

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr Edward Soczewiński

Edward SOCZEWIŃSKI

Niektóre problemy optymalizacji cieczowych układów chromatograficznych

Некоторые проблемы оптимализации систем жидкостной хроматографии

Some Problems of Optimization of Liquid Chromatography Solvent Systems

Omówienie wyników badań naukowych prowadzonych w Katedrze Chemii Nieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego dotyczy głównie prac opublikowanych w ciągu ostatnich kilku lat; wcześniejsze prace z zakresu niektórych zagadnień teorii optymalizacji układów chromatograficznych, rozpoczęte przed dwunastoma laty pod kierownictwem prof. A. Waksmundzkiego, zostały przedstawione w obszernym artykule przeglądowym opublikowanym w V tomie *Advances in Chromatography* (1).

Podjęcie tej problematyki było spowodowane z jednej strony rozpowszechnieniem metody chromatograficznej, a z drugiej istnieniem poważnych luk w opracowaniu ilościowej teorii chromatografii — teorii, która mogłaby ułatwić dobór odpowiednich układów dla konkretnych zadań analitycznych, a także znacznie rozszerzyć możliwości interpretacji danych chromatograficznych.

1. Czynniki decydujące o efektywności rozdzielania. Parametry chromatograficzne: R_F , R_M , objętość retencji

Stopień rozdzielania mieszaniny jest określany przez dwa czynniki:

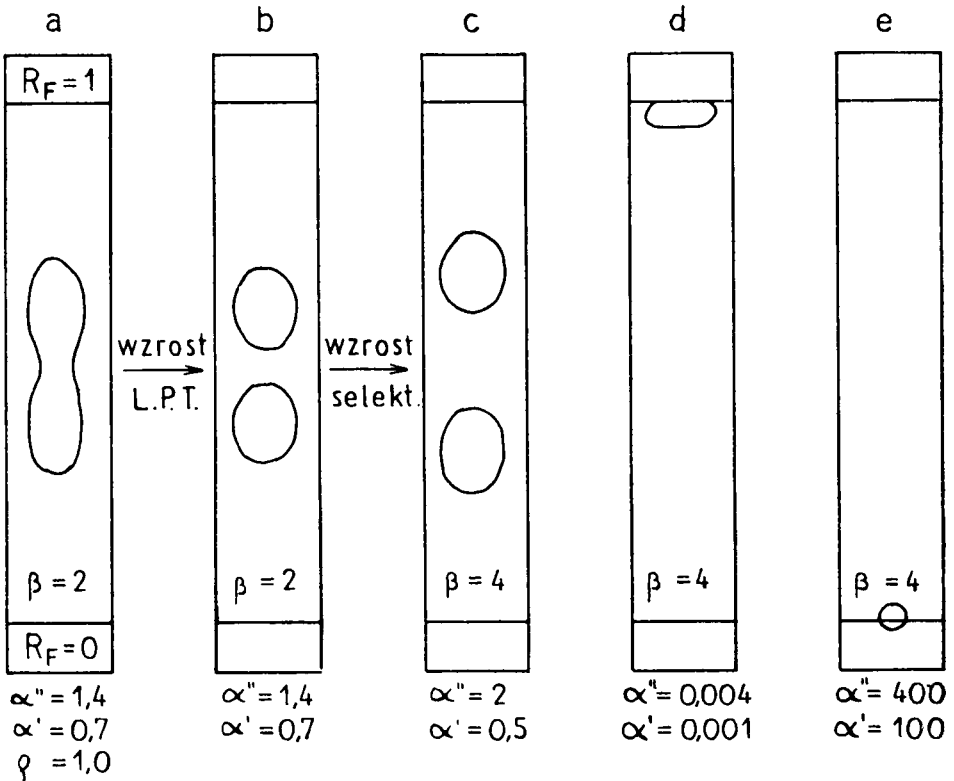
a) rozmycie plamki (strefy, profilu stężeniowego) zależne od efektywności układu, określonej liczbą pólek teoretycznych,

b) selektywność układu określającą oddalenie stref. Ilościowo selektywność charakteryzuje się tzw. współczynnikiem separacji β , równym stosunkowi współczynników podziału danej pary substancji

$$\beta = \frac{\alpha''}{\alpha'} \geq 1$$

Jednak niezależnie od odpowiedniej wielkości współczynników separacji istotne są także absolutne wielkości współczynników podziału, gdyż zbyt wysokie lub zbyt niskie wartości współczynników podziału mogą spowodować niedostateczne rozdzielanie.

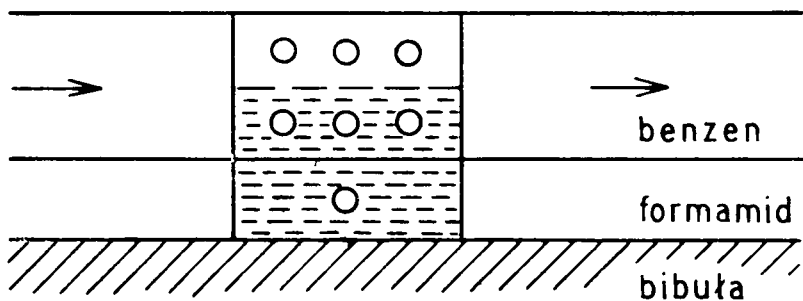
Powyższe tezy ilustruje ryc. 1 (1). Pierwszy chromatogram wykazuje niską selektywność ($\beta = 2$) i silne rozmycie pasma; otrzymuje się w rezultacie niepełne rozdzielanie substancji. Poprawa struktury układu (np. zmiana gatunku bibuły) prowadzi do zmniejszenia rozmycia pasma (wzrost liczby pólki teoretycznych); dalszą poprawę rozdzielania otrzymuje się stosując układ o wyższej selektywności ($\beta = 4$, ryc. 1c). Jednak przy tej samej selektywności, rozdzielania nie otrzyma się, gdy oba współczynniki podziału są wysokie (ryc. 1e) lub niskie (ryc. 1d), gdyż wówczas obie plamki wędrują z czołem rozpuszczalnika, albo pozostają na linii startu.



Ryc. 1. Wpływ liczby pólki teoretycznych, selektywności i bezwzględnych wielkości liczb podziału na stopień rozdzielania dwu substancji

Effect of the number of theoretical plates, selectivity, and absolute values of partition coefficients on the separation efficiency

Dlatego jednym z głównych problemów teorii optymalizacji układów chromatograficznych jest dobór układu, w którym współczynniki podziału mają wartość umiarkowaną, ewentualnie możliwość regulacji współczynników podziału w celu uzyskania odpowiedniego rozmieszczenia plamek na chromatogramie (ewentualnie uzyskania zróżnicowanych szybkości migracji substancji w kolumnie). Zagadnienia te zostały szeroko opracowane w chromatografii gazowej, w której układ chromatograficzny jest stosunkowo nieskomplikowany. Trudniejsza jest sytuacja w chromatografii cieczowej, gdzie występuje szereg czynników komplikujących. Niniejszy referat poświęcony jest właśnie badaniom z zakresu teorii optymalizacji cieczowych układów chromatograficznych (podziałowych i adsorpcyjnych). Jednak przed przystąpieniem do właściwych rozważań teoretycznych omówię pokrótce związek podstawowych parametrów chromatograficznych ze współczynnikiem podziału substancji ($\alpha = c_s/c_m$) i stosunkiem objętości fazy stacjonarnej i ruchomej ($\varrho = V_{st}/V_m$).



Ryc. 2. Schematyczny model podziału substancji między fazę nieruchomą i ruchomą. Współczynnik podziału $\alpha = 1/3$ (zacięzione prostokąty — liczby cząsteczek odniesione do jednakowych objętości obu faz). Liczba podziału $k' = \alpha\varrho = 1/6$; $R_F = 1/(1 + 1/6) = 6/7 = 0,86$

Diagrammatic representation of the distribution of a solute between the stationary and mobile phase. Partition coefficient $\alpha = 1/3$ (shaded rectangles represent numbers of molecules corresponding to equal volumes of the two phases). Distribution number $k' = \alpha\varrho = 1/6$; $R_F = 1/(1 + 1/6) = 6/7 = 0.86$

Bezpośrednio o względnej szybkości migracji decyduje iloczyn $\alpha \cdot V_{st}/V_m$, równy stosunkowi liczby cząsteczek w fazie stacjonarnej i ruchomej (tzw. równy liczbie cząsteczek w fazie stacjonarnej, przypadających na jedną cząsteczkę substancji w fazie ruchomej). Ilustruje to schematycznie ryc. 2, na której $\alpha = 1/3$, $\varrho = 1/2$, $k' = \alpha\varrho = 1/3 \times 1/2 = 1/6$, czyli, że na jedną cząsteczkę w fazie stacjonarnej przypada 6 cząsteczek substancji w fazie ruchomej. Ze względu na ciągłe przechodzenie cząsteczek substancji z jednej fazy do drugiej, w ilustrowanym przypadku

przeciętna cząsteczka spędza 6 razy mniej czasu w fazie stacjonarnej, tzn. na 1 sekundę w fazie ruchomej przypada 1/6 sekundy w fazie nieruchomej. Łącznie każda cząsteczka spędza w fazie ruchomej tylko

$$\frac{1}{1 + 1/6} = \frac{6}{6 + 1} = \frac{6}{7}$$

swego czasu, (tzn. $R_F = 6/7$); uogólniając to rozumowanie stwierdzamy, że

$$R_F = \frac{1}{1 + \alpha\rho} = \frac{1}{1 + k'} \quad (1)$$

Wielkość R_F stosuje się szeroko w chromatografii bibułowej i cienko-warstwowej. Natomiast w chromatografii kolumnowej, gdzie mierzy się objętość eluatu, lub otrzymuje wykres stężenia jako funkcję czasu, wygodniejsza jest tzw. objętość retencji (ewentualnie proporcjonalny do niej czas retencji). Jeżeli cząsteczki fazy ruchomej spędzają w kolumnie czas t_0 , to cząsteczki substancji chromatografowanej spędzają w kolumnie czas równy t_0 w fazie ruchomej i dodatkowo czas $t_0 \cdot k'$ w fazie nieruchomej; łącznie czas retencji substancji wyniesie

$$t = t_0 + t_0 \cdot k' = t_0(1 + k') \quad (2a)$$

i analogicznie, zakładając stałą szybkość wypływu eluatu

$$V = V_0(1 + k') \quad (2b)$$

gdzie V_0 — objętość fazy ruchomej w kolumnie.

Z ostatnich wzorów wynika, że:

$$\frac{t_0}{t} = \frac{V_0}{V} = \frac{1}{1 + k'} = R_F \quad (3)$$

Jednak w teoretycznym ujęciu procesów chromatograficznych celowe jest stosowanie jeszcze innej wielkości, tzw. współczynnika R_M , który wykazuje następujące zalety:

A. Prostą (liniową) zależność od różnicy potencjałów chemicznych substancji w obu fazach, tzn. pracy przeniesienia substancji z jednej fazy do drugiej w warunkach standardowych. Powoduje to o wiele prostsze zależności R_M od różnych parametrów decydujących o podziale: temperatury, składu faz, struktury cząsteczkowej substancji itp.

B. Prostsza zależność od współczynnika podziału

$$R_M = \log \frac{1 - R_F}{R_F} = \log \left(\frac{k'}{1 + k'} : \frac{1}{1 + k'} \right) = \log k' = \log \alpha + \log \rho \quad (4)$$

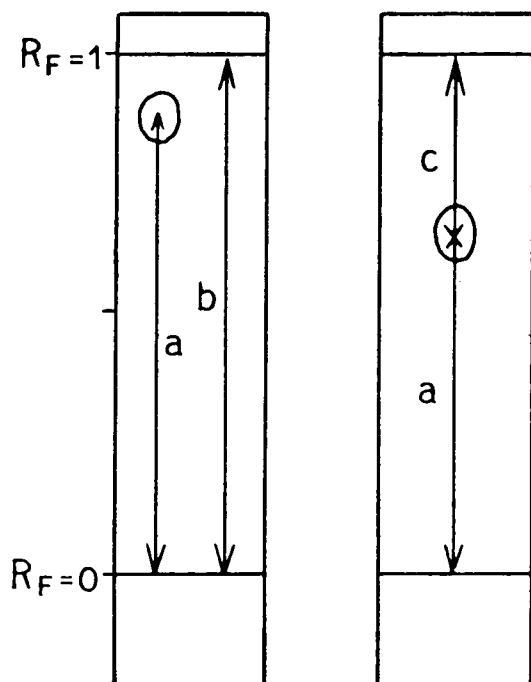
C. Różnica współczynników R_M obu substancji jest też prościej związana z selektywnością układu

$$\Delta R_M = R_M'' - R_M' = \log \alpha''\rho - \log \alpha'\rho = \log \frac{\alpha''}{\alpha'} = \log \beta \quad (5)$$

Dlatego w dalszych rozważaniach rozpatrywane będą głównie zależności współczynników R_M od czynników wpływających na tę wielkość.

Sens fizyczny współczynnika R_M przedstawia ryc. 3 zarówno w przypadku definicji Bate-Smitha i Westalla (2), jak i Reichla (3).

Funkcjonalną zależność R_F od R_M przedstawia ryc. 4. Ilustruje ona także dodatkowo konieczność zapewnienia odpowiednich wartości absolutnych współczynników podziału w celu uzyskania optymalnego rozmie-



Ryc. 3. Definicja R_F i R_M . $R_F = a/b$. $R_M = \log c/a = \log (1-R_F)/R_F$ (Bate-Smith i Westall (2)); $R'_M = \log a/c$ Reichl (3))

Definition of R_F and R_M . $R_F = a/b$; $R_M = \log c/a = \log (1-R_F)/R_F$ (Bate-Smith and Westall (2)); $R'_M = \log a/c$ (Reichl (3))

szczenia plamek na chromatogramie; naniesione punkty można uważać za współczynniki R_F substancji o współczynnikach podziału stanowiących szereg geometryczny z mnożnikiem równym 10. Widoczne jest, że w takiej sytuacji rozdziela się substancje o umiarkowanych współczynnikach podziału. Widoczne jest także, że bardzo niskie i bardzo wysokie współczynniki R_F są nieprzydatne dla identyfikacji substancji, gdyż $R_F = 0$ może wystąpić np. dla dwu substancji o $R_M = +3$ i $R_M = +2$. Najbardziej stromy przebieg i najbardziej zróżnicowane współczynniki R_F otrzymuje się w okolicy $R_M = 0$ ($R_F = 0,5$).

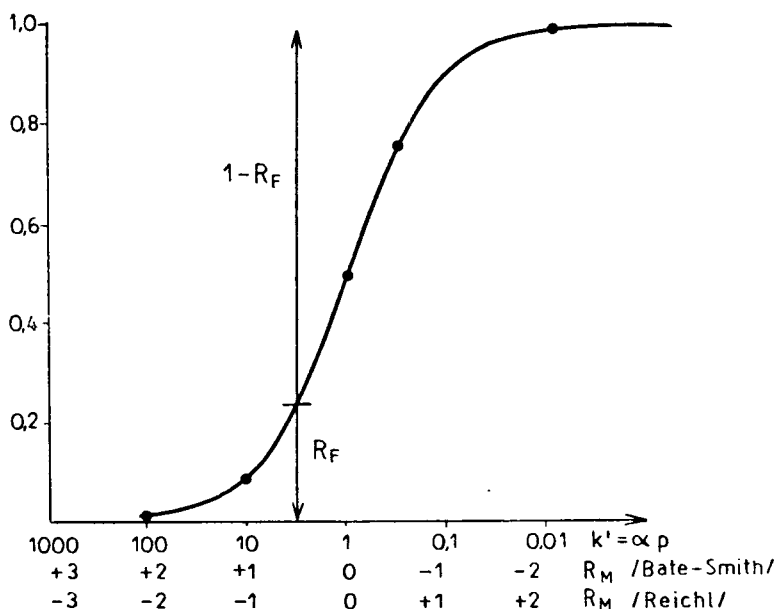
Z drugiej strony, kształt krzywej $R_F = f(R_M)$ (litera S) powoduje, że często spotykane liniowe zależności R_M od niektórych parametrów (odwrotności temperatury bezwzględnej, pH, składu fazy mieszanej, liczby atomów węgla w cząsteczce substancji) przetransformowane na częścię stosowane współczynniki R_F dają zależność w kształcie litery S (o ile zmiany zachodzą w pełnym zakresie R_F) ewentualnie łuku (zmiany w zakresie R_F od 0 do 0,6 albo 0,4 do 1,0). I odwrotnie, nieliniowe zależności współczynników R_F (przebieg sigmoidalny lub łukowy) „prostują się” po przeliczeniu na współczynniki R_M , co ułatwia interpretację teoretyczną zależności, interpolację, czy ekstrapolację danych itp. Jedynie w zakresie R_F od 0,3 do 0,7, w którym funkcja $R_F = f(R_M)$ ma przebieg w przybliżeniu liniowy, można spodziewać się zależności liniowych, zarówno dla współczynników R_F jak i R_M .

2. Niektóre teoretyczne zagadnienia doboru układu rozpuszczalników w chromatografii podziałowej ciecz/ciecz

A. Zdolność ekstrakcyjna rozpuszczalników. Widma chromatograficzne

Zdolność ekstrakcyjną rozpuszczalników czystych próbowano wiązać z różnymi ich własnościami (4): stałą dielektryczną, parametrem rozpuszczalności, rozpuszczalnością wzajemną z wodą (szereg miksotropowy Heckera), jednak te próby nie dały zadowalających wyników, z wyjątkiem układów, w których występują słabe oddziaływania międzycząsteczkowe. Należy dodać, że próby uszeregowania rozpuszczalników pod względem zdolności ekstrakcyjnej są trudniejsze niż w chromatografii adsorpcyjnej, gdzie zdolność elucyjna rozpuszczalnika jest najczęściej określana głównie przez oddziaływanie rozpuszczalnik-adsorbent, a w mniejszym stopniu zależna od solwatacji substancji przez rozpuszczalnik (5).

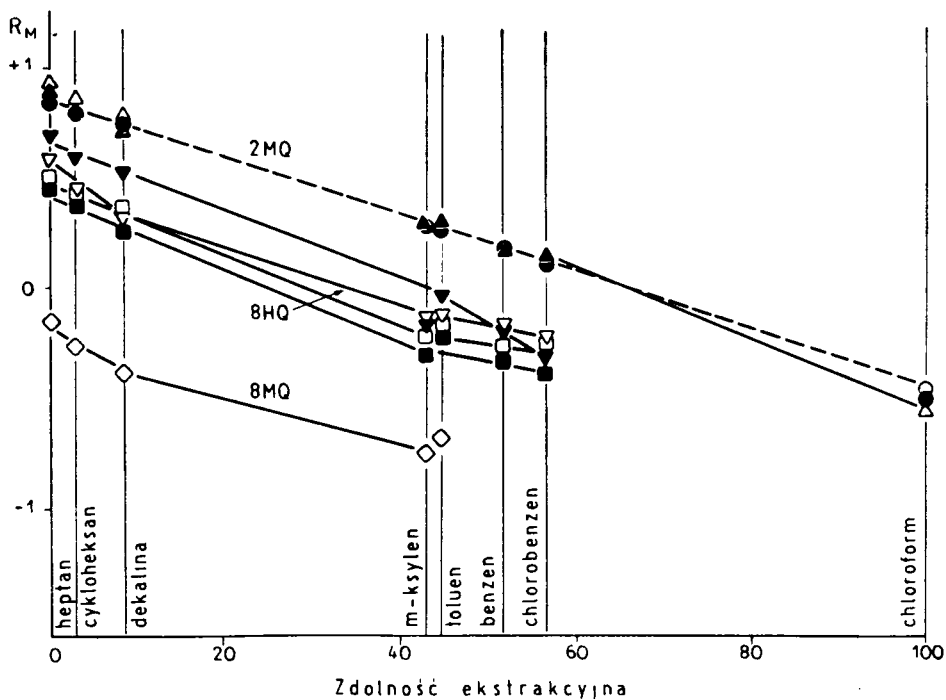
Dlatego celowe wydaje się podejście empiryczne przez zestawianie „widm chromatograficznych”, tzn. wykreślanie zależności parametrów chromatograficznych od stosowanego rozpuszczalnika. Istotny jest w tym przypadku racjonalny sposób porządkowania i rozmieszczenia rozpuszczalników wzdłuż osi odciętych. Ponieważ porządkowanie rozpuszczalników wg ich parametrów fizykochemicznych (stała dielektryczna, napięcie międzyfazowe, parametr rozpuszczalności) nie dało pozytywnych wyników w przypadkach silniejszych oddziaływań międzycząsteczkowych, w pracach Katedry zastosowano modyfikację metody wprowadzonej przez Rohrschneidera (6) i Littlewooda (7) w chromatografii gazów.



Ryc. 4. Zależność graficzna R_F od R_M . Sigmoidalna krzywa dzieli odcinek pionowy dla danej wartości R_M na dwa odcinki równe odpowiednio R_F i $1 - R_F$
 Graphical relationship between R_F and R_M . The sigmoidal curve divides a vertical line for a given value of R_M into two sections equal to R_F and $1 - R_F$

Na osi rzędnej celowe jest wykreślanie współczynnika R_M , rozpuszczalniki zaś na osi odciętej porządkuje się tak, aby otrzymać widmo liniowe dla wybranej substancji wzorcowej (linia przerywana). W tych warunkach odległość pionowa punktów różnych substancji dla danego rozpuszczalnika (linia pionowa) oznacza bezpośrednio $\Delta R_M = \log \beta$, tzn. charakteryzuje selektywność rozpuszczalnika. Różnica poziomów dwu punktów tej samej substancji dla dwu danych rozpuszczalników oznacza wprowadzony przez B u s h a (8) parametr ΔR_{MS} , tzn. zmianę R_M związaną ze zmianą rozpuszczalnika. Przyjmując rozpuszczalnik o najmniejszej zdolności ekstrakcyjnej (na przykład heptan) za skrajny rozpuszczalnik odniesienia otrzymuje się charakterystykę ilościową zdolności ekstrakcyjnej pozostałych rozpuszczalników; przypisując jednemu z nich, np. chloroformowi, umowną zdolność ekstrakcyjną równą 100, otrzymuje się również dla pozostałych rozpuszczalników charakterystykę ilościową. Stwierdzono, że dla substancji o analogicznej strukturze, ich widma mają przebieg liniowy i w przybliżeniu równoległy do linii substancji wzorcowej (np. chinaldyny w przypadku zasad chinolinowych), dlatego otrzymana charakterystyka odnosi się do całej grupy substancji

i pozwala na wybór odpowiednich układów i nawet orientacyjne przewidywanie ich współczynników R_F dla nowych substancji z tej grupy na podstawie ich parametrów chromatograficznych dla 1—2 rozpuszczalników, przez poprowadzenie linii równoległej do linii substancji wzorcowej. Na ryc. 5 przedstawiono widmo R_M — rozpuszczalnik dla zasad chinolinowych (9).

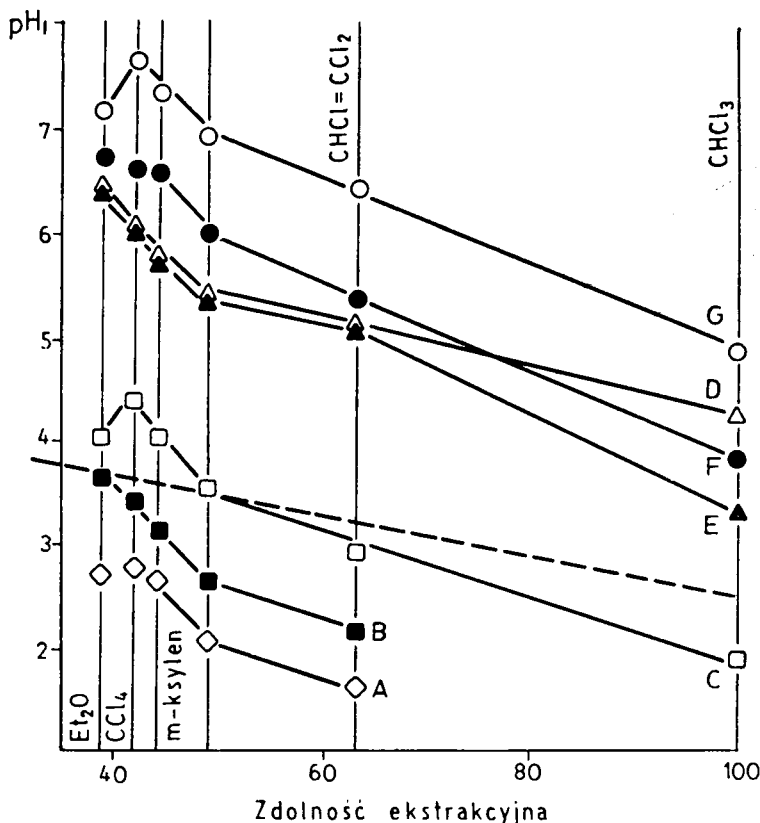


Ryc. 5. Widma chromatograficzne kilku zasad chinolinowych podporządkowane liniowemu widmu 2-metylochinoliny (linia przerywana). Nieco odmienne nachylenie wykazuje 8-hydroksychinolina (8HQ, tworzenie wewnętrznego H-mostka) i 8-metylochinolina (8MQ, osłanianie atomu azotu). Układy typu rozpuszczalnik organiczny — 4% HCOOH w formamidzie

Chromatographic spectra of several quinoline bases subordinate to a linear spectrum of 2-methylquinoline (2MQ, dashed line). Somewhat different slope is observed for 8-hydroxyquinoline (8HQ, formation of an internal H-bond) and 8-methylquinoline (8MQ, shielding of the nitrogen atom). Systems of the type organic solvent 4% HCOOH in formamide.

Dalsze badania wykazały, że w przypadku wystąpienia dodatkowych grup funkcyjnych zdolnych do tworzenia mostków wodorowych, otrzymuje się pewne zakłócenia równoległego przebiegu widm (tzn. $\Delta R_{MS} \neq \text{const.}$). W szczególności wystąpienie dwu zasadowych atomów azotu (np. fenantrolina) powoduje o wiele bardziej stromy przebieg widma.

Jednak tworzenie wewnętrznego mostka wodorowego (np. OH...N w 8-hydroksychinolinie, czy NH...N w 8-aminochinolinie) powoduje w dużym stopniu deaktywację jednej z grup, co prowadzi do zachowania liniowego przebiegu widm (ryc. 5). Równoległość widm, chociaż z zakłóceniami, stosuje się także nawet do dość złożonych substancji o analogicznej strukturze (np. alkaloidów, ryc. 6).

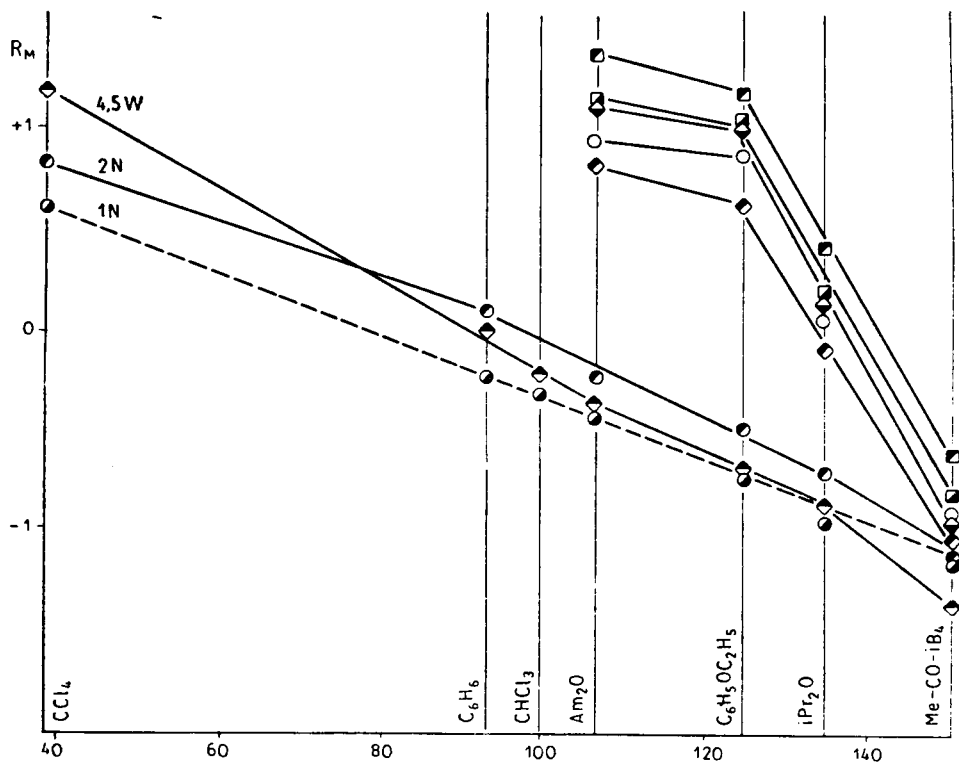


Ryc. 6. Widma chromatograficzne alkaloidów dymnicy (*Fumaria officinalis*) podporządkowane liniowemu widmu 2-metylocholininy. Wyraźne odchylenie dla eteru etylowego wykazują dwa alkaloidy fenolowe (C i G) (12)

Chromatographic spectra of the *Fumaria* alkaloids subordinate to a linear spectrum of 2-methylquinoline. Marked deviation for ethyl ether is seen for two phenolic alkaloids (C and G) (12)

Wykazano także, że charakterystyka rozpuszczalników otrzymana dla substancji elektronodonorowych (chinoliny) nie jest uniwersalna i że konieczne jest wprowadzenie równoległej uzupełniającej klasyfikacji dla substancji o przeważającym charakterze protonodonorowym (np. fenole).

Rozmieszczenie rozpuszczalników jest tu zupełnie inne, gdyż rozpuszczalniki elektronodorowe (węglowodory aromatyczne, eter i szczególnie ketony) są efektywnymi ekstrahentami fenoli, silniejszymi od chloroformu. Również i w tym przypadku związki dwufunkcyjne (dwohydroksydwubenzofurany, dwohydroksynaftaleny) wykazywały stromy przebieg widm, z wyjątkiem przypadku tworzenia wewnętrznego H-mostka, który powodował deaktywizację jednej grupy (ryc. 7) (9).



Ryc. 7. Widma chromatograficzne fenoli podporządkowane liniowemu widmu 1-naftolu (linia przerywana). Fenole dwohydroksylowe wykazują większe nachylenie widm, z wyjątkiem 4,5-dwohydroksydwubenzofuranu (4,5W), który tworzy wewnętrzny H-mostek

Chromatographic spectra of several phenols subordinate to a linear spectrum of 1-naphthol (dashed line). The spectra of di-hydroxy phenols are steeper, except for 4,5-dihydroxydibenzofurane (4,5W) which forms an internal H-bond

Te dwa typy widm, jedno oparte na substancji elektronodorowej — np. na zasadzie chinolinowej (ryc. 5), a drugie na substancji protonodorowej — np. na naftolu (ryc. 7) dostarczają już zadowalającej charakterystyki zdolności ekstrakcyjnej rozpuszczalników w odniesieniu do

większości substancji organicznych (z wyjątkiem substancji niezdolnych do tworzenia H-mostków, które jednak nie są najczęściej chromatografowane w układach ciecz-ciecz, lecz gaz-ciecz, ze względu na ich lotność). Należy przy tym dodać, że w przypadku silnie polarnych substancji (cukry, aminokwasy itp.) decydującą rolę zdaje się odgrywać rozpuszczalność fazy polarnej (np. wody) w ekstrakcji słabo polarnym.

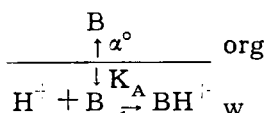
Widma R_M — rozpuszczalnik pozwalają na zestawienie dużej liczby danych w sposób uporządkowany i wybór odpowiedniego rozpuszczalnika, uwzględniając, że optymalne wartości R_M leżą w zakresie $-1, +1$ (co odpowiada R_F 0,9—0,1). Pozwalają one również na przewidywanie jak należy zmienić układ, aby zachować optymalne warunki analizy, po zmianie struktury substancji powodującej określone zmiany R_M (np. redukcja $=CO \rightarrow =CHOH$, co powoduje w układach wodnych podwyższenie R_M o ok. 1,5 jednostek).

Oprócz skokowej zmiany parametrów chromatograficznych drogą zmiany rozpuszczalnika stanowiącego fazę ruchomą albo stacjonarną, możliwe jest także regulowanie zdolności ekstrakcyjnej jednej czy drugiej fazy w sposób ciągły przez zastosowanie zmiany stężeń jonów H^+ lub innego ligandu w fazie wodnej, ewentualnie zmianę stężenia rozpuszczalnika tworzącego kompleksy solwatacyjne z substancją. O ile równowaga jonizacji lub solwatacji ustala się szybko, do charakterystyki równowag podziału można zastosować prawo działania mas. Sytuacja jest analogiczna w obu przypadkach; jednak ze względu na pewne specyficzne różnice, obie metody regulacji R_F (tzn. stosowanie buforowanej fazy wodnej oraz stosowanie rozpuszczalników mieszanych) będą omówione osobno.

B. Regulacja współczynników R_M przez kontrolę stopnia jonizacji elektrolitów organicznych

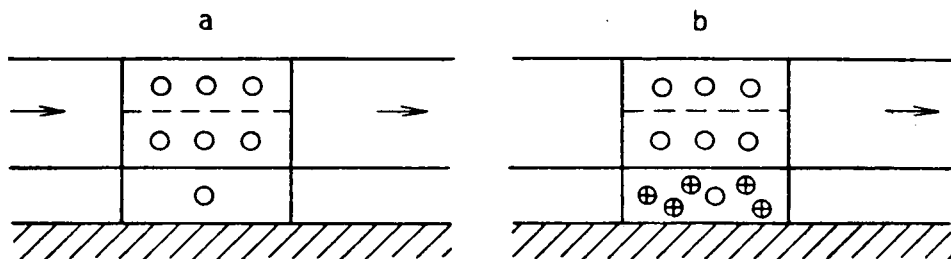
W przypadku podziału elektrolitów organicznych, forma zjonizowana nie ulega zwykle ekstrakcji przez rozpuszczalnik organiczny, szczególnie w przypadku nieznacznej rozpuszczalności wody w rozpuszczalniku organicznym (por. jednak (10)).

Podział zasady organicznej B można więc przedstawić następującym schematem (por. także ryc. 8):



przy czym równowagę jonizacji określa zgodnie z prawem działania mas stała dysocjacji kwasu BH^+ , zaś podział niezjonizowanych cząsteczek — współczynnik podziału α° :

$$K_A = \frac{[B]_w [H^+]_w}{[BH^+]_w} \quad \alpha^\circ = \frac{[B]_w}{[B]_{org}} \quad [6]$$



Ryc. 8. Podział zasady organicznej przy cofniętej jonizacji (a, $\alpha^\circ = 1/3$) i przy 83,3% jonizacji w fazie wodnej (b, $\alpha = 6/3 = 2$)

Distribution of an organic base at suppressed ionization (a, $\alpha^\circ = 1/3$) and at 83,3% ionization in the aqueous phase (b, $\alpha = 6/3 = 2$)

Sumaryczne stężenie obu form zasady w fazie wodnej wynosi $[B]_w + [BH^+]_w$, stąd ogólny stosunek stężeń, tzw. współczynnik ekstrakcji jest równy

$$\alpha = \frac{[B]_w + [BH^+]_w}{[B]_{org}} = \frac{[B]_w + [B]_w [H^+]_w / K_A}{[B]_{org}} = \frac{[B]_w}{[B]_{org}} \left(1 + \frac{[H^+]_w}{K_A} \right) = \alpha^\circ (1 + 10^{pK_A - pH}) \quad [7]$$

O ile elektrolit ma własności silnie lipofilne, współczynnik podziału ma niską wartość (np. $\alpha^\circ < 0,01$) i w stanie niezjonizowanym substancja wędruje z czołem rozpuszczalnika (gdyż wówczas $R_F = 1/(1 + \alpha^\circ)$). W tym przypadku należy, w celu uzyskania niższych R_F , stosować wartości pH fazy wodnej znacznie niższe od pK_A (o co najmniej 2 jednostki).

W tych warunkach

$$10^{pK_A - pH} > 100 \gg 1$$

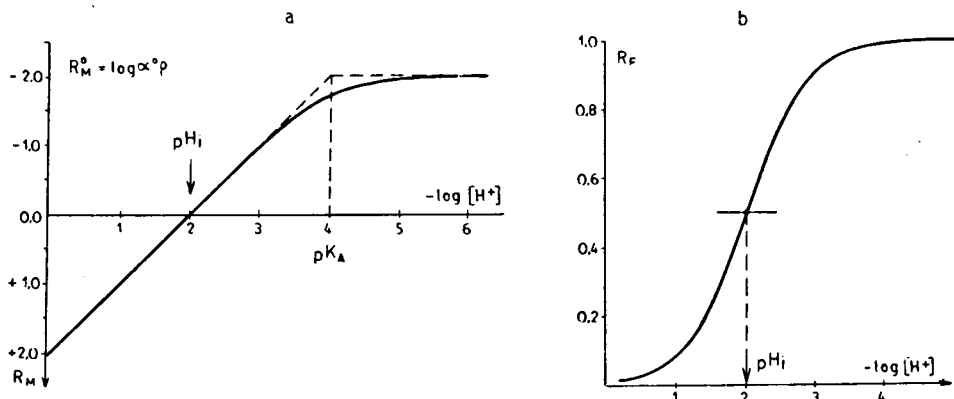
i wzór upraszcza się do

$$\alpha = \alpha^\circ \cdot 10^{pK_A - pH} \quad [8]$$

zaś

$$R_M = \log \alpha + \log \rho = \log \alpha^\circ + pK_A - pH + \log \rho \quad [8a]$$

Współczynnik R_M zasady jest więc liniowo zależny od pH fazy wodnej, przy czym współczynnik kierunkowy linii jest równy $-1,0$. Przy cofniętej jonizacji linia nagina się do asymptoty poziomej: $R_M = \log \alpha^\circ \rho$. Natomiast zależność $R_F = f(pH)$, po transformacji R_M na R_F powtarza sigmoidalny kształt krzywej $R_F = f(R_M)$ (ryc. 9) (11, 1).



Ryc. 9. Teoretyczna krzywa R_M vs. pH i odpowiadająca jej krzywa R_F vs. pH (zasada, $pK_A = 4,0$, $k' = 0,01$, $R_M^0 = -2,0$)

A theoretical R_M vs. pH curve and the corresponding R_F vs. pH plot (base, $pK_A = 4,0$, $k' = 0,01$, $R_M^0 = -2,0$)

Dla scharakteryzowania położenia linii $R_M = f(pH)$ i $R_F = f(pH)$ wyliczymy punkt przecięcia pierwszej funkcji z osią pH (tzn. dla $R_M = 0$).

Z warunku

$$\log \alpha^0 + pK_A - pH_i + \log \rho = 0$$

otrzymujemy, że

$$pH_i = pK_A + \log \alpha^0 \rho = pK_A + R_M^0 \quad (9)$$

Wartość pH_i odpowiada także wartości $R_F = 0,5$, tzn. punktowi infleksji, leżącemu na połowie wysokości krzywej $R_F = f(pH)$ (ryc. 9b). Widoczne jest, że położenie krzywej i zakres zmian R_F (odpowiadający $pH_i \pm 2$), zależy nie tylko od pK_A zasady, ale także od liczby podziału.

Spróbujmy jeszcze scharakteryzować zmiany różnicy R_F dwu substancji wraz ze zmianą pH fazy wodnej. Wprawdzie selektywność wyrażona współczynnikiem separacji jest dla danego układu stała w warunkach silnej jonizacji

$$\log \frac{\alpha''}{\alpha'} = \log \beta = R_M'' - R_M' = \frac{\alpha'' K_A'}{\alpha' K_A''} = pH_i'' - pH_i' \quad (10)$$

jednak różnica R_F , ze względu na specyficzny kształt zależności $R_F = f(R_M)$ zmienia się wraz ze zmianą pH (ryc. 10), osiągając maksimum w warunkach, gdy średnia współczynników R_F wynosi 0,5.

Z warunku

$$\frac{d \Delta R_F}{d pH} = 0$$

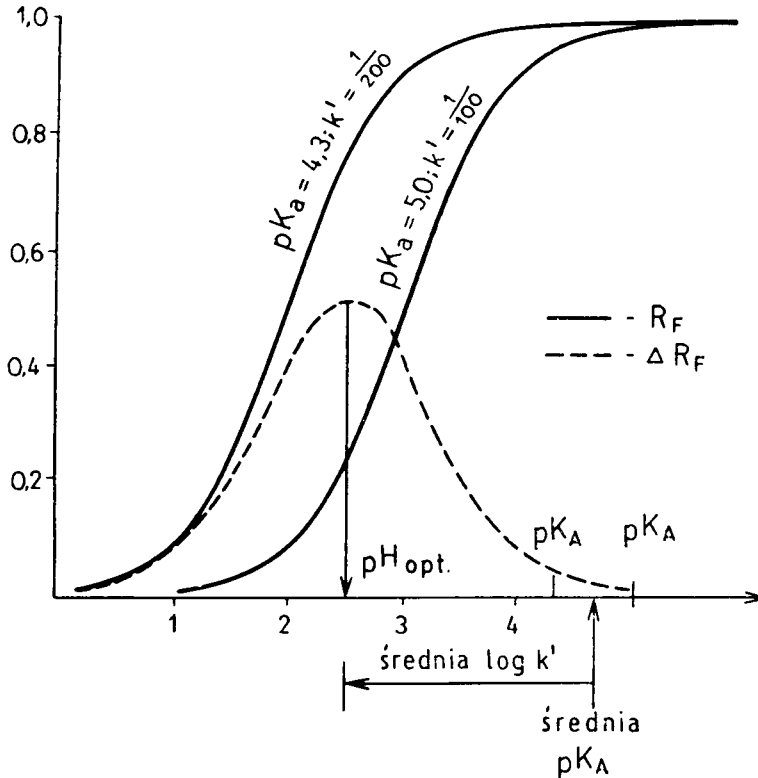
otrzymujemy:

$$\text{pH}_{\text{opt}} = \frac{1}{2} (\text{pK}'_{\text{A}} + \text{pK}''_{\text{A}}) + \frac{1}{2} (\log \alpha^{\circ} + \log \alpha^{\circ\prime\prime}) + \log \rho \quad (11)$$

czyli

$$\text{pH}_{\text{opt}} = \frac{1}{2} (\text{pK}'_{\text{A}} + \text{pK}''_{\text{A}}) + \frac{1}{2} (R_{\text{M}}^{\circ\prime} + R_{\text{M}}^{\circ\prime\prime}) = \frac{1}{2} (\text{pH}'_1 + \text{pH}''_1) \quad (11a)$$

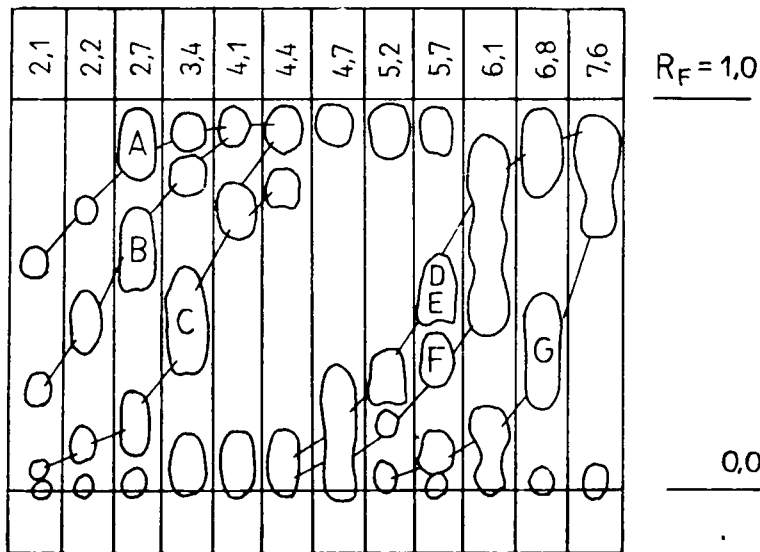
tnz. optymalne pH jest równe średniej wartości pK_{A} obu zasad zmiennej o średnią logarytmów współczynników podziału niezdisocjujących zasad i o logarytm stosunku objętości faz. Zależność tę ilustruje ryc. 10. Im silniejsza jest zdolność ekstrakcyjna rozpuszczalnika organicznego (im niższa wartość α°), tym niższa będzie wartość pH_{opt} i tak np. w chromatografii alkaloidów najniższe wartości pH_{opt} otrzymuje się



Ryc. 10. Krzywe R_F vs. pH dwu substancji i krzywa zmian różnicy współczynników R_F , osiągająca maksimum przy określonym, optymalnym pH fazy wodnej R_F vs. pH curves of two solutes and the corresponding plot of differences of R_F values with a maximum at a certain optimal pH of the aqueous phase

dla chloroformu, wyższe dla benzenu i jeszcze wyższe dla cykloheksanu, który jest najslabszym ekstrahentem zasad azotowych.

Zalety stosowania kontrolowanej jonizacji zasad organicznych w fazie wodnej przez zmianę pH ilustruje ryc. 11, na której przedstawiono zestawienie chromatogramów ekstraktów alkaloidowych dymnicy lekarskiej (12), przy zastosowaniu benzenu jako fazy ruchomej. Widoczny jest sigmoidalny przebieg zależności R_F od pH, zgodnie z oczekiwaniami teoretycznymi.



Ryc. 11. Zestawienie chromatogramów ekstraktu alkaloidowego ziela dymnicy (*Fumaria officinalis*) przy zastosowaniu benzenu jako fazy ruchomej i bibuły impregnowanej roztworami buforowymi o różnym pH

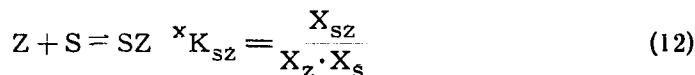
Comparison of chromatograms of the *Fumaria* alkaloids for the system benzene/buffer solutions of different pH values

Dla kwasów organicznych otrzymuje się symetryczne zależności, których wykresy stanowią odbicie zwierciadlane wykresów dla zasad, z pionową osią symetrii przy $\text{pH} = 7,0$ (por. (1) — gdzie omówiono także bardziej złożone przypadki równowag jonizacji i kompleksowania, np. dla elektrolitów dwuzasadowych).

C. Zastosowanie rozpuszczalników mieszanych

Tworzenie nieekstrahowalnych kompleksów substancji w jednej z faz może polegać nie tylko na jonizacji, lecz także na tworzeniu kompleksów solwatacyjnych. Przypuśćmy, że fazą polarną jest mieszanina dwu roz-

puszczalników N + S, z których rozpuszczalnik S tworzy odwracalnie kompleksy solwatacyjne z cząsteczkami substancji wg równania:

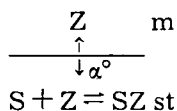


gdzie X oznacza stężenie wyrażone w ułamkach molowych; dla niezbyt stężonych roztworów

$$K_{sz} = \frac{[SZ]}{[S][Z]}$$

gdzie nawiasy oznaczają stężenia molarne.

Równowaga podziału przedstawia się schematycznie, podobnie jak w przypadku elektrolitów (8):



zaś współczynnik ekstrakcji

$$\begin{aligned} \alpha &= \frac{[Z]_{st} + [SZ]_{st}}{[Z]_m} = \frac{[Z]_{st} + [Z]_{st}[S]_{st}K_{sz}}{[Z]_m} = \frac{[Z]_{st}}{[Z]_m}(1 + [S]_{st}K_{sz}) \\ &= \alpha^\circ(1 + [S]_{st}K_{sz}) \end{aligned} \quad (13)$$

$$R_M = \log \alpha \rho = \log \alpha^\circ + \log \rho + \log(1 + [S]K_{sz}) \quad (14)$$

gdzie α° oznacza współczynnik podziału swobodnych cząsteczek substancji Z. Wzór ten jest analogiczny jak dla przypadku elektrolitu z tą różnicą, że $K_{sz} = 1/K_A$ i podobnie jak krzywa $R_M = f(\log [H^+])$, linia R_M vs. $\log [S]$ posiada dwie asymptoty:

$$\text{gdy } K_{sz}[S] \gg 1, \text{ to } R_M = \log \alpha^\circ + \log \rho + \log K_{sz} + \log [S] \quad (14a)$$

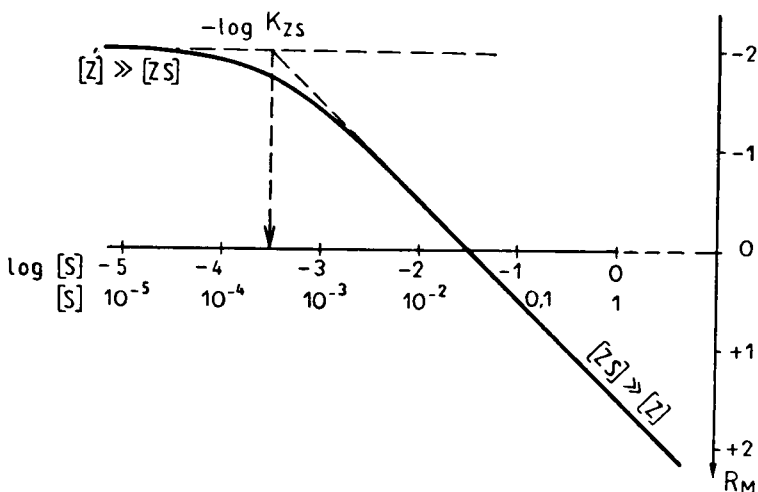
i wówczas R_M zależy liniowo od stężenia rozpuszczalnika S w fazie stacjonarnej, przy czym spadek jest równy 1,0,

$$\text{gdy } K_{sz}[S] \ll 1, \text{ wówczas } R_M = \log \alpha^\circ + \log \rho = \text{const.} \quad (14b)$$

(spadek = 0, linia pozioma), co przedstawiono na wykresie (ryc. 12).

W przypadku, gdy kompleks solwatacyjny jest trwały, a stężenie rozpuszczalnika niezbyt niskie, R_M zależy liniowo od $\log [S]$, zaś $R_F = f(\log [S])$ daje przebieg sigmoidalny. Zastosowanie proporcjonalnej skali składu fazy mieszanej (tzn. wykres $R_F = f([S])$) powoduje dalszą deformację zależności funkcjonalnej.

Jako interpretację doświadczalną tego rodzaju zależności można podać podział zasad chinolinowych między benzen a formamidowe roztwory kwasu cytrynowego. Kwas cytrynowy odgrywa tu rolę składnika



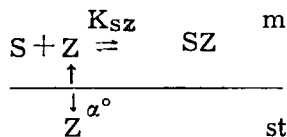
Ryc. 12. Teoretyczna krzywa R_M vs. $\log[S]$ dla przypadku tworzenia kompleksu solwatacyjnego ZS w fazie stacjonarnej. Wykres jest analogiczny do wykresu R_M vs. $\log[H^+]$ (ryc. 9)

A theoretical R_M vs. $\log[S]$ relationship for the case of formation of solvation complex ZS in the stationary phase. The plot is analogous to that in Fig. 9 which represents R_M vs. $\log[H^+]$ relationship

„S”, który tworzy kompleksy solwatacyjne z chinolinami (drogą tworzenia H-mostków $-\text{COOH}\dots\text{N}$, ewentualnie par jonowych $\text{COO}^- + \text{HN}$, czy też pośrednich form mezomerycznych).

Zależność R_M od logarytmu stężenia kwasu ilustruje ryc. 13 (9). Przy silniejszych rozcieńczeniach kwasu linia odchyła się dążąc do asymptoty poziomej (w okolicy $\log[S] = -\log K_{SZ}$) jednak przy wyższych stężeniach kwasu otrzymuje się spadek zbliżony do 1,0, zgodnie z oczekiwaniami. Równolegle przedstawiono te same wyniki w bardziej złożonej formie w skali $R_M = f([S])$ i $R_F = f([S])$.

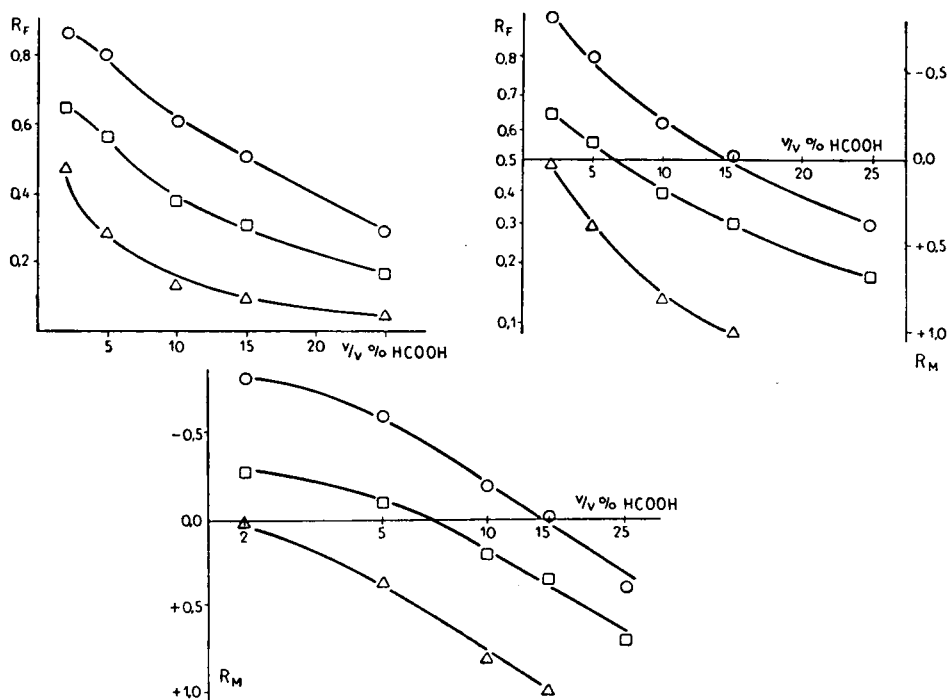
Tworzenie kompleksów solwatacyjnych może także zachodzić w fazie mniej polarnej (ruchomej) (13, 14):



W tych warunkach

$$\alpha = \frac{[Z]_{st}}{[Z]_m + [SZ]_m} = \frac{[Z]_{st}}{[Z]_m + [S]_m [Z]_m K_{SZ}} = \frac{\alpha^0}{1 + [S]_m K_{SZ}} \quad (15)$$

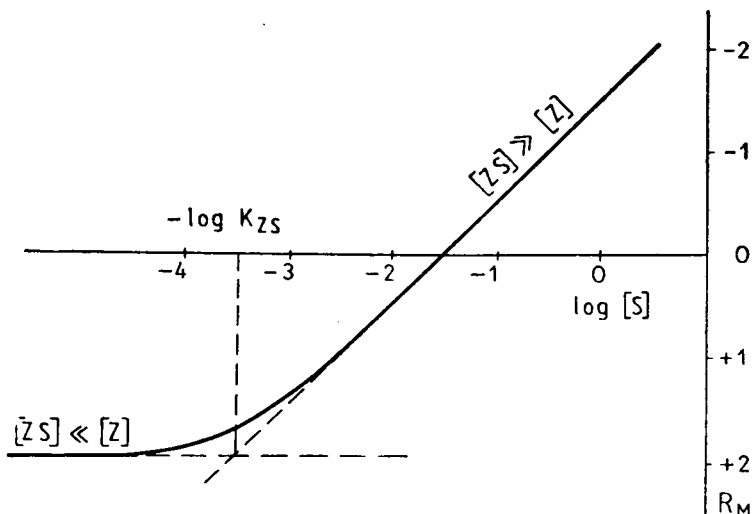
$$R_M = \log \alpha^0 + \log \rho - \log(1 + [S]_m K_{SZ}) \quad (16)$$



Ryc. 13. Doświadczalne krzywe R_M vs. $\log[S]$, R_M vs. $[S]$ i R_F vs. $[S]$ dla przypadku, gdy kompleks solwacyjny tworzy się w fazie stacjonarnej
 Experimental R_F vs. $[S]$, R_M vs. $[S]$ and R_M vs. $\log[S]$ relationships of three quinolin bases; solvation complexes are formed in the stationary phase

Funkcja ta jest podobna do poprzedniej, jednak na skutek tworzenia kompleksów solwacyjnych w fazie ruchomej linia R_M vs $\log[S]$ jest obrócona o 180° wokół osi $\log[S]$ (ryc. 14), a ukośna asymptota ma spadek równy $-1,0$. Odwróceniu ulegnie też linia R_F vs. $\log[S]$. Tego rodzaju zależność otrzymano m. in. w przypadku chromatografii aminokwasów w układzie heksanol + kwas bis (2-etyloheksylo) fosforowy — roztwór buforowy; w układzie tym kwas dwualkilofosforowy w fazie organicznej oddziałuje silnie z aminokwasami tworząc kompleksy solwacyjne (14).

Bardziej złożone przypadki, w których rozpuszczalnik aktywny w fazie mniej polarnej ulega dimeryzacji, co prowadzi do zmniejszenia jego stężenia efektywnego, rozpatrywano w innej pracy (13); również i w tym przypadku otrzymuje się w pewnych warunkach liniowe zależności R_M od logarytmu stężenia rozpuszczalnika aktywnego. Wykres 15 przedstawia zależność R_M brucyny od logarytmu stężenia kwasu olejowego w benzenie (1), trójchloroetylenie (2), alkoholu izo-amylowym (3), to-



Ryc. 14. Teoretyczna krzywa R_M vs. $\log[S]$ dla przypadku, gdy kompleks solwatacyjny tworzy się w fazie ruchomej
 A theoretical R_M vs. $\log[S]$ curve for the case when the solvation complex ZS is formed in the mobile phase

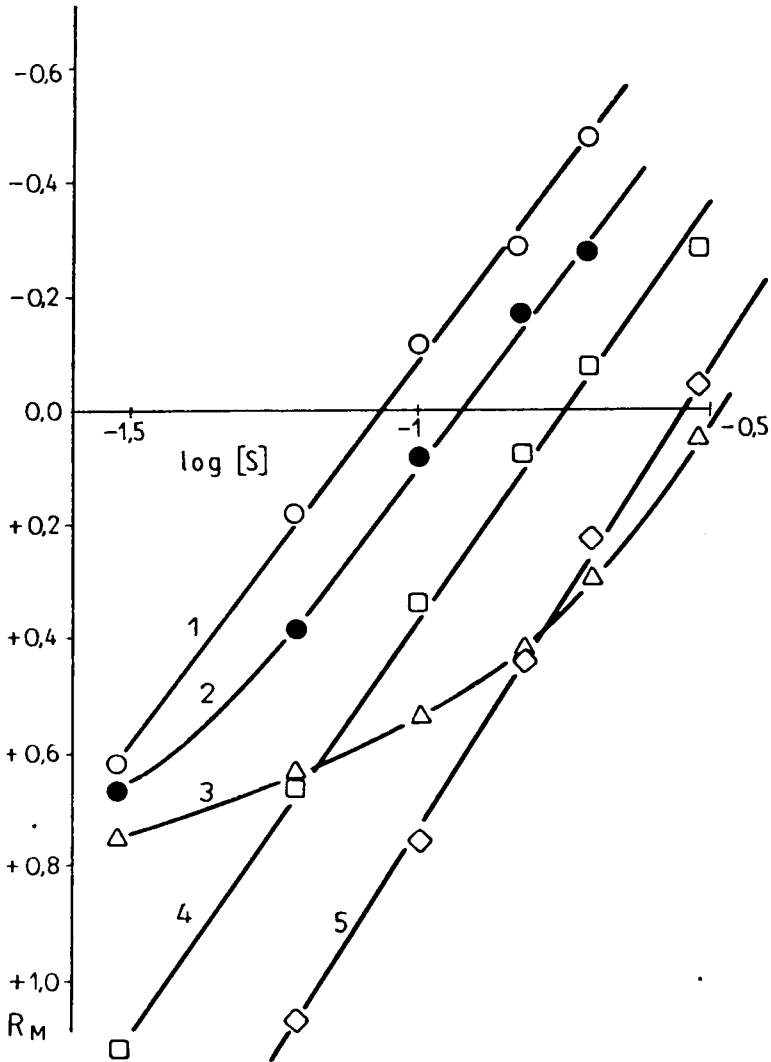
luenie (4). Odpowiednie wielkości współczynników R_F otrzymuje się w zakresie R_M od -1 do $+1$ (por. dodatkową skalę współczynników R_F na ryc. 13 b).

Metoda regulacji podziału przez dodatek do fazy stacjonarnej związków tworzących kompleksy solwatacyjne z rozdzielanymi substancjami okazała się również przydatna w chromatografii gazów: tak np. dodatek soli srebra, tworzących π -kompleksy z wiązaniami podwójnymi i potrójnymi między atomami węgla, umożliwia łatwe oddzielenie węglodorów aromatycznych i nienasyconych od nasyconych, zaś dodatek nielotnych alkoholi do fazy stacjonarnej powoduje selektywny wzrost retencji substancji elektronodonorowych (15).

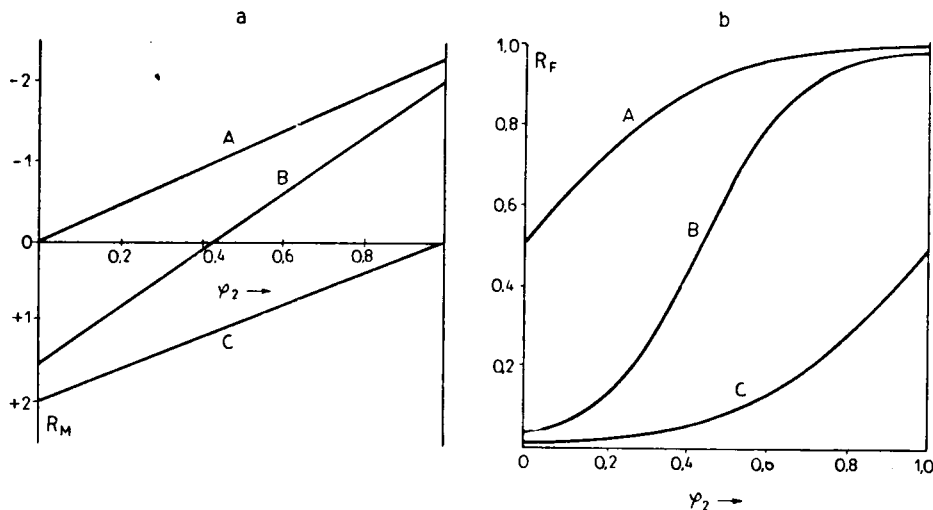
W przypadku, gdy substancje chromatografowane oddziałują słabo z oboma składnikami fazy mieszanej, otrzymuje się często liniowe zależności R_M od składu objętościowego fazy mieszanej, zgodnie ze wzorem

$$R_M = \varphi_1 R_{M1} + \varphi_2 R_{M2} \quad (17)$$

gdzie 1, 2 oznaczają składniki fazy mieszanej, zaś φ — ułamek objętościowy. Zależność tę ilustruje ryc. 16a; doświadczalne zależności $R_F = f(\varphi)$ przedstawiają wówczas krzywe w kształcie litery S (ryc. 16b), ew. łuki wklęsłe lub wypukłe.



Ryc. 15. Podział brucyny w układach typu kwas olejowy + rozcieńczalnik/woda, w zależności od stężenia kwasu olejowego w fazie organicznej (przykłady liniowej zależności R_M od logarytmu stężenia rozpuszczalnika aktywnego). Rozcieńczalnik: 1 — benzen; 2 — trójchloroetylen; 3 — alkohol izo-amylowy; 4 — toluen; 5 — ksylen
 Distribution of brucine in systems of the type oleic acid + diluting solvent/water for varying concentration of oleic acid in the organic phase (examples of linear R_M vs. $\log[S]$ relationships). The diluting solvents are: 1 — benzene; 2 — trichloroethylene; 3 — iso-amyl alcohol; 4 — toluene; 5 — xylene

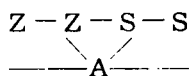


Ryc. 16. Zależność R_M od stężenia rozpuszczalnika w przypadku słabych oddziaływań w fazie mieszanej i odpowiadające im zależności R_F substancji A, B i C od składu objętościowego

R_M vs. $[S]$ relationship for the case of weak interactions in the mixed phase and the corresponding R_F vs. volume composition relationships of three solutes A, B, C

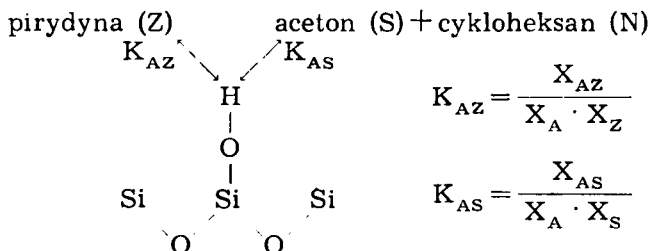
3. Próby zastosowania prawa działania mas do ilościowego ujęcia optymalizacji układów adsorpcyjnych

Mechanizm chromatografii typu adsorpcyjnego (np. chromatografia na „suchym” silikażelu, tlenku glinu itp.) odbiega od mechanizmu chromatografii podziałowej, w której opóźnienie cząsteczek substancji chromatografowanej zachodzi na skutek absorpcji przez ciekłą fazę stacjonarną. W przypadku, gdy centra aktywne adsorbentu są grupami funkcyjnymi zdolnymi do tworzenia mostków wodorowych, ich oddziaływania z cząsteczkami substancji i rozpuszczalnika można opisać następującym uproszczonym schematem, w którym Z oznacza cząsteczkę substancji chromatografowanej, S — cząsteczkę rozpuszczalnika, zaś A — grupę funkcyjną na powierzchni adsorbentu (schemat uwzględnia asocjację własną substancji, Z—Z, i rozpuszczalnika, S—S).



Prostszą sytuację otrzymuje się, gdy rozpuszczalnik ani substancja nie asocjują drogą tworzenia mostków wodorowych, tzn. gdy oddziaływania Z—Z, S—S i S—Z są słabe i ich efekt energetyczny można pominać.

Sytuacja taka występuje, gdy zarówno substancja Z, jak i rozpuszczalnik S mają charakter elektronodonorowy (np. pirydyna i aceton, klasa B wg Pimentela i McClellana), zaś adsorbent ma przeważający charakter protonodonorowy (np. silikażel); równowagi adsorpcji substancji i rozpuszczalnika można wówczas przedstawić na podstawie prawa działania mas stałymi K_{AZ} i K_{AS} wg następującego schematu (rozpuszczalnik elektronodonorowy, aceton, rozcieńczono rozpuszczalnikiem neutralnym N — cykloheksanem; zakłada się stałość współczynników aktywności):



Założymy następujący model procesu chromatograficznego (16):

1. Wszystkie grupy hydroksylowe powierzchni są jednakowe, nie związane między sobą mostkami wodorowymi i dostępne dla cząsteczek substancji. Odpowiada to właściwościom żeli szerokoporowatych o umiarkowanej powierzchni właściwej.

2. Układ składa się z cząsteczek Z, S i N, grup hydroksylowych powierzchni (A), oraz kompleksów AZ i AS. Skład układu wyrażamy ułamkami molowymi. Liczbowo cząsteczki rozpuszczalnika przeważają nad grupami powierzchni adsorbentu (A, AS i AZ), a stężenie substancji Z (Z i AZ) jest najniższe. W formie nierówności warunki te można zapisać

$$X_S + X_N + X_A + X_Z + X_{AZ} + X_{AS} = 1$$

$$X_S + X_N \gg X_A + X_{AZ} + X_{AS} + X_Z$$

$$X_A + X_{AS} \gg X_{AZ} + X_Z$$

Doświadczalnie wykazano, że w standardowych warunkach chromatografii cienkowarstwowej na szerokoporowatym silikażelu założenia te są realistyczne.

3. Zakłada się, że adsorpcja substancji Z zachodzi jedynie w chwili, gdy grupa OH powierzchni silikażelu nie jest połączona mostkiem wodorowym z cząsteczką rozpuszczalnika S (tzn. występuje w formie swobodnej, A a nie AS). Zakłada się także, że grupy hydroksylowe reagują w stosunku 1:1 zarówno z cząsteczkami substancji, jak i rozpuszczalnika (tzn. pirydyna ruguje z powierzchni aceton w stosunku cząsteczkowym 1:1, w przeciwnym razie należy wprowadzić modyfikację do sta-

łych równowagi adsorpcji substancji, K_{AZ} i rozpuszczalnika, K_{AS} , por. monografia Snydera (5).

4. Zakłada się idealizowany przebieg procesu chromatograficznego (brak gradientu składu i stosunku masy adsorbentu i rozpuszczalnika wzdłuż drogi rozwijania, stałość temperatury itp.).

Ogólne stężenie powierzchniowych grup funkcyjnych wynosi $X_A + X_{AS}$ ($X_{AZ} = 0$); jednak o adsorpcji decyduje stężenie X_A , równe

$$\frac{X_{AS}}{K_{AS} \cdot X_S}$$

Współczynnik podziału wynosi, zgodnie z definicją:

$$\alpha = \frac{X_{AZ}}{X_Z} = K_{AZ} \cdot X_A = \frac{K_{AZ} \cdot X_{AS}}{K_{AS} \cdot X_S} \quad (18)$$

gdź X_{AZ} oznacza stężenie cząsteczek unieruchomionych w danym momencie przez adsorpcję, zaś X_Z — stężenie cząsteczek migrujących.

Z równania 18 wynika, że

$$R_M = \log \alpha = \log K_{AZ} - \log K_{AS} + \log X_{AS} - \log X_S \quad (19)$$

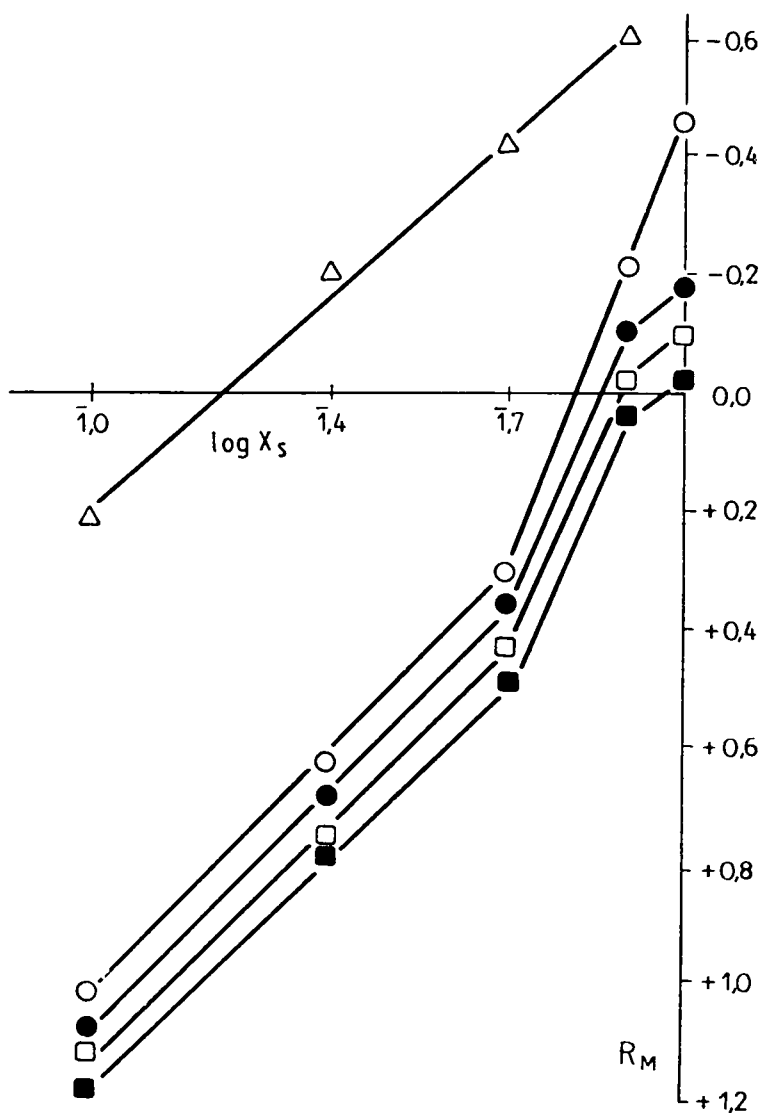
oraz, że adsorpcja substancji wzrasta

- a) ze wzrostem siły oddziaływania A—Z,
- b) ze wzrostem powierzchni adsorbentu (X_{AS}),
- c) z obniżeniem adsorpcji rozpuszczalnika, A—S,
- d) z obniżeniem zawartości rozpuszczalnika aktywnego (w ilustrowanym przypadku) — acetonu) w rozpuszczalniku rozwijającym.

Ze wzoru na R_M wynikają następujące wnioski dotyczące czynników wpływających na przebieg procesu adsorpcyjnej chromatografii cienkowarstwowej.

1. Wpływ składu rozpuszczalnika mieszanego S + N (np. aceton + cykloheksan)

Dla danej substancji, adsorbentu i rozpuszczalnika R_M zależy liniowo od logarytmu ułamka molowego rozpuszczalnika S. Ponieważ rozpuszczalnik stanowi dominujący składnik układu, w definicji jego składu można pominąć pozostałe składniki i X_S rozpatrywać jako ułamek molowy rozpuszczalnika w mieszaninie S + N. Dla silniej rozcieńczonych roztworów rozpuszczalnika S, $\log X_{AS}$ przestaje mieć wartość stałą i w tych warunkach zależność przestaje przebiegać liniowo względem $\log X_S$ i odchyła się od przebiegu poziomego, odpowiadającego wartości $X_{AZ}/X_Z = K_{AZ} \cdot X_A$ (ryc. 17).



Ryc. 17. Zależność R_M aniliny i jej pochodnych od zawartości anizolu w fazie ruchomej dla chromatografii na silikażelu przy zastosowaniu dwuskładnikowego rozpuszczalnika mieszanego cykloheksan + anizol. W zakresie umiarkowanych stężeń anizolu otrzymuje się zależności liniowe

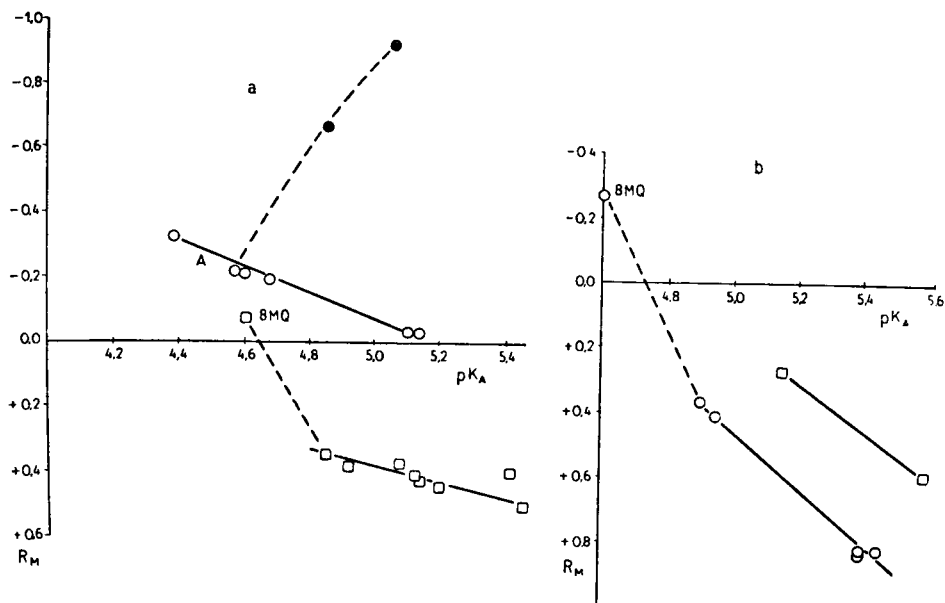
R_M values of aniline derivatives plotted against the concentration of anisole for adsorption chromatography on silica, using a binary developing solvent composed of cyclohexane and anisole. In the range of moderate concentrations linear relationships are observed

2. Wpływ powierzchni właściwej adsorbentu

W przyjętym modelu liczba powierzchniowych grup OH, a więc i X_{AS} , są proporcjonalne do powierzchni adsorbentu; tak więc R_M zależy liniowo od logarytmu powierzchni właściwej adsorbentu, o ile struktura warstwy i pozostałe parametry są analogiczne. Wniosek ten jest zgodny z podstawowym wzorem Snydera na równowagę adsorpcji, wyprowadzonym na podstawie innych założeń (5).

3. Wpływ struktury cząsteczkowej substancji Z

Oddziaływania — OH...N można uważać za reakcję kwas-zasada w roztworze niewodnym; z drugiej strony, dla substancji o analogicznej strukturze cząsteczkowej można oczekiwać, że $\log K_{AZ}$ zależy liniowo



Ryc. 18. a. Liniowe korelacje R_M od pK_A pochodnych aniliny (kółka) i chinoliny kwadrat). Obie N-metylo-pochodne (czarne kółka) wykazują odrębną zależność, podobnie jak 8-metylocholinina (8MQ), ze względu na efekty steryczne. Układ: anizol/silikażel. b. Analogiczne korelacje w układzie podziałowym cykloheksan/4% HCOOH w HCONH₂ dla pochodnych chinoliny (kółka) i zasad trójpierścieniowych (kwadraty) a. Linear R_M vs. pK_A correlations of aniline derivatives (circles) and quinolines (squares). The two N-methyl derivatives (filled circles), as well as 8-methylquinoline (8MQ) deviate from the correlations because of steric effects. System: anisole/silica. b. Analogous correlations in a liquid/liquid partition system (cyclohexane/4% HCOOH in HCONH₂) for some derivatives of quinoline (circles) and three-ring bases (squares)

od wartości pK_A zasad, wyznaczonych dla roztworów wodnych. Prowadzi to do wniosku, że również R_M zależy liniowo od pK_A . Przypuszczenie to zostało potwierdzone dla metylowych pochodnych aniliny; dla N-metylo-pochodnych stwierdzono jednak przebieg odwrotny, co wskazuje na znaczenie efektów sterycznych (9, 17) (ryc. 18). Regularność taką stwierdzono także dla substancji o bardziej złożonej strukturze (np. alkaloidów zawierających oprócz zasadowych atomów azotu, także atomy tlenu eterowego), o ile adsorpcja zachodzi z rozpuszczalników elektronodonorowych nie dopuszczających do oddziaływań mniej zasadowych grup funkcyjnych substancji z powierzchniowymi grupami hydroksylowymi. Analogiczną korelację stwierdzono również dla podziału chinolin między cykloheksan a formamidowy roztwór kwasu mrówkowego (ryc. 18 b).

4. Wpływ objętości molowej rozpuszczalnika w szeregach homologicznych

Wzór 18 przekształcimy tak, aby wyrazić ilość adsorbentu w gramach, a ilość rozpuszczalnika w ml.

$$\alpha = \frac{K_{AZ} \cdot X_{AS}}{K_{AS} \cdot X_S} = \frac{K_{AZ}}{K_{AS}} \cdot \frac{n_{AS}}{n_S} \quad (20)$$

(gdzie $X_{AS} = \frac{n_{AS}}{\sum_i n_i}$ i $X_S = \frac{n_S}{\sum_i n_i}$, gdzie n oznacza liczbę moli). Zakładając, że $X_{AS} \gg X_A$, oraz biorąc pod uwagę, że na 1 m² silikazelu przypada $8,5 \cdot 10^{-6}$ mola grup OH (18), otrzymamy, że

$$n_{AS} = 8,5 \cdot 10^{-6} \cdot W_A \cdot a \quad (21)$$

gdzie W_A oznacza wagę adsorbentu w gramach, zaś a — jego powierzchnię właściwą w m²/g.

Oznaczając objętość rozpuszczalnika w układzie przez V_S (ml), zaś jego objętość molową przez V_S° (ml/mol) otrzymamy

$$n_S = V_S / V_S^\circ$$

wobec tego

$$\alpha = \frac{K_{AZ}}{K_{AS}} \cdot \frac{V_S^\circ}{V_S} \cdot 8,5 \cdot 10^{-6} \cdot W_A \cdot a \quad (22)$$

zaś

$$R_M = \log \frac{K_{AZ}}{K_{AS}} + \log \frac{V_S^\circ}{V_S} + \log W_A + \log a + 5,07 \quad (23)$$

Tak więc, jeżeli stała równowagi K_{AS} jest ta sama dla szeregu rozpuszczalników (np. szeregu homologicznego), wówczas przy pozostałych warunkach identycznych R_M zależy liniowo od logarytmu objętości molowej

rozpuszczalnika S. Wniosek ten nie został jeszcze sprawdzony doświadczalnie. Przedłużenie długości łańcucha węglowego można zresztą uważać za rozcieńczanie aktywnej grupy funkcyjnej (np. stężenie grup karbonylowych wynosi 13,7 mola/l w acetonie, a 9,5 mola/l w ketonie dwuetylowym).

Ostatni wzór wykazuje również bezpośrednio liniową zależność R_M od powierzchni właściwej adsorbentu (por. wyżej p. 2) wraz z innymi parametrami, które decydują o wielkości bezwzględnej współczynnika R_M , pozwalając na ilościowe ujęcie możliwości regulacji współczynników R_M w celu otrzymania optymalnych warunków rozdzielania (R_M w zakresie $-1, +1$).

Na zakończenie rozważań omawianego modelu adsorpcji należy wskazać na konsekwencje bardziej złożonych mechanizmów (polegających na adsorpcji dwupunktowej — gdy cząsteczka substancji zawiera dwie aktywne grupy funkcyjne, np. nitroanilina; gdy ze względu na swą większą objętość ruguje z powierzchni więcej niż jedną cząsteczkę rozpuszczalnika; gdy cząsteczka rozpuszczalnika blokuje dwie powierzchniowe grupy hydroksylowe itp.). Rozpatrzmy dla przykładu przypadek dwupunktowej adsorpcji substancji Z i jednopunktowej adsorpcji rozpuszczalnika S. W przypadku tym

$$K_{A,Z} = \frac{X_{A,Z}}{X_A^2 \cdot X_Z}$$

$$\alpha = \frac{X_{A,Z}}{X_Z} = K_{A,Z} \cdot X_A^2 = \frac{K_{A,Z} \cdot X_{AS}^2}{K_{AS}^2 \cdot X_S^2} \quad (24)$$

$$R_M = \log \alpha = \log K_{A,Z} - 2 \log K_{AS} + 2 \log X_{AS} - 2 \log X_S \quad (25)$$

Z ostatniego wzoru wynika, że współczynnik R_M jest wówczas w większym stopniu zależny od oddziaływań adsorbent — rozpuszczalnik, powierzchni adsorbentu i ułamka molowego rozpuszczalnika aktywnego; współczynnik kierunkowy linii R_M vs. $\log a$ i R_M vs. $\log X_S$ wynosi w tym przypadku -2 .

W przypadku mieszanego mechanizmu możliwe są też pośrednie współczynniki kierunkowe; w miarę zmiany składu rozpuszczalnika mieszanego (np. aceton + cykloheksan) może nastąpić zmiana udziału mechanizmu jednopunktowego i dwupunktowego; ten ostatni przeważa w rozcieńczonych roztworach acetonu ze względu na słabszą konkurencję rozpuszczalnika o grupy hydroksylowe na powierzchni adsorbentu.

4. Uwagi końcowe

W związku z powrotem koncepcji prawa działania mas do teorii roztworów niewodnych, w których występują silne oddziaływania typu mostka wodorowego (19) wydają się celowe próby zastosowania prawa działania mas także do ilościowego ujęcia przebiegu procesu chromatograficznego, szczególnie pod kątem optymalizacji układów. Zreferowane powyżej pozytywne wyniki badań sugerują, że na tej drodze, kosztem pewnych uproszczeń, można uzyskać ilościowe ujęcie zależności R_M od pH, składu rozpuszczalnika itp. Struktura cząsteczkowa rozpuszczalników, substancji, adsorbentów oraz struktura układu chromatograficznego przejawia się poprzez proste parametry, takie jak: stałe równowag jonizacji, solwatacji, asocjacji, współczynniki podziału itp.

W zakresie praktycznych zastosowań, poza optymalizacją układów, teoretyczne zależności współczynników R_M od parametrów decydujących o podziale, pozwalają na ujęcie zagadnienia powtarzalności danych chromatograficznych (20) oraz pozwalają na ocenę zmian rozpuszczalności substancji w rozpuszczalnikach mieszanych (21, 22), zarówno w układach o słabych oddziaływaniach międzycząsteczkowych, w których otrzymuje się liniowe zależności R_M od składu fazy mieszanej (21), jak i w przypadku zależności typu logarymicznego (22). Analogiczne metody regulacji podziału stosuje się również w chromatografii metali, przy czym zastosowanie odpowiedniego układu współrzędnych pozwala na wyjaśnienie mechanizmu podziału (23). Zastosowanie kontrolowanego stopnia wilgotności bibuły pozwoliło także na wyznaczenie z danych chromatograficznych zależności współczynników ekstrakcji od pH (24), a także na optymalizację układów ekstrakcyjnych dla preparatywnego rozdzielania alkaloidów (12, 25, 26); w niektórych przypadkach trudności interpretacji danych chromatograficznych mogą wynikać z udziału mechanizmu adsorpcyjnego (27).

Omówione w referacie prace Katedry Chemii Nieorganicznej wykazały, że:

1. Możliwe jest opracowanie uproszczonej teorii optymalizacji układów chromatografii podziałowej i adsorpcyjnej związków organicznych.

2. Ze względu na złożoność parametrów chromatograficznych, doświadczalne zależności mogą wykazywać pewne odchylenia od oczekiwań teoretycznych, stanowią jednak odzwierciedlenie zależności teoretycznych, szczególnie w przypadku zapewnienia odpowiednich warunków procesu (28).

3. Niezależnie od ułatwienia optymalizacji układów (poprzez lepsze zrozumienie parametrów, które decydują o podziale i adsorpcji), wyprowadzone zależności umożliwiają szerszą interpretację danych doświadczalnych.

Uwaga. W referacie zastosowano definicje parametrów zgodnie z większością prac z zakresu chromatografii, a odbiegające od wcześniejszych prac autora, nawiązujących do teorii ekstrakcji. Tak więc zastosowano definicję R_M wg Bate-Smitha i Westalla, zaś współczynnik podziału definiowano zgodnie z pracami Martina ($\alpha = C_w/C_{org}$); we wcześniejszych pracach współczynnik podziału $k = 1/\alpha$, zaś $r = 1/\rho$, tzn. $kr = 1/\alpha\rho = 1/k'$. Dla uzyskania równoległości wzrostu R_F i R_M , os R_M skierowano w dół, co pozwoliło także na zachowanie przebiegu funkcji R_M od pH, składu faz itp. analogicznego, jak we wcześniejszych pracach autora.

PIŚMIENNICTWO

1. Soczewiński E.: *Advances in Chromatography* (red. Giddings J. C. i Keller R. A.), tom V, Dekker M., New York 1968, s. 3—78.
2. Bate-Smith E. C., Westall R. G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **4**, 427—434, 1950.
3. Reichl E. R.: *Monatsh.*, **86**, 69—74, 1955.
4. Buchowski H.: Wpływ własności rozpuszczalników na współczynniki podziału nieelektrolitów w układach woda-rozpuszczalnik organiczny, PWN, Warszawa 1963.
5. Snyder L. R.: *Principles of Adsorption Chromatography*, Dekker M., New York 1968.
6. Rohrschneider L.: *Z. Anal. Chem.*, **170**, 256—263, 1959.
7. Littlewood A. B.: *J. Gas Chromatog.*, **1** (11), 16—29, 1963.
8. Bush I. E.: *Methods Biochem. Anal.*, **13**, 357—438, 1965.
9. Maciejewicz W.: Praca doktorska, UMCS Lublin 1968 (por. także *Separation Sci.*, **2**, 293—305, 1967; **2**, 779—788, 1967).
10. Soczewiński E., Bieganowska M., Ciszewska M.: *Bull. Acad. Polon. Sci., ser. chim.*, **16**, 433—438, 1968.
11. Waksmundzki A., Soczewiński E.: *J. Chromatog.*, **3**, 252—255, 1958.
12. Wawrzynowicz T.: Praca doktorska, AM Lublin 1965 (por. także *Chromatographia*, **1**, 327—331, 1968; **1**, 378—381, 1968).
13. Soczewiński E., Matysik G.: *J. Chromatog.*, **32**, 458—471, 1968.
14. Soczewiński E., Rojowska M.: *J. Chromatog.*, **32**, 364—367, 1968.
15. Karger B. L.: *Anal. Chem.*, **39**, 24A—50A (July 1967).
16. Soczewiński E.: *Anal. Chem.* **41**, 179—182, 1969.
17. Soczewiński E., Gołkiewicz W.: *Chem. Anal.* **14**, 465—472, 1959.
18. Kiselev A. V., Jaszin Ja. I.: *Gazoabsorbjonnoj chromatografija*, „Nauka”, Moskwa 1967.
19. Buchowski H.: *Association dans les liquides*, PWN, Warszawa 1967.
20. Soczewiński E., Mańko R.: *J. Chromatog.*, **33**, 40—44, 1968.
21. Soczewiński E., Wolski T., Jurkiewicz K.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska Lublin, Sec. AA*, **19**, 25—32, 1964.
22. Soczewiński E., Kuczyński J.: *Separation Science*, **3**, 132—142, 1968.
23. Przeszlakowski S., Soczewiński E., Flieger A.: *Chem. Anal.* **13**, 841—848, 1968.
24. Soczewiński E., Szabelska B.: *Dissert. Pharm.*, **57**, 53—58, 1965.
25. Jusiak L.: *Acta Polon. Pharm.*, **23**, 247—251, 1966; **24**, 65—70, 1967.

26. Przyborowska M.: Dissert. Pharm. Pharmacol., **17**, 497—50, 1965.
27. Ratajewicz D.: Chem. Anal., **12**, 517—526, 1967.
28. Waksmundzki A., Soczewiński E., Aksanowski R.: Chem. Anal., **2**, 459—462, 1957.

Otrzymano 15 I 1969.

РЕЗЮМЕ

Обсуждаются работы кафедры неорганической и аналитической химии (Медицинская Академия в Люблине) по теории оптимализации систем распределительной и адсорбционной хроматографии органических веществ.

Применяя закон действия масс к равновесиям ионизации и сольватации и трактуя процесс адсорбции вещества и растворителя как образование сольватационных комплексов с поверхностными функциональными группами, способными образовать водородные связи, вывели простые теоретические зависимости влияния составов фаз (или pH водной фазы) на значение R_M вещества для следующих типов хроматографических систем: 1) органический растворитель — водный буферный раствор; 2) слабо полярный растворитель — полярный разбавитель с добавленным компонентом, образующим сольватационные комплексы с веществом; 3) слабо полярный разбавитель + компонент, образующий сольватационные комплексы с веществом/полярный растворитель; 4) разбавитель + электронодонорный растворитель/протонодонорный адсорбент (например силикагель).

Описывается также метод составления в жидкостной хроматографии хроматографических спектров, основанных на принципе, применяющимся до сих пор в газо-жидкостной хроматографии.

В вышеуказанных рассуждениях молекулярная структура вещества, растворителей и адсорбентов проявляется через константы равновесий сольватации, ионизации и пр. Даются экспериментальные примеры, иллюстрирующие теоретические рассуждения.

SUMMARY

Studies were carried out in the Department of Inorganic and Analytical Chemistry (Medical Academy, Lublin) on the theory of optimization of adsorption and partition chromatography.

The Law of Mass Action was applied to the ionization and solvation equilibria; the process of adsorption of the solvent and solutes were considered to be the reversible formation of solvation complexes with

the surface groups capable of H-bonding; this permitted to derive simple relationships between R_M values and the composition of the phases (or pH of the aqueous phase) for the following types of chromatographic systems: 1) organic solvent — aqueous buffer solution, 2) weakly polar solvent — polar diluting solvent containing a component which forms solvation complexes with the solute, 3) weakly polar diluting solvent containing a component which forms solvation complexes with the solute — polar solvent, 4) diluting solvent + electron-donor solvent — proton-donor adsorbent (e.g., silica).

A method of plotting chromatographic spectra in liquid chromatography (based upon a method employed so far in gas-liquid chromatography) is also described.

In the theoretical considerations the molecular structure of the solutes and solvents is reflected by the constants of ionization and solvation equilibria and other simple parameters.

The theoretical considerations are illustrated by some experimental examples.

