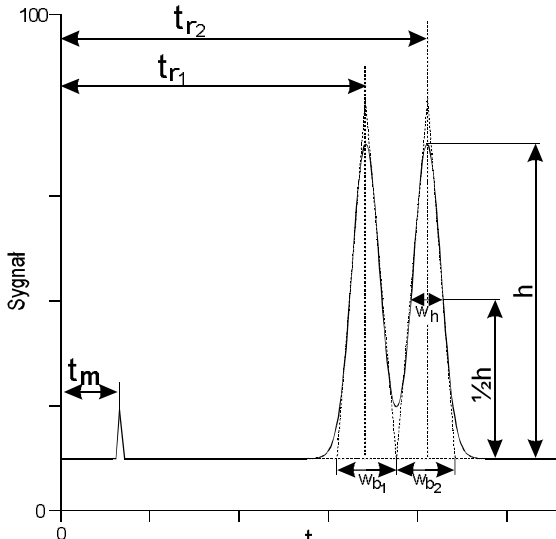


Podstawowy kurs chromatografii gazowej

Materiały do ćwiczenia:

Optymalizacja procesu
rozdzielania analitów

I Teoria

Symbol	Objaśnienie	Uwagi
R	Rozdzielczość, zdolność rozdzielcza (ang. <i>Resolution</i>) - miara zdolności kolumny do wytwarzania dobrze rozdzielonych pików.	 $R = \frac{t_{r_2} - t_{r_1}}{w_{b_1} + w_{b_2}}$
n	Sprawność, ilość pólk teoretycznych (ang. <i>efficiency, number of theoretical plates</i>) - miara zdolności kolumny do wytwarzania wąskich pików.	$n = 5.54 \cdot \left(\frac{t_r}{w_h} \right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2$
h	Wysokość równoważna półce teoretycznej (ang. <i>height equivalent to a theoretical plate</i>) - sposób wyrażania sprawności kolumny.	$h = \frac{L}{n}$
α	Współczynnik selektywności (ang. <i>selectivity factor</i>) - liczba określająca względną selektywność fazy stacjonarnej w stosunku do dwóch substancji. Aby rozdzielenie tych substancji na danej fazie było możliwe współczynnik selektywności musi być większy od 1.	$\alpha = \frac{t'_{r_2}}{t'_{r_1}} \quad \begin{aligned} t'_r &= t_r - t_m \\ t_{r_2} &> t_{r_1} \end{aligned}$
k	Retencja względna (ang. <i>capacity factor</i>) - liczba wyrażająca stosunek długości czasu przez jaki substancja przebywa w fazie stacjonarnej w stosunku do czasu przebywania w fazie ruchomej	$k = \frac{t'_r}{t_m}$
SC	Brak dobrego polskiego odpowiednika (ang. <i>sample capacity</i>) - maksymalna wielkość próbki jaką można zadozować na kolumnę bez utraty jej zdolności do rozdzielania analitów.	$SC \approx r^2 \cdot (1+k) \cdot \sqrt{L \cdot h} \approx r^2 \cdot \left(1 + \frac{2 \cdot d_f \cdot K_d}{r} \right) \cdot \sqrt{L \cdot h}$

- α - współczynnik selektywności (*ang. selectivity factor*)
- d_f - grubość filmu fazy stacjonarnej (*ang. film thickness*)
- h - wysokość równoważna płaszczyźnie teoretycznej (*ang. height equivalent to a theoretical plate*)
- k - retencja względna (*ang. capacity factor*)
- L - długość kolumny (*ang. column length*)
- n - liczba płaszczyzn teoretycznych (*ang. number of theoretical plates*)
- R - rozdzielczość (*ang. resolution*)
- r - promień wewnętrzny kolumny (*ang. column radius*)
- SC - maksymalna wielkość próbki (*ang. sample capacity*)
- t_m - czas retencji analitu który nie oddziałuje z kolumną (*ang. retention time of unretained solute*)
- t_r - czas retencji analitu (*ang. retention time of the solute*)
- t'_r - skorygowany czas retencji analitu (*ang. adjusted retention time of the solute*)
- w_b - szerokość piku u podstawy (*ang. peak width at base*)
- w_h - szerokość piku w połowie wysokości (*ang. peak width at half height*)
- K_d - stała podziału (*ang. distribution constant*), stosunek stężenia analitu w fazie stacjonarnej do stężenia analitu w fazie ruchomej

II Optymalizacja analizy

A. Definicja celu

1. *Jaka rozdzielczość jest wymagana ?*

Odpowiedź na to pytanie zależy od:

- rodzaju i stopnia skomplikowania próbki
- rozdzielczości wymaganej przez analityka

2. *Jaka pojemność próbki jest niezbędna ?*

Zależy to od:

- zakresu stężeń składników próbki
- wymagań analityka

3. *Ile czasu możemy poświęcić na analizę ?*

Czy mamy do czynienia z analizą pojedynczej próbki czy też jest to rutynowa analiza.

B. Wybór odpowiedniej kolumny

1. *Faza stacjonarna*

Dobór odpowiedniej fazy stacjonarnej jest jednym z najważniejszych etapów optymalizacji analizy. Na różnicach oddziaływań pomiędzy fazą stacjonarną a różnymi analitami opiera się przecież cały proces chromatograficzny.

- **Fazy niepolarne** - rozdzielanie analitów opiera się w głównej mierze na różnicach temperatur wrzenia. Wykazują takie zalety jak: obojętność chemiczna, mała wrażliwość na zanieczyszczenia gazu nośnego tlenem i wodą, stabilność termiczna (MS), dobra jakość pokrycia wewnętrznej powierzchni kolumny, dobra odtwarzalność, szeroki zakres temperatur pracy. Do wad zaliczyć należy niezdolność do rozdzielania substancji niewiele różniących się temperaturami wrzenia.
- **Fazy polarne** - rozdzielanie substancji oparte jest na specyficznych oddziaływaniach pomiędzy fazą a grupami funkcyjnymi obecnymi w cząsteczkach analizowanych substancji. Zaletą tych kolumn jest zdolność do rozdzielania substancji bardzo niewiele różniących się temperaturami wrzenia lecz o odmiennej budowie chemicznej. Są wrażliwe na zanieczyszczenia obecne w gazie nośnym, posiadają mniejszą stabilność termiczną jak również trudniej jest uzyskać powtarzalność wyników pomiędzy kolumnami.
- **Fazy o średniej polarności** - posiadają cechy pośrednie pomiędzy dwiema wyżej wymienionymi typami faz stacjonarnych.

2. Średnica wewnętrzna kolumny

Średnica wewnętrzna kolumny ma duży wpływ na sprawność kolumny jak również na ilość analitu jaką możemy zadozować na kolumnę. Parametr ten może również mieć wpływ na pewne ograniczenia w sposobie detekcji analitów.

Powszechnie spotykane średnice wewnętrzne kolumn to: **0.1, 0.25, 0.32 i 0.53 mm**.

0.1 mm

- bardzo wysoka rozdzielczość
- krótki czas analizy
- niewielka wartość **SC**
- wymagają wysokich ciśnień gazu nośnego (duże opory hydrauliczne)
- doskonałe do połączenia z detektorem mas (MS)

Kolumny o mniejszej średnicy pozwalają osiągnąć większą wykrywalność ze względu na zdolność do wytwarzania wąskich i wysokich pików lecz równocześnie ilość próbki jaką możemy zadozować jest nieduża.

0.25 i 0.32 mm

- możliwość nastrzyku on-column
- dobre do połączenia z detektorem mas (MS)
- do rutynowych analiz

Ten rodzaj kolumn cechuje wysoka sprawność, stosunkowo duża wartość **SC**, dzięki czemu nadają się dobrze do większości rutynowych analiz.

0.53 mm

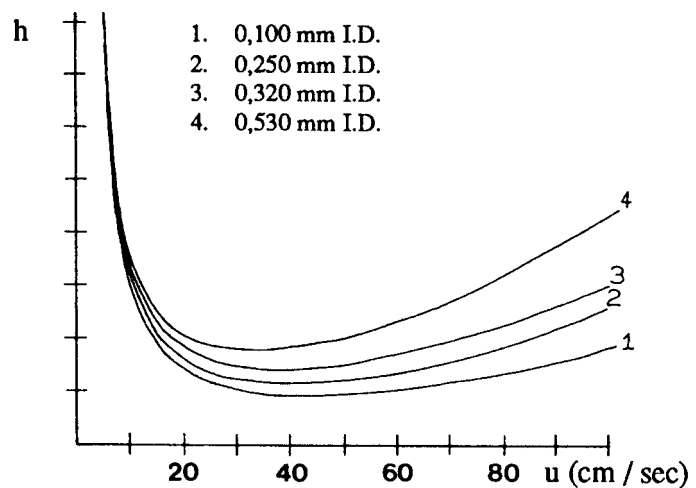
- mogą być zainstalowane w każdym chromatografie (nawet starego typu przystosowanym do kolumn pakowanych)
- bardzo duża wartość **SC**

Kolumny o tej średnicy wewnętrznej często nazywane "*megabore*" stanowią doskonałą alternatywę dla kolumn pakowanych od których są znacznie sprawniejsze. Łatwo mogą być zainstalowane w każdym typie chromatografu. Duża wartość **SC** sprawia, że w przypadkach kiedy nie jest wymagana duża sprawność, pozwalają uzyskać niskie progi wykrywalności.

Na rysunku poniżej pokazano zależność pomiędzy średnicą wewnętrzną a wysokością równoważną półce teoretycznej. Jak widać, przy tej samej długości kolumna o średnicy wew. **0.1 mm** będzie miała ok. 2 razy więcej półek teoretycznych niż kolumna **0.53 mm**

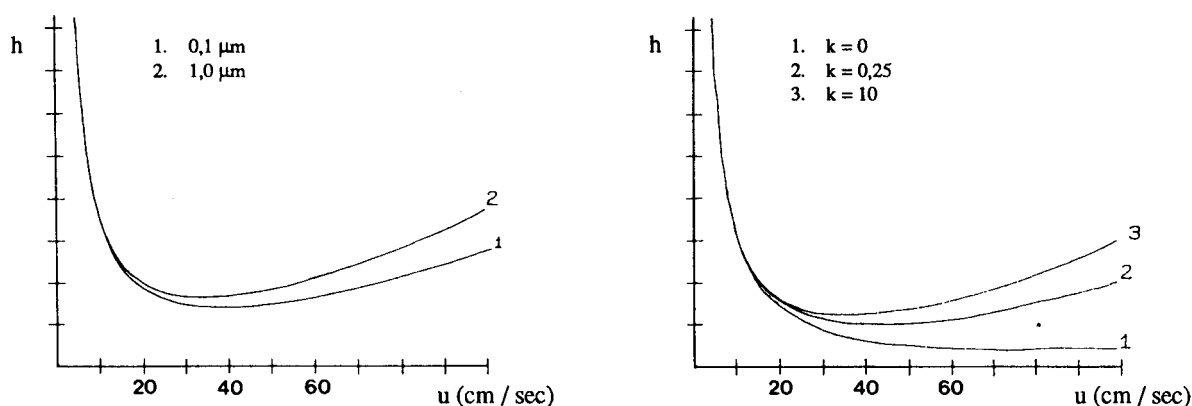
Rysunek 1

Zależność wysokości pólki teoretycznej od średnicy kolumny.



3. Dobór właściwej grubości filmu fazy stacjonarnej

- Retencja analitu w kolumnie zależy od temperatury i grubości filmu fazy stacjonarnej. Dla analitów o niskich wartości retencji względnej k retencja może być zwiększona przez zastosowanie grubszego filmu fazy stacjonarnej.
- Sprawność kolumny zmniejsza się ze wzrostem grubości filmu fazy stacjonarnej. Ogólnie fazy niepolarne dają większe sprawności przy tej samej grubości filmu fazy stacjonarnej.
- Grubsze filmy fazy stacjonarnej pozwalają zadozować większe ilości próbek.
- Cienkie filmy fazy stacjonarnej są bardziej stabilne termicznie i pozwalają na analizę próbek zawierających składniki znacznie różniące się temperaturami wrzenia.
- Grubsze filmy fazy stacjonarnej wydłużają czas analizy.
- Kolumny pokryte grubszymi warstwami fazy stacjonarnej posiadają węższy zakres optymalnych przepływów gazu nośnego.



Rysunek 2

Zależność wysokości płytki teoretycznej od grubości filmu fazy stacjonarnej i retencji względnej analitu.

4. Wybór odpowiedniej długości kolumny

- dłuższe kolumny mają większą sprawność (większa liczba płytek teoretycznych)
- im dłuższa kolumna tym więcej próbek możemy zadozować
- czas analizy jest proporcjonalny do długości kolumny, im krótsza kolumna tym jest on krótszy czas

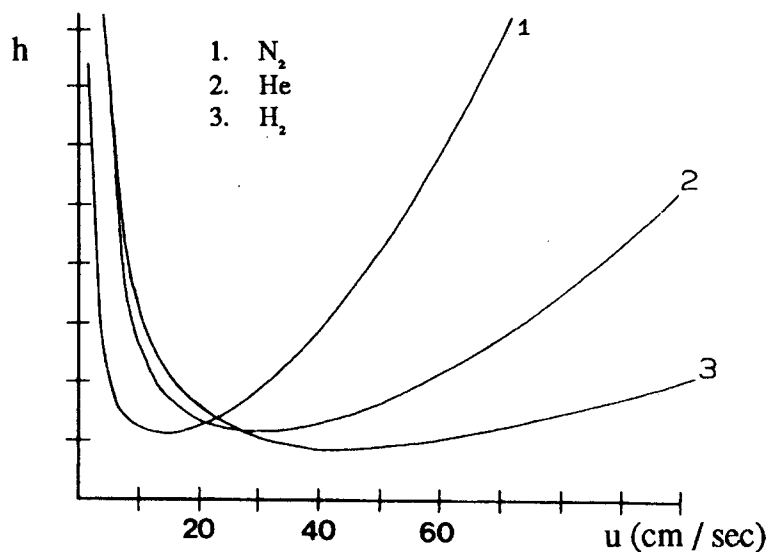
C. Wybór gazu nośnego

Powszechnie stosuje się trzy rodzaje gazów nośnych:

- Wodór - pozwala on na najlepsze wykorzystanie potencjału rozdzielczego kolumn z cienkim filmem fazy stacjonarnej. Wysoka sprawność kolumny utrzymywana jest w szerokim zakresie przepływów gazu nośnego.
- Hel - kiedy nie możemy używać wodoru (np. ze względu na zagrożenie wybuchowe) hel jest najlepszą alternatywą.
- Azot - stosować go należy aby najlepiej wykorzystać własności rozdzielcze kolumn z grubym filmem fazy stacjonarnej. Do wad należy wąski zakres optymalnych wartości przepływu gazu nośnego a także ich niskie wartości bezwzględne (dłuższy czas analizy).

Rysunek 3

Zależność wysokości półki teoretycznej od grubości filmu fazy stacjonarnej i retencji względnej analitu.



Sposoby pomiaru prędkości gazu nośnego i przeliczania prędkości liniowej na przepł:

- nastrzyk niewielkiej ilości analitu niezatrzymywanego przez kolumnę np. metan i pomiar jego czasu retencji t_m

$$u = \frac{L}{t_m} [cm / s]; L - w cm; t_m - w sekundach$$

- przeliczanie prędkości liniowej na przepływ objętościowy

$$F = 60 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot u [cm^3 / min]; r - w cm$$

D. Programowanie temperatury

Nie ma niestety w tym przypadku ścisłych reguł pozwalających podać sposób programowania temperatury pieca chromatografu. Najlepszym źródłem informacji są w tym przypadku noty aplikacyjne i katalogi. W końcu sposób programowania temperatury optymalizujemy metodą prób i błędów. (Można też posłużyć się specjalnym oprogramowaniem - o ile ktoś je posiada)

Można podać jedynie dwie bardzo ogólne zasady:

- w trybie izotermowym rozdzielamy substancje niewiele różniące się temperaturami wrzenia;
- analizy z programowaniem temperatury stosujemy gdy musimy analizować próbki zawierające substancje o dużej rozpiętości temperatur wrzenia.

III Ćwiczenie

Celem ćwiczenia jest optymalizacja analizy chromatograficznej wybranej mieszaniny substancji. Na ćwiczenie składają się następujące zadania :

- sporządzenie mieszaniny wzorcowej
 - a. odmierzanie małych ilości substancji
- wyznaczenie krzywej $H=f(u)$ dla używanego zestawu aparaturowego
 - a. pomiar prędkości przepływu gazu nośnego
 - b. nastrzyk próbki
 - c. odczytywanie wielkości charakterystycznych dla pików i obliczanie parametrów kolumny
- "ręczna" optymalizacja analizy z obserwacją wpływu parametrów na wygląd chromatogramu
- komputerowa optymalizacja analizy

Tabele i wzory pomocnicze do ćwiczenia

$$u = \frac{L \times 100}{t_m} \text{ [cm/s]}$$

L - w metrach; t_m w sekundach

Parametry kolumny:
długość L [m] :
promień wewnętrzny r [mm] :
grubość filmu fazy stacjonarnej d_f [μm] :

Ciśnienie gazu nośnego P						
Czas martwy t_m						
Prędkość przepływu gazu nośnego u						
Temperatura pieca T						

$$n = 5,54 \times \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2$$

$$h = \frac{L}{n}$$

Prędkość przepływu gazu nośnego u						
Czas retencji pików t_r						
Szerokość pików u podstawy w_b						
Sprawność n						
Wysokość równoważna półce teoretycznej h						
Temperatura pieca T						