

## **Marian KAMIŃSKI, Bogdan KANDYBOWICZ**

Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, 80-233 Gdańsk, ul. Narutowicza 11/12,  
e-mail: [mknkj@chem.pg.gda.pl](mailto:mknkj@chem.pg.gda.pl)

# **METODYKA KOREKTY PROGRAMU ELUCJI W KOLUMNOWEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ – HPLC/UPC**

*Użytkownik aparatu HPLC / UPC oczekuje zgodności przebiegu programu elucji na wlocie do kolumny z zaprogramowaną jego postacią. W praktyce - szczególnie z zastosowaniem modułów zasilania kolumny eluentem o programowanym składzie, wyposażonych w tzw. zawory proporcjonujące - mają miejsce odchylenia przebiegu programu elucji od wymaganej postaci. Ich amplituda mierzona w funkcji czasu, zależy od wartości opóźnienia transportowego (delay volume), od zastępczej objętości mieszania cieczy na drodze zawory proporcjonujące – wlot do kolumny (mixing volume) oraz od natężenia przepływu eluentu (flow rate) i jest względnie tym większa, im mniejsza jest skala rozdzielania oraz im większe wartości ww. objętości. W aparatach różnych producentów wartości te są zróżnicowane, co powoduje problemy z uzyskaniem odtwarzalności parametrów retencji uzyskiwanych z zastosowaniem tej samej kolumny i tych samych warunków rozdzielania, lecz różnych aparatów HPLC/UPC.*

*W pracy przedstawiono zastępczy model fizyczny gradientowego modułu zasilania eluentem kolumny HPLC/UPC, matematyczny opis modelu, zasady i sposoby doświadczalnego wyznaczenia parametrów modelu oraz wykazano teoretycznie i potwierdzono doświadczalnie, że zastosowanie skorygowanej postaci programu elucji umożliwia całkowitą eliminację opisanych problemów z odtwarzalnością parametrów retencji otrzymywanych w warunkach elucji gradientowej. Korekta polega przede wszystkim na uwzględnieniu opóźnienia transportowego, co ostatecznie zostało zaimplementowane do oprogramowania nowoczesnych aparatów UPC. Dodatkowo należy uwzględnić tzw. zastępczą objętość mieszania cieczy na drodze zawory proporcjonujące – kolumna i dokonać odpowiedniej modyfikacji postaci programu elucji, wprowadzonego do sterownika zaworami proporcjonującymi programatora zmian składu eluentu. Wykazano doświadczalnie, że w taki sposób zaprogramowana korekta programu elucji zapewnia uzyskiwanie powtarzalnych i odtwarzalnych wyników rozdzielania w warunkach elucji gradientowej, z zastosowaniem aparatów chromatograficznych o różnych parametrach w zakresie opóźnienia transportowego i objętości mieszania. Zwrócono też uwagę, że obowiązkiem producenta aparatu HPLC/UPC powinno być podawanie tych parametrów w specyfikacji technicznej aparatu chromatograficznego.*

## **WSTĘP**

Każdy użytkownik aparatu HPLC/UPC oczekuje, by program elucji na wlocie do kolumny chromatograficznej był zgodny z przebiegiem zaprogramowanym. Przy czym wydaje się, że program elucji wprowadzony do ste-

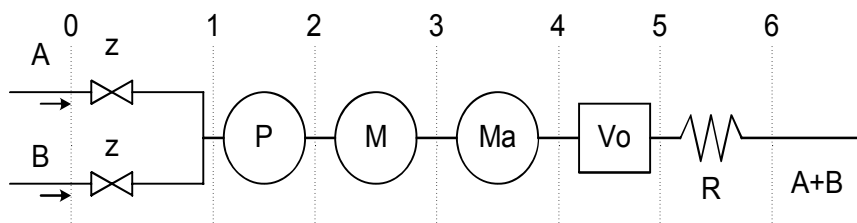
rownika powinien zostać dokładnie zrealizowany na wlocie do kolumny. To oczekiwanie jest z gruntu błędne w przypadku stosowania aparatury wyposażonej w tzw. niskociśnieniowy system programowania składu eluentu (system z zaworami proporcjonującymi umieszczonymi po stronie ssącej pompy aparatu). Program wprowadzony do sterownika jest wówczas realizowany właśnie na wlocie z zaworów proporcjonujących i w sposób istotny jest on inny od otrzymywanego na wlocie do kolumny [1-15]. Dodatkowo, aparaty różnych producentów charakteryzują się różnymi wartościami objętości mieszania cieczy w przestrzeni między wylotem z układu programowania składu cieczy i wlotem do kolumny chromatograficznej, co powoduje, że ten sam program elucji wprowadzony do sterownika programatora składu eluentu aparatów chromatograficznych różnych producentów prowadzi do otrzymywania na wlocie do kolumny HPLC różnych funkcji przebiegu programu elucji i różnych w konsekwencji wartości czasu retencji tych samych substancji rozdzielanych z zastosowaniem tej samej kolumny.

Można ogólnie stwierdzić, że w gradientowej aparaturze HPLC z zaworami proporcjonującymi przebieg programu elucji na wlocie do kolumny chromatograficznej często odbiega od programu oczekiwanego [1-16]. Jeśli synchronizacja cyklicznej pracy pompy i zaworów proporcjonujących jest zapewniona [1, 4], to rozbieżność między zaprogramowanym i zrealizowanym programem elucji jest spowodowana przez opóźnienie transportowe oraz – dodatkowo - mieszanie cieczy w elementach aparatu [1-6]. W konsekwencji, otrzymuje się istotne odchylenia wartości czasu retencji pików rozdzielanych substancji od wartości przewidywanych, np. obliczonych z zależności teoretycznych [1, 6], lub wyznaczonych przez oprogramowanie optymalizujące program elucji [4, 5]. Szczególnie ważne znaczenie ma w związku z tym problem uzyskiwania dobrej odtwarzalności wyników rozdzielania, z zastosowaniem aparatów różnych producentów i konkretnej procedury analitycznej [1-8]. Wynika to stąd, że aparaty HPLC/UPC różnych producentów charakteryzują się z reguły różnymi wartościami opóźnienia transportowego oraz objętości mieszania na drodze zawory proporcjonujące – wlot do kolumny. Im mniejsze są wymiary stosowanej kolumny i względnie większe wartości ww. parametrów aparatu, tym omawiane odchylenia są względnie większe. W praktyce mogą dochodzić do kilku minut w zakresie wartości czasu retencji rozdzielanych substancji [4-6].

Wcześniejsze studia i badania teoretyczne, wykazały, że można zastosować takie procedury sterowania modułem wykonawczym systemu programowania składu eluentu, że następuje eliminacja odchylenia programu elucji otrzymanego na wlocie do kolumny od żądanej postaci programu [15-17]. Korekta powinna zapewnić nie tylko powtarzalność programu elucji, która zależy głównie od powtarzalności działania modułu programowania składu cieczy, ale także odtwarzalność wartości czasu retencji i innych parametrów rozdzielania. Wytwarzanie na wlocie do kolumny programu elucji, dokładnie o żądanej postaci, powinno zapewnić efektywne stosowanie istniejących narzędzi doboru optymalnego programu elucji oraz możliwość weryfikacji skuteczności tych narzędzi.

## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Przeprowadzono analizę teoretyczną kilku wariantów, przedstawionego na rys. 1 w formie uogólnionej - aktualnego dla gradientowego aparatu chromatograficznego z zaworami proporcjonującymi, umieszczonymi po stronie niskiego ciśnienia pompy - zastępczego modelu mieszania cieczy w elementach gradientowego aparatu chromatograficznego.



Rysunek 1. Zastępczy model przyjęty dla matematycznego opisu zmian składu eluentu w układzie zasilania eluentem kolumny chromatograficznej. Oznaczenia: A, B – składniki eluentu, Z – zawory proporcjonujące, P – pompa, M – mieszalnik o objętości  $V$ , Ma – mieszalnik o objętości  $V_a$  zastępujący mieszanie cieczy w aparacie poza mieszalnikiem M,  $V_o$  – pojemność o łukowym profilu przepływu zastępująca opóźnienie transportowe, R – opór powodujący podwyższone ciśnienie pracy pompy, 1-6 – przekroje rozpatrywane w pełnym opisie modelu.

Model na rys. 1 może zostać też zastosowany do opisu mieszania cieczy w gradientowym aparacie chromatograficznym z zaworami proporcjonującymi, zarówno, umieszczonymi po stronie wysokiego, jak i niskiego ciśnienia, a także dla aparatu, w którym programowanie składu cieczy odbywa się na drodze sterowania kilkoma równocześnie pracującymi pompami (tzw. wysokociśnieniowy system programowania składu cieczy). Jednak, ścisły opis matematyczny uwzględniający wszystkie elementy modelu na rys. 1 jest stosunkowo skomplikowany.

Do analizy teoretycznej problemu, zastosowano uproszczony model, który pozwala łatwo otrzymać ścisły opis teoretyczny [15-17]. Otrzymane wyniki okazały się, jednocześnie, w zadowalającym stopniu przydatne praktycznie. Model ten składa się z połączonych wzajemnie szeregowo elementów: "Z" (programator programu elucji, generujący w przekroju „1” określoną funkcję programu elucji), mieszalników „M i Ma”, które zastąpiono jednym mieszalnikiem „M” o objętości  $V_z$  oraz elementu  $V_o$ , zastępującego opóźnienie transportowe (które zawsze ma miejsce na drodze: programator programu elucji – kolumna chromatograficzna). Model składa się, więc, tylko z jednego mieszalnika o objętości  $V_z = V + V_a$ , zastępującego mieszanie cieczy w przestrzeni między elementami wykonawczymi programatora składu eluentu oraz z elementu ( $V_o$ ), zastępującego opóźnienie transportowe między wylotem z programatora składu eluentu i wlotem do kolumny chromatograficznej.

Analiza teoretyczna takiego modelu, w przypadku liniowego programu elucji, żądanego na wlocie do kolumny chromatograficznej (w przekroju „5”), prowadzi do następujących wniosków (czytelnik może samodzielnie wyprowadzić odpowiednie zależności, jeżeli ma chęć „poćwiczyć” układanie i rozwiązywanie dość prostych równań różniczkowych, mających praktyczne zastosowanie):

- Gdy programator składu eluentu realizuje w przekroju „1” liniową funkcję programu elucji (1) w postaci:

$$X = at + b \quad (1)$$

- to w stanie ustalonym ( $t \gg TA = Vz/w$ ), otrzymamy na wylocie z mieszalnika  $Vz$  (w przekroju „4”) następujący przebieg (2) funkcji programu elucji :

$$X_1(t) = a \cdot t + b + a \cdot TA \quad (2)$$

Analiza równań, prowadzących do otrzymania zależności (2) w okresie, zarówno stanu ustalonego, jak i w stanie nieustalonym, sugeruje możliwość takiego przekształcenia programu sterowania elementami wykonawczymi urządzenia gradientowego (zaworami proporcjonującymi, lub równolegle pracującymi pompami), aby na wlocie do kolumny otrzymywać pożądany program elucji, zgodny z równaniem (1).

W przypadku liniowego programu elucji, przebieg skorygowany programu przedstawia się następująco:

$$X_k(t) = (at + b) + TA \cdot a + \delta(t) \cdot TA \cdot [b - X_1(0)] \quad (3)$$

gdzie:

$w$  – objętościowe natężenie przepływu eluentu w kolumnie;

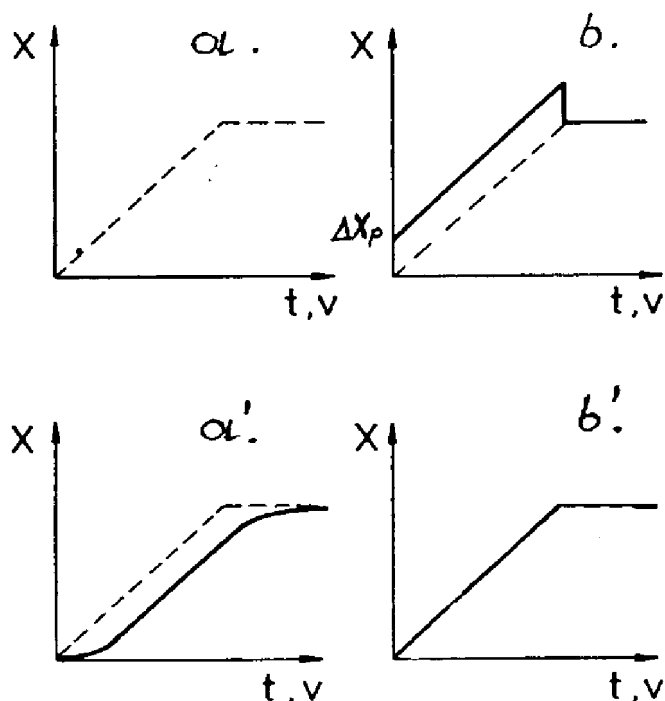
$\delta(t)$  – delta Diraca;

$X_1(0)$  – początkowa zawartość składnika B w mieszalniku  $Vz$  w czasie  $t=0$  (w praktyce wartość  $b$ ), a więc ostatni składnik zależności (3) wynosi zero.

W konsekwencji, gdy do programatora składu eluentu, w przypadku żądania otrzymywania liniowego programu elucji w kolumnie, zostanie wprowadzona skorygowana funkcja programu o postaci zależności (3), i, gdy jednocześnie zostanie skorygowany moment wprowadzenia próbki do kolumny o wartość opóźnienia transportowego ( $t_0 = V_0/w$ ) - to na wlocie do kolumny chromatograficznej (w przekroju „5”) powinna zostać otrzymana dokładnie funkcja programu elucji w postaci równania (1).

Rysunek 2 ilustruje wyniki studiów teoretycznych dla oczekiwania liniowego przebiegu funkcji programu elucji w kolumnie (przy czym, wartość  $\Delta X_p$  na rys. 2 jest tożsama z  $aTA$  w równaniach (1) do (3)). Podobne wnioski otrzymano także dla wybranych, nieliniowych postaci programu elucji. W konsekwencji, w myśl streszczonych tu wyników rozważań teoretycznych,

program elucji, otrzymywany na wlocie do kolumny chromatograficznej, może być dokładnym odwzorowaniem postaci funkcji, która jest oczekiwana.



Rysunek 2. Schematyczne wykresy, związane ze zniekształceniem i korektą liniowego programu elucji, gdy aparat chromatograficzny można modelować obiektem inercyjnym I rzędu (idealnym mieszalnikiem) o objętości  $V_z = V + V_a$ . Opóźnienie transportowe pominięto. Program pożądaný:  $X = at + b$ ; Program skorygowany:  $X = at + b + (a \cdot TA)$ ;  $TA = V_z/w$ .

a – pożądaný przebieg programu elucji na wlocie do kolumny chromatograficznej,  
 a' – rzeczywisty przebieg programu elucji (linia ciągła), otrzymany na wlocie do kolumny chromatograficznej, gdy programator wykonuje program naszkicowany linią kreskową;  
 b – programator wykonuje program skorygowany, zgodny z linią ciągłą;  
 b' – przebieg programu elucji, zrealizowany na wlocie do kolumny w wyniku wprowadzenia do programatora programu skorygowanego „b”.

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Zastosowano dwa różne komercyjne analityczne gradientowe chromatografy cieczowe z zaworami proporcjonującymi po stronie ssącej pompy, charakteryzujące się zróżnicowanymi wartościami parametrów dynamiki mieszania cieczy w przestrzeni przed wlotem do kolumny chromatograficznej. W tabeli 1 podano dla obu aparatów wartości parametrów dynamiki mieszania cieczy oraz przebiegi funkcji programu elucji, wprowadzone do programatora. Zastępczą objętość mieszania  $V_z$  w elementach aparatu na

drodze od zaworów proporcjonujących do wlotu do kolumny chromatograficznej oraz wynikającą z niej zastępczą stałą czasową TA ( $TA = Vz/w$ ) wyznaczono metodą „0.632”.

Wpływ korekty programu elucji na wartość parametrów retencji substancji rozdzielanych w warunkach elucji gradientowej badano dla wartości natężenia przepływu  $w = 1,5 \text{ cm}^3/\text{min}$ , z zastosowaniem typowej kolumny Lichrospher RP 18  $5 \mu\text{m}$  o wymiarach  $125 \times 4 \text{ mm}$  i  $250 \times 4 \text{ mm}$ , rozdzielając acetanilid i węglowodory aromatyczne. Zastosowano, często wykorzystywaną w praktyce, wartość gradientu stężenia ok.  $4,5\%/ \text{min}$  w zakresie od 4% do 90% metanolu w wodzie. Analizowano też wpływ opóźnienia transportowego.

Dzięki obecności acetonu w cieczy A (0,025% v/v) i cieczy B (0,1% v/v) otrzymano jednocześnie chromatogramy oraz orientacyjne przebiegi zmian udziału składnika B w eluencie na wylocie z kolumny.

## WYNIKI I WNIOSKI

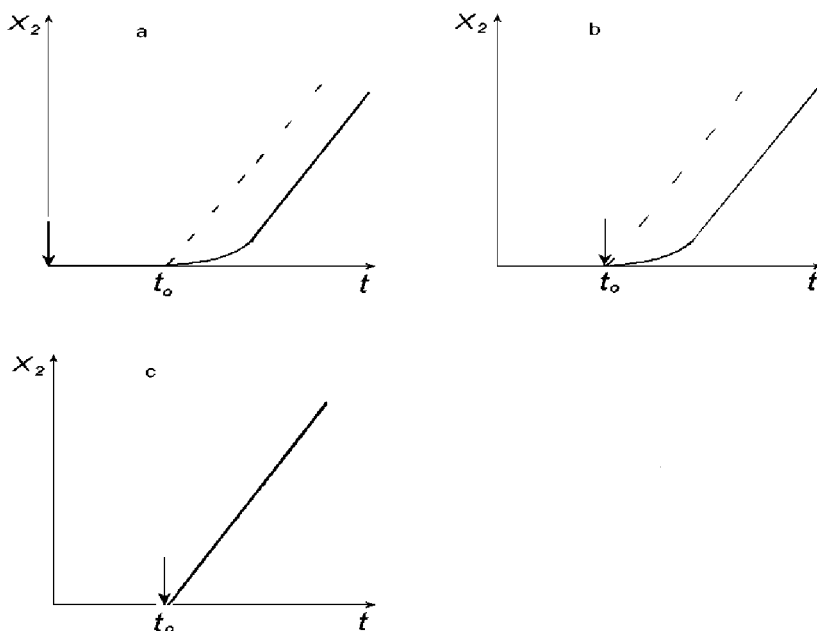
W badaniach zastosowane dwa różne gradientowe aparaty chromatograficzne, scharakteryzowane w tab. 1 pod względem wartości parametrów dynamiki mieszania cieczy i odpowiednich skorygowanych postaci programu elucji. Rozpatrywano trzy warianty korekty programu elucji i momentu wprowadzenia próbki do kolumny, zilustrowane na rysunku 3:

- Próbkę dozowano ignorując istnienie zarówno opóźnienia transportowego, jak i mieszania cieczy przed wlotem do dozownika (tak jak, ma to miejsce dotychczas – rysunek 3a),
- Próbkę dozowano z opóźnieniem w stosunku momentu uruchomienia programatora gradientu elucji; wielkość opóźnienia, tak dobrana, by próbka „trafiła” w kolumnie na początek realizacji programu elucji, jednak nie korygowano programu elucji ze względu na mieszanie cieczy przed wlotem do kolumny (rysunek 3b),
- Uwzględniono obydwa efekty powodujące odchylenie programu elucji odżądanego przebiegu, tj. dozowano z uwzględnieniem opóźnienia transportowego oraz skorygowano program elucji (rysunek 3c).

**Tabela 1.** Parametry dynamiki mieszania cieczy w aparatach wykorzystanych w doświadczeniach, których wyniki przedstawiono na rysunku 4-6 i w tabeli 2 oraz 3

Lp.	Nazwa aparatu	Opóźnienie transportowe	Zastępcza objętość mieszania cieczy	Postać skorygowanego programu elucji
		$[\text{cm}^3] / [\text{min}]$	$[\text{cm}^3] / [\text{min}]$	$(a * t + aTA)$
1	LaChrom (Ap.1)	0.6 / 0.4	0.35 / 0.23	$4.3 \%/\text{min} * t + 1\%$
2	Lichrograph (Ap.2)	2.4 / 1.6	1.05 / 0.7	$4.3 \%/\text{min} * t + 3\%$

$Vz$  wyznaczano metodą „0,632” [15-17].



Rysunek 3. Szkicowe przedstawienie przebiegów programu elucji ( $X_2$ ) na wlocie do kolumny chromatograficznej w relacji do momentu dozowania próbki:

- a) przy braku korekty programu elucji i nieuwzględnieniu opóźnienia transportowego
  - b) po uwzględnieniu opóźnienia transportowego, ale bez korekty programu elucji,
  - c) po uwzględnieniu opóźnienia transportowego oraz zastosowaniu korekty programu elucji.
- Linia kreskowa - pożądany przebieg programu elucji, linia ciągła - zrealizowany przebieg programu elucji, strzałką zaznaczono moment dozowania próbki.  $t_0$  – opóźnienie transportowe.

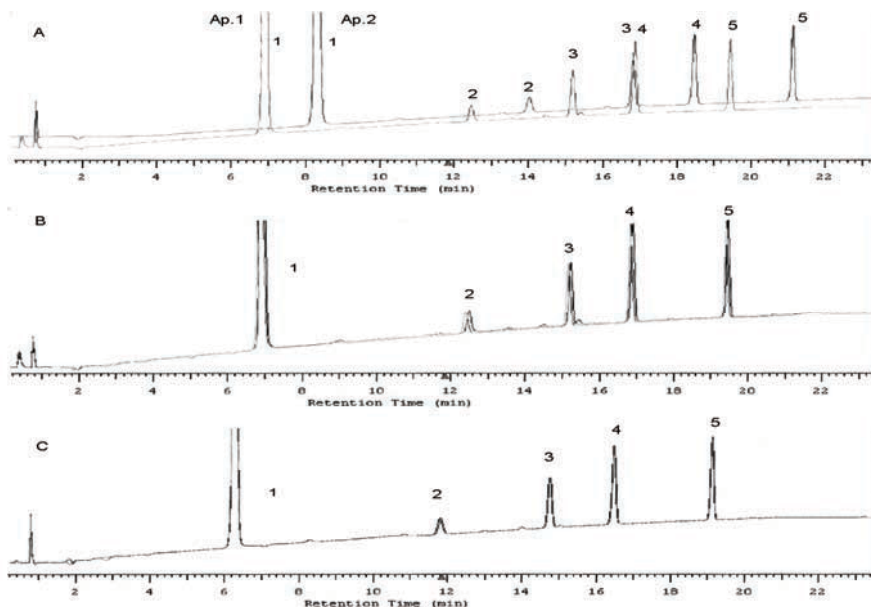
Na rysunku 3 linią kreskową zaznaczono pożądany przebieg programu elucji, linią ciągłą zrealizowany przebieg programu elucji, zaś strzałką moment dozowania próbki. Jak widać, przy uwzględnieniu tylko korekty opóźnienia transportowego (rysunek 3b), następuje przesunięcie programu elucji w kolumnie wzdłuż osi czasu względem momentu dozowania próbki. W przypadku całkowitej korekty (rysunek 3c) następuje także zmiana charakteru funkcji opisującej przebieg funkcji programu elucji zrealizowany na wlocie do kolumny i dostosowanie jej do pożądanego (w tym przypadku – liniowego) przebiegu. Ma miejsce usunięcie początkowego zagięcia krzywej programu elucji oraz eliminacja dodatkowego przesunięcia tej linii spowodowanego mieszaniem cieczy przed wlotem do kolumny.

Różnice przebiegu programu elucji w kolumnie przekładają się na różnice czasu i objętości retencji rozdzielanych substancji. Różnice objętości retencji są względnie tym większe, im większe jest opóźnienie transportowe, im większa jest wartość zastępczej stałej czasowej  $TA$  oraz im mniejsza jest

objętość wypełnienia kolumny. Dodatkowo, przesunięcie czasu retencji jest tym większe, im mniejsze jest natężenie przepływu eluentu ( $w$ ).

Potwierdzają to przedstawione na rysunku 4 przykłady chromatogramów uzyskanych dla dwóch aparatów w warunkach elucji gradientowej oraz zawarte w tabeli 1 wartości czasu retencji i zawarte w tabeli 3 wartości powierzchni pików, otrzymane:

- przy braku korekty programu elucji i nieuwzględnieniu opóźnienia transportowego, rysunek 3a, tabele 2 i 3 kolumna A;
- po uwzględnieniu opóźnienia transportowego, ale bez korekty programu elucji, rysunek 3b, tabele 2 i 3 kolumna B;
- po uwzględnieniu opóźnienia transportowego oraz zastosowaniu korekty programu elucji, rysunek 3c, tabele 2 i 3 kolumna C.



Rysunek 4. Zestawienie 3-6 nałożonych chromatogramów otrzymanych w warunkach elucji gradientowej z zastosowaniem obu aparatów chromatograficznych (Ap. 1 i Ap. 2):

- przy braku korekty programu elucji i nieuwzględnieniu opóźnienia transportowego,
  - po uwzględnieniu opóźnienia transportowego, ale bez korekty programu elucji,
  - po uwzględnieniu opóźnienia transportowego oraz zastosowaniu korekty programu elucji.
- Pożądaný program elucji  $X = 4,3[\%/min.] * t + 4\%$  (w zakresie 4% do 90%), ciecz A – woda, ciecz B – metanol + 0,1% acetonu,  $w=1,5 \text{ cm}^3/min$ , kolumna – Lichrospher RP 18  $5 \mu\text{m}$ ,  $125 \times 4 \text{ mm}$ ,  $t = 30^\circ\text{C}$ . Ap. 1 – LaChrom (Merck-Hitachi), Ap. 2 – Lichrograph (Merck-Hitachi). Rozdzielane substancje: 1 - acetonilid, 2 – benzen, 3 – toluen, 4 – o-ksylen, 5 – n-butylobenzen.



**Tabela 2.** Zestawienie średnich wartości czasu retencji bez i po zastosowaniu korekty programu elucji

- A) przy braku korekty programu elucji i nie uwzględnieniu opóźnienia transportowego,
- B) po uwzględnieniu opóźnienia transportowego, ale bez korekty programu elucji,
- C) po uwzględnieniu opóźnienia transportowego oraz zastosowaniu korekty programu elucji.

Aparat: Substancja:	A		B		C	
	Ap. 1 [min]	Ap.2 [min]	Ap. 1 [min]	Ap.2 [min]	Ap.1 [min]	Ap.2 [min]
Acetanilid	6,82	8,21	6,88	6,85	6,09	6,08
Benzen	12,5	14,06	12,46	12,38	11,65	11,66
Toluen	16,62	16,81	15,20	15,11	14,64	14,65
o-ksylen	16,91	18,47	16,90	16,84	16,34	16,35
n-butylo-benzen	19,51	21,37	19,45	19,41	18,99	19,01

Na rys. 5 porównano chromatogramy otrzymane bez zastosowania korekty programu elucji i gdy w korekcie uwzględniono tylko jeden z efektów, powodujących odchylenie programu na wlocie do kolumny od zaprogramowanej postaci.

Na podstawie chromatogramów na rys. 4 i 5 oraz wartości czasu retencji, zamieszczonych w tabeli 2, widać, że czas retencji substancji rozdzielanych w warunkach elucji gradientowej różni się znacznie bez i z zastosowaniem korekty programu elucji. Widać też, że największe znaczenie przy przenoszeniu parametrów retencji między aparatami o różnych wartościach dynamiki mieszania, ma uwzględnienie opóźnienia transportowego, a w następnej kolejności korekta programu elucji uwzględniająca mieszanie cieczy. W przypadku gradientowego aparatu chromatograficznego z kolumnami mikropakowanymi sytuacja może być odwrotna.

Powyższe wyniki dobitnie też dokumentują, że bez zastosowania odpowiedniej korekty programu elucji nie można oczekiwać zadowalającej odtwierzalności parametrów retencji między aparatami o różnych wartościach parametrów dynamiki mieszania cieczy przed wlotem do kolumny chromatograficznej, szczególnie gdy znaczne są różnice opóźnienia transportowego.

Widać też, że stosowanie w praktyce narzędzi programowych przewidujących parametry retencji na podstawie przebiegu funkcji programu elucji, wymiarów kolumny i natężenia przepływu eluentu musi być obarczone określonym błędem, gdy nie uwzględnia się wpływu mieszania cieczy w przestrzeni przed wlotem do kolumny chromatograficznej, a zwłaszcza wpływu opóźnienia transportowego.

Można dodać, że wtedy gdy eluent A (tzn. eluent, od którego rozpoczyna się program elucji) posiada znikomą siłę elucyjną, wówczas korygowanie momentu dozowania próbki o wartość opóźnienia transportowego nie jest konieczne. Dopóki eluent ma zerową siłę elucyjną, to znaczy do czasu, gdy nie zacznie wpływać do kolumny również składnik B eluentu, rozdziela-

ne substancje nie podlegają elucji. Wtedy wystarczy zastosować tylko korektę uwzględniającą mieszanie cieczy.

Na podstawie danych w tabeli 3 widać, natomiast, że stosowanie korekty programu elucji ma przede wszystkim znaczenie dla otrzymywania oczekiwanych wartości czasu (objętości) retencji i nie ma dużego wpływu na odtwarzalność oraz powtarzalność powierzchni pików i, w konsekwencji, na możliwość przenoszenia parametrów kalibracyjnych między różnymi aparatami, gdy czułości detektora i warunki dozowania i chromatografowania są takie same. Jedynie, gdy zastosowanie korekty programu elucji znacznie zmieni czas retencji, to można spodziewać się różnic wartości powierzchni pików i w konsekwencji wartości współczynników kalibracyjnych, szczególnie dla substancji o niskich i wysokich wartościach czasu retencji.

**Tabela 3.** Zestawienie średnich wartości powierzchni pików bez i po zastosowaniu korekty programu elucji uwzględniającej wpływ zastępczej objętości mieszania cieczy przed wlotem do kolumny oraz bez i po uwzględnieniu wpływu opóźnienia transportowego na przebieg programu elucji (prowadzących do otrzymywania odpowiednich chromatogramów przedstawionych na rysunku 4)

- A) brak korekty programu elucji i nieuwzględnienie opóźnienia transportowego;
- B) po uwzględnieniu opóźnienia transportowego, ale bez korekty programu elucji ze względu na dynamikę mieszania cieczy przed wlotem do kolumny;
- C) po uwzględnieniu opóźnienia transportowego oraz zastosowaniu korekty programu elucji eliminującej mieszanie cieczy.

Substancja / Aparat	A		B		C	
	Ap. 1	Ap.2	Ap. 1	Ap.2	Ap.1	Ap.2
	[mVs]	[mVs]	[mVs]	[mVs]	[mVs]	[mVs]
Acetanilid	10679	10836 (157) <sup>*)</sup>	10634	10710 (76)	10640	10700 (60)
Benzen	266	271 (5)	264	267 (3)	263	265 (2)
Toluen	631	639 (8)	651	658 (7)	662	668 (6)
o-ksylen	911	924 (13)	916	925 (9)	922	926 (4)
n-butylobenzen	776	796 (20)	779	791 (12)	783	788 (5)

<sup>\*)</sup> – w nawiasach podano różnice otrzymanych wartości średnich powierzchni pików.

Zbadano też wpływ niedokładnego wyznaczenia zastępczej objętości mieszania  $V_z$  zastosowanej do określenia skorygowanego programu elucji na uzyskiwane wartości czasu retencji. Na rysunku 5 przedstawiono chromatogramy otrzymane dla trzech programów elucji, różniących się wartością zastępczej objętości mieszania przyjętą do obliczenia korekty programu elucji, a co za tym idzie, różniących się parametrem „b” ( $b+aTA$ ) w równaniu prostej opisującej program elucji wprowadzany do programatora.

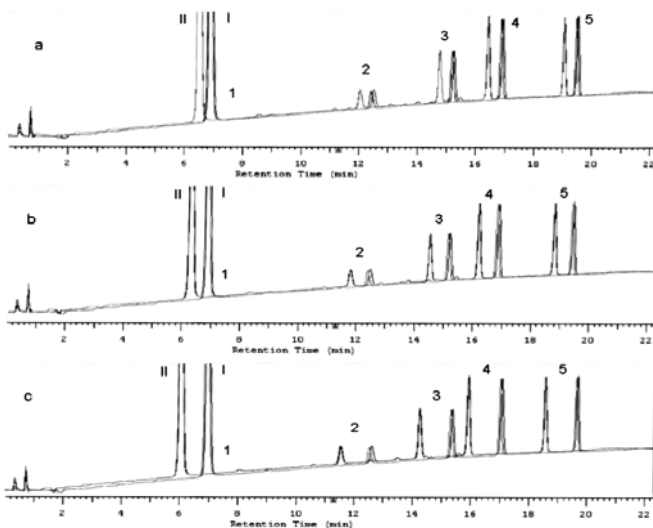
**Tabela 4.** Zestawienie wartości czasu retencji, zastępczych objętości mieszania, stałych czasowych oraz odpowiadające im równania skorygowanego programu elucji, wykorzystane do otrzymania chromatogramów na rysunku 5 ( $V_0 = 3$  ml,  $V_z = 1.4$  ml)

Chromatogram na rysunku 5	A	B	C
$V_0$ [cm <sup>3</sup> ] / $t_0$ [min]	3,0 / 2,0	3,0 / 2,0	3,0 / 2,0
$V_z$ [cm <sup>3</sup> ] / TA [min]	1,05 / 0,7	1,40 / 0,93	1,74 / 1,16
Równanie skorygowanej funkcji programu elucji $4,3[\%/min]*t + 4\%$ [v/v]	$4,3[\%/min]*t+6[\%]$	$4,3[\%/min]*t+7[\%]$	$4,3[\%/min]*t+8[\%]$
Substancja	Czas retencji [min]		
1. Acetaniłid	6,14	5,99	5,81
2. Benzen	11,71	11,56	11,33
3. Toluen	14,6	14,4	14,2
4. o-ksylen	16,3	16,1	15,8
5. n-butylobenzen	18,9	18,7	18,4

W tabeli 4 zestawiono wartości zastępczej objętości mieszania przyjęte do korekty, odpowiadające im wartości zastępczej stałej czasowej, postaci skorygowanych równań programu elucji dla odpowiednich chromatogramów oznaczonych na rysunku 6 jako a, b, c oraz podano uzyskane czasy retencji poszczególnych rozdzielanych substancji.

Jak można zauważyć, nawet przy dość dużej zmianie zastępczej objętości mieszania, o 0,4 cm<sup>3</sup>, wykorzystywanej dla korygowania programu elucji, zmiany uzyskiwanych wartości czasu retencji są względnie nieduże (na poziomie ok. 0,2 min). Oznacza to, że niewielkie błędy w wyznaczaniu zastępczej objętości mieszania nie powinny poważnie pogorszyć odtwarzalności czasu retencji.

Badania wykazały niewielki, praktycznie pomijalny, wpływ sposobu i stopnia korekty programu elucji na powtarzalność: czasu retencji oraz powierzchni pików, - dla tego samego aparatu, kolumny i tych samych warunków rozdzielania. Wydaje się to oczywiste, także intuicyjnie, ponieważ charakter funkcji programu elucji powinien mieć drugorzędny wpływ na powtarzalność otrzymywanych wartości czasu retencji oraz powierzchni pików chromatograficznych. O powtarzalności uzyskiwania ww. parametrów w warunkach kolumnowej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem programowania składu cieczy decyduje przede wszystkim powtarzalność wytwarzania przez aparat określonej wartości składu eluentu czy powtarzalność realizacji określonej postaci programu elucji, w tym dokładność i stabilność pracy pompy.

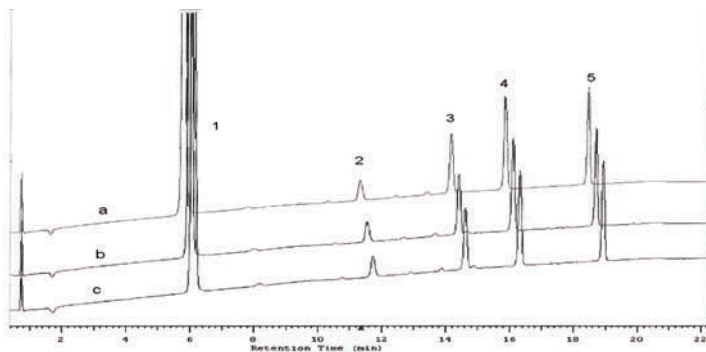


Rysunek 5. Ilustracja wpływu rodzaju korekty programu elucji na czas retencji dla aparatu Lichrograph. Symbolem „I” oznaczono chromatogramy otrzymane przy braku korekty programu elucji, a symbolem „II”, odpowiednio, chromatogramy:

- a) gdy skorygowano tylko wpływ mieszania cieczy przed wlotem do kolumny,
- b) gdy skorygowano tylko wpływ opóźnienia transportowego,
- c) gdy skorygowano oba efekty jednocześnie.

Pożądaný program elucji  $X = 5[\%/min.] * t$ , ciecz A - woda, ciecz B – metanol + 0,1% acetonu,  $w = 1,5 \text{ cm}^3/min$ , kolumna – Lichrospher RP 18  $5 \mu\text{m}$ ,  $125 \times 4 \text{ mm}$ ,  $t = 30^\circ\text{C}$ .

Substancje: 1 – acetanilid, 2 – benzen, 3 – toluen, 4 – o-ksylen, 5 – n-butylobenzen



Rysunek 6. Ilustracja wartości wpływu zastępczej objętości mieszania przyjętej do obliczenia korekty programu elucji na czas retencji dla aparatu Lichrograph.

Pożądaný program elucji  $X = 4,3[\%/min.] * t + 4\%$  (w zakresie 4% do 90%), opóźnienie transportowe  $V_0 = 3 \text{ cm}^3$ ,  $t_0 = 2 \text{ min}$ , ciecz A - woda, ciecz B – metanol + 0,1% acetonu,  $w = 1,5 \text{ cm}^3/min$ , kolumna – Lichrospher RP 18  $5 \mu\text{m}$ ,  $125 \times 4 \text{ mm}$ ,  $t = 30^\circ\text{C}$ .

Przyjęte wartości zastępczych objętości mieszania, stałych czasowych oraz odpowiadające im równania skorygowanego programu elucji:

a –  $V_z = 1,05 \text{ cm}^3$ ,  $TA_z = 0,7 \text{ min}$ ,  $X = 4,3[\%/min.] * t + 6[\%]$ ,

b –  $V_z = 1,40 \text{ cm}^3$ ,  $TA_z = 0,93 \text{ min}$ ,  $X = 4,3[\%/min.] * t + 7[\%]$ ,

c –  $V_z = 1,74 \text{ cm}^3$ ,  $TA_z = 1,16 \text{ min}$ ,  $X = 4,3[\%/min.] * t + 8[\%]$ ,

Rozdzielane substancje: 1 – acetanilid, 2 – benzen, 3 – toluen, 4 – o-ksylen, 5 – n-butylobenzen.

Zupełnie inaczej ma się sprawa z odtwarzalnością czasu retencji z wykorzystaniem różnych aparatów HPLC. Wykazano, że z zastosowaniem tej samej kolumny i programu elucji, parametry retencji mogą znacznie różnić się wartości czasu (objętości) retencji, gdy nie zostanie zastosowana korekta programu elucji, a wartości opóźnienia transportowego i zastępcze objętości mieszania dwóch aparatów są różne.

## WNIOSKI KOŃCOWE

Studia i badania wykonane w ramach tej pracy wykazały, że istnieje prosty sposób postępowania, zapewniający otrzymanie na wlocie do kolumny chromatograficznej, z dobrą dokładnością, takiej postaci programu elucji, jakiego żądamy. W tej pracy wykazano to dla liniowych programów elucji. Teoretyczne zasady postępowania zostały przedstawione dla liniowych i nieliniowych programów elucji w pracy [15]. Dla liniowego programu elucji zasady teoretyczne i sposób postępowania opisują i ilustrują zależności (1) do (3) oraz rys. 1 do 3.

- Należy wprowadzić skorygowany program elucji do sterownika programatora eluentu oraz uruchomić dozownik po upływie czasu określonego na podstawie doświadczalnie wyznaczonej wartości opóźnienia transportowego oraz aktualnie stosowanego natężenia przepływu eluentu.
- Postępowanie takie zapewnia otrzymywanie, zarówno powtarzalnych rezultatów rozdzielania, jak i odtwarzalność wyników, w przypadku stosowania gradientowych aparatów chromatograficznych o różnych wartościach parametrów dynamiki mieszania cieczy [15-17] (różne wartości opóźnienia transportowego ( $V_0$ ) i różne wartości zastępczej objętości mieszania cieczy w przestrzeni między wylotem z programatora i wlotem do kolumny chromatograficznej ( $V_z$ ) dla różnych gradientowych aparatów chromatograficznych).
- Stosowanie w praktyce opisanej tu metody korekty programu elucji ma znaczenie dla uzyskiwania zgodności parametrów retencji z wartościami przewidywanymi teoretycznie oraz dla weryfikacji poprawności narzędzi predykcji optymalnego przebiegu programu elucji.
- Korekta programu elucji powinna być przede wszystkim stosowana w przypadku gradientowych chromatografów ciekowych wyposażonych w tzw. niskociśnieniowe systemy programowania składu eluentu (układy z zaworami proporcjonującymi po stronie ssącej pompy) oraz przy wykorzystywaniu z zastosowaniem elucji gradientowej mikrokolumn pakowanych i kapilarnych (gdy zastępcze objętości mieszania i wartości opóźnienia transportowego są względnie wysokie).
- Użytkownik aparatu chromatograficznego może dość łatwo wyznaczyć doświadczalnie wartości parametrów opisujących dynamikę mieszania cieczy w gradientowym aparacie chromatograficznym między wylotem z programatora a wlotem do kolumny chromatograficznej [16, 17], jednak, wartości tych parametrów powinny zostać wyznaczone i podawane przez producenta aparatu chromatograficznego.

## ZNACZENIE SYMBOLI

- a, b - współczynniki w liniowym programie elucji gradientowej ( $X = AT + b$ ),  
t - czas, wyrażony w [s] albo [min],  
 $t_0, T_0$  - opóźnienie transportowe, wyrażone w [s], albo [min],  
TA - zastępcza stała czasowa mieszalnika i aparatu, modelowana pojedynczym elementem inercyjnym I rzędu, [s] albo [min],  
 $V_0$  - opóźnienie transportowe wyrażone w [ $\text{cm}^3$ ],  
 $V_Z$  - zastępcza objętość mieszania w mieszalniku i aparacie chromatograficznym modelowanym elementem inercyjnym I rzędu, wyrażona w [ $\text{cm}^3$ ],  
w - objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej przez kolumnę chromatograficzną, wyrażone w [ $\text{cm}^3/\text{min}$ ],  
 $X, X_1$  - stężenie objętościowe składnia B, C, ... w eluencie, wyrażone jako udział objętościowy [v/v] (ułamek objętościowy), albo [% v/v] (procent objętościowy).

## LITERATURA

1. Snyder L.R., Kirkland J.J., Glajch J.L., "Practical HPLC Method Development", Wiley, New York, NY, 1998.
2. Dolan J.W., LC-GC 5 (1987) 950.
3. Dolan J.W., LC-GC- 6 (1988) 388.
4. Snyder L.R., Dolan J.W., LC-GC 8 (7) (1990) 524.
5. Quarry M.A., Grob R.L., Snyder L.R., J. Chromatogr. 285 (1984) 1.
6. Jandera P., Churacek J., "Gradient Elution in Column Liquid Chromatography", Elsevier, Amsterdam, 1985.
7. Dolan J.W., LC-GC INT. 8(1) (1995) 1.
8. Dolan J.W., LC-GC INT, 8(7) (1995) 1.
9. Dolan J.W., LC-GC INT, 9(1) (1996) 1.
10. Dolan J.W., LC-GC INT, 9(5) (1996) 1.
11. Engelhardt H., Arangio M., Lobert T., LC-GC-INT. 10(12) (1997) 803.
12. Engelhardt H., Ah G. r, Chromatographia, 14 (1981) 227.
13. Sjödaahl J., Lundin H., Eriksson R., Ericson J., Chromatographia 16 (1982) 325.
14. Dolan J.W., Snyder L.R., "Troubleshooting LC Systems", Humana Press, Clifton, New York, 1989.
15. Kamiński M., Kandybowicz B. and Kowalczyk J.S., J. Chromatogr., 292 (1984) 85.
16. Kamiński M., Kandybowicz B., Szukalski J., Chem. Anal. (Warsaw) 38 (1993) 237.
17. Kamiński M., Kandybowicz B., Proceedings of 11<sup>th</sup> International Symposium on Column Liquid Chromatography, Amsterdam, 1987.