość pików są bardzo ważne, ponieważ umożliwiają identyfikację i oszacowanie ilości analizowanych związków w próbce. Wielkość otrzymanego pików jest proporcjonalna do ilości składnika w próbce. Większe piki obserwuje się wtedy gdy rośnie stężenie danego składnika.

Jeżeli kolumna i wszystkie warunki jej pracy pozostają nie zmienione, dany związek zawsze przemieszcza się przez kolumnę z tą samą szybkością. Dlatego, analizowany związek może być także rozpoznany na podstawie czasu w jakim przepłynął przez kolumnę (czas retencji). Natomiast identyfikacja związków nie może odbywać się tylko na podstawie ich czasów retencji. Analiza musi być przeprowadzona na czystym związku o znanej ilości co umożliwi określenie jego czasu retencji i wielkość pików. Wartości te mogą być porównane z wynikami nieznanymi próbek w celu sprawdzenia obecności żądanych składników (przez porównanie ich czasów retencji) i określenia ich ilości (porównanie wielkości pików). Jeżeli któryś z pików zachodzi na pik sąsiadujący, dokładne określenie związków reprezentowanych przez te piki nie jest możliwe. Jeżeli dwa piki posiadają taki sam czas retencji, dokładna ich identyfikacja także nie jest możliwa. Dlatego w chromatografii zawsze dąży się do tego aby piki nie nakładały się na siebie i żeby nie koelowały.