

# Chromatografia gazowa i cieczowa

– opis metody oraz zastosowanie

Związki chemiczne występują w przyrodzie w postaci mieszanin i w takiej też postaci są najczęściej otrzymywane drogą syntezy. Pojęcie rozdzielania mieszanin związków chemicznych było więc podstawowym problemem nauk chemicznych. W procesie owego rozdzielania mieszanin wykorzystuje się różne właściwości fizyczne, fizykochemiczne i chemiczne składników. Opracowano wiele metod rozdzielania substancji, zarówno na skalę mikro, jak i makro. Wśród klasycznych metod wymienić można: filtrację, odparowywanie, krystalizację, sedymentację, dekantację czy destylację. Zaliczyć tu należy także metody chromatograficzne.

## Nadzieja Gawenda

Zastępca Kierownika Laboratorium Ds. Rozwoju i Wdrożeń  
Zakład Farmaceutyczny AMARA Sp. z o.o.



## Co to jest chromatografia?

Chromatografia to wyraz powstały połączenia dwóch leksemów pochodzących z języka greckiego: *chromatos*, czyli 'barwa' i *grapho*, czyli 'pisze'. Za ojca chromatografii uznaje się Michaiła Siemionowicza Cwieta, rosyjskiego botanika, fizjologa i biochemika. Pierwsze prace prowadził on, używając roztworu chlorofilu w eterze naftowym, który przesączał przez ubitą kredę, opracował tym samym chromatografię kolumnową. Prowadził również badania nad rozdzielaniem barwników roślinnych – rozdzielił chlorofil i ksantofil, dlatego też uznawany jest za odkrywcę karotenoidów.

Chromatografia jest metodą rozdzielania mieszanin, w których rozdzielane składniki ulegają podziałowi między dwie fazy – nieruchomą (stacjonarną) i ruchomą (mobilną) – układu chromatograficznego. Fazą ruchomą może być gaz, ciecz lub substancja w stanie nadkrytycznym, podczas gdy fazą stacjonarną jest substancja stała albo ciekną. Kinetyczny ruch cząsteczek prowadzi do nieustannej wymiany substancji pomiędzy obiema fazami. Jeżeli dla danej substancji podział jest bardziej korzystny dla poruszającej się fazy stacjonarnej, cząsteczki spędzą większość czasu, migrując ze strumieniem tej fazy i będą oddzielone od innych składników, których cząsteczki są dłużej zatrzymane przez fazę stacjonarną. Badana mieszanina jest wprowadzona do układu



w postaci wąskiej strefy (punkt wyjściowy), po czym substancje są transportowane z różną szybkością zgodnie z kierunkiem przepływu fazy ruchomej. Siłą napędową migrującej substancji jest poruszająca się faza ruchoma, a siłą przytrzymującą powinowactwo substancji do fazy stacjonarnej. Kombinacja obu tych sił, kontrolowana przez analityka, prowadzi do rozdzielania składników mieszaniny na poszczególne substancje.

Zdefiniowanie chromatografii jako metody rozdzielania nie oddaje w pełni możliwości jej zastosowań. Trzeba nadmienić, że jest to także metoda analizy mieszanin – jakościowej i ilościowej. Aktualnie chromatografia stanowi najbardziej rozpowszechnioną metodę analityczną i w połączeniu na przykład z metodami spektroskopowymi stwarza szerokie możliwości analizy skomplikowanych mieszanin, w szczególności związków organicznych.

### Podział metod chromatograficznych

Metody chromatograficzne klasyfikuje się według następujących kryteriów:

Stan skupienia fazy ruchomej

- Chromatografia gazowa
- Chromatografia cieczowa
- Chromatografia fluidalna

Stan skupienia fazy stacjonarnej

- Gaz – ciecz (ang. Gas-Liquid Chromatography – **GLC**)
- Ciecz – ciecz (ang. Liquid-Liquid Chromatography – **LLC**)
- Gaz – ciało stałe (ang. Gas-Solid Chromatography – **GSC**)
- Ciecz – ciało stałe (ang. Liquid-Solid Chromatography – **LSC**)

Natura zjawisk będących podstawą procesu chromatograficznego

- Chromatografia adsorpcyjna

- Chromatografia podziałowa
- Chromatografia jonowymienna
- Chromatografia sitowa (sączenie molekularne – chromatografia żelowa)

Techniki eksperymentalne

Proces chromatografowania można prowadzić:

- Techniką kolumnową, stosowaną we wszystkich metodach chromatograficznych.
- Techniką planarną, możliwą tylko w chromatografii cieczowej, która dzieli się na chromatografię cienkowarstwową i bibułową.

### Co to jest chromatografia gazowa?

Chromatografia gazowa jest metodą stosunkowo niedawną, gdyż pierwsze prace na jej temat ukazały się w 1952 roku (James i Martin – chromatografia gazowa podziałowa, Cremer i Janak – chromatografia gazowa adsorpcyjna).

Szacuje się, że 10-20% znanych związków może zostać wykryta za pomocą chromatografii gazowej. Związki, które mogą być analizowane z wykorzystaniem tej metody muszą charakteryzować się wystarczającą trwałością termiczną i odpowiednią lotnością. Jeżeli wszystkie, albo niektóre, cząstki składników znajdują się w fazie gazowej lub w postaci pary w 400-450°C (ewentualnie poniżej tej temperatury), ale nie rozkładają się w niej, prawdopodobnie mogą być analizowane metodą chromatografii gazowej.

### Zasada działania

Do chromatografu gazowego dostarczany jest gaz lub gazy odznaczające się wysoką czystością. Jeden z nich (nazywany gazem nośnym) płynie przez kolumnę do dozownika, a następnie do detektora.

Próbka wprowadzana jest do dozownika strzykawką albo zewnętrznym urządzeniem dozującym. Dozownik ogrzewa się zazwyczaj do temperatury 150-250°C, co powoduje odparowanie lotnych składników próbki. Odparowane składniki przenoszone są do kolumny za pomocą gazu nośnego.

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

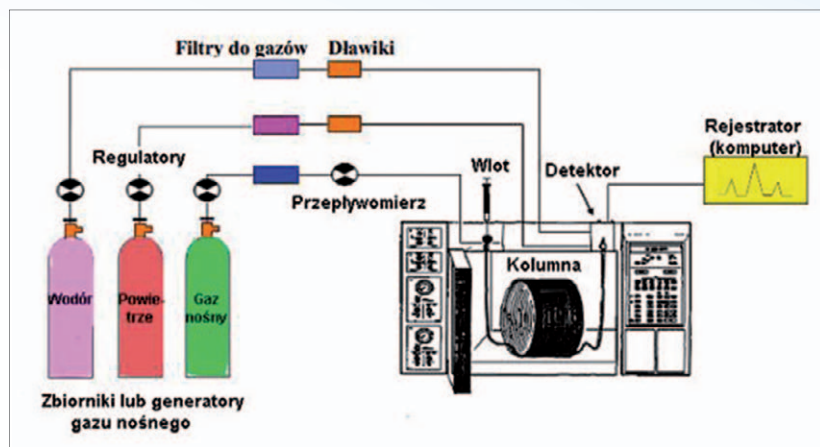
Detektor reaguje na poszczególne składniki próbki i wytwarza odpowiedni sygnał elektroniczny. Wielkość sygnału zapisana jest w systemie danych, a następnie wykreślona na chromatogramie, który przedstawia zależność wielkości piku do czasu wymycia składników.

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

Jeżeli kolumna i wszystkie warunki jej pracy pozostają niezmiennione, dany związek zawsze przemieszcza się przez kolumnę z tą samą szybkością. Dlatego analizowany związek może być także rozpoznany na podstawie czasu, w jakim przepłynął przez kolumnę (czas retencji).

### Co to jest chromatografia cieczowa?

Najstarsza z metod chromatograficznych, klasyczna kolumnowa chromatografia cieczowa, przeżywa obecnie swój renesans dzięki nowoczesnym rozwiązaniom, skracającym czas analizy i zwiększającym zdolność rozdzielczą. Chromatografia cieczowa obejmuje te metody, w których fazą ruchomą jest ciecz. Współczesną chromatografię określamy w różny sposób: wysokosprawna chromatografia cieczowa, wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa, szybka chromatografia cieczowa czy też chromatografia cieczowa o dużej zdolności rozdzielczej.



Rys. 1. Podstawowe elementy układu GC (C. Lopez, *Chemia Analityczna – Chromatografia*, Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska 2002)



Właściwie wszystkie te określenia wypuklają najistotniejsze cechy współczesnej chromatografii ciekowej, a mianowicie: wysoka sprawność, dobra rozdzielczość, duża szybkość procesu i stosowanie wysokich ciśnień. Wszystkie te korzystne parametry współczesnej chromatografii ciekowej (HPLC) osiągnięto dzięki instrumentacji metody i wprowadzeniu nowych faz stacjonarnych. Metoda HPLC okazała się najprężniej rozwijającą się techniką chromatograficzną i znalazła szerokie zastosowanie w analizie preparatów farmaceutycznych.



Rys. 2. Rodzaje kolumn chromatograficznych (R. Głowacki, *Razem czy osobno, czyli kilka słów o separacji związków chemicznych*, Katedra Chemii Środowiskowej, Wydział Chemiczny, Uniwersytet Łódzki)

### Zasada działania

W chromatografach ciekowych fazę ruchomą pompuje się przez kolumnę chromatograficzną. Analizowana próbka wstrzykiwana jest na szczyt kolumny, gdzie składniki próbki są rozdzielane, a na wyjściu wykrywane przez detektor. Sygnał z detektora zapisywany jest i przekazywany w postaci zapisu cyfrowego. Po przeprowadzonej analizie powstaje chromatogram, na podstawie którego można stwierdzić tożsamość związków, jak również ich zawartość.

„Sercem HPLC” jest kolumna chromatograficzna. Kolumna z wypełnieniem zawiera cząstki, które stanowią lub podtrzymują fazę stacjonarną, natomiast faza ruchoma przepływa przez kanaliki przestrzeni międzyziarnowej. Teoria wykazała, że lepsze rezultaty osiąga się, stosując bardzo małe cząsteczki, które jednocześnie zapewniają

dotadkową pożądaną cechę, a mianowicie bardzo wąskie kanaliki.

Obecnie na rynku dostępnych jest wiele różnorodnych rodzajów kolumn, stwarza to ogromne możliwości dla rozwoju przemysłu farmaceutycznego – skomplikowane formułacje leków mogą być coraz szybciej i dokładniej analizowane. Podczas jednego badania można zidentyfikować związki, określić ich zawartość, jak również zawartość zanieczyszczeń. Przy pomocy klasycznych metod nie było podstaw, by choćby o tym marzyć. Kto wie, czym będziemy dysponować za 15 lat? Być może rozpuszczalniki zużywane będą w mikro-, a nie w mililościach, może analizy wykonywane będą w sekundach, a nie minutach. Tego w stu procentach dzisiaj nie wiemy, ale jedno jest pewne – rozwój chromatografii będzie pędził, jak najszybsze pociągi tego świata,

a rezultat tego pędu na pewno silnie odczucie przemysł farmaceutyczny.

### Zastosowanie chromatografii w przemyśle farmaceutycznym

Chromatografia, poprzez swoją uniwersalność i możliwość łączenia jej z innymi technikami analitycznymi, stwarza ogromne pole do zastosowania w przemyśle farmaceutycznym. Chromatografia gazowa pozwala na określenie pozostałości rozpuszczalników po syntezie surowców farmaceutycznych. Niesie ze sobą również ogromne możliwości do badania preparatów, w skład których wchodzi alkohol, m.in. nalewek, wyciągu ziółowych, kropli i syropów.

Analiza kremów, maści czy żeli nie stanowi żadnego problemu dla chromatografii ciekowej. W jednej analizie jesteśmy w stanie określić tożsamość preparatu oraz zawartość poszczególnych substancji aktywnych i konserwujących.

Można tak wymieniać bez końca, lecz podkreślić należy, że uniwersalność zastosowania metod chromatograficznych sprawia, iż stanie się ona nierozdzielalną częścią przemysłu farmaceutycznego i to właśnie ta gałąź przemysłu będzie wyznaczać trendy rozwoju chromatografii.

### Bibliografia

- C. Lopez, *Chemia Analityczna – Chromatografia*, Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska 2002.
- R. Głowacki, *Razem czy osobno, czyli kilka słów o separacji związków chemicznych*, Katedra Chemii Środowiskowej, Wydział Chemiczny, Uniwersytet Łódzki.