

**Marian KAMIŃSKI**

Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, 80-233 Gdańsk, ul. Narutowicza 11/12,  
e-mail: [mknki@chem.pg.gda.pl](mailto:mknki@chem.pg.gda.pl); tel: 601-40-18-24, (058) 347-17-29

## **PREPARATYWNA I PROCESOWA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA**

### **WPROWADZENIE**

Niniejszy artykuł monograficzny został pomyślany jako swego rodzaju podręcznik i przewodnik optymalnego stosowania kolumnowej elucyjnej chromatografii cieczowej w skali preparatywnej lub procesowej do rozdzielania mieszanin substancji, lub grup substancji. Może też być pomocny w pracach nad optymalizacją warunków preparatywnego stosowania kolumnowej elucyjnej chromatografii gazowej oraz z eluentem nadkrytycznym, ponieważ wiele ogólnych reguł jest wspólnych dla optymalnego stosowania wszystkich technik chromatografii w skali preparatywnej. Oczywiście, chromatografia gazowa, lub z eluentem nadkrytycznym, tak w skali analitycznej, jak i preparatywnej posiada wiele specyficznych cech i właściwości. Stąd tylko niektóre z opisanych dalej zasad optymalnego stosowania preparatywnej i procesowej chromatografii cieczowej jest wspólnych dla innych technik preparatywnego stosowania chromatografii.

Chromatografia w sprzężeniu z detekcją to niezastąpione techniki analityczne o ogromnym i ciągle rosnącym zakresie zastosowań. Przede wszystkim, jednak, jest to ważna grupa technik rozdzielania, które mogą służyć do otrzymywania użytecznych ilości czystych substancji ze złożonych mieszanin. Istnieją takie problemy separacyjne, których rozwiązanie jest do tychczas możliwe tylko z wykorzystaniem chromatografii. Wówczas chromatografia jest niezastąpiona. Istnieje wiele innych problemów rozdzielczych, które można „rozwiązać” innymi technikami rozdzielania, takimi jak, ekstrakcja przeciwprądowa, metody strącania, membranowe i inne oraz ich kombinacje. Często okazuje się, że chromatografia jest bardziej efektywną od innych, techniką uzyskania użytecznych ilości substancji. Jest tak nie tylko wtedy, gdy można zastosować warunki symulacji przemieszczania złoża (Simulated Moving Bed) i otrzymywać produkt w sposób ciągły, ale także, w przypadku okresowego wykorzystywania tej techniki rozdzielania.

Należy na wstępie podkreślić, że proces rozdzielania i otrzymywania substancji czystych, z wykorzystaniem chromatografii, jest tym bardziej efektywny, im wyższa jest selektywność zastosowanego układu rozdzielczego, a w przypadku chromatografii cieczowej, im mniejsze zapewni się straty eluentu, tzn., im większy będzie stopień zawracanie eluentu do ponownego rozdzielania. Stąd, m.in., należy unikać stosowania warunków elucji gradientowej w przypadku wykorzystywania chromatografii cieczowej do otrzymani-

wania substancji, zwłaszcza, w skali procesowej, ponieważ to zawsze podraża łączne koszty.

Warto też zwrócić uwagę, że doświadczenia ostatnich lat wykazały, iż szczególnie efektywną ekonomicznie techniką rozdzielania i otrzymywania substancji w skali preparatywnej i procesowej jest chromatografia z eluentem nadkrytycznym (P-SFC). Jednakże, można tą techniką rozdzielać tylko substancje trwałe termicznie oraz nisko i średnio polarne. Rozdzielanie substancji wysoko polarnych napotyka na trudności związane z koniecznością stosowania polarnego modyfikatora cieczy nadkrytycznej.

W konsekwencji chromatografia cieczowa w skali preparatywnej lub procesowej (P-LC, albo P-HPLC) jest obecnie powszechnie i szeroko stosowaną techniką rozdzielania i otrzymywania czystych substancji i to nie tylko w laboratoriach, do uzyskiwania wzorców i niewielkich ilości określonych związków chemicznych dla mikrosyntezy, czy zbadania właściwości nowo odkrytych lub zsyntetyzowanych związków chemicznych, ale także w skali procesowej, do produkcji, np., insuliny, antybiotyków peptydowych, hormonów, glikozydów i innych substancji aktywnych biologicznie, w tym, leków itp.

## **GLÓWNE OBSZARY ZASTOSOWAŃ CHROMATOGRAFII W SKALI PREPARATYWNEJ I PROCESOWEJ**

Chromatografia w zastosowaniu do otrzymywania czystych substancji ma dwie nazwy:

- *chromatografia preparatywna*, gdy ilości otrzymywanych substancji są niewielkie i otrzymywanie ma charakter sporadyczny;
- *chromatografia procesowa* (produkcyjna, przemysłowa), gdy proces prowadzony jest systematycznie, w sposób cykliczny lub ciągły, a ilość produktu jest znacznie większa (np. otrzymywanie leku, produktu handlowego itp.).

Od początku stosowania chromatografii technika ta była wykorzystywana dwukierunkowo: jako technika analityczna i jako sposób na wydzielenie z mieszaniny interesującego składnika (lub składników) mieszaniny. Przez wiele lat, w okresie poprzedzającym automatyzację i mikroprocesory, detekcja, analityka ilościowa, a także preparatyka, z zastosowaniem chromatografii cieczowej, opierała się na stosowaniu szklanej kolumny, wypełnionej sorbentem i zbieraniu kolejnych frakcji eluatu, ich analizie typowymi technikami analitycznymi, np. spektrofotometrycznie, czy refraktometrią. Analityk musiał często użyć do analizy całą ilość wydzielonej substancji, szczególnie, w przypadku wykonywania analizy śladowej, albo wydzielenia składników występujących w bardzo niskich zawartościach. Im lepsze uzyskiwał rozdzielanie od składników towarzyszących, tym wynik był bardziej rzetelny. Na tym etapie rozwoju chromatografii granica pomiędzy chromatografią, jako techniką analityczną, czy służącą do otrzymywania czystych substancji nie była wyraźna. Wprowadzenie detektorów przepływowych i rejestratorów, a później komputerów, wyraźnie rozdzieliło te dwa obszary zastosowań chromatografii.

W chromatografii analitycznej celem jest uzyskanie rozdzielania interesujących (czasem wszystkich) substancji w jak najkrótszym czasie, z rozdzielczością  $R = \text{ok. } 1$ . Dąży się do zmniejszenia skali procesu i oszczędności drogich składników eluentu przez zmniejszenie wymiarów kolumny, zwłaszcza średnicy, dbając równocześnie o jak najwyższą sprawność rozdzielania. Stosuje się niewielkie objętości roztworu dozowanej mieszaniny, by obniżyć do minimum tzw. rozmycie poza-kolumnowe. Ze względu na wysoką czułość współczesnych detektorów ilość dozowanej próbki może być bardzo mała (poza przypadkami analityki śladowej) i eluat traktowany jest jako ściek, który zostaje poddany utylizacji.

W skali preparatywnej, lub procesowej stosuje się, natomiast, kolumny o dużych średnicach i wysokie natężenia przepływu eluentu.

Chromatografia w zastosowaniu preparatywnym jest powszechnie uważana za szczególnie efektywną technikę rozdzielania wieloskładnikowych mieszanin w celu otrzymania czystych substancji do zastosowań badawczych lub mikrosyntez, gdy problem rozdzielczy należy do trudnych, lub bardzo trudnych, gdy możliwy do osiągnięcia współczynnik rozdzielania interesującej nas substancji i pasm towarzyszących jest niższy od 1.05. Również, w skali procesowej znajduje coraz więcej zastosowań do otrzymania substancji w ilości nawet do kilkudziesięciu kilogramów na dobę. Szczególnie, w nowoczesnym przemyśle farmaceutycznym można dzisiaj spotkać hale produkcyjne, gdzie znajdują się, wyłącznie, kolumny chromatograficzne i ich oprzyrządowanie w postaci pomp eluentu, pomp dozujących wsad, zbiorników, kolektorów frakcji, urządzeń do wzbogacania frakcji eluatu w postaci odparowywaczy próżniowych, lub membranowych wymienników masy oraz urządzeń do izolacji substancji w postaci krystalicznej z frakcji eluatu.

Najważniejsze dziedziny preparatywnych i procesowych zastosowań chromatografii to:

- izolacja produktów biotechnologii, szczególnie białek i enzymów, polisacharydów, fosfolipidów, określonych fragmentów DNA, lub RNA itp.;
- izolacja produktów naturalnych pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego,
- izolacja produktów oraz zanieczyszczeń powstałych podczas syntezy leków (farmaceutyków, składników kosmetyków itp.),
- izolacja lantanowców i transuranowców,
- izolacja użytecznych ilości substancji do badań i mikrosyntez w zakresie chemii organicznej, biochemii, mikrobiologii itp.,
- izolacja izomerów optycznych.

## **TECHNIKI I MECHANIZMY CHROMATOGRAFII UŻYWANE W ZASTOSOWANIACH PREPARATYWNYCH ORAZ NAJWAŻNIEJSZE ZASADY POWIĘKSZANIA SKALI ROZDZIELANIA**

Techniki chromatograficzne stosowane w skali preparatywnej i procesowej to:

- Kolumnowa, elucyjna chromatografia cieczowa (P-LC, lub P-HPLC) – największy zakres preparatywnych i procesowych zastosowań chromatografii,

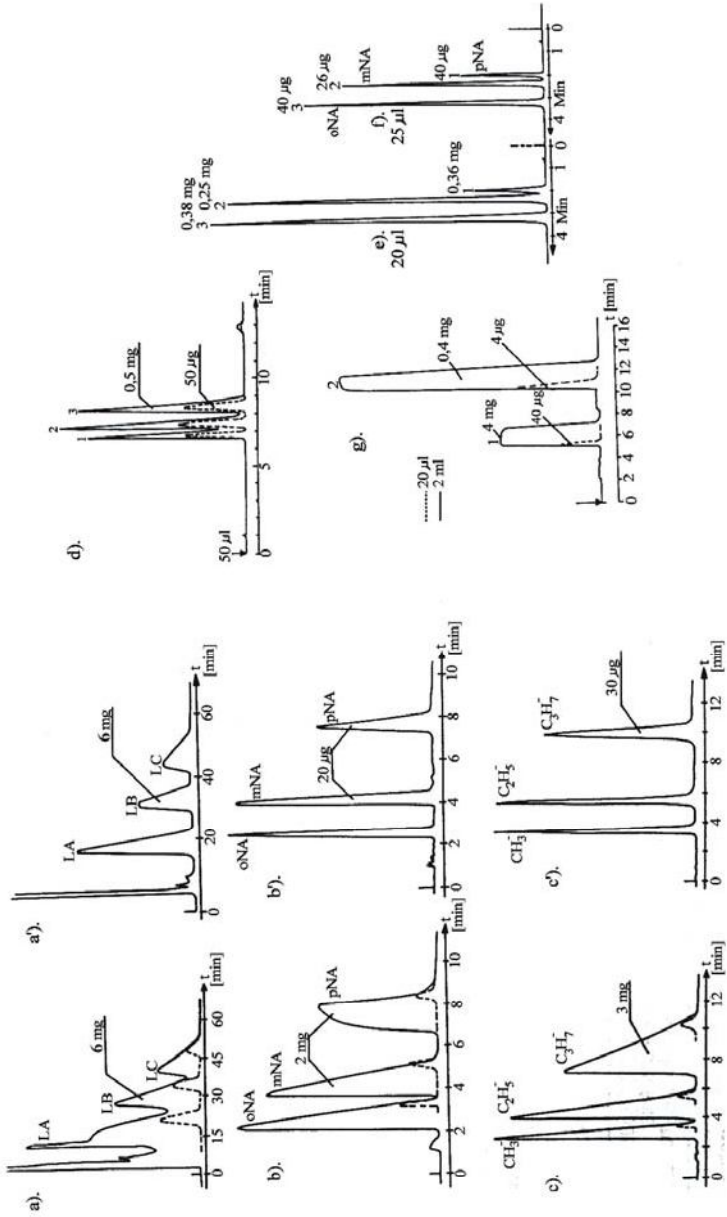
- Kolumnowa, elucyjna chromatografia gazowa (P-GC) – zastosowania głównie do izolacji substancji zapachowych i składników olejków eterycznych,
- Kolumnowa, elucyjna chromatografia z fazą ruchomą w stanie nadkrytycznym (P-SFC), najbardziej efektywna ekonomicznie domena zastosowań chromatografii preparatywnej i procesowej, ale wiąże się z wieloma trudnościami metodycznymi i technicznymi,
- „Flush Chromatography” (F-LC) – technika podobna do cienkowarstwowej, ale realizowana w kolumnie, wypełnionej niezwiązonym sorbentem, z wykorzystaniem wymuszonego, albo niewymuszonego przepływu eluentu,
- Planarna (cienkowarstwowa) preparatywna chromatografia cieczowa (P-TLC), przydatna do otrzymywania bardzo niewielkich ilości substancji.

Do celów preparatywnych wykorzystywane są wszystkie poznane chromatograficzne mechanizmy rozdzielcze i wszystkie znane układy chromatograficzne. Wykorzystuje się chromatografię adsorpcyjną w układzie faz normalnych (NP) i odwróconych (RP), chromatografię oddziaływań hydrofilowych (HILIC), chromatografię jonowymienną (IEC), mechanizmy sita molekularnego i sączenia molekularnego (GPC/SEC), chromatografię powinowactwa (AC), mechanizm oddziaływań hydrofobowych (HIC) itd.

Wykorzystuje się te same rodzaje wypełnienia kolumny, jak w chromatografii analitycznej, ale najczęściej o nieco większych ziarnach oraz jednoznacznie dozuje możliwie jak największą ilość mieszaniny komponentów do kolumny, w przeliczeniu na masę wypełnienia, tzn., dąży się do uzyskiwania maksymalnego, możliwy do zastosowania stopnia przeładowania kolumny (sorbentu). To warunkuje jak najwyższą wydajność otrzymywania substancji.

Na rys. 1 zamieszczono przykłady chromatogramów, uzyskanych z zastosowaniem kolumn analitycznych, pełniących w tym przypadku funkcję kolumn modelowych, otrzymane, w warunkach braku przeładowania kolumny oraz w warunkach różnego stopnia przeładowania stężeniowego, albo objętościowego, w układach faz odwróconych i normalnych. Warunki rozdzielania oraz masy substancji w roztworach dozowanych do kolumny podano w opisie rysunku.

W komentarzu do tego rysunku warto dodać, że szczególne korzyści w zastosowaniach preparatywnych, daje stosowanie warunków dynamicznie generowanej fazy stacjonarnej w układach faz normalnych, tzn., z zastosowaniem np. porowatego żel krzemionkowy, jako sorbentu i mieszaniny nierozpuszczalnego w wodzie nisko polarnego rozpuszczalnika organicznego (chlorku metylenu, etylenu, chloroformu, eteru di-etylowego, MTBE, octanu metylu, etylu itp.), w mieszaninie z niewielką ilością rozpuszczalnika polarnego, rozpuszczalnego w wodzie (metanolu, etanolu, acetonitrylu, dioksanu itp.) oraz z niewielkim dodatkiem wody do eluentu - o stężeniu bliskim stężeniu nasycenia, ale nieco niższym. Takie warunki są bardzo przydatne do rozdzielania glikozydów, alkaloidów itp. substancji (patrz chromatogramy na rys. 1 a i a') i są szczególnie korzystne, pod względem maksymalizacji produktywności kolumny.



Rys. 1. Zestawienie typowych chromatogramów, ilustrujących różne warunki rozdzielania mieszanin tych samych substancji bez i w warunkach przeladowania kolumny, otrzymane z zastosowaniem kolumnowej elucyjnej chromatografii cieczowej w skali modelowej oraz w warunkach liniowej odpowiedzi detektora – praca nad doбором optymalnych warunków rozdzielania. Szczegółowy opis rysunku na kolejnej stronie

Przykłady a, a', b, b', c, c' dotyczą optymalnych warunków rozdzielania z przeładowaniem stężeniowym, natomiast, przykłady d – f dotyczą rozdzielania substancji w niekorzystnych układach chromatograficznych lub w warunkach znikomej rozpuszczalności w eluencie (konieczne stosowanie przeładowania objętościowego).

**a, a'** – rozdzielanie lanatozydów A (LA), B (LB), C (LC) z odpadu poprodukcyjnego, powstałego podczas otrzymywania lanatozydu C z zastosowaniem ekstrakcji p-prądowej. Przykład wykorzystywania chromatografii podziałowej z dynamicznie generowaną fazą stacjonarną dla rutynowego otrzymywania substancji. a: — warunki przeładowania ( $2 \cdot 10^{-3} \text{ g}_{\text{mix}}/\text{g}_{\text{morb}}$ ); - - - warunki braku przeładowania („analityczne”); a': warunki dolnej granicy przeładowania stężeniowego ( $2 \cdot 10^{-3} \text{ g}_{\text{mix}}/\text{g}_{\text{morb}}$ );

Warunki chromatogr.: kolumna 800x6 mm i.d., Kieselgel SI 60 40-63  $\mu\text{m}$  (Merck), eluent:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  92:8:0,2 V/V, w = 5 ml/min, detektor UV-254 (KABiD), czułość – 1,28 AU/FS (oprócz - - -: 0,08 AU/FS).

**b, b'** – rozdzielanie „modelowej” mieszaniny o (oNA), m (mNA), p (pNA)-nitroaniliny w warunkach chromatografii adsorpcyjnej; b: — warunki przeładowania stężeniowego ( $6 \cdot 10^{-3} \text{ g}_{\text{mix}}/\text{g}_{\text{morb}}$ ), - - - warunki „analityczne” ( $6 \cdot 10^{-3} \text{ g}_{\text{mix}}/\text{g}_{\text{morb}}$ ), b': warunki dolnej granicy przeładowania ( $2 \cdot 10^{-3} \text{ g}_{\text{mix}}/\text{g}_{\text{morb}}$ );

Warunki chromatograficzne: kolumna 100x4 mm i.d., Lichrosorb SI 60 5  $\mu\text{m}$ , eluent: n-heptan – dioksan 8:2 V/V, 1 ml/min, detektor UV 280 nm (Knauer), długość drogi optycznej 0,4 mm, czułość – b: — 2,56 AU/FS, - - - 0,08 AU/FS, b': 0,16 AU/FS.

**c, c'**: rozdzielanie modelowej mieszaniny estrów  $\text{CH}_3-$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5-$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7-$ -kwasu 4OH benzooesowego w układzie faz odwróconych (RP18); c: — warunki przeładowania stężeniowego ( $10^{-2} \text{ g}_{\text{mix}}/\text{g}_{\text{morb}}$ ), - - - warunki „analityczne” ( $10^{-5} \text{ g}_{\text{mix}}/\text{g}_{\text{morb}}$ ); c': warunki dolnej granicy przeładowania stężeniowego ( $2 \times 10^{-4} \text{ g}_{\text{mix}}/\text{g}_{\text{morb}}$ ); Warunki chromatograficzne: kolumna 120x4 mm i.d., Nucleosil RP18 7  $\mu\text{m}$ , eluent:  $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$  1:1 V/V, 1 ml/min, detektor UV 280 nm, długość drogi opt. 0,4 mm (Knauer), czułość - c: — 2,56 AU/FS, - - - 0,08 AU/FS, c': 0,32 AU/FS.

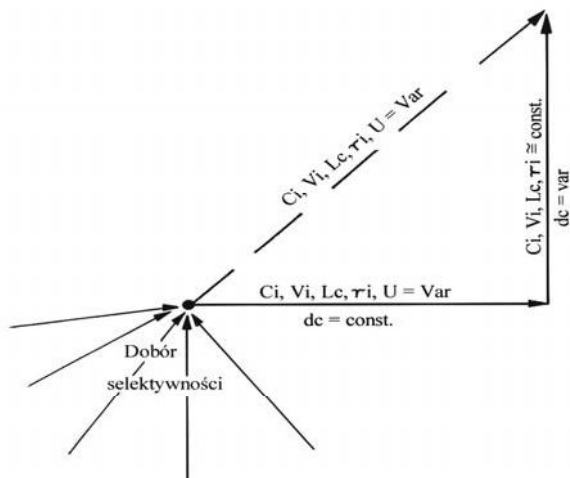
**d** – rozdzielanie estrów kwasu 4-OH benzooesowego:  $\text{C}_3\text{H}_7-$  (1),  $\text{C}_2\text{H}_5-$  (2),  $\text{CH}_3-$  (3) w układzie faz normalnych na żelu krzemionkowym Lichrosorb SI 60 5  $\mu\text{m}$  – kolumna 250x4 mm i.d., eluent: heptan – dioksan 8:2 V/V, 2 ml/min, 256 nm; — warunki granicy przeładowania stężeniowego, - - - warunki „analityczne”;

**e, f** – rozdzielanie o, m, p – nitroaniliny (patrz rys. 1b, b') w układzie faz odwróconych: Nucleosil C18 7  $\mu\text{m}$ , kolumna 120x4 mm, eluent:  $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$  1:1 V/V, 2 ml/min, e – warunki granicy przeładowania stężeniowego, f – warunki „analityczne”;

**g** – rozdzielanie benzenu ( $c_i = 2 \text{ mg/ml}$ , pik 1) i naftalenu ( $c_i = 0,2 \text{ mg/ml}$ , pik 2) w warunkach znikomej rozpuszczalności substancji w eluencie: — obj. dozowania 2 ml, warunki typowego przeładowania objętościowego, - - - obj. dozow. 20  $\mu\text{m}$  warunki „analityczne”; kolumna: Nucleosil C18 7  $\mu\text{m}$ , 250x4 mm i.d., 1 ml/min; W przypadku chromatogramów d-f detektor UV 254 nm, droga opt. 0,4 mm.

Najczęściej optymalne warunki rozdzielania w skali preparatywnej, a szczególnie w skali procesowej dobiera się z zastosowaniem kolumny modelowej. Dotyczy to doboru selektywności układu chromatograficznego, sprawności rozdzielania - wielkość ziaren wypełnienia, długości kolumny, prędkości przepływu eluentu, możliwego do osiągnięcia stopnia przeładowania sorbentu oraz położenia na chromatogramie punktów zbierania frakcji itp. parametrów decydujących o efektywności rozdzielania i zbierania frakcji eluatu oraz o czystości otrzymywanego produktu. Funkcję kolumny modelowej pełni często kolumna analityczna, albo semi-preparatywna o średnicy  $d_c = 4 - 8 \text{ mm}$ , jednak, nie jest to optymalne, ponieważ kolumna modelowa powinna być wypełniona nie tylko tego samego typu sorbentem, jak preparatywna, ale tym samym sorbentem, także w zakresie wielkości ziaren oraz powinna być tej samej długości, jak kolumna preparatywna, albo procesowa. Następnie można w sposób bardzo prosty dokonać powiększenia skali roz-

dzielania, przechodząc do stosowania kolumny o odpowiednio większej średnicy, nie zmieniając ani sorbentu, ani długości kolumny. Średnicę kolumny preparatywnej, konieczną do uzyskania potrzebnej wydajności rozdzielania, oblicza się wówczas, zakładając odpowiednie zwiększenie objętości dozowanej mieszaniny substancji rozdzielanych oraz natężenia przepływu eluentu, proporcjonalnie do stopnia zwiększenia pola przekroju poprzecznego wypełnienia kolumny preparatywnej lub procesowej i modelowej. Na rys. 2 naszkicowano schematycznie opisaną powyżej zasadę postępowania w związku z doбором optymalnych warunków rozdzielania substancji w skali preparatywnej, albo procesowej.



Rys. 2. Ilustracja dwuetapowego postępowania podczas powiększania skali procesu rozdzielania w celu otrzymywania substancji metodami chromatografii w skali preparatywnej lub procesowej. M – skala modelowa rozdzielania, P – skala preparatywna i procesowa rozdzielania

Warto też zwrócić uwagę, że w prawie wszystkich w/w domenach zastosowań chromatografii - szczególnie, gdy trzeba rozdzielać tylko dwie substancje i gdy nie jest konieczne stosowanie elucji gradientowej - jest możliwe wykonywanie rozdzielania w warunkach procesu ciągłego (SMB). Polega on na równoczesnej pracy ośmiu do kilkunastu kolumn, z odpowiednim przesunięciem fazy rozdzielania w każdej z nich. Roztwór rozdzielanych substancji („wsad”) i eluent („ekstrahent”), wprowadza się w sposób ciągły oraz w sposób ciągły odbiera się składnik A (o niższej retencji – „ekstrakt”) i składnik B (o wyższej retencji – „rafinat”). Odpowiednie miejsca doprowadzania / odbioru w/w strumieni są okresowo zmieniane przez odpowiedni system sterowania komputerowego. W konsekwencji frakcje eluentu, zawierające poszczególne rozdzielane substancje są zbierane bez przerwy. W takich przypadkach okazuje się, że chromatografia może być najbardziej opłacalna ekonomicznie ze wszystkich technik rozdzielania, możliwych potencjalnie do stosowania.

## ZJAWISKA PRZEŁADOWANIA KOLUMNY (POWIERZCHNI SORPCYJNEJ) I ICH EFEKTYWNE WYKORZYSTANIE W WARUNKACH CHROMATOGRAFII PREPARATYWNEJ I PROCESOWEJ

Różnica warunków preparatywnych, w porównaniu do warunków chromatografii analitycznej, polega na konieczności wykorzystania w maksymalnym stopniu powierzchni sorpcyjnej, lub fazy stacjonarnej. Im wyższy udaje się osiągnąć stopień przeładowania kolumny, tym bardziej efektywny ekonomicznie jest proces rozdzielczy. Przy czym, rozdzielanie jest szczególnie efektywne, gdy można uzyskać warunki silnego przeładowania stężeniowego kolumny. Istnieje wówczas możliwość rozdzielania jednorazowo do ok.  $10^{-2}$ g mieszaniny rozdzielanych substancji / g sorbentu typu żel krzemionkowy lub chemicznie modyfikowany żel krzemionkowy i uzyskiwanie produktu o czystości powyżej 99.99 %. Może to, jednak, mieć miejsce tylko wtedy, gdy rozpuszczalność rozdzielanych substancji w eluencie jest dostatecznie wysoka oraz, gdy kolumna o wysokiej sprawności (wysokiej liczbie półek teoretycznych), wypełniona techniką zawieszinową na mokro, albo na mokro - techniką dynamicznej kompresji aksjalnej (DAC), jest wykorzystywana w warunkach „niekończącej średnicy). Wówczas piki chromatograficzne są kształtu zbliżonego do trójkąta prostokątnego, którego prawy dolny wierzchołek leży w punkcie retencji, jaka by została uzyskana w warunkach braku przeładowania (analitycznych - patrz rys. 1 a, b, c).

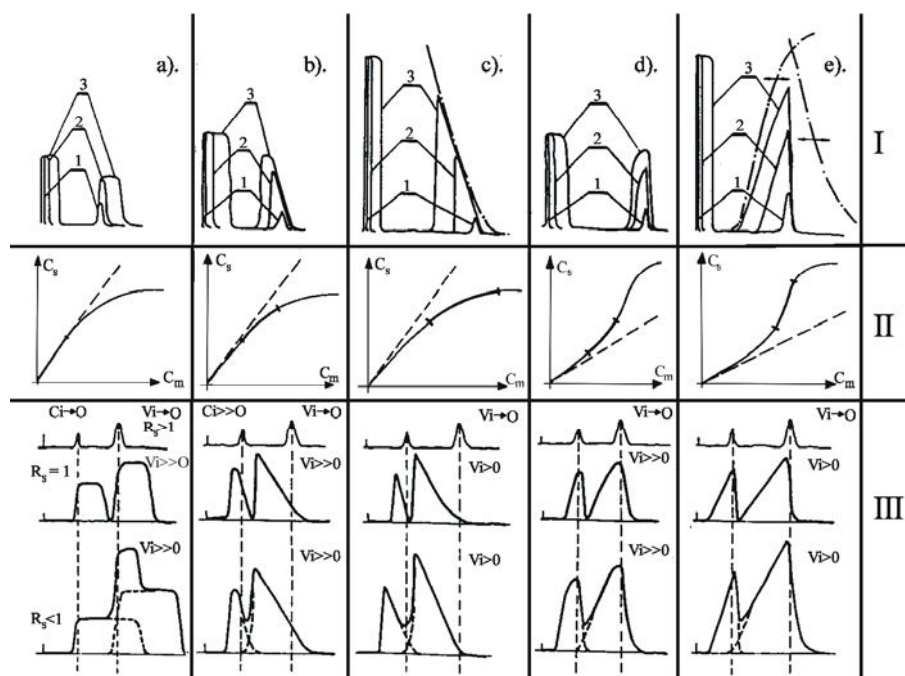
W przypadku niskiej rozpuszczalności rozdzielanych substancji w eluencie możliwe jest uzyskanie jedynie przeładowania objętościowego. Nie można wówczas osiągnąć tak wysokiej efektywności ekonomicznej rozdzielania – teoretycznie, nawet 50 razy mniejszą, niż w warunkach przeładowania stężeniowego. Piki chromatograficzne mają, wówczas, kształt zbliżony do prostokąta, co jest spowodowane koniecznością dozowania dużych objętości roztworu substancji rozdzielanych o stosunkowo niskim stężeniu (patrz rys. 1g).

W przypadku trudnych, lub bardzo trudnych problemów separacyjnych (współczynnik selektywności  $\alpha$  zbliżony do 1.01), Dąży się również do prowadzenia rozdzielania w warunkach przeładowania kolumny, lecz w praktyce konieczne jest poprzestanie na dozowaniu jednorazowo do kolumny tylko takiej ilości mieszaniny substancji rozdzielanych, aby nie przekraczać granicy liniowości odpowiedniej izotermy sorpcji (w praktyce do ok.  $5 \cdot 10^{-4}$  g/g sorbentu typu żel krzemionkowy i fazy stacjonarnej związanej do powierzchni żelu krzemionkowego). W przeciwnym razie strefy rozdzielanych substancji nakładają się na siebie wzajemnie i czystość rozdzielanych substancji będzie niewielka. Wówczas efektywność ekonomiczna separacji też pozostaje niewielka (patrz rys. 1 d, e).

Opisane powyżej reguły mają bezpośredni związek ze zjawiskami sorpcji substancji rozdzielanych na powierzchni wypełnienia kolumny i z rodzajem izotermy sorpcji. Najczęściej izoterma sorpcji ma w warunkach chromatografii, w tym, cieczowej - charakter izotermy Langmuira, Zdarzają się też bardzo korzystne dla wydajności rozdzielania, przypadki, sorpcji wie-



lowarstwowej, gdy charakter izoterm sorpcji jest wklęsły (typu „S”). Na rys. 3. zamieszczono zestawienie różnych warunków rozdzielania, wykorzystywanych w chromatografii preparatywnej przy niewielkim i znacznym stopniu przeładowania kolumny oraz rodzaje spotykanych izoterm sorpcji i związek zakresu stężenia w roztworze dozowanym do kolumny z zakresem izoterm sorpcji oraz kształtem pików i zmianą retencji substancji w porównaniu do warunków braku przeładowania (warunków „analitycznych”). W podpisie pod rysunkiem zamieszczono dodatkowe wyjaśnienia.



Rys. 3.

**Część I:** Zestawienie form pików chromatograficznych dla pojedynczej substancji eluowanej w kolumnie chromatograficznej, w zależności od typu przeładowania kolumny (po lewej stronie cyfr odniesienia naszkicowano profile stężenia w chwili dozowania roztworu substancji eluowanej do kolumny).

Oznaczenia: 1 – brak przeładowania kolumny, 2 – dolna granica przeładowania danego typu, 3 – typowy przykład przeładowania danego typu;

**Część II:** Kształty i zakresy izoterm sorpcji odpowiednie dla pików chromatograficznych zamieszczonych powyżej (linią pogrubioną zaznaczono zakresy izoterm sorpcji charakterystyczne dla danego typu przeładowania kolumny);

**Część III:** Zestawienie charakteru typowych chromatogramów otrzymanych w przypadku rozdzielania dwóch substancji w warunkach danego typu przeładowania kolumny, odpowiednio: z zachowaniem warunku  $R_s=1$  (środką części fragmentu III – piki rozdzielane praktycznie do poziomu linii bazowej) i po zwiększeniu ilości substancji wprowadzonej do kolumny (piki częściowo „nałożone” wzajemnie). W górnym fragmencie cz.III naszkicowano odpowiednie chromatogramy otrzymane w warunkach braku przeładowania (tzw. „warunkach analitycznych”);

## ZASADY OPTIMALNEGO STOSOWANIA PREPARATYWNEJ I PROCESOWEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

### Parametry opisujące wydajność i produktywność kolumny

Wydajność kolumny definiuje się jako masę interesującej nas substancji, otrzymywaną w jednostce czasu (1):

$$R_h = Q_r / t_c \quad (1)$$

Produktywność kolumny w chromatografii preparatywnej i procesowej jest definiowana najogólniej w ten sposób, że jest obliczana da jednostki przekroju poprzecznego wypełnienia kolumny (2). To pozwala porównywać efektywność rozdzielania tych samych substancji z zastosowaniem kolumn o różnych wymiarach, a wartość maksymalna oznacza optimum generalne. W każdym przypadku obliczenia oraz porównywanie wyników jest wykonywane dla warunków otrzymywania produktu o takiej samej czystości:

$$P_t = \frac{Q_r}{Q_i} * \frac{Q_i}{t_c A} \left[ \frac{kg}{h * m^2} \right] \quad (2)$$

$P_t$  - wydajność wyrażona jako masa substancji otrzymana w ciągu jednostki czasu i dla

jednostki powierzchni przekroju kolumny;

$Q_i$  - masa substancji wprowadzona do kolumny;

$Q_r$  - masa substancji o czystości ( $p$ ), otrzymana z kolumny;

$t_c$  - czas trwania procesu rozdzielania (w warunkach repetycyjnego dozowania – czas trwania jednego etapu rozdzielania);

$A$  - powierzchnia przekroju poprzecznego wypełnienia kolumny  $A = \pi d_c^2 / 4$ ;

Wyrażenie  $\frac{Q_r}{Q_i}$  nazwane jest stopniem odzysku.

Przedstawione wyrażenia uwzględnia stronę „korzyści”. Do strony „koszty”, należą koszty związane ze bezpowrotnym zużyciem składników eluentu (jeśli ma miejsce), usuwaniem składników eluentu z frakcji eluatu i odzyskiem eluentu, cena kolumny i urządzeń pomocniczych, koszty robocizny itd.

Optymalne przeładowanie kolumny w warunkach pracy preparatywnej jest najczęściej takie, aby wartość  $R$  między izolowaną substancją, a najbliższymi „zanieczyszczeniami”, widocznymi na chromatogramie wynosiła ok. 1. W warunkach rozdzielania procesowego korzystne jest stosowanie wyższego stopnia przeładowania, utrzymując  $R$  na optymalnym poziomie (często ok. 0.75) i „wycinając” oraz zawracając do ponownego rozdzielania, odpo-

wiednie między-frakcje. Trzeba dodać, że eksperymentalne określenie optymalnej wartości  $R$  oraz punktów zbierania frakcji, zapewniających otrzymanie maksymalnej produktywności kolumny i wymaganej czystości produktu jest bardzo pracochłonne. Jeżeli nie dysponujemy odpowiednim poprawnym komputerowym modelem rozdzielania, warto to wykonać doświadczalnie tylko wtedy, gdy optymalizuje się przeładowanie kolumny i zbieranie frakcji dla warunków procesowego rozdzielania i dla produkcji substancji. Dla sporadycznego wykonywania rozdzielania preparatywnego, znacznie bardziej celowe jest jednorazowe dozowanie takiej objętości możliwie stężonej mieszaniny substancji, by otrzymywać  $R$  ok. 1 i zbierać cały zakres pików interesujących nas substancji widocznych na chromatogramie.

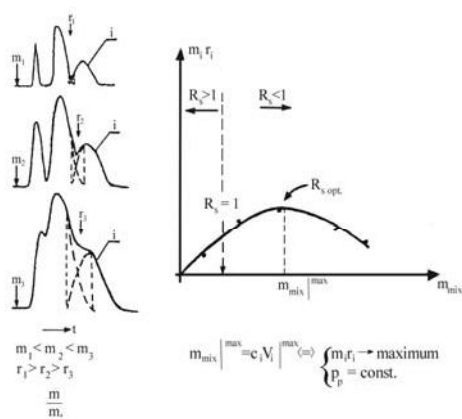
Zasadę doboru optymalnej ilości jednorazowo dozowanej do kolumny mieszaniny substancji w warunkach chromatografii preparatywnej, albo procesowej zilustrowano na rys. 4.

Do parametrów, które mają istotny wpływ na wydajność preparatywnego, albo procesowego rozdzielania należą: ilość dozowanej substancji ( $V_i \cdot C_i$ ), średnica kolumny ( $d_c$ ), długość wypełnienia kolumny ( $L_c$ ), natężenie przepływu eluentu ( $w$ ), powierzchnia właściwa materiału stanowiącego wypełnienie kolumny ( $F$ ), wielkość ziaren wypełnienia ( $d_p$ ), wartość współczynnika retencji substancji izolowanej ( $k_i$ ) i współczynnika retencji ostatniego pików ( $k_n$ ). Wpływ każdego z tych parametrów na wydajność rozdzielania wymaga oddzielnego omówienia.

### Ilość dozowanej substancji

Ilość dozowanej substancji ( $m_i$ ) określona jest iloczynem objętości ( $V_i$ ) i stężenia izolowanej substancji ( $c_i$ ):

$$m_i = V_i \cdot c_i \quad (3)$$



Rys. 4. Ilustracja zasady określania ilości substancji dozowanych jednorazowo do kolumny oraz wyznaczania punktów zbierania frakcji w warunkach chromatografii procesowej

## - przeładowanie objętościowe

W chromatografii analitycznej próbka jest dozowana w taki sposób, aby ze wzrostem dozowanej ilości  $m_i$  rosła tylko wysokość pików. Aby spełnić ten warunek objętość próbki nie powinna przekroczyć około  $\frac{1}{4}$  szerokości pików (wyrażonej w jednostkach objętości), mierzonej przy podstawie pików, a stężenie nie powinno być większe niż  $10^{-4}$  g substancji na g wypełnienia kolumny.

Zwiększenie objętości dozowania (bez wzrostu stężenia – warunki przeładowania objętościowego), powoduje wzrost wysokości i szerokości pików. Jeżeli objętość przekroczy graniczną wartość, dalszy wzrost powoduje wyłącznie poszerzenie pasm. W takim przypadku stężenie substancji w elucji obserwowane jako wysokość pików nie zmienia się (pojawia się „odcinek” pików o stałej wysokości). Objętość, od której obserwuje się pik z plateau wynosi około 6 odchyżeń standardowych pików otrzymanego po dozowaniu próbki analitycznej, tj. o znikomej objętości i niskim stężeniu.

Wzrost szerokości pików będący wynikiem dużej objętości dozowania odbywa się poprzez wzrost objętości elucji opadającej części pików, podczas gdy położenie frontu pików nie ulega zmianie i odpowiada położeniu pików w warunkach chromatografii analitycznej i nie zależy od retencji substancji ani jej rodzaju. Maksymalną objętość, którą można dozować w celu zwiększenia wydajności procesu można oszacować z chromatogramu, otrzymanego dla próbki analitycznej. Jest to, zmierzona na poziomie linii podstawowej i wyrażona w jednostkach objętości - odległość pomiędzy pikami substancji, które są celem rozdzielania.

## - przeładowanie stężeniowe

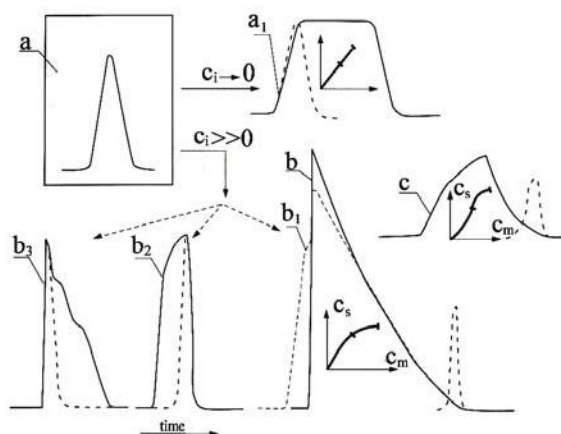
Wzrost stężenia substancji w próbce dozowanej do kolumny (przy zachowaniu małej objętości dozowania ( $V_i$ )), powoduje poszerzenie pasm, a kształt pików zależy od rodzaju izotermy sorpcji (patrz rys. 3 oraz 1 i 4), ale także od stopnia nieliniowości odpowiedzi detektora. Zależności retencji od kształtu izotermy sorpcji przedstawiono schematycznie na rys. 3, a dla pików otrzymywanych w praktyce, na rys. 1.

Adsorpcja substancji z roztworów w układach ciecz - ciało stałe najczęściej przebiega wg izotermy Langmuira. W nieliniowym zakresie tej izotermy, dla wysokiego stężenia substancji, wartość współczynnika retencji ( $k$ ) maleje ze wzrostem stężenia, tzn., że ta część pasma, gdzie jest wyższe stężenie wędruje szybciej. Pasma staje się niesymetryczne, w kształcie trójkąta, ze stromym frontem. Wzrost stężenia próbki powoduje wzrost wysokości maksimum pików i poszerzenie pasm przez zmniejszenie objętości elucji frontu. Tył pików pozostaje w przybliżeniu w tym samym miejscu, jak dla pików analitycznych.

Zwiększanie wydajności procesu rozdzielania preparatywnego poprzez wzrost stężenia roztworu dozowanego jest bardziej korzystne, niż zachowywanie przeładowania objętościowego (ze względu na większe stężenie

nie substancji w eluacie, można uzyskać ponad 50-cio krotny wzrost wydajności kolumny). Ograniczeniem jest rozpuszczalność składników rozdzielanej mieszaniny w eluencie, która z reguły maleje ze wzrostem retencji rozdzielanego składnika.

Powyższe stwierdzenia są poprawne, przy założeniu, że rozpuszczalnikiem roztworu dozowanego do kolumny jest eluent (albo ciecz o początkowym składzie, w przypadku elucji gradientowej) oraz gdy lepkość roztworu dozowanego jest niewiele wyższa od lepkości eluentu. Gdy rozpuszczalnikiem jest ciecz o wyższej sile elucyjnej niż eluent i/albo roztwór dozowany jest bardzo lepki, to ze wzrostem stężenia roztworu dozowanego do kolumny chromatograficznej mogą być związane dodatkowe problemy, powodujące w konsekwencji różnego typu zniekształcenia pików chromatograficznych. Efekty te zilustrowano na rys. 5.



Rys. 5. Zestawienie zaobserwowanych w praktyce rodzajów zniekształceń pików chromatograficznych w warunkach chromatografii preparatywnej z uwzględnieniem warunków, gdy inna ciecz niż faza ruchoma pełni rolę rozpuszczalnika dla sporządzenia roztworu dozowanego do kolumny

Oznaczenia:

- a – kształt pików w warunkach górnej granicy braku przeładowania
- a<sub>1</sub> – naturalny kształt pików w warunkach przeładowania objętościowego
- b – naturalny kształt pików w warunkach przeładowania stężeniowego
- b<sub>1</sub> – zniekształcenie pików spowodowane zbyt wysoką różnicą lepkości i napięć powierzchniowych między roztworem dozowanym do kolumny i eluentem
- b<sub>2</sub> – zniekształcenie pików w sytuacji niedostatecznej rozpuszczalności substancji rozdzielonej w eluencie – przypadek „wypadania oleju” podczas dozowania
- b<sub>3</sub> – zniekształcenie pików w sytuacji niedostatecznej rozpuszczalności substancji rozdzielonej w eluencie – przypadek „wypadania kryształów” podczas dozowania
- kształt pików bez przeładowania, lub w warunkach górnej granicy braku przeładowania oraz usytuowanie pików w tych warunkach
- c – naturalny kształt pików w warunkach izotermii sorpcji typu „s” (dość rzadki, lecz korzystny przypadek w praktyce)
- c<sub>s</sub>, c<sub>m</sub> – stężenia substancji rozdzielanej odpowiednio: w fazie stacjonarnej (s) i ruchomej (m) jako oznaczenia osi odpowiednich izotermii sorpcji naszkicowanych w pobliżu odpowiadającym im pikom chromatograficznym

## Średnica kolumny

Najbardziej celowe jest powiększanie skali rozdzielania substancji z zastosowaniem kolumn tej samej długości, wypełnionych tym samym sorbentem, z zachowaniem tego samego układu chromatograficznego i warunków pełnego podobieństwa fizycznego. Zwiększeniu powinna, więc, ulec tylko średnica kolumny. Wydajność otrzymywania produktu wzrośnie proporcjonalnie do zmiany powierzchni przekroju poprzecznego kolumny, a więc proporcjonalnie do drugiej potęgi zmiany średnicy kolumny z modelowej do preparatywnej.

$$m_2 = m_1 * \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \quad (4)$$

$m_2$ ,  $m_1$  - masy substancji, dozowanych, odpowiednio, do kolumny o średnicy  $d_{c2}$  i  $d_{c1}$ ;

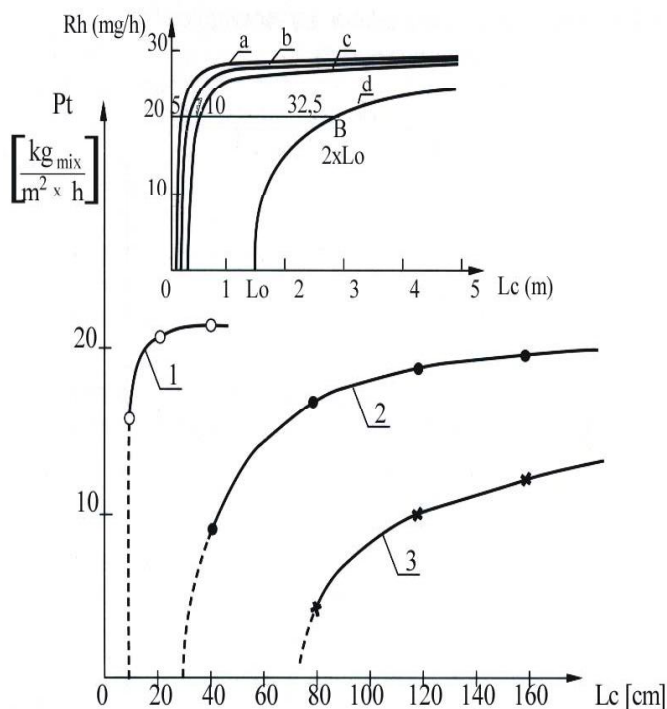
Według tej samej proporcji należy również zwiększyć natężenie przepływu eluentu, a więc, odpowiednio wzrośnie zużycie eluentu. Natomiast, liniowa prędkość przepływu eluentu powinna być zachowana bez zmiany. Nie powinien też zmienić się czas rozdzielania, położenie punktów zbierania frakcji na chromatogramie, sprawność kolumny, ani ciśnienie pompowania eluentu. Pod warunkiem, jednak, opanowania umiejętności uzyskiwania takiej samej sprawności kolumny modelowej i preparatywnej lub procesowej, co nie zawsze jest łatwe do osiągnięcia, choć z pewnością możliwe. Zależność wydajności i niektórych innych parametrów procesu rozdzielania w funkcji średnicy kolumny, pozostają wtedy zgodne z wyrażeniem (4). Zależność (4) dotyczy także zmiany wydajności otrzymywania substancji ( $R_i$ ), objętości dozowania ( $V_i$ ) i natężenia przepływu eluentu ( $w$ ).

## Długość kolumny

Wraz z długością kolumny ( $L_c$ ) proporcjonalnie rośnie masa wypełnienia, lecz liczba pól teoretycznych jest proporcjonalna do  $\sqrt{L_c}$ , stąd w dłuższej kolumnie pasma substancji są bezwzględnie bardziej rozmyte, ale względnie - mniej. Wzrost długości kolumny powoduje też zwiększenie oporów przepływu ( $\Delta P$ ), co, w przypadku ograniczenia maksymalnego ciśnienia pracy aparatury preparatywnej lub procesowej może uniemożliwić uzyskanie optymalnego natężenia przepływu eluentu.

Istnieje najmniejsza, krytyczna długość kolumny ( $L_{c \min}$ ), wypełnionej określonym sorbentem, a w istocie najmniejsza liczba tzw. pól teoretycznych kolumny ( $N_{\min}$ ), która warunkuje minimalny konieczny stopień rozdzielania interesujących nas substancji, wzajemnie od siebie, albo od niepożą-

danych składników. Zwiększenie długości kolumny, powyżej tej krytycznej, minimalnej długości, jest bardzo korzystne i celowe, zwłaszcza, gdy jednocześnie można zwiększać wartość liniowej prędkości przepływu eluentu ( $u$ ). Umożliwia to znaczne zwiększenie wydajności rozdzielania. Zależność produktywności kolumny ( $P_t$ ) od jej długości ( $L_c$ ), otrzymana w warunkach stałej prędkości liniowej eluentu ( $u$ ) jest, jednak, nieliniowa. Osiąga się optymalną długość kolumny - znacznie większą, niż potrzebna do rozdzielania analitycznego, w warunkach bez przeładowania, jednak dalsze zwiększanie długości kolumny jest już niecelowe. Dla warunków zachowania stałej wartości prędkości przepływu eluentu zilustrowano to na rys. 6, pokazującym u góry wykresy zależności produktywności kolumny od długości wypełnienia, otrzymane na podstawie równań uzyskanych teoretycznie przez Hupe i Lauera, oraz poniżej, wykresy uzyskane doświadczalnie, podczas pracy nad optymalizacją warunków otrzymywania lantozydu C z ekstraktów suszu z brunatnicy wełnistej.



Rys. 6. Zależność produktywności czasowej ( $P_t$ ) kolumny chromatograficznej od długości ( $L_c$ ) kolumny w warunkach stałej prędkości przepływu eluentu. Krzywe a, b, c, d, zostały uzyskane w wyniku obliczeń teoretycznych przez Hupe i Lauera, odpowiednio, dla wypełnień o wielkości ziaren  $d_p = 5, 7, 10, 32.5 \mu\text{m}$ , a krzywe 1, 2, 3, podczas badań nad optymalizacją warunków otrzymywania lantozydu C z ekstraktu suszu z brunatnicy wełnistej dla kolumn wypełnionych żelalem krzemionkowym o średnich wielkościach ziaren, odpowiednio: 10, 45, i 102  $\mu\text{m}$

## Średnica ziaren wypełnienia kolumny

Średnica ziaren wypełnienia ma zasadniczy wpływ na sprawność kolumny. Krytyczną, minimalną liczbę pól teoretycznych, niezbędną do preparatywnego rozdzielania mieszaniny substancji można osiągnąć zmieniając długość kolumny, albo  $l$  i średnicę ziaren wypełnienia kolumny. Przy zmianie skali procesu rozdzielania w warunkach przeładowania objętościowego, ważna jest nie tyle sama długość kolumny  $L_c$ , lecz stosunek  $\frac{L_c}{d_p^2}$ , tj. proporcja

długości kolumny do kwadratu średnicy ziaren wypełnienia. W warunkach przeładowania stężeniowego korzystne jest jednocześnie zmniejszanie wielkości ziaren wypełnienia oraz długości kolumny, jednak, zachowanie stałej wartości proporcji  $\frac{L_c}{d_p^2}$  nie jest wówczas optymalną regułą. Bardziej korzyst-

ne jest zastosowanie o ok. 30% dłuższej kolumny, niż to wynika z obliczenia otrzymanego na podstawie tej reguły. Zachowując te proporcje oraz zwiększając jednocześnie prędkość przepływu eluentu, można uzyskać znaczący wzrost wydajności rozdzielania preparatywnego lub procesowego, z zachowaniem stałej czystości produktu.

Można generalnie stwierdzić, że zmniejszanie wielkości ziaren wypełnienia kolumny preparatywnej ( $d_p$ ) jest zawsze bardzo korzystne dla uzyskiwania wzrostu wydajności procesu rozdzielania oraz czystości otrzymanych substancji i jest tym bardziej celowe, im trudniejszy jest problem rozdzielczy (im mniejsze wartości  $\alpha$ ). Ograniczeniem może być, jednak, maksymalna wartość ciśnienia ( $\Delta P_{\max}$ ), jakie można zastosować do rozdzielania. Optymalną wielkość ziaren wypełnienia kolumny preparatywnej lub procesowej można określić jako wartość w zakresie 10-25 mikrometrów i jest ona tym niższa, im trudniejszy jest problem rozdzielczy (im niższa wartość  $\alpha$  w warunkach bez przeładowania kolumny).

W przypadku rozdzielania substancji makromolekularnych, ich bardzo niekorzystna kinetyka dyfuzji (niskie wartości współczynników dyfuzji) powodują, że zwiększanie liniowej prędkości przepływu jest niekorzystne i prowadzi do znacznego względnego poszerzenia pików. Wówczas zmniejszanie wielkości ziaren wypełnienia  $i$ , jeśli to możliwe z jednoczesnym zwiększaniem temperatury pracy kolumny, w zasadniczym stopniu poprawia rozdzielczość  $R$  i umożliwia zwiększanie przeładowania, a stąd i wydajności oraz produktywności kolumny.

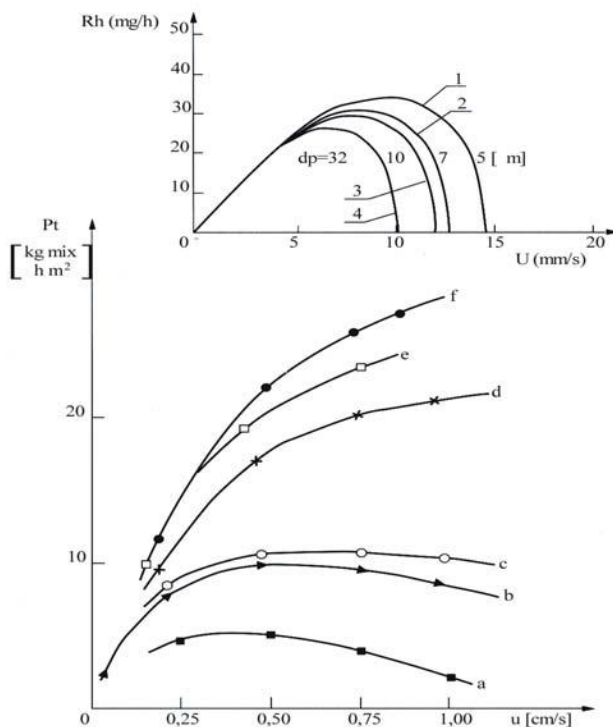
## Prędkość przepływu fazy ruchomej

Wzrost prędkości przepływu fazy ruchomej powyżej prędkości optymalnej dla zależności  $H=f(u)$ , powoduje zmniejszenie czasu trwania rozdzielania i tym samym wzrost wydajności kolumny. Wpływa, jednak, ujemnie na sprawność rozdzielania, powodując poszerzenie pasm. To, przy założonej czystości wydzielanej substancji, wymusza konieczność zmniejszenia masy



dozowanej próbki albo zmniejszenie objętości zbieranych frakcji. Spadek sprawności kolumny powoduje też zmniejszenie stężenia substancji w eluacie wypływającym z kolumny. Należy, jednocześnie, brać pod uwagę ograniczenia, wynikające z możliwości uzyskania odpowiednio wysokiego ciśnienia pompowania eluentu na wlocie do kolumny oraz ograniczoną wytrzymałość mechaniczną kolumny i jej wypełnienia.

Bez uwzględniania ograniczeń wytrzymałościowych, zależność produktywności kolumny ( $P_t$ ) od szybkości przepływu eluentu ( $u$ ) nie jest liniowa i posiada maksimum, którego wartość jest tym wyższa im mniejsze są ziarna wypełnienia kolumny ( $d_p$ ). Dalsze zwiększanie prędkości eluentu jest nieopłacalne i z wielu powodów niekorzystne. Zilustrowano to na rys. 7 pokazującym u góry wykresy zależności, otrzymanych na podstawie równań otrzymanych teoretycznie przez Hupe i Lauera oraz poniżej - krzywe, otrzymane na podstawie wyników uzyskanych doświadczalnie podczas pracy nad optymalizacją warunków otrzymywania lantozydu C z ekstraktów suszu brunatnicy wełnistej.



Rys. 7. Zależność produktywności czasowej kolumn chromatograficznych wypełnionych sorbentem o różnych wielkościach ziaren od prędkości przepływu eluentu. Krzywe teoretyczne wzięto z pracy Hupe i Lauera Krzywe eksperymentalne otrzymano podczas badań nad doбором optymalnych warunków procesu otrzymywania lantozydu C.

Oznaczenia: a, b –  $d_p = 102 \mu\text{m}$ ,  $L_c$  odpowiednio: 800 mm (a) i 1600 mm (b);  
c, d, e –  $d_p = 50 \mu\text{m}$ ,  $L_c$  odpowiednio: 400, 800 i 1200 mm; f –  $d_p = 10 \mu\text{m}$ ,  $L_c = 250 \text{ mm}$

## Retencja

Silna retencja składników mieszaniny jest niekorzystna ze względu na nadmierne zużycie eluentu, a przede wszystkim wzrost czasu rozdzielania. Jednakże, dla dwóch substancji o różnej retencji, względnie wolniej rośnie szerokość pasma wraz z ilością dozowanej substancji dla pików o większej retencji, niż dla substancji o niższej wartości  $k$ . Optymalna wartość współczynnika retencji ( $k$ ) dla pierwszego rozdzielanego składnika mieszaniny dwóch substancji nie powinna przekraczać 2-3, a dla ostatniego powinna być większa od 2-3, ale nie wyższa niż ok. 12 [3].

Maksymalizacja selektywności, czyli wartości  $\alpha$ , ma najważniejsze znaczenie dla maksymalizacji wydajności rozdzielania substancji w chromatografii preparatywnej lub procesowej, niezależnie od stosowanej techniki chromatograficznej.

Korzystne jest stosowanie sorbentów o dużej powierzchni właściwej (o ziarnach wypełnienia całkowicie porowatych, albo posiadających nieporowate „jądro”, o bardzo niewielkiej średnicy.

Odkrycie ostatnio technologii otrzymywania, tzw., monolitycznych wypełnień kolumn HPLC o bardzo niskiej wartości impedancji rozdzielania jest szczególnie ważne dla rozwoju wykorzystania chromatografii ciekowej w skali preparatywnej i procesowej. Tego typu kolumny umożliwiają otrzymywanie zasadniczo wyższych wydajności preparatywnego rozdzielania substancji o niewysokich masach cząsteczkowych, niż kolumny „klasyczne”, wypełnione ziarnistym sorbentem.

## Optymalne warunki preparatywnego albo procesowego otrzymywania substancji

Podsumowując przedstawione powyżej reguły optymalizacji warunków preparatywnego lub procesowego rozdzielania substancji z wykorzystaniem chromatografii ciekowej, można podać następujące ogólne zasady maksymalizacji wydajności:

- W przypadku rozdzielania substancji o niskich masach cząsteczkowych, w układach chromatograficznych, charakteryzujących się dobrą kinetyką zjawisk sorpcji – desorpcji oraz, gdy ograniczeniem nie jest dopuszczalne ciśnienie pompowania eluentu, najbardziej korzystne jest stosowanie stosunkowo wysokosprawnych kolumn preparatywnych o optymalnej długości, tym wyższej im większa jest wielkość ziaren wypełnienia kolumny oraz zasadniczo dłuższych, niż wynosiłaby konieczna długość kolumny analitycznej, wypełnionych sorbentem typu HPLC, o małych ziarnach wypełnienia. Jeśli to możliwe, należy stosować wysokosprawne kolumny monolityczne. Jednocześnie należy stosować stosunkowo wysoką, prędkość przepływu eluentu, której optymalna wartość zależy od wielkości ziaren wypełnienia kolumny ( $d_p$ ), znacznie wyższą od prędkości optymalnej dla zależności  $H=f(u)$ .

- W przypadku rozdzielania substancji o wysokich masach molekularnych, albo w przypadku bardzo trudnych problemów rozdzielczych, należy stosować kolumny o maksymalnej możliwej do osiągnięcia sprawności, jednak liniowa prędkość przepływu eluentu, szczególnie dla rozdzielania substancji makromolekularnych powinna być zbliżona do optymalnej dla zależności  $H=f(u)$ , a więc stosunkowo bardzo niska i w tych warunkach produktywność kolumny jest też względnie niska.

- Gdy kinetyka zjawisk sorpcji – desorpcji jest niekorzystna, np. w warunkach chromatografii jonowymiennej, celowe jest stosowanie kolumn, wypełnionych sorbentem o większych ziarnach (25-40 mikrometrów). Konieczne jest wówczas również stosowanie stosunkowo niskich, optymalnych, prędkości przepływu eluentu, jednak wyższych od prędkości optymalnych wg zależności  $H=f(u)$ . Wówczas nie jest możliwe otrzymanie tak wysokiej produktywności kolumny, jak w warunkach opisanych na początku.

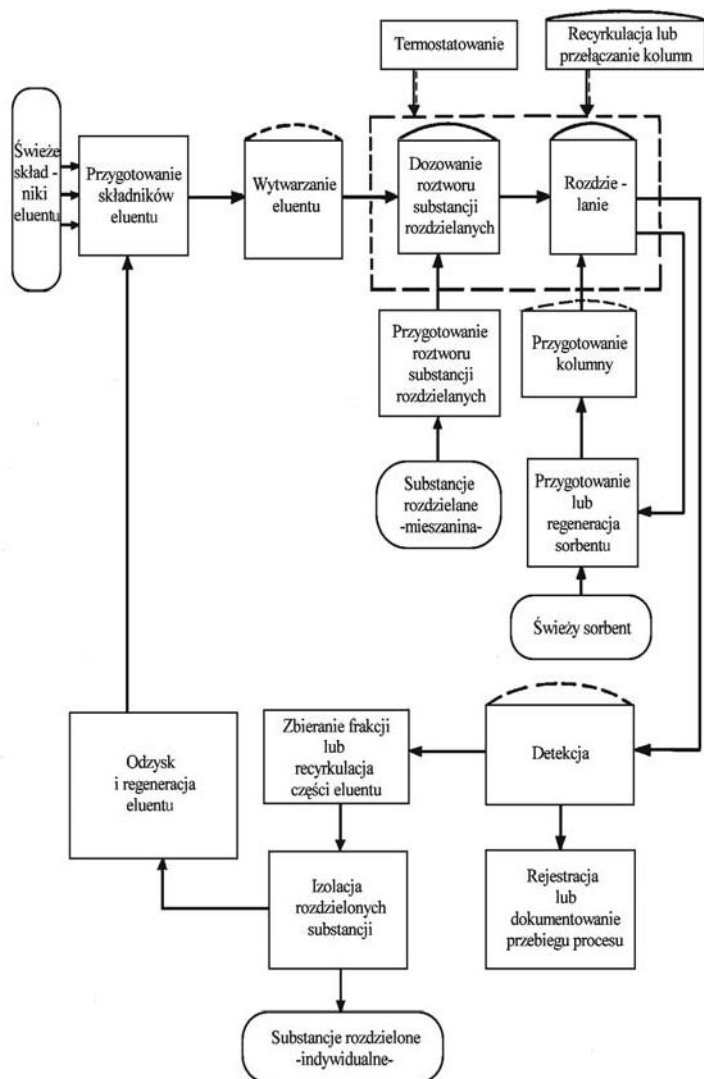
- W każdym przypadku, korzystne jest stosowanie dla celów preparatywnych sorbentów o wysokiej powierzchni właściwej oraz zachowanie niezbyt wysokich wartości  $k$ , pierwszej z rozdzielanych substancji i wartości  $k$  poniżej ok. 12 dla ostatniej substancji eluowanej z kolumny.

- Stosowanie elucji stopniowej, w celu skrócenia ogólnego czasu elucji (czasu jednego etapu rozdzielania), bywa niezbędne. Należy, jednak, wówczas wykonywać reaktywację powierzchni wypełnienia kolumny, co najczęściej wymaga zastosowania eluentu o początkowym składzie w ilości co najmniej 7 objętości martwych kolumny. Bardziej korzystne, niż elucja skokowa, jest stosowanie przepływu zwrotnego eluentu w kolumnie preparatywnej, albo procesowej. Zapewnia to długotrwałe utrzymywanie stałej aktywności powierzchni sorpcyjnej oraz produktywności kolumny, przy minimalnym zużyciu eluentu.

- Stosowanie elucji gradientowej nie jest korzystne. W przypadku rozdzielania peptydów i białek, albo w warunkach chromatografii oddziaływań hydrofobowych, jest jednak, konieczne. Powoduje, w porównaniu do warunków elucji izokratycznej, obniżenie efektywności procesu otrzymywania substancji z powodu zwiększenia czasu trwania jednego etapu rozdzielania o czas reaktywacji kolumny/ Powoduje istotny wzrost kosztów repetycyjnego otrzymywania substancji, tym większy im wyższa jest cena eluentu, wyższy koszt odzysku eluentu i im większa część eluentu ulega utracie (nie może zostać zawrócona do procesu).

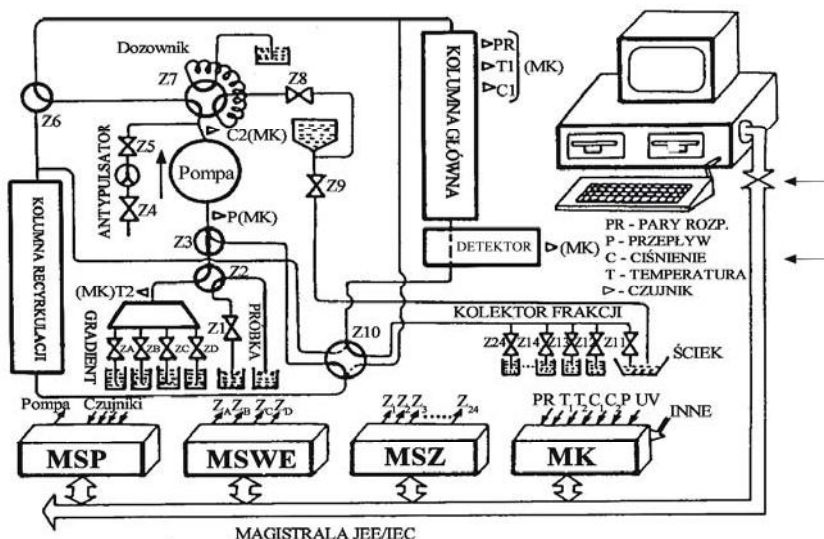
## OPERACJE JEDNOSTKOWE I TECHNOLOGIA ROZDZIELANIA I OTRZYMYWANIA SUBSTANCJI Z ZASTOSOWANIEM PREPARATYWNEJ LUB PROCESOWEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

Na rys. 8 przedstawiono operacje jednostkowe, z których składa się technologia otrzymywania substancji z zastosowaniem chromatografii cieczowej.

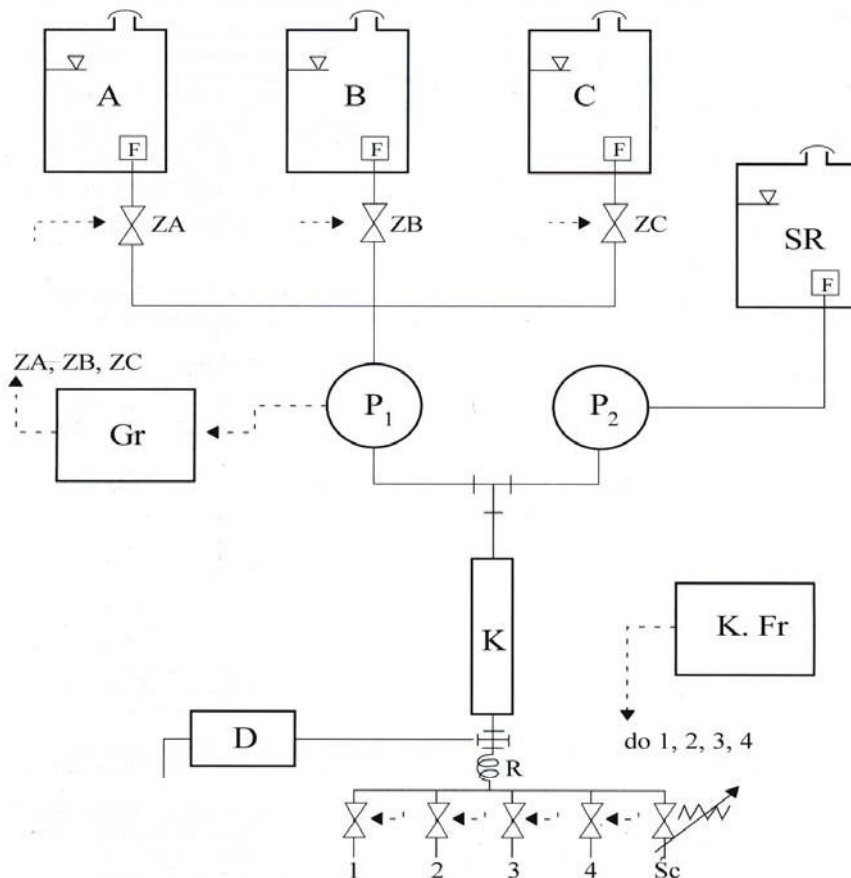


Rys. 8. Schemat technologiczny procesu otrzymywania substancji z wykorzystaniem chromatografii cieczowej procesowej lub preparatywnej


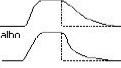



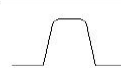



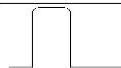

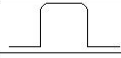

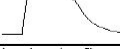
Na rys. 9 i 10 pokazano przykłady schematów ideowych układu aparatów, odpowiednio: do chromatografii preparatywnej (rys. 9) i do chromatografii w skali procesowej (rys. 10).



Rys. 9. Schemat ideowy i funkcjonalny układu zautomatyzowanego – sterowanego komputerem – gradientowego chromatografu preparatywnego z zaworami dwustanowymi ( $Z_1 \dots Z_{24}$ ), z możliwością recyrkulacji części eluentu oraz z podwójnym systemem automatycznie kontrolowanego dozowania roztworu substancji rozdzielanych (dozownik pętlicowy z samoczynnym repetycyjnym napełnianiem pętli z regulowaną objętością cieczy lub dozowanie dużych objętości poprzez zawory  $Z_2$  i  $Z_3$ ), oraz z systemem samoczynnego wykrywania ewentualnych przecieków eluentu. Znaczenie symboli (które nie zostały wyjaśnione na rysunku lub powyżej): P – pompa ssąco-tłocząca o małej objętości skokowej, Z – zawory (A – D: programowanie składu eluenta, 1 – 10: sterowania przebiegiem procesu separacji, 11 – 24: kolekcji frakcji); MSP – moduł sterowania pompą, MSWE – moduł sterowania „niskociśnieniowym” systemem gradientowym, MSZ – moduł sterowania zaworami, MK – moduł komunikacji z użytkownikiem i wzajemnej koordynacji programów, obsługi awarii oraz kontroli warunków pracy kolumn (moduł o nadrzędnych priorytetach, może umożliwiać wykorzystywanie komputera do innych zadań w przypadku bezawaryjnej pracy aparatu, a w przyszłości ewentualne wyeliminowanie konieczności stosowania komputera) – obecnie część funkcji tego modułu powierzono nadrzędnemu komputerowi

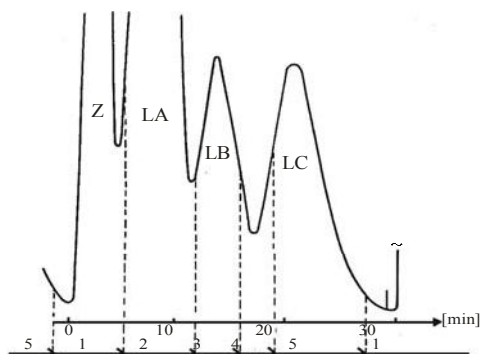


Rys. 10. Schemat ideowy chromatografu preparatywnego w dużej skali separacji lub chromatografu procesowego. Oznaczenia: A, B, C – składniki eluentu i odpowiednie zbiorniki; SR – roztwór rozdzielonych i odpowiedni zbiornik; P1 – pompa główna z programowaniem składu eluentu; P2 – pompa dozująca roztwór substancji rozdzielonych (P1 i P2 włączona alternatywnie); Gr – programator i sterownik programu elucji, K – kolumna PLC, D – detektor; R – „restryktor”, K.Fr – sterownik kolektora frakcji, ZA, ZB, ZC – zawory proporcjonujące, 1, 2, 3, 4 – zawory kolektora frakcji, F – filtry ssawne, Sc – ściek

Typ	Opis	Schemat	Kształty impulsu stężeniowego	Uwagi:		
				$V_i$	Skala	
Zawór z pętlowym zasobnikiem próbki	Najczęściej sześciopoleżonowy dwupoleżonowy zawór dozujący z zasobnikiem w formie pętli wykonanej z rurki. Możliwe różne kształty pętli	 <p>a. pętla „zwykła”</p>		0,5 ml (do 50 ml)	Analit. modelowa preparat.	$\sigma_v^2 = V_i^2/B \cdot 12$ 1. Re < 2100: Im większe natężenie przepływu cieczy wymywającej, im mniejsza średnica rurki zasobnika, oraz im bardziej zbliżone lepkości i napężcia powierzchniowe cieczy wymywanej i wymywającej, tym bardziej korzystny profil dozowania
		 <p>b. pętla o małym prom. krzywizny</p>		j.w.		
		 <p>c. pętla typu „S”</p>		j.w.		
Zawór dwupoleżonowy z innym zasobnikiem niż pętla	Zasobnik w postaci kolumny z warstwą porowatą			0,1 ml do 1000 ml	Modelowa do proces.	Rzadko używany w praktyce ze względu na konieczne nadciśnienie podczas napełniania pojemnika
	Zasobnik w postaci „pseudo-strzykawki”			0,5 ml do 500 ml (do 5000 ml)	j.w.	Oferowany przez Amicon. Bardzo korzystny profil dozowania
Dozowanie pompą	6a. Dodatkowa pompa dozująca			od 0,5 ml	j.w.	Rozwiązanie kosztowne, gwarantujące bardzo korzystny profil dozowania
	6b. Dozowanie pompą tłoczącą eluent			od 10 ml	j.w.	Tylko z pompą o b. niskiej objętości skokowej

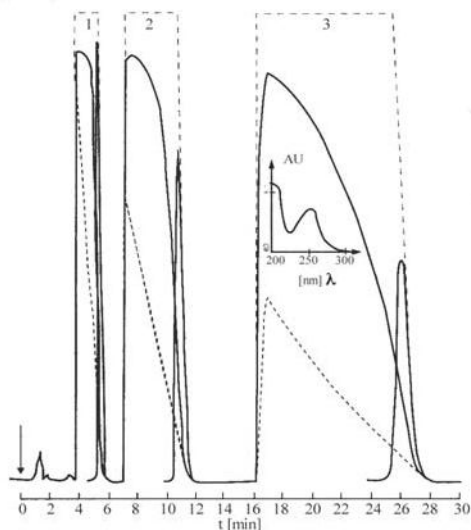
Rys. 11. Schematy ideowe różnych rozwiązań technicznych dozowania wsadu w chromatografii preparatywnej lub procesowej

Na rys. 12 zamieszczono przykład chromatogramu otrzymanego w czasie jednego etapu repetycyjnego rozdzielania zanieczyszczonej mieszaniny lanatozydów A, B, i C w warunkach chromatografii procesowej – produkcja lanatozydu C (LC) z metanolowego ekstraktu z suszu zioła - brunatnica włniśta (*digitalis lanata*), z wykorzystaniem kolumny chromatograficznej o średnicy wypełnienia: 150 mm.



Rys. 12. Przykład chromatogramu uzyskanego w czasie trwania jednego etapu cyklicznej izolacji lanatozydu C z odpadu produkcyjnego z wykorzystaniem kolumny 800x150 mm, wypełnionej żelem krzemionkowym 60A  $d_p=50\mu\text{m}$  ( $N_0=1600$ ); Warunki: Eluent –  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$  92:8:0,2 v/v, natężenie przepływu 2200 ml/min, ciśn. 26 bar, temperatura pokojowa, detektor UV 254nm. Poniżej osi czasu podano numery zbiorników, gdzie zostają kierowane frakcje

Na rys. 13 pokazano kilka chromatogramów otrzymanych bez przeładowania kolumny (w warunkach „analitycznych – piki gaussowskie”) i w warunkach przeładowania stężeniowego (piki pozostałe), otrzymane z przekroczeniem liniowości zakresu odpowiedzi detektora UV, jak i zastosowaniem kilku sposobów postępowania dla uniknięcia przekroczenia liniowego zakresu wskazań detektora - bardzo mała droga optyczna – 2 mm, a nawet 0.5 mm, i / albo wybór długości fali o niskich wartościach absorbancji molarnej rozdzielanych substancji – 220 nm, albo 290 nm, zamiast 250 nm.



Rys. 13 Przykłady kilku chromatogramów uzyskanych dla tych samych ilości estrów kwasu 4OH benzoowego rozdzielanych w warunkach typowego przeładowania stężenia kolumny, z wyjątkiem gaussowskich pików narysowanych linią cienką ciągłą, które dotyczą braku przeładowania; W warunkach przeładowania stężenia zastosowano następujące warunki detekcji:

- 280 nm, 2,56 AU/FS, kuweta 10 mm
- - - - - 280 nm, 1,28 AU/FS, kuweta 0,5 mm
- 254 nm, 1,28 AU/FS, kuweta 0,5 mm

Zamieszczone ilustracje i podpisy pod nimi, umożliwiają uzyskanie ogólnej orientacji w zakresie stosowanych operacji jednostkowych i alternatywnych sposobów ich realizacji w praktyce w chromatografii cieczowej w skali preparatywnej lub procesowej. Opis bardziej szczegółowy przekracza ramy tego opracowania. Zainteresowany czytelnik powinien skorzystać ze specjalistycznej literatury, albo z bardziej obszernego podręcznika na temat preparatywnej i procesowej chromatografii cieczowej.

## **KOLUMNY DO CHROMATOGRAFII PREPARATYWNEJ I PROCESOWEJ – WYMAGANIA I ZASADY ICH SPEŁNIENIA W PRAKTYCE**

Kolumny do chromatografii preparatywnej są zawsze bardziej skomplikowanej konstrukcji, niż do kolumny do chromatografii analitycznej. Jed-



nakże, w kolumnach preparatywnych zachodzą takie same zjawiska fizykochemiczne i hydrodynamiczne jak w kolumnach analitycznych. Dotyczy to zasad opisu retencji i selektywności układu chromatograficznego, a także zjawisk decydujących o sprawności rozdzielania i wpływających na liczbę pól teoretycznych kolumny, z zastrzeżeniem, konieczności rozpatrywania, w obu wypadkach, warunków przekroczenia zakresu liniowości izotermy sorpcji, tzn. rozpatrywania warunków przeładowania kolumny.

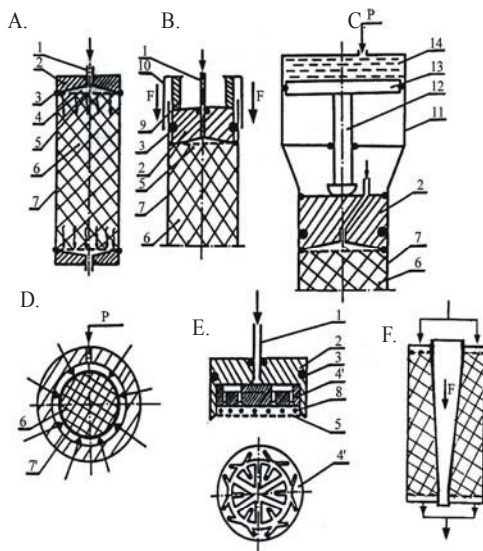
W związku z wykorzystywaniem do celów preparatywnych i procesowych kolumn o znacznie większej średnicy niż kolumny analityczne pojawiają się dodatkowe trudności oraz problemy. Jednym z nich jest konieczność zapewnienia równomiernego rozprowadzenia roztworu rozdzielanych substancji oraz eluentu na całym przekroju poprzecznym wypełnienia kolumny i takiego samego odbierania eluatu opuszczającego kolumnę. Musi to zapewnić optymalna konstrukcja głowic - rozprowadzających eluent na powierzchni warstwy wypełnienia kolumny i zbierających eluat z powierzchni złoża kolumny.

Istnieje wiele konstrukcji preparatywnych kolumn chromatograficznych, w których powyższe wymagania zostały w różny sposób - najczęściej poprawnie - rozwiązane. Na rys. 14 zamieszczono kilka przykładów schematów budowy kolumn chromatograficznych, stosowanych do preparatywnego, albo procesowego rozdzielania substancji, a w opisie rysunku zamieszczono potrzebne wyjaśnienia.

Ważny problem, to zapewnienie długookresowej stabilności wypełnienia kolumny, gdy stosunek średnicy kolumny i średnicy ziarna wypełnienia często jest większy od 1000, a nawet 10000, a ziarna wypełnienia są wyjątkowo małych rozmiarów. W tych warunkach oddziaływanie ścian - stabilizujące strukturę złoża w kolumnie, tak ważne w reaktorach chemicznych z wypełnieniem, albo także w kolumnach analitycznych - w kolumnach procesowych i preparatywnych praktycznie nie ma miejsca. W tej sytuacji szczególne znaczenie ma poprawne, równomierne i zwarte (ale nie nadmiernie zwarte) upakowanie kolumny. Wykorzystywane są też dodatkowo, specjalne sposoby stabilizacji struktury złoża w czasie rozdzielania, takie jak tzw. „dynamiczna kompresja aksjalna” (DAC), lub kompresja „aksjalno-radialna”, lub ma miejsce kompresja złoża w kolumnie za pomocą mechanizmu śrubowego, niekiedy z zastosowaniem sprężyn regulujących siłę docisku przesuwnej głowicy (patrz rys. 14).

Poprawne działanie głowicy wlotowej - wprowadzającej ciecz do kolumny i wylotowej, wyprowadzającej eluat z kolumny oraz charakter profilu przepływu cieczy w warstwie wypełnienia kolumny preparatywnej, lub procesowej, zależny od właściwości złoża (promieniowego rozkładu porowatości między-ziarnowej i promieniowego rozkładu ziaren pod względem wielkości, i ma decydujący wpływ na szerokość i kształt pików chromatograficznych otrzymywanych z zastosowaniem kolumny preparatywnej, bądź procesowej, niezależnie od stopnia przeładowania kolumny. Sprawność kolumny mierzona liczbą pól teoretycznych (N), nie powinna zależeć od średnicy kolumny. Tylko wówczas może mieć miejsce całkowite podobieństwo warunków

fizycznych i hydrodynamicznych w kolumnie modelowej i preparatywnej lub procesowej. Na wlocie do obu kolumn i na wylocie i na wylocie z nich, powinno mieć miejsce, odpowiednio, równomierne rozprowadzanie cieczy na cały przekrój poprzeczny wypełnienia / równomierne zbieranie z całego przekroju poprzecznego wypełnienia kolumny. Zasadnicze znaczenie ma taki sposób wypełniania kolumny, aby profil prędkości przepływu cieczy w całym przekroju poprzecznym kolumny i wzdłuż całej długości wypełnienia, był płaski, tzn. „łódkowy”, a także taki sposób wprowadzania strefy dozowanej do kolumny, aby już na początku nie było zniekształcenia, którego nie można zmienić w czasie trwania elucji.



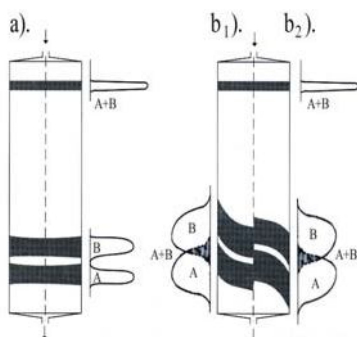
Rys. 14. Zasady budowy i działania ważniejszych typów kolumn i głowic dystrybucyjnych do preparatywnej i procesowej chromatografii cieczowej

**Typy kolumn** (ciąg dalszy opisu rys. 14.): A – kolumna z nieruchomymi głowicami; B – kolumna z co najmniej jedną głowicą przesuwaną, dociskaną śrubami lub poprzez połączenie gwintowe nakrętki (10) z korpusem (7); C – kolumna z co najmniej jedną głowicą dociskaną do złoża z wykorzystaniem siłownika hydraulicznego lub pneumatycznego, tzn. kolumna wyposażona w tzw. „system dynamicznej kompresji aksjalnej złoża (DAC)”; D – kolumna o elastycznych ścianach wyposażona w system promieniowej kompresji złoża (patent f-my Waters); F – kolumna o radialno-aksjalnej kompresji złoża.

**Typy głowic dystrybucyjnych:** A, B, C – głowice z wolną przestrzenią dystrybucyjną w formie stożka o kącie wierzchołkowym 140-165° (patent f-my Amicon); E – jedna z uproszczonych form typoszeregu głowic dystrybucyjnych opracowanych w Politechnice Gdańskiej,

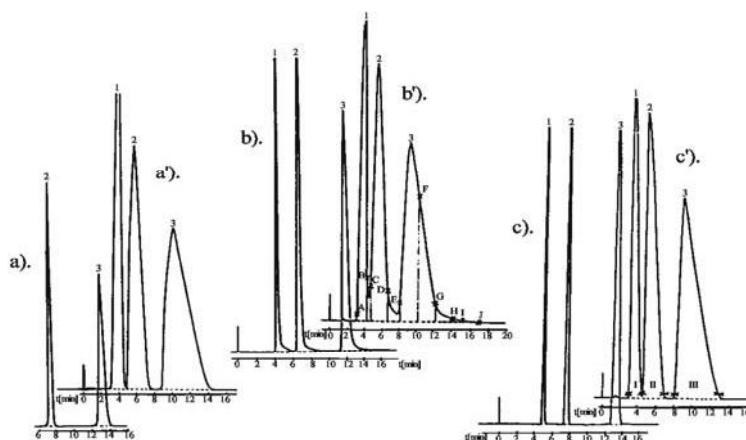
**Oznaczenia:** 1 – przewód doprowadzający eluent lub roztwór dozowany, 2 – korpus głowicy, 3- uszczelka główna, 4 – przestrzeń dystrybucyjna, 4' – wkładka dystrybucyjna z systemem rowków poziomych i poprzecznych otworków, 5 – spiek porowaty lub „tkanina” z drutu kwasoodpornego, 6 – materiał wypełnienia kolumny, 7, 7' – korpus kolumny, odpowiednio: rura kwasoodporna lub z elastycznego chemoodpornego tworzywa sztucznego, 8 – siatka tkana ze stonkowo grubego drutu (0,3-1,0 mm) lub wkładka z rowkami zapewniającymi promieniowy rozływ cieczy w głowicy, 9 – tuleja dystansowa, 10 – nakrętka lub pokrywa dociskana śrubami, 11 – korpus siłownika hydraulicznego lub pneumatycznego, 12 – trzpień tłoczyska, 13 – tłoczysko, 14 – płyn tłoczący

Można stwierdzić, że w praktyce, większość niepowodzeń preparatywnego stosowania chromatografii cieczowej jest spowodowane nieumiejętnością zapewnienia łukowego profilu przepływu eluentu w kolumnie oraz wystarczającej stabilności mechanicznej wypełnienia kolumny. Na rysunku 15 pokazano związek kształtu pików chromatograficznych z profilem przepływu eluentu w kolumnie. Strefy substancji są w każdym przypadku rozdzielne w przestrzeni wypełnienia kolumny. Jednakże na wylocie z kolumny tylko łukowy profil przepływu zapewnia całkowite rozdzielenie. W przypadku profilu nie łukowego, dowolnego typu, na wylocie z kolumny następuje „wtórne” wymieszanie stref rozdzielonych w kolumnie.



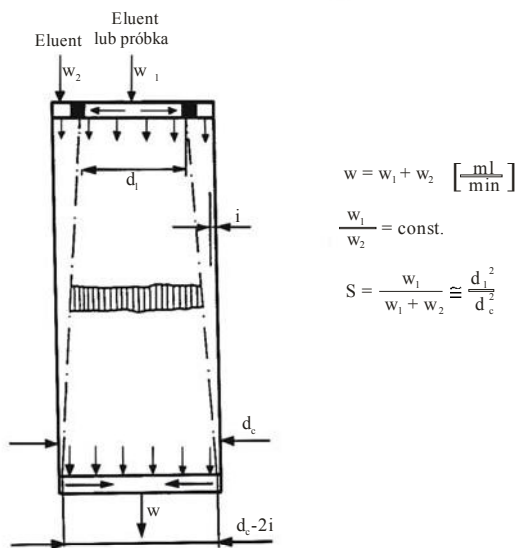
Rys. 15. Ilustracja uzasadniająca konieczność istnienia łukowego (płaskiego) profilu przepływu cieczy w przestrzeni wypełnienia kolumny preparatywnej oraz pokazująca niekorzystny wpływ zniekształcenia stref w kolumnie z p-tu widzenia wymagań, co do czystości substancji:

- a) Kolumna charakteryzująca się łukowym profilem przepływu eluentu;
- b) Kolumna o niższej przepuszczalności w rejonie przyściennym niż w pobliżu osi – półprzekrój;
- c) Kolumna o wyższej przepuszczalności w rejonie w przyściennym niż w pobliżu osi – półprzekrój



Rys. 16. Zestawienie odpowiadających sobie chromatogramów otrzymanych w warunkach braku przeładowania – a, b, c oraz w warunkach typowego przeładowania stężeniowego – a', b', c' z wykorzystaniem kolumny analitycznej (120x4 mm i.d.) – a, a' oraz preparatywnej (120x32 mm i.d.) – b, b'; c, c'

Nie opanowany do końca problem stanowi też występowanie nie wyjaśnionego dotychczas w pełni, efektu tzw. „ogonowania” pików przy linii bazowej - przy „podstawie” pików po stronie zstępującej - w przypadku większości komercyjnych kolumn preparatywnych HPLC, wypełnionych metodami „na mokro”. Tego typu zniekształcenie pików skutkuje otrzymaniem mniej czystych substancji, jak by to było możliwe, gdyby efektu tego nie było. Na rys. 16 i 17 zilustrowano ten problem oraz pokazano, że najbardziej efektywnym sposobem uniknięcia jego skutków, jest stosowanie kolumny preparatywnej HPLC, w warunkach tzw. nieskończonej średnicy. Takie rozwiązanie zaproponowanych przed laty Knox dla kolumn analitycznych i semi-preparatywnych, charakteryzujących się niekorzystnym profilem przepływu eluentu w rejonie przyściennym wypełnienia kolumny. Stosowanie warunków nieskończonej średnicy wiąże się ze zmniejszeniem wydajności kolumny, ale jest ono, tym mniejsze, im większa jest średnica kolumny i im mniejsza jest wielkość ziaren wypełnienia.



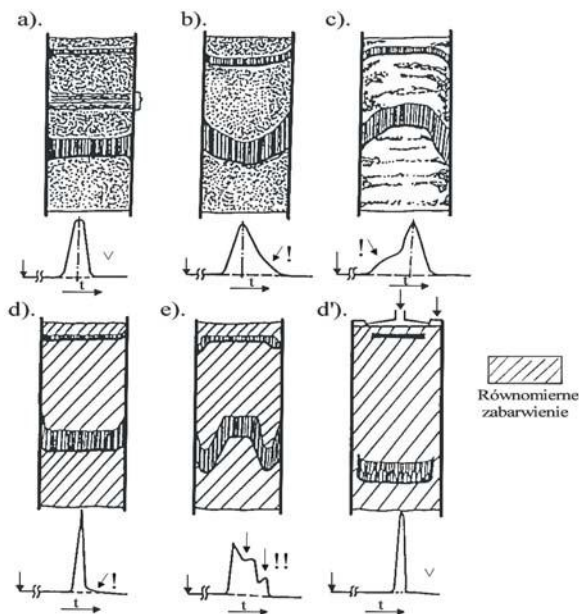
Rys. 17. Model optymalnego wykorzystania kolumny preparatywnej w warunkach nieskończonej średnicy z ograniczeniem penetracji przez substancje eluowane strefy przyściennej w kolumnie o grubości „i”

Wypełnienie kolumn: Nucleosil C18 7  $\mu\text{m}$ ; Kolumny wypełnianie na mokro sposobami stosowanymi dla kolumn komercyjnych; b, b' - kolumna preparatywna była eksploatowana w sposób „klasyczny”, tzn. z wykorzystaniem całej powierzchni przekroju poprzecznego dla rozdzielania; c, c' – ta sama kolumna stosowana w optymalnym wykorzystaniu warunków nieskończonej

średnicy ( $s=76\%$ ). Na chromatogramach b' i c' oznaczono zakresy zbierania frakcji eluentu, poddanych następnie analizie. Substancje rozdzielane: estry kwasu 4 OH benzoowego, masa substancji dozowanych do kolumny w warunkach przeładowania stężeniowego: ester etylowy – 95 mg, ester etylowy 120 mg, ester propylowy 137 mg, masa substancji dozowanych do kolumny analitycznej ok. 60 razy mniejsza niż do kolumny preparatywnej; eluent:  $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$  1:1 V/V,  $w=0,97$  ml/min ( $d_c=4$  mm) oraz  $w=58$  ml/min ( $d_c=32$  mm) (74 bar), detektor UV 280 nm, czułość 1,28 AU/FS, kuweta o drodze optycznej 0,5 mm.

W przypadku wypełnień o wielkości ziaren ponad ok. 25 mikrometrów, kolumny można napełniać na sucho, stosując, np. metodę udarową (udarowanie kolumny w pionie, przy bardzo niewielkiej intensywności, jest bardziej korzystne od udarów intensywnych). W przypadku stosowania wypełnień o ziarnach poniżej ok. 25 mikrometrów, nie można w sposób zadowalający wypełnić kolumn chromatograficznych metodami „na sucho” i konieczne jest stosowanie metod „na mokro” z wykorzystaniem zawiesiny wypełnienia w odpowiednio dobranej cieczy. Często stosuje się pompowanie cieczy, albo jej wyłaczanie za pomocą tłoka, tworząc wypełnienie kolumny w czasie filtracji złoża, narastającego na powierzchni głowicy odbiorczej kolumny, albo pompując zawiesinę z zastosowaniem jednej z głowic umieszczonych w kolumnie.

Na rys. 18 przedstawiono przykłady wyników badania związku między profilem przepływu cieczy w preparatywnej kolumnie do chromatografii cieczowej, warunkami wypełniania kolumny i występowaniem tzw. efektu auto-segregacji ziaren wypełnienia kolumny pod względem wielkości. Widać, że także wówczas, gdy nie występuje auto-segregacja ziaren pod względem wielkości, może mieć miejsce nie-tłokowy profil przepływu cieczy w kolumnie i zniekształcenie pików chromatograficznych, a w konsekwencji zmniejszenie wydajności kolumny i czystości otrzymywanych substancji. Widać też, że przyczyną efektu „ogonowania” pików w przypadku kolumn preparatywnych HPLC, wypełnionych „na mokro” nie jest zjawisko „auto-segregacji” ziaren wypełnienia w kolumnie. Widać również, że stosowanie warunków nieskończonej średnicy może skutkować otrzymywaniem czystych substancji tylko wtedy, gdy przyczyną problemu jest „ogonowanie” pików.



Rys. 18. Przykłady reprezentowanych rezultatów uzyskanych podczas doboru optymalnych warunków wypełnienia kolumn preparatywnych o średnicy 32-52 mm, wykonanych z zastosowaniem mieszaniny dwóch różnobarwnych frakcji żelu krzemionkowego o zakresie wielkości ziaren 22 do 45  $\mu\text{m}$  (frakcja bezbarwna: 22 do 35  $\mu\text{m}$  i frakcja zabarwiona: 30 do 45  $\mu\text{m}$ ) z uwzględnieniem kształtów stref barwnika Sudan I „zatrzymanego” w przekroju poprzecznym wypełnienia kolumny oraz odpowiadające tym kolumnom kształty pików chromatograficznych na chromatogramach testowych.

Warunki wypełnienia kolumn: A, B, C – wypełnianie na sucho metodą udarową z równomiernym doprowadzeniem sorbentu do kolumny podczas wypełniania w warunkach, odpowiednio: A – optymalnych (prędkość narostu złoża podczas wypełniania ( $u_t$  - ok. 1 cm/min) – cyfrą „1” oznaczono wygląd przekroju wypełnienia obserwowany również niekiedy w optymalnie wypełnionej kolumnie),

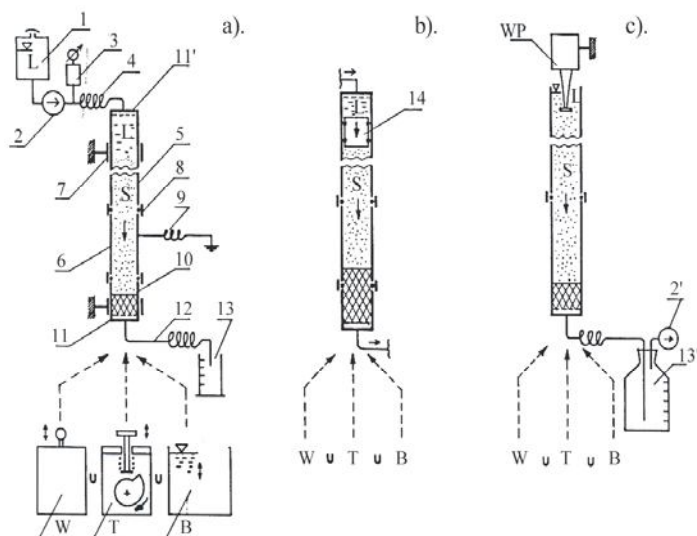
B – przy zbyt szybkim doprowadzaniu sorbentu do kolumny ( $u_t$  - ok. 3 cm/min),

C – przy zbyt powolnym doprowadzaniu sorbentu do kolumny ( $u_t$  - ok. 0,22 cm/min),

D, D', E – wypełnianie kolumny na mokro, odpowiednio: metodą filtracyjną lub tłokową w warunkach optymalnych (przykłady D, D') i sedimentacyjno-wibracyjną (przykład E), (w przypadku D' zastosowano głowicę dystrybucyjną zapewniającą realizację warunków nieskończonej średnicy w kolumnie ( $S=50\%$ ) wypełnionej w tych samych warunkach jak w przykładzie D). Długości warstwy wypełnienia w kolumnach: 15-25 cm

Na rys. 19 pokazano schematycznie kilka alternatywnych sposobów wypełniania „na mokro” kolumn preparatywnych HPLC. Warto zwrócić uwagę na metodę pokazaną na rys. 19b, nie tyle dlatego, że jest oryginalna i autor nie spotkał w literaturze propozycji jej stosowania, ale przede wszystkim dlatego, że jest prosta w realizacji, bardzo skuteczna w praktyce i może zostać zastosowana w każdym laboratorium, które ma możliwość wykonania w warsztacie mechanicznym kilku prostych metalowych elementów oraz po-

siada jakąkolwiek pompę, mającą ograniczenie maksymalnego ciśnienia pompowania. Schemat a dotyczy procedur postępowania realizowanych najczęściej przez producentów kolumn. Schemat b, to stosowanie „tłoka” uszczelnionego względem ściany kolumny, oddzielającego zawiesinę wypełnienia od medium tłoczącego, którym może być sprężone powietrze (w istocie pompa stało-ciśnieniowa). Schemat c dotyczy metodyki zalecanej do wypełniania na mokro kolumn preparatywnych sorbentami o wielkości ziaren powyżej 20 mikrometrów, z zastosowaniem zasysania cieczy tworzącej zawiesinę.



Rys. 19. Zestawienie schematów instalacji do badań „kombinowanych” metod wypełnienia kolumn preparatywnych HPLC i MPLC na mokro,

- Kombinacja metody zawiesinowej z wibracjami lub udarowaniem zespołu kolumna – zbiornik z zawiesiną
- Kombinacja metody dynamicznej kompresji aksjalnej z zastosowaniem „pływającego” tłoka z wibracjami lub udarowaniem
- Udarowanie albo wibrowanie zespołu kolumn – zbiornik z zawiesiną, albo wykorzystanie wibratora pogrążalnego – z jednoczesnym zasysaniem cieczy tworzącej zawiesinę

Elementy 1-13 powtarzają się na rysunku b w całości, natomiast na rysunku c nie stosowano elementów 1-4 oraz 10 i głowicy górnej 11.

Oznaczenia:

1 – zbiornik z ciecżą konsolidującą „L”, 2 – pompa wodna tłokowa, ( $w = \text{const} = 0-1 \text{ l/min}$  lub  $P = \text{const} = 0-300 \text{ bar}$ ), 3 – zawiesina „s”, 6 – kolumna, 7- uchwyt suwliwy, 8 – łącznik i uszczelnienie, 9 – kabel uziemiający, 10 – post-kolumna wstępnie częściowo wypełniona na sucho ( $d_p = 60 \mu\text{m}$ ), 11, 11' – głowice wylotowa i wlotowa, 12 – przewód wlotowy (rurka), 13, 13' – cylinder miarowy lub zbiornik próżniowy, 14 – „pływający tłok”

W – wzbudnik wibracji wraz z czujnikiem wibracji i oscyloskopem, T - urządzenie udarowania kolumn [31], B – łożnia ultradźwiękowa, WP – pogrążalny wzbudnik ultradźwiękowy

**LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA** (pozycje w posiadaniu Biblioteki Wydziału Chemicznego PG, w przypadku niektórych pozycji - istnieją na rynku nowsze wydania)

w języku angielskim

1. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, "Practical HPLC Method Development", Willey, New York, NY, 1998.,
2. J. Cazes (ed), "Encyclopedia of Chromatography", Marcel Dekker, New, York, 2001.,
3. P. Jandera, J. Churacek, "Gradient Elution in Column Liquid Chromatography", Elsevier, Amsterdam, 1985.,
4. O. Mikes, "HPLC, of Biopolimers and Biooligomers", Elsevier, Amsterdam, 1988.,
5. J.W. Dolan, L.R. Snyder, "Troubleshooting LC Systems", Humana Press, Clifton, New York, 1989.,
6. K. Hostettman, A. Morston, "Preparative Chromatography – Techniques, Applications", Springer Verlag, 1998.,
7. H. Jork, W. Funk, W. Fischer, H. Wimmer, "Thin-Layer Chromatography – Reagents and Detection Methods", vol. 1a – *Physical and Chemical Detection Methods: Fundamentals, Reagents*, VCH Publishers, Weinheim, 1990.,
8. D. M. Ruthven, "Encyclopedia of Separation Technology", vol. 1-2, J. Willey. 1997.,
9. A.S. Grandisson (ed), M.J. Lewis (ed), "Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries – *Principles and Applications*", Woodhoed Publ. Ltd., Cambridge, England, 1998,
10. V. R. Mayer, "Practical High-Perfomace Liquid Chromatography", John Wiley and Sons, Chichester, 1994

w języku polskim

1. Z. Witkiewicz, „Podstawy chromatografii”, wyd. II, a szczególnie III, WNT, Warszawa, odpowiednio: 1992, 2000, 2005.
2. D. Berek, M. Dressler, M. Kubin, K. Marcinka. „Chromatografia żelowa”, PWN, Warszawa, 1989.
3. R. Rosset, H. Kołodziejczyk, „Współczesna chromatografia cieczowa - ćwiczenia i zadania”, PWN, Warszawa 2001.
4. B. Walczak, J. Śliwiok, „Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)”, Skrypty Uniwersytetu Śląskiego, *skrypt nr 429*, Uniwersytet Śląski, Katowice 1989.
5. Z. Witkiewicz, „Nowe kierunki w chromatografii”, WNT, Warszawa 1988.
6. M. Kamiński, „Problemy stosowania kolumnowej chromatografii cieczowej, jako metody otrzymywania substancji”, rozprawa habilitacyjna, Politechnika Gdańska, Gdańsk, 1992.



*Pozycje o znaczeniu historycznym, ale opisane zasady teoretyczne są nadal aktualne i przydatne dla zrozumienia zjawisk:*

7. R.J. Hamilton, P.A. Sewell, „Wysokosprawna chromatografia cieczowa”, PWN, 1982.
8. J.S. Kowalczyk (ed.), „Podstawy podziałowej i adsorpcyjnej chromatografii cieczowej”, Wrocław, Warszawa, Kraków, Gdańsk, Zakład Narodowy im. Ossolińskich, Wydawnictwo Polskiej Akademii Nauk, Ossolineum, 1973.
9. A. Zlatkis (ed), V. Pretorius, (ed), „Preparatywna chromatografia gazowa”, WNT, Warszawa 1975.
10. L. R. Snyder, „Principles of Adsorption Chromatography”, Merce Dekker, Nowy York, 1968
11. E. Stahl, „Thin-Layer Chromatography – A Laboratory Handbook”, Springer, Berlin, wydanie drugie 1969.
12. J.J. Kirkland (praca zbiorowa), „Współczesna chromatografia cieczowa”, PWN, Warszawa, 1976

## LITERATURA ŹRÓDŁOWA

1. Bildingmayer B.A., Preparative Liquid Chromatography , (P.D. McDonald Ed), Elsevier, Amsterdam, 1987.
2. Hostettman K., Preparative Chromatographic Technics: Applications in Natural Product Isolation, Springer - Verlag, 1986.
3. Scaven M.D. and Hammond P.M., J.Chem. Tech. Biotechnol. 46, 85 (1989).
4. Jones K., Chromatographia, 25, 437, 443, 547, 577 (1988).
5. Kamiński M., Rozprawa habilitacyjna, Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Gdańsk 1992.
6. Knox J.H., Pyper H. M., J. Chromatogr. 363 , 1 (1986).
7. Cox G.B., Snyder L.R. and Dolan L.W., J. Chromatogr., 484, 409, 425, 483, (1989).
8. Wawrzynowicz T., Soczewiński E. and Czapińska K., Chromatographia, 20, 223 (1985).
9. Soczewiński E, Czapińska K. and Wawrzynowicz T., Separ. Sci., 22, 210 (1987),
10. Verzele M., de Conink M., Vinderogel J. and Develee C., J. Chromatogr., 450, 47 (1988).
11. Katti A. and Guiochon G., Anal. Chem. 61, 982 (1989).
12. Proceedings of the 9th International Symposium “Preparative and Industrial Chromatography” PREP-92, 6-8 April, 1992 Nancy, France.,
13. Kamiński M., Śledzińska B. and J. Klawiter., J. Chromatogr., 367, 45 (1986).

14. Hupe K.P. and Lauer H.H., J. Chromatogr., 203, 41 (1981).
15. Guiochon G., J.Chromatogr., 185, 3 (1979).
16. Klawiter J., Kamiński M. and Kowalczyk J.S., J. Chromatogr., 243, 207 (1982).
17. Leutert Th. von Arx E., J. Chromatogr., 292, 33 (1984).
18. Kamiński M., Reusch J.F., Preparative Chromatography, 1(4), 367 (1992).
19. Kamiński M., Reusch J.F., J. Chromatogr., 356, 47 (1986).
20. Coq B., Cretier G., Rocca J.L. and Portlhault M., J. Chromatogr. Sci., 19, 1 (1981).
21. Martin C.W., Shalon Y., LC-GC 5, 23 (1985).
22. M. Kamiński, Proceedngs of the 17 th International Symposium on "Column Liquid Chromatography - HPLC'93", GDCh, Hamburg, May 9-14, 1993, vol. 1,2.
23. Snyder L.R., Cox G.B and Antle P.E., Chromatographia, 24, 82 (1987).
24. Kamiński M., J. Chromatogr., 589, 61 (1991).
25. Goddings J.C., Dynamics of Chromatography, Marcel Dekker, New York, 1965.
26. Wroński S., Molga E., Chem. Eng. Process, 22, 123 (1987).
27. Knox J.H., J. Chromatogr. Sci., 15, 352 (1977).
28. Carbonell R.D. and Mc Coy B.L., Chem. Eng. J., 9, 115 (1975).
29. Francotte E., Junker-Buchheit A., J. Chromatogr., 576, 1 (1992).
30. Unger K.K., Proceedings of "HPLC'93", Hamburg May 1993,
31. Godbille E., Devaux P., J. Chromatogr., 122, 317 (1976).
32. Collin H., Hilaireau P., de Tounemire J., LC-GC, 3, 40 (1990).
33. Kamiński M. , Klawiter J., Kowalczyk J.S., J. Chromatogr., 243, 225 (1982),
34. Kozak M.W., Davis E.J., Jour. Coll Interface Sci., 127, 497 (1989), 129, 166 (1989).
35. Głód B., Thesis, IChF Wa-wa 1985.
36. Kamiński M., Reusch J.F., J. Chromatogr., 436, 367 (1988).