

PRACA
DOKTORSKA

Bronisław K. GŁÓD

A-21-7
H-69
K-g-186

ELEKTROKINETYCZNA DETEKcja W WYSOKOSPRAWNEJ
CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ.

Praca doktorska

wykonana w

Zakładzie Fizykochemicznych

Metod Analitycznych

Instytutu Chemii Fizycznej

Polskiej Akademii Nauk

pod kierunkiem

Prof. dr hab. Wiktora Kemuli

Promotor:

Doc. dr hab. Janusz Lipkowski

Warszawa, 1987 r.

Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

F-B.266/1988



7000000002089



B. 266/88

Jestem wdzięczny Panu Profesorowi Wiktorowi Kemuli za wskazanie mi fascynującego kierunku badań, opiekę naukową, dyskusję wyników i życzliwość. Wyrażam swój głęboki żal, że nie dożył On ukończenia tej pracy.

Serdecznie dziękuję Panu Docentowi Januszowi Lipkowskiemu za pomoc i cenne uwagi udzielone mi w trakcie przygotowywania niniejszej pracy.

Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Zakładu II IChF PAN dziękuję za życzliwość i stworzenie twórczej atmosfery pracy.

Spis treści

	strona
A. WSTĘP.	5
B. CEL PRACY.	9
C. CZĘŚĆ LITERATUROWA.	10
I. Detektory w wysokosprawnej chromatografii cieczowej.	
1. Charakterystyka i kryteria stosowalności detektorów.	10
2. Podział i charakterystyka różnych typów detektorów.	19
3. Główne kierunki rozwoju metod detekcyjnych.	22
II. Mechanizmy powstawania prądu i potencjału przepływu.	
1. Wprowadzenie.	27
2. Prądy przepływu w cieczach dielektrycznych.	35
3. Prądy przepływu w roztworach elektrolitów.	40
4. Detektory elektrokinetyczne.	45
D. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.	49
1. Opis zastosowanej aparatury.	49
2. Stosowane odczynniki.	50
3. Procedura.	51
E. KONSTRUKCJA DETEKTORA.	53
1. Budowa celki pomiarowej detektora elektrokinetycznego.	53
2. Pomiar potencjału i prądu przepływu w detektorze.	57
3. Detektor konduktometryczny.	64
4. Mechanizm działania detektora elektrokinetycznego.	67

F. WYNIKI I ICH DYSKUSJA.	
I. Praca i własności detektora elektrokinetycznego.	74
1. Wpływ konstrukcji detektora na jego pracę i własności.	74
2. Wpływ szybkości przepływu fazy ruchomej na wartości potencjału i prądu przepływu.	79
3. Wpływ własności i składu fazy ruchomej na pracę detektora.	91
4. Wpływ własności analizowanego związku na wykrywalność detektora.	95
5. Rozmycie próbki w detektorze.	100
6. Kalibracja detektora elektrokinetycznego.	102
7. Zakłócenia pracy detektora.	117
8. Porównanie własności detektora elektrokinetycznego i konduktometrycznego.	126
II. Zastosowanie detekcji elektrokinetycznej w różnych systemach rozdzielczych wysokiej sprawnej chromatografii cieczowej.	130
1. HPLC faz normalnych.	130
2. HPLC faz odwróconych.	136
3. HPLC par jonowych.	143
4. HPLC jonowo-wykluczająca.	150
G. PODSUMOWANIE.	167
H. WNIOSKI KOŃCOWE.	181
I. STRESZCZENIE.	185
J. SPIS UŻYTYCH SYMBOLI.	187
K. SPIS ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW.	192
L. LITERATURA.	193

A. WSTĘP

Od końca lat sześćdziesiątych datuje się szybki rozwój nowej techniki kolumnowej chromatografii cieczowej zwanej wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC z ang. High Performance Liquid Chromatography). Rozkwit tej metody analitycznej nastąpił dzięki urzeczywistnieniu za jej pomocą szybkich rozdzieleń, które poprzednio uważano za nieosiągalne. Osiągnięcia te w dużym stopniu można przypisać polepszeniu sprawności kolumn i zastosowaniu dużych szybkości przepływu fazy ruchomej. Jednakże jednym z głównych czynników, które przyczyniły się do tak szybkiego rozwoju HPLC był postęp w rozwoju technik detekcyjnych. Wydaje się, że są one również głównym ogranicznikiem dalszego jej rozwoju idącego w kierunku poprawy jej sprawności i miniaturyzacji. Przy czym detekcja w chromatografii cieczowej jest wielokrotnie trudniejsza niż w, rozwiniętej wcześniej, chromatografii gazowej. Próbką nie modyfikuje tak znacznie cieczy jak gazu, którego własności zazwyczaj w istotny sposób różnią się od własności substancji rozpuszczonych przechodzących przez układ. W związku z tym w chromatografii cieczowej nie istnieje tak uniwersalny detektor, jak w chromatografii gazowej, np. detektor płomieniowo-jonizacyjny czy też pomiaru przewodnictwa cieplnego. Dlatego też badania nad nowymi układami detekcyjnymi w chromatografii cieczowej wzbudzają obecnie tak duże zainteresowanie badaczy.

Często okazuje się, że niestety najlepsze warunki do chromatograficznego podziału nie są optymalne z punktu widzenia detekcji. Powoduje to konflikt i konieczność

wyboru rozwiązania kompromisowego. Zmniejszenie średnicy ziarna nośnika, średnicy kolumny (chromatografia mikrokolunowa) oraz wprowadzenie wielokolumnowych operacji i otwartych kapilarnych kolumn do chromatografii cieczowej stwarzają coraz to ostrzejsze wymagania stawiane detektorom. W zależności od stopnia złożoności aparatury, kosztu i sprawności dopasowuje się wówczas detektor do chromatografu lub na odwrót.

Rozwój detektorów dokonuje się obecnie w pięciu głównych kierunkach:

1. Budowy detektorów "uniwersalnych", zdolnych do monitorowania chromatogramów różnych klas związków. Obecnie sądzi się, że zbudowanie takiego detektora jest niemożliwe. Zatem w tym przypadku chodzi raczej o zbliżenie się do ideału detektora uniwersalnego, czyli stworzenie detektora o szerokim "spektrum" działania.
2. Budowy nowych detektorów specyficznych, reagujących na pewne związki lub klasy związków, nieczułe natomiast na inne. Umożliwiają one selektywną analizę substancji nie rozdzielonych na kolumnie. Każdy nowy detektor specyficzny powinien się charakteryzować możliwością zastosowania do wykrywania klasy związków trudnych do detekcji innymi metodami. W praktyce zainteresowanie wzbudzają detektory umożliwiające analizę związków nie wykrywanych przez detektor pomiaru zmian absorpcji światła w ultrafiolecie.
3. Budowy detektorów przestrajalnych. Łączą one w sobie własności obu pierwszych klas detektorów. Ponadto pewne ich rozwiązania umożliwiają uzyskanie trójwymiarowych chromatogramów. Tym samym zastępują one pracę wielu detektorów jednocześnie.

4. Budowy detektorów wielofunkcyjnych. Kilka różnych detektorów przyłączonych jest do wspólnej celki pomiarowej. Detektory tego typu są rozwinięciem poprzednio opisanych.

5. Rozwoju przed- i pokolumnowej derywatywacji próbki.

Technika ta stanowi uzupełnienie różnych typów detekcji.

W zależności od zastosowanych reagentów można uzyskać wyniki analogiczne do uzyskiwanych za pomocą detektorów wymienionych w pierwszych dwu punktach.

Pomiary potencjału i prądu przepływu wykorzystywane były od wielu lat w różnorodnych badaniach fizykochemicznych. W celach metrologicznych wielkości te mierzone są w przetwornikach elektrokinetycznych. Przetworniki te zamieniają niektóre parametry mechaniczne, szybkość przepływu cieczy, przyspieszenie, ciśnienie, częstotliwość i amplitudę drgań itp., na wielkości elektryczne, potencjał i prąd elektryczny. Na podstawie tego wydawać by się mogło, że zastosowanie tego typu efektów w detekcji pozwoliłoby przybliżyć się do w pełni uniwersalnego detektora do chromatografii cieczowej i technik pokrewnych (np. Flow Injection Analysis). Pierwszy taki detektor został opisany w 1967 r. W trakcie rozwoju pracy nad tego typu detektorami okazało się, że nie spełniają one wszystkich wymagań detektora uniwersalnego. Charakteryzują się one podobnymi ograniczeniami co inne detektory mierzące sumaryczną wielkość wspólną dla próbki i fazy ruchomej własności. Wobec tego, zgodnie z tym co zostało przedstawione w punkcie drugim, konieczne było wykazanie możliwości zastosowania detektora do analizy związków trudno wykrywalnych innymi technikami. Związkami spełniającymi to założenie okazały się być kwasy tłuszczowe. Ich oznaczanie

jest ważne w wielu działach nauki i techniki. Mimo to dotychczas nie został jeszcze skonstruowany czuły detektor umożliwiający ich oznaczanie w różnych układach chromatograficznych. Wydaje się, że w pewnej mierze lukę tę wypełnić może detektor elektrokinetyczny.

B. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było przeanalizowanie możliwości zastosowania zjawisk elektrokinetycznych do detekcji^w wysokiej sprawnej chromatografii cieczowej. Oznaczało to określenie rodzaju klas związków wykrywalnych przez ten typ detekcji. Jak to zostało przedstawione we wstępie o wartości nowego detektora stanowi m.in. jego czułość na związki trudne do detekcji innymi metodami. Jako modelowe związki do testowania własności detektora wybrane zostały , spełniające powyższy warunek, kwasy tłuszczowe. Dla tych związków konieczne było dobranie optymalnych warunków chromatograficznych w różnych systemach rozdzielczych, umożliwiających z jednej strony dobry ich rozdział, z drugiej zaś efektywną detekcję. Na tej podstawie możliwe było dokonanie porównania detektora z innymi detektorami stosowanymi w HPLC. Aby tego typu pomiary były możliwe do wykonania konieczne było w pierwszej kolejności opracowanie i skonstruowanie detektora elektrokinetycznego, następnie określenie wpływu różnych szczegółów konstrukcyjnych jego budowy oraz różnych czynników zewnętrznych na jego pracę.

C. CZĘŚĆ LITERATUROWA.

I. Detektory w wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

1. Charakterystyka i kryteria stosowalności detektorów.

Zadaniem detektora w chromatografii cieczowej jest ciągła analiza zmiany składu eluatu w momencie opuszczania przez niego kolumny. W tym celu zamienia on pewną wielkość fizyczną pozostającą w funkcji stężenia próbki w eluacie na wielkość elektryczną (na ogół napięcie) dogodną do rejestracji.

W pierwszych rozdziałach chromatograficznych Cwiet [1] w roli detektora zastosował wizualną obserwację chromatogramu. Metoda ta stosowana jest obecnie jeszcze w chromatografii bibułowej i cienkwarstwowej. Posiada ona jednak szereg istotnych ograniczeń. Przede wszystkim nadaje się ona tylko do detekcji związków barwnych. Po wtóre, ze względu na nieliniowość odpowiedzi, raczej do analizy jakościowej niż ilościowej.

W późniejszych latach stosowano zbieranie kolejnych frakcji eluatu, a następnie jego analizę różnymi metodami. Postępowanie to było bardzo pracochłonne i mało efektywne. Idea stosowania detektora w przepływie pojawiła się na początku lat czterdziestych. Pierwszym takim detektorem był detektor refraktometryczny opisany przez Tiseliusa [2].

W początkowym okresie rozwoju wysokosprawnej chromatografii cieczowej stosowano w niej detektory bezpośrednio przeniesione z bardziej wówczas rozwiniętej techniki chromatografii gazowej [3]. Szczególnie dużą rolę odegrały wówczas detektory transportowe. Później rozwinęły się nowe techniki detekcyjne dostosowane do specyfiki tej metody.

Obecnie, stałe doskonalenie instrumentalnej detekcji substancji rozdzielonych w eluacie jest jednym z głównych elementów umożliwiających ogólny postęp metod chromatograficznych [4,5].

Idealny detektor HPLC powinien charakteryzować się porównywalnymi parametrami w stosunku do detektorów stosowanych w chromatografii gazowej. Oznacza to wykrywalność rzędu 10^{-12} mola oraz liniowość odpowiedzi detektora w zakresie sześciu rzędów wielkości. Detektor taki powinien być również wszechstronny i być czuły na wszystkie analizowane związki, jednocześnie będąc nieczułym na zmiany składu stosowanej fazy ruchomej. Ostatnia właściwość oznacza możliwość zmiany składu fazy ruchomej w trakcie rejestracji chromatogramu (elucja gradientowa). Ponadto detektor taki powinien być nieczuły na zmiany temperatury, ciśnienia i szybkości przepływu eluatu, niezawodny, prosty i tani, charakteryzować się małą objętością własną i ciągłą pracą. Mimo, że wiemy jaki powinien być idealny detektor do HPLC to w chwili obecnej nie jest nam znany detektor spełniający wszystkie powyższe warunki. Z tego powodu prace nad detekcją chromatograficzną są obecnie szeroko rozwijane. Przy czym często poszukuje się detektorów odpowiednich do pewnego szczególnego zastosowania.

Detektory rozpatruje się z punktu widzenia szeregu kryteriów. Podstawowymi parametrami charakteryzującymi pracę detektora są: liniowość odpowiedzi, wielkość szumu, wykrywalność, rozmycie próbki [6-10].

Z analitycznego punktu widzenia najbardziej korzystna jest liniowa odpowiedź detektora. Oznacza to liniową

zależnością odpowiedzi detektora (sygnału wyjściowego, tzn. wysokości lub pola powierzchni pików chromatograficznego), R , od stężenia próbki, c :

$$R = k \cdot c \quad (1)$$

gdzie k -czułość detektora.

Detektor taki w kształcie pików chromatograficznych (zależność stężenia od czasu) dokładnie odwzorowuje krzywą Gaussa. W rzeczywistości, żaden detektor nie jest w pełni liniowy. Jego odpowiedź można uznać za liniową jedynie w pewnym zakresie stężeń próbki. Dlatego też ogólnie odpowiedź detektora opisuje równanie:

$$R = R_0 + k \cdot c^r \quad (2)$$

gdzie r -indeks odpowiedzi, R_0 -sygnał resztkowy.

Prawdziwie liniowy detektor charakteryzuje się $r=1$, jednakże z praktycznego punktu widzenia za liniowy przyjmuje się detektor o wartości r między 0.98 a 1.02 [6]. Zaznaczyć przy tym należy, że często korzysta się również z detektorów o innym r lub innej charakterystyce odpowiedzi (np. eksponencjalnej) stosując odpowiednią korekcję elektroniczną (np. logarytmowanie). Pozostałe detektory nie znajdują szerszego zastosowania.

Z zagadnieniem liniowości związany jest liniowy zakres dynamiki odpowiedzi detektora, L_D . Zdefiniowany on jest jako zakres stężeń badanego związku, w którym odpowiedź detektora jest liniowa (dla założonego zakresu indeksu odpowiedzi). Odróżniać go należy od dynamiki odpowiedzi detektora, D_R , zdefiniowanej jako zakres stężeń próbki, dla którego odpowiedź detektora jest zależna od stężenia. Dolny zakres obu parametrów odpowiada stężeniu, dla którego odpo-

wieź detektora jest n razy większa od poziomu szumów (na ogół zakłada się $n=2$). Górny zakres D_R odpowiada stanowi nasycenia na krzywej kalibracyjnej. Z powyższych definicji wynika nierówność $L_D \leq D_R$.

Szumem, N_L , detektora nazywa się wszelką zmianę sygnału wyjściowego detektora, której nie można przypisać substancji rozpuszczonej przechodzącej przez komorę detektora, tzn. są to przypadkowe sygnały przeszkadzające w pomiarze. Przyczyną szumu może być układ elektroniczny, fluktuacje temperatury, napięcia zasilania, szybkości przepływu eluatu itp. Określa on w sposób pośredni wykrywalność detektora. W zależności od częstotliwości rozróżnia się szum wysokoczęstotliwościowy (poszerza on szerokość linii pisaka rejestratora), niskoczęstotliwościowy i dryft. Najbardziej szkodliwy okazuje się drugi z szumów, o częstotliwościach zbliżonych do częstotliwości pików chromatograficznych, ponieważ nie można go zlikwidować przy pomocy żadnych filtrów.

Minimalna ilość lub stężenie próbki powodujące rozróżnienie pików chromatograficznych od szumu (zazwyczaj przyjmuje się, że wysokość pików powinna być dwukrotnie większa od szumu) jest wykrywalnością, D_L , danego detektora. Wykrywalność detektora czasami mylnie nazywa się jego czułością. W rzeczywistości czułość (równanie (1)) oznacza tangens nachylenia krzywej kalibracyjnej. Obie te wielkości powiązane są ze sobą zależnością:

$$D_L = 2 N_L / k \quad (3)$$

Czułość detektora, k , równa jest stosunkowi wysokości pików chromatograficznych do stężenia próbki w maksimum pików, C_m ,

(bądź też stężenia, C_i , lub ilości, $C_i V_i$, wstrzykiwanej próbki). Stąd D_L w równaniu (3) oznacza stężenie próbki w maksimum piku dwukrotnie większego od N_L . C_m przedstawić można w postaci zależności |11-13|:

$$C_m = \frac{4 C_i V_i N^{1/2}}{d_c^2 (2\pi)^{1/2} L \Sigma_T (1+k')} = \frac{C_i V_i N^{1/2}}{(2\pi)^{1/2} V_R} \quad (4)$$

gdzie: V_i - objętość wstrzykiwanej próbki, N - ilość pól teoretycznych, d_c - średnica kolumny, L - długość kolumny, Σ_T - porowatość całkowita, k - współczynnik pojemnościowy, V_R - objętość retencji.

Wysokość piku chromatograficznego proporcjonalna jest do C_m , a stąd zgodnie z równaniem 4, również i do $C_i V_i$. Dlatego też D_L powinno się wyrażać w ilości lub masie wstrzykiwanej próbki |12, 14|. Jest to ponadto uzasadnione tym, że można wówczas porównywać wykrywalności detektorów uzyskane przy różnych objętościach wstrzykiwanej próbki. Z połączenia równań (3) i (4) otrzymuje się |15|:

$$D_L (C_i V_i) = \frac{2(2\pi)^{1/2} N_L V_R}{k N^{1/2}} \quad (5)$$

Wielkość ta będzie stosowana w dalszej części pracy. Wyrażając D_L za pomocą stężenia próbki w maksimum piku otrzymuje się:

$$D_L (C_m) = \frac{2N_L C_i V_i N^{1/2}}{h (2\pi)^{1/2} V_R} \quad (6)$$

gdzie h - wysokość piku chromatograficznego.

Konsekwentnie do równania (5) k należy przedstawiać w postaci:

$$k = \frac{C_i V_i}{h} \quad (7)$$

Czasami zamiast D_L stosuje się pojęcie minimum detekcji, M_D . Odnosi się ono do wykrywalności detektora wyznaczonej bez kolumny chromatograficznej [12]. Obie wielkości można porównywać po uwzględnieniu rozcieńczenia próbki w kolumnie.

Na wykrywalność detektora ma wpływ, oprócz parametrów samego detektora, szereg parametrów charakteryzujących kolumnę i rozdział chromatograficzny [15, 16]. Można to przedyskutować np. w oparciu o równania (4) i (5). Zwiększanie wymiarów kolumny pogarsza D_L ze względu na większe rozcieńczenie próbki. Z tego samego powodu wykrywalność różnych próbek pogarsza się ze wzrostem ich współczynników pojemnościowych i objętości retencji. Wysokość półki teoretycznej rośnie ze wzrostem szybkości przepływu fazy ruchomej (równanie van Deemtera [8]). Większy przepływ natomiast oznacza większe rozmycie próbki, a więc pogorszenie wykrywalności. Ze wzrostem ilości półek teoretycznych zmniejsza się rozmycie próbek i polepsza wykrywalność detektora [15].

Zadaniem kolumny chromatograficznej jest rozdzielenie wstrzykiwanej próbki na poszczególne składniki, przy czym uzyskiwane pasma (piki) chromatograficzne powinny być możliwie jak najwęższe.

Detektor i jego połączenia, nie powinny wpływać na uzyskany w kolumnie stopień rozdzielania pasm. Dodatkowe

rozmycie następuje w nich z powodu zbyt powolnego transportu w kierunku radialnym i z powodu parabolicznego rozkładu prędkości przepływu fazy ruchomej. Rozwój chromatografii powoduje zwiększenie sprawności kolumn (mniejsze średnice kolumn i ziarna) co oznacza zwężenie pasm. Wiąże się z tym konieczność konstrukcji detektorów charakteryzujących się małą objętością. Zabezpiecza to przed mieszanieniem się w nich już rozdzielonych związków, tzn. poszerzeniem obserwowanych pasm. Z tego samego powodu również stałe czasowe wzmacniacza i rejestratora powinny być małe. Na ogół przyjmuje się, że w HPLC powinny one być mniejsze od 0.5 sek. [9].

Całkowita wielkość poszerzenia strefy chromatograficznej jest sumą kilku udziałów i wyrażona jest za pomocą wariancji, σ^2 , szerokości piku [17]:

$$\sigma^2 = \sigma_i^2 + \sigma_k^2 + \sigma_p^2 + \sigma_d^2 + \sigma_w^2 + \sigma_r^2 \quad (8)$$

gdzie kolejne wariancje odnoszą się do dozownika, kolumny, przewodów łączących, detektora, wzmacniacza i rejestratora. Wariancja jest tu zdefiniowana poprzez równanie:

$$\sigma^2 = (x - \bar{x})^2 = \overline{(x^2)} - (\bar{x})^2 \quad (9)$$

gdzie x oznacza czas t_R lub objętość V_R retencji.

Wariancje szerokości piku wyrażone w jednostkach czasu, σ_t^2 , i objętości, σ_v^2 , powiązane są ze sobą zależnością:

$$\sigma_v^2 = \sigma_t^2 \cdot J^2 \quad (10)$$

Jeśli toleruje się 5% stratę zdolności rozdzielczej spowodowaną detektorem wówczas [18, 19]:

$$\sigma_k^2 + \sigma_d^2 = (1,05 \sigma_k)^2 \quad (11)$$

Stąd:

$$\sigma_d^2 = 0,1025 \sigma_k^2 \quad (12)$$

Oznacza to, że rozmycie pików w detektorze nie przekracza ok. 10% rozmycia w kolumnie.

Po pierwiastkowaniu z równania (12) otrzymuje się:

$$\sigma_d = 0,32 \sigma_k \quad (13)$$

σ_k wyrazić można poprzez [11, 17]:

$$\sigma_k = t_R/N^{1/2} = N^{1/2} (1+k') H/u \quad (14)$$

gdzie t_R - czas retencji, H - wysokość płytki teoretycznej, u - liniowa szybkość przepływu.

Z kombinacji równań (10, 13 i 14) otrzymuje się σ_d wyrażone w jednostkach czasu, σ_{dt} , lub objętości, σ_{dV} :

$$\sigma_{dt} = 0,32 t_R/N^{1/2} = 0,32 N^{1/2} (1+k') H/u \quad (15)$$

$$\sigma_{dV} = 0,32 V_R/N^{1/2} = 0,32 N^{1/2} (1+k') H J/u \quad (16)$$

gdzie J - objętościowa szybkość przepływu.

Z równań tych wynika, że im sprawniejsza jest kolumna (duże N) tym mniejsze powinno być σ_d .

Wpływ na rozmycie pików w detektorze mają jego własności przepływowe, objętość oraz niektóre inne cechy konstrukcyjne. Przyczyną tego rozmycia jest mieszanie się cieczy podczas jej przepływu przez detektor. Jego wielkość trudno określić ze względu na nieznaną dokładność profilu przepływu cieczy. Z danych empirycznych wynika [11, 21]:



$$\sigma_{V_d}^2 = a \cdot V_d^2 \quad (17)$$

gdzie a - współczynnik proporcjonalności równy: $\frac{1}{\sqrt{12}} \approx 0,3$ - przy laminarnym przepływie cieczy, 1 - przy przepływie turbulentnym (idealny mieszalnik), V_d - objętość detektora.

Po podstawieniu równania (17) do (16) otrzymuje się zależność na maksymalną objętość detektora, V_d , spełniającą warunek zawarty w równaniu (11):

$$V_d = b \cdot V_R / N^{1/2} \quad (b=0,32+1,11) \quad (18)$$

$$(19)$$

Dla uproszczenia rozważań często przyjmuje się [20, 23], że objętość detektora powinna być równa jednej dziesiątej objętości pików. Zakładając, że pik ma rozkład Gaussa otrzymuje się:

$$V_p = 4 \sigma_k^2 = \pi d_k^2 L \epsilon_T (1+k') / N^{1/2} = 4 V_R / N^{1/2} \quad (20)$$

Stąd:

$$V_d = 0,4 V_R / N^{1/2} \quad (21)$$

Korzystając z powyższych równań można udowodnić [15, 24], że objętość detektora powinna być tym mniejsza im mniejsze są: długość i średnica kolumny, średnica ziarna wypełnienia, współczynnik pojemnościowy, wysokość półki teoretycznej, szybkość przepływu, współczynnik rozdziału.

Dla cienkich i długich rurek (będących np. elementem pracującym detektora lub połączenia) o promieniu r_d , długości, L , wariancję rozmycia przedstawić można w postaci [24, 25]:

$$G_{Vd}^2 = \frac{\pi R_d^4 L J}{24D} \quad (22)$$

gdzie D - współczynnik dyfuzji molekularnej.

Z równań (22) i (16) otrzymuje się:

$$R_d = \left(\frac{2,4 D V_R^2}{\pi N J L} \right)^{1/4} \quad (23)$$

Z zależności tej wynika, że dla tej samej objętości detektora korzystniej jest stosować kapilary cieńsze a dłuższe.

Wariancję wywołaną czasem relaksacji, τ , wzmacniacza detektora opisuje zależność:

$$G_d = \tau J \quad (24)$$

Stąd, po podstawieniu do równania (16) otrzymuje się [16]:

$$\tau = \frac{0,32 V_R}{J N^{1/2}} \quad (25)$$

Powyższe równanie odnosi się do maksymalnego czasu relaksacji wzmacniacza detektora spełniającego warunek (11).

2. Podział i charakterystyka różnych typów detektorów.

Ze względu na rodzaj odpowiedzi rozróżnia się detektory liniowe, całkowite i różniczkowe. Detektorem liniowym jest, jak sama nazwa wskazuje, detektor, którego sygnał wyjściowy jest liniowo zależny od stężenia próbki.

Detektor może być czuły bądź na ilość, bądź na stężenie próbki. Oznacza to, że odpowiedź detektora może być pewną funkcją ilości próbki przepływającej przez niego na jednostkę czasu lub ilości próbki na jednostkę

objętości fazy ruchomej. Odpowiedź detektora czułego na ilość jest stała dla danej przepływającej ilości próbki, niezależna od szybkości przepływu fazy ruchomej.

Ponadto wyróżnia się dwie podstawowe grupy detektorów. Detektory działające na zasadzie różnicowego pomiaru własności wspólnej próbki i fazy ruchomej (np. przewodnictwo, przenikalność elektryczna lub współczynnik załamania światła) oraz detektory działające na zasadzie pomiaru własności charakterystycznej tylko dla próbki (absorbpcja światła, fluorescencja itp.). Oczywiście klasyfikacja tego typu nie jest ścisła. Niektóre detektory w różnych układach mogą należeć raz do jednej raz do drugiej grupy.

Poniżej zostaną zestawione najważniejsze rodzaje detektorów chromatograficznych. Dokładne ich omówienie można znaleźć w wielu pracach przeglądowych [6-10, 26-47].

Detektory pierwszej grupy w sposób ciągły monitorują pewną wielkość fizyczną eluatu. Poprzez użycie odpowiedniego przetwornika uzyskuje się z nich odpowiedź: napięcie-czas, proporcjonalną do mierzonej wielkości. Do tego typu detektorów zalicza się detektor refraktometryczny (pierwszy detektor tego typu, jak i pierwszy detektor do chromatografii cieczowej opisany został w 1942 r. przez Tiseliusa [2]), dielektryczny, konduktometryczny, densometryczny, przewodnictwa cieplnego, interferometryczny, wiskozymetryczny itp. Detektory tego typu charakteryzują się ograniczoną wykrywalnością, bezpośrednio związaną z ich zasadą działania. Z tego powodu odznaczają się one również ograniczonym zakresem dynamiki liniowej, zwykle

niższym niż dwa rzędy wielkości. Ich potencjalny zakres dynamiki jest duży (cztery do pięciu rzędów wielkości) lecz jest ograniczony z powodu ich słabej wykrywalności. Detektory te są czułe na zmiany temperatury, szybkości przepływu i składu fazy ruchomej. Wynika z tego, że mogą być one wykorzystywane w warunkach izotermicznych (niska wykrywalność) i izokratycznych. Główne zastosowanie znajdują do analizy związków nie adsorbujących światła w zakresie ultrafioletowym, w chromatografii preparatywnej, gdzie duże stężenia przekraczają zakres normalnych detektorów. Ponadto są one użytecznym dodatkiem do innych detektorów, gdy wystarczająca jest słaba wykrywalność. Używane są one w mniej niż 20% wszystkich rozdzieleń [6].

Drugą grupę stanowią detektory mierzące tylko pewną wielkość rozpuszczonej w fazie ruchomej próbki. Są one częściej używane niż detektory opisywane poprzednio. Charakteryzują się z reguły lepszą wykrywalnością i szerszym zakresem dynamiki liniowej. Zalicza się do nich detektor pomiaru absorpcji światła w zakresie ultrafioletowym, fluorymetryczny, polarograficzny, amperometryczny, kulometryczny, potencjometryczny, czy też rzadziej stosowane detektory absorpcji ciepła, radiochemiczny, wychwytu elektronów, spektroskopii atomowej, piezoelektryczny, fotojonizacyjny, fotoakustyczny, jonizacji płomieniowej itp.

3. Główne kierunki rozwoju metod detekcyjnych.

Co pewien czas w literaturze fachowej pojawia się opis nowego typu detektora do chromatografii cieczonej (np. detektora elektrokinetycznego). Jednakże obecnie większość chromatografistów jest przekonana, że niemożliwe jest skonstruowanie uniwersalnego detektora do HPLC. W związku z tym badania skupiają się na poszukiwaniu nowych rozwiązań detektorów wysoce selektywnych, przystosowanych do analizy określonej grupy związków. Największe nadzieje wiąże się tu z połączenia chromatografii cieczonej ze spektroskopią masową [48]. Szczególnie w chromatografii mikrokolumnowej istnieje możliwość bezpośredniego przyłączenia kolumny do źródła jonów, bez pośredniego kroku odparowywania [49]. Wysoką selektywność oznaczeń uzyskać można również przeprowadzając przed- lub po-kolumnową derywatyzację próbki [50-52]. Technika pokolumnowej derywatywacji, dodatkowo, często pozwala uzyskiwać lepsze rozdziały oznaczanych substancji.

Rozwój detektorów elektrochemicznych zmierza w kierunku wprowadzania nowych materiałów elektrodowych (elektrody stałe), stosowania ich do roztworów niewodnych, zwiększania czułości detektorów poprzez taką ich konstrukcję, aby analizowany związek ulegał wielokrotnie reakcjom utleniania i redukcji [27, 53]. Większość prac skupia się jednak w tym przypadku nad wprowadzeniem do detekcji nowych technik elektrochemicznych np. polarografii zmienoprądowej, pulsowej itp. [54-56].

W detektorach optycznych coraz częściej obserwuje się wprowadzanie laserów jako źródeł światła [22, 57].

Drugi kierunek rozwoju tych detektorów polega na wprowadzaniu możliwości dowolnego ustawiania długości fali światła, przy której dokonywany jest pomiar jego absorpcji, ręcznie lub automatycznie. Rozwój tego typu konstrukcji doprowadził do powstania optycznych detektorów "przestrajalnych". Rejestruje się w nich jednocześnie wiele chromatogramów (wykresy trójwymiarowe) przy różnych długościach fal padającego światła [50, 51]. Uzyskuje się to za pomocą mechanicznego przemieszczania lub poprzez zastosowanie w detektorze tablicowych fotodiod.

Detektory tego typu wydają się mieć największe znaczenie na przyszłość [4]. Łączą one w sobie zalety detektorów uniwersalnych i wysoce specyficznych, a ponadto umożliwiają analizę związków nierozdzielonych na kolumnie. Oprócz wymienionych powyżej detektorów pomiaru absorpcji światła w nadfiolecie do detektorów przestrajalnych zalicza się detektory fluorescencyjne (zmienna długość fali światła wzbudzającego i absorbującego) i elektrochemiczne (nastawny lub "przemiatany" potencjał elektrody). Dalszym rozwinięciem tego typu detektorów są detektory wielofunkcyjne. Jedną celką detekcyjną jest w nich podłączona do kilku układów pomiarowych. Obecnie znane są układy pomiarowe będące jednocześnie detektorem konduktometrycznym i dielektrycznym [58, 59], w tym również z pomiarem stratności [60, 61], oraz trójfunkcyjne detektory pomiaru absorpcji światła, fluorescencyjny fotoakustyczny i fotojonizacyjny [64, 65]. Kilka

detektorów tego samego lub różnego typu połączyć można również szeregowo [64, 66]. W układzie porównawczym mierzy się w takim przypadku stosunek lub różnicę ich sygnałów wyjściowych. Gdy zastrzyknięta próbka daje inny sygnał niż standard zapisany w bazie danych to oznacza to, że wraz z nią wymywa się zanieczyszczenie.

Rozwój chromatografii cieczowej dokonuje się obecnie w dużej mierze na drodze miniaturyzacji jej aparatury, chromatografy mikrokolumnowe oraz pakowane lub otwarte kapilarne wymagają znacznie mniejszych ilości próbki i fazy ruchomej do analizy [67, 68]. Udowodnić można [69], że krótka, kilkunastocentrymetrowa, kapilara o średnicy wewnętrznej ok. 1µm może pracować jako kolumna chromatograficzna o bardzo dużej sprawności ($N > 10^6$). Problemem jest tu konstrukcja odpowiedniego chromatografu, a przede wszystkim detektora o odpowiednio małej objętości, poniżej 1 nl .

Znacznie bardziej rozwiniętą i szerzej stosowaną techniką jest obecnie chromatografia mikrokolumnowa [13, 17, 70-75]. Do jej zalet zaliczyć można niższą cenę wypełnienia i rozpuszczalnika, łatwość połączenia ze spektroskopem masowym, większą sprawność kolumny, lepszą wykrywalność detektora. Lepsza wykrywalność detektora jest w tej technice spowodowana tym, że stężenie próbki w maksimum piku jest proporcjonalne do odwrotności średnicy kolumny [70]. Oznacza to mniejsze rozmycie próbki w mikrokolumnach. Przy czym przy polepszaniu wykrywalności tą techniką pojawiają się dwie komplikacje [71]:

1. Zmniejszenie objętości próbki zwiększa szum detektora, co pogarsza jego wykrywalność.
2. Próbka rozcieńczona jest w kolumnie proporcjonalnie do kwadratu średnicy kolumny, tzn. jej objętości. Stąd, dla danej objętości wstrzykiwanej próbki mikrokolumny są korzystne ze względu na mniejsze rozmycie próbki. Jednakże, jeżeli wstrzykiwane objętości próbki na kolumny o różnych średnicach (lecz o tych samych długościach i średnicach ziaren) są proporcjonalne do objętości każdej z nich to kolumnowe rozcieńczenie próbki w chromatografii mikrokolumnowej i konwencjonalnej są sobie równe. Wobec tego niższe wykrywalności oferowane przez chromatografię mikrokolumnową mają praktyczne znaczenie tylko wtedy gdy objętości dostępnych próbek są mniejsze niż to potrzebne do zastrzyku proporcjonalnego do objętości danej kolumny i żądanej jej sprawności.

Z tego powodu niektórzy autorzy [4, 71] polecają stosowanie kolumn o średnicy wewnętrznej 2 mm. Pozwalają one zredukować ilość zużywanej fazy ruchomej do 25% w stosunku do kolumn 4 mm. Ponadto pracować na nich można z detektorami stosowanymi w konwencjonalnej HPLC.

Do sterowania pracą chromatografu coraz częściej znajdują zastosowanie mikrokomputery. Między innymi stosuje się je do przechowywania i analizy chromatogramów (porównanie z danymi zawartymi w pamięci komputera), sterowania gradientem elucji i przepływu itp. Ponadto stosuje się je również do korekcji temperatury detektora, co daje lepsze rezultaty niż jego termostatowanie [76].

Na zakończenie wspomnieć należy, że wykrywalność detektora zależy nie tylko od własności samego detektora ale od całego zestawu chromatograficznego. Zwiększyć ją można np. przez zastosowanie przed lub pokolumnowego zatężania próbki. W przypadku gdy używana kolumna posiada większą ilość pól teoretycznych niż to jest potrzebne do osiągnięcia danego rozdziału wykrywalność detektora można polepszyć poprzez zwiększenie objętości wstrzykiwanej próbki [11, 71]. Wykrywalność detektora polepsza się również stosując możliwie cienkie i długie kolumny, przy danej ich objętości. Można wówczas znacznie zwiększyć objętość zastrzyku i zmniejszyć szybkość przepływu fazy ruchomej (większe N).

II. Mechanizmy powstawania prądu i potencjału przepływu.

1. Wprowadzenie.

Ze względnym ruchem cieczy o kierunku równoległym do powierzchni ciała stałego będącego z nią w kontakcie związany jest prąd, I , i potencjał, E , przepływu. Mierzone są one wzdłuż kierunku ruchu cieczy, np. między końcami rury lub kapilary przez które przepływa ciecz. Efekty te zaliczają się do grupy zjawisk elektrokinetycznych. Odgrywają one ważną rolę w takich dziedzinach nauki i techniki jak chemia powierzchni i koloidów, bioelektrochemia, mineralogia lub petrochemia [77-82]. Natrafiamy na nie również w badaniach podstawowych podwójnej warstwy elektrycznej [79], mechanizmu adsorpcji [83] i filtracji [84, 85], procesów wzbogacania minerałów [77, 81], powstawania ładunków przy przepływie cieczy wysokoporowych przez rury, kapilary i przegrody porowate [86], a także krzepnięcia krwi *in vivo* [87]. Do przyrządów pomiarowych działających na zasadzie pomiaru potencjału i prądu przepływu zalicza się przetworniki [88] i detektory elektrokinetyczne [82]. Były również czynione próby zastosowania tych efektów w generatorach wysokiego napięcia [89] oraz do wytwarzania energii elektrycznej [78].

Tworzenie się potencjału przepływu podczas przepływu roztworów elektrolitów przez układy kapilarne wykonane z dielektryka odkrył Quincke w 1852 r. Mechanizm jego powstawania wyjaśnił w 1908 r. Smoluchowski [90]. Pod koniec XIX w. odkryto również elektrostatyczne ładowanie się cieczy niepolarnych przy przepływie ich przez rurki

metalowe. Zaobserwowano, że efekt ten, będący przyczyną pożarów i eksplozji instalacji naftowych, zlikwidować można zwiększając przewodnictwo cieczy. Mechanizmy tworzenia się ładunków w obu przypadkach są różne. Wynika to głównie z różnic przewodnictwa właściwego cieczy [82,86].

Wielkością opisującą zdolność cieczy do gromadzenia ładunku jest czas połowicznego zaniku ładunku, $t_{1/2}$:

$$t_{1/2} = \tau / 1,44 = \epsilon \epsilon_0 / 1,44 \kappa \quad (26)$$

gdzie: τ - czas relaksacji ładunku, ϵ - względna przenikalność elektryczna cieczy, ϵ_0 - przenikalność elektryczna próżni, κ - przewodnictwo właściwe cieczy.

Definiuje się go jako czas, w którym ciecz zamknięta w uziemionym lub izolowanym metalowym zbiorniku, traci połowę swego ładunku wskutek upływności.

Jedną z wielkości opisujących zachowanie się cieczy na granicy faz z ciałem stałym jest umowna grubość podwójnej warstwy elektrycznej, δ . Zgodnie z teorią Gouy-Chapmana równa jest ona odległości okładek kondensatora płaskiego stosowanego jako jej model. Korzystając z równania Poissona-Boltzmannia przedstawić ją można w postaci:

$$\delta = \sqrt{\frac{\epsilon \epsilon_0 k_B T}{2nz\bar{e}^2}} \quad (27)$$

gdzie k_B - stała Boltzmann, T - temperatura bezwzględna, n - liczba zdysocjowanych molekuł w jednostce objętości roztworu, z - wartościowość jonu, \bar{e} - elementarny ładunek elektryczny.

Po wprowadzeniu do równania (27) współczynnika dyfuzji molekularnej, D , szybkości ruchu jonów opisanych równaniem Stokesa, skorzystaniu z zależności Kohlrauscha oraz założeniu jednakowych rozmiarów, wartościowości i ruchliwości jonów dodatnich i ujemnych otrzymuje się zależność [86]:

$$\delta = \sqrt{D\tau} \quad (28)$$

Wielkości występujące w powyższych równaniach zostały, przykładowo dla wodnego roztworu KCl i mieszaniny węglowodorów alifatycznych, zestawione w Tabeli 1. Widać z niej, że między roztworami elektrolitów, a cieczami niepolarnymi występują jakościowe różnice. Są one przyczyną różnych mechanizmów tworzenia się prądów przepływu w tych cieczach. Dłuższy czas relaksacji cieczy niepolarnych powoduje możliwość gromadzenia przez nie ładunków elektrostatycznych. Roztwory elektrolitów pozostają praktycznie zawsze elektrobojętne.

Tabela 1

Niektóre stałe fizykochemiczne charakteryzujące własności cieczy w głębi fazy i w obszarze podwójnej warstwy elektrycznej wodnego roztworu KCl oraz mieszaniny węglowodorów alifatycznych występujących w benzynie.

Parametr	10^{-3} M KCl	Węglowodory alifatyczne
κ Ohm ⁻¹ cm ⁻¹	$1,47 \times 10^{-4}$	10^{-14}
ϵ bezwym.	80	2
D m ² s ⁻¹	$1,9 \times 10^{-9}$	$5,7 \times 10^{-9}$
τ s	5×10^{-8}	18
δ μ m	10^{-2}	184

Czasową zależność zmian stężenia "i"-tego składnika w roztworze opisuje jego równanie bilansu [91, 92]:

$$\partial C_i / \partial t = -\text{div } J'_i + r_i \quad (29)$$

gdzie J - gęstość przepływu masy, r_i - szybkość zmiany stężenia w jednostce objętości w wyniku przebiegu homogennej reakcji chemicznej. Przy czym transport jonów opisać tu można równaniem [91]:

$$J'_i = - \frac{D_i C_i}{R' T} \nabla \tilde{\mu}_i + C_i \bar{u} = - D_i \nabla C_i - D_i C_i \nabla \gamma_i - \frac{F Z_i C_i D_i}{R' T} \nabla \varphi + C_i \bar{u} \quad (30)$$

gdzie R' - uniwersalna stała gazowa, $\tilde{\mu}_i$ - potencjał elektrochemiczny, γ - współczynnik aktywności, φ - potencjał elektryczny.

Dla roztworów rozcieńczonych równanie to upraszcza się do postaci:

$$J'_i = J'_{di} + J'_{mi} + J'_{ki} = - D_i \nabla C_i - F C_i Z_i u'_i \nabla \varphi + C_i \bar{u} \quad (31)$$

W równaniu tym J'_d , J'_m i J'_k oznaczają odpowiednio transport dyfuzyjny, migracyjny i konwekcyjny.

Gęstość prądu j opisać można wówczas poprzez:

$$j = \sum_i J_i = F \sum_i Z_i J_i \quad (32)$$

Po uwzględnieniu równania Kohlrauscha oraz założeniu równych wartości współczynników dyfuzji i ruchliwości jonów dodatnich i ujemnych otrzymuje się równanie:

$$j = -D \nabla s - \alpha \nabla \varphi + s \cdot \bar{u} \quad (33)$$

gdzie $s = F \sum_i C_i$ - objętościowa gęstość ładunku, stanowiące podstawę dalszych rozważań.

Do wyprowadzenia równań opisujących omawiane zjawiska konieczna jest również znajomość rozkładu potencjału w obrębie podwójnej warstwy elektrycznej cieczy. Rozkład ten opisuje równanie Poissona-Boltzmann. Dla energii oddziaływań elektrostatycznych mniejszych od termicznej energii ruchu cząstek, przechodzi ono w równanie Debye a-Hückla [79, 93-97]. Wprawdzie zastosowanie równania Poissona i Boltzmann do opisu budowy warstwy podwójnej budzi od dawna pewne uzasadnione zastrzeżenia, to jednakże do opisu zjawisk elektrokinetycznych stosuje się jednakże i tak jego bardzo uproszczone wersje. W dokładniejszych rozważaniach powinno się dodatkowo uwzględniać również zaburzenie struktury warstwy podwójnej spowodowane ruchem cieczy [94]. Dokładniejszy formalizm matematyczno-fizyczny jest również potrzebny do zrozumienia mechanizmu tworzenia się prądu przepływu w cienkich kapilarach [98, 99]. Przypadek ten nie dotyczy jednak detektorów elektrokinetycznych.

Ciecze niepolarne charakteryzują się grubą, makroskopowych rozmiarów, podwójną warstwą elektryczną (Tabela 1). Stąd w układach kapilarnych ich własności w warstwie

przypowierzchniowej i w głębi fazy są jednakowe. Równomierny rozkład ładunku elektrycznego występuje wtedy, gdy grubość warstwy podwójnej jest większa od średnicy kapilary. Ze względu na tak znaczną jej wartość, efekty elektrokinetyczne w cieczach niepolarnych zależą od tego, czy przepływ cieczy ma charakter laminarny czy turbulentny. Grubość warstwy podwójnej zależna jest od przewodnictwa cieczy (27, 28). Stąd im mniejsza średnica kapilary tym bardziej równomierny rozkład ładunku w cieczy można uzyskać dla większego przewodnictwa cieczy. Przykładowo dla $\epsilon = 2$, $D = 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ i $\kappa = 7 \times 10^{-8} \text{ Ohm}^{-1}\text{cm}^{-1}$ jednorodny rozkład ładunku uzyskuje się dla średnicy rurki $d = 1 \text{ mm}$. Natomiast dla tych samych ϵ i D oraz $\kappa = 7 \times 10^{-20} \text{ Ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dla $d = 10\text{mm}$ |100|.

W roztworach elektrolitów wytwarzanie ładunku zachodzi zawsze według tego samego mechanizmu bez względu na charakter przepływu cieczy. Wynika to z faktu, że nawet przy przepływie turbulentnym w pobliżu granicy faz ciało stałe-ciecz występuje laminarna warstwa przypowierzchniowa o grubości przewyższającej znacznie grubość podwójnej warstwy elektrycznej roztworów elektrolitów. Grubość takiej warstwy laminarnej obliczyć można z równania |86|:

$$\delta_1 = 5 d \text{Re}^{-7/8} = 5d \left(\frac{\rho_{ud}}{\eta} \right)^{-7/8} \quad (34)$$

gdzie Re - liczba Reynoldsa, ρ - gęstość cieczy,
 η - współczynnik lepkości dynamicznej.

Przykładowo dla $Re = 10\ 000$ i $d=1\text{mm}$, $\delta_1 \approx 1,6\ \mu\text{m}$.

Z Tabeli 1 wynika, że grubość warstwy laminarnej jest około stu razy większa od grubości warstwy podwójnej roztworów elektrolitów. Jednocześnie jest ona około stu razy mniejsza od grubości warstwy podwójnej cieczy niepolarnych. Wynika z tego, że w przypadku cieczy niepolarnych przy obliczaniu grubości ich warstw podwójnych powinien być uwzględniony współczynnik dyfuzji wirowej, D_e :

$$D_e = 0,009\ d\ u\ Re^{-1/6} \quad (35)$$

Dla omawianego powyżej przypadku ($u = 1\ \text{m/s}$) uzyskuje się wówczas dla cieczy niepolarnych $\delta = 1,9\ \text{mm}$. Oznacza to nakładanie się dwóch przeciwległych warstw podwójnych oraz równomierny rozkład ładunku elektrycznego wewnątrz rurki. Należy przy tym zaznaczyć, że grubość warstwy dyfuzyjnej jest zwykle mniejsza od grubości warstwy laminarnej. Spowodowane to jest zmniejszeniem się grubości warstwy dyfuzyjnej wskutek ruchu cieczy.

Ruch płynów odbywa się zwykle pod wpływem działania różnicy ciśnienia. Przepływ cieczy rzeczywistych, tzn. lepkich i ściśliwych, opisuje równanie Naviera-Stokesa [92, 96, 101-104]. W problemach elektrokinetycznych często wykorzystuje się uproszczone wersje tego równania. Przykładowo laminarny ruch lepkiej cieczy nieściśliwej przez okrągłe rurki opisuje równanie Hagen-Poiseuille'a. Równanie to wykorzystuje się m.in. przy wyznaczaniu lepkości cieczy metodą oznaczania jej szybkości przepływu przez kapilary. Okazało się przy tym, że tak wyznaczona lepkość cieczy nie zależy od materiału kapilary [105]. Oznacza

to, że cienka warstewka cieczy, tuż przy powierzchni ścianki jest nieruchoma (ciecz płynie wzdłuż cieczy). Wynika z tego, że ruch cieczy może dzielić podwójną warstwę elektryczną na część nieruchomą (adsorpcyjną) oraz poruszającą się wraz z cieczą (rozmytą). Podział taki zakłada się we wszystkich teoriach opisujących generację prądu przepływu.

Opis prądu i potencjału przepływu dotyczy na ogół przypadku w którym zaburzenie mechaniczne cieczy przy wejściu do kapilary można pominąć. W przypadku laminarnego przepływu cieczy, przez rurkę o promieniu R_d , czasową zależność objętościowej szybkości przepływu opisuje równanie [92, 106]:

$$J(t) = J \left| 1 - \exp \left(- \frac{6 \eta t}{\rho R_d^2} \right) \right| \quad (36)$$

gdzie J - oznacza objętościowy przepływ cieczy opisany równaniem Poiseuille'a:

$$J = \frac{\pi R_d^4 \Delta P}{8 \eta l} \quad (37)$$

gdzie ΔP - różnica ciśnień przyłożona do rurki.

Stąd czas, τ_w , lub długość, l_w , wejściową odcinka rurki, w którym rozkład prędkości wpływającej cieczy zmienia się z jednorodnego na paraboliczny, charakterystyczny dla laminarnego przepływu cieczy, obliczyć można z równań:

$$\tau_w = - \frac{9 R_d^4}{6 \eta} \ln\left(1 - \frac{1}{e}\right) \quad (38)$$

$$l_w = u \tau_w = 0,02 \text{ Red} \quad (39)$$

2. Prądy przepływu w cieczach dielektrycznych.

Ciecze dielektryczne, wysokooporowe ($\rho < 10^{-13} \text{ Ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), przepływając przez rurki lub układy kapilarne (wykonane z przewodnika lub dielektryka) ładują się elektrycznie wskutek tarcia [107-113]. Mechanizm tego zjawiska został wyjaśniony w latach sześćdziesiątych naszego stulecia [114-131]. Poszczególni autorzy wyprowadzili równania opisujące zależność wielkości gęstości ładunku bądź prądu przepływu od różnych własności cieczy i parametrów rurki lub kapilary oraz dla różnych założeń odnoszących się do charakteru przepływu cieczy i budowy warstwy podwójnej [89]. Z powodu dużego oporu tych cieczy (porównywalnego z oporem kapilar) nie jest w nich możliwy pomiar potencjału przepływu [132].

Zetknięciu dwóch różnych ciał towarzyszy przejście elektronów z jednej powierzchni na drugą. Spowodowane to jest różnicą powierzchniowego stężenia ładunku i różnicą prac wyjścia elektronów w obu fazach.

Na granicy styku metalu z dielektrykiem elektrony przechodzą do materiału dielektrycznego, charakteryzującego się mniejszą pracą wyjścia elektronów (niższym poziomem Fermiego) [130]. Podobna sytuacja występuje na granicy styku dwu różnych materiałów dielektrycznych. Powoduje

to powstanie podwójnej warstwy elektrycznej w ich warstwach powierzchniowych. Rozdzielenie ich prowadzi do rozdzielenia ładunków. Oznacza to, że oba materiały pozostają elektrycznie naładowane. Empiryczna reguła Coehna [133] mówi, że dielektryk o większej przenikalności elektrycznej ładuje się dodatnio, a dielektryk o mniejszej przenikalności ujemnie. Wielkość powstałych ładunków zależy od różnicy przenikalności elektrycznych obu materiałów.

Istotne jest w tym miejscu pytanie, skąd biorą się ładunki elektryczne w cieczach dielektrycznych. Otóż okazuje się, że nawet w idealnie czystych cieczach niepolarnych występuje pewna, śladowa ilość jonów. Są one przyczyną przewodnictwa tych cieczy. Przykładowo dla cieczy o $\kappa = 10^{-12} \text{ Ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $D = 5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ i $z = 1$, zgodnie z równaniem Kohlrauscha:

$$\kappa = F^2 \sum_i z_i^2 u_i C_i = \frac{F^2}{R \cdot T} \sum_i z_i^2 C_i D_i \quad (40)$$

stężenie jonów wynosi $4 \times 10^{-11} \text{ M}$. Jony te powstają w wyniku autojonizacji cząsteczek rozpuszczalnika, jego jonizacji promieniowaniem kosmicznym lub izotopami promieniotwórczymi zawartymi w cieczy bądź ściance kapilary [132]. Główną przyczyną ich występowania jest jednakże dysocjacja zawartych w cieczy zanieczyszczeń. Potwierdza to fakt 30% spadku przewodnictwa cieczy po jej przepłynięciu przez kapilarę metalową [144].

Równanie opisujące natężenie prądu przepływu podczas przepływu cieczy niepolarnych przez kapilary metalowe wyprowadzić można z równania (29). W przypadku

niewystępowania reakcji chemicznej i zmian stężenia w czasie równanie to upraszcza się do postaci:

$$\operatorname{div} J = 0 \quad (41)$$

W przypadku turbulентnego przepływu cieczy po lewej stronie równania (41) występuje średnia czasowa z dywergencji.

Jeśli przyjąć, że elektrodowe procesy utleniania - redukcji mogą zachodzić również w roztworach cieczy niepolarnych typu węglowodorów nasyconych, to wówczas procesom tym towarzyszyć będzie transport jonów do powierzchni ciała stałego wywołany gradientem potencjału na granicy faz. Gdy ładunek z powierzchni ciała stałego zostanie odprowadzony, np. przez uziemienie, wówczas ciecz unosić będzie ładunki przeciwnego znaku $|100|$. Spowodowane to jest jej dużym czasem relaksacji (Tabela 1). Procesowi temu towarzyszą dwa typy polaryzacji. Pierwszy to polaryzacja stężeniowa, której przyczyną jest mała szybkość dyfuzji jonów w stosunku do szybkości ich rozładowywania. Drugi polega na wzroście stężenia jonów przeciwnego znaku, wzdłuż długości kapilary, co powoduje zmiany w strukturze warstwy podwójnej.

Całkowity przepływ prądu przez powierzchnię ścianki kapilary, j_s , opisany jest za pomocą równania:

$$j_s = -D \left. \frac{ds}{dr} \right|_{x_i R_d} - x \left. \frac{d\varphi}{dr} \right|_{x_i R_d} \quad (42)$$

gdzie r' - radialna odległość od osi kapilary, x - osiowa odległość od początku kapilary.

Pierwszy składnik prawej strony równania (42) odpowiada dyfuzyjnemu przepływowi ładunku, który zapisać można [89, 93, 119]:

$$D \frac{ds}{dr'} = \pm \frac{DF}{d_e n'} (C - C_0) = 0 \quad (43)$$

gdzie d_e - grubość warstwy dyfuzyjnej, C_0 - stężenie jonów przy powierzchni granicy faz.

Równanie to określa warunki brzegowe równania (33).

Drugi składnik równania (42) odpowiada za efekty polaryzacji. Jego wartość wynosi zero u wlotu do kapilary i wzrasta wzdłuż jej osi. Dla długich kapilar osiąga on tę samą wartość co składnik pierwszy lecz jest przeciwnego znaku. W konsekwencji prowadzi to do $j_s = 0$. Po podstawieniu do równania (33) równania Poissona, otrzymuje się [100, 114-116] zależność opisującą prąd przepływu, I , cieczy dielektrycznych:

$$I = \pm \frac{\pi R_d \epsilon \epsilon_0 R' T}{d_e n' F} \left(1 - \frac{C_0}{C}\right) |1 - \exp(-l/\bar{u}\tau)| \quad (44)$$

Powyższe równanie wyprowadzone zostało przy założeniu, że w cieczy znajdują się tylko jony jednowartościowe o równych sobie współczynnikach dyfuzji molekularnej, ciecz jest nieściśliwa, natomiast jej przewodnictwo jest stałe i niezmienne w czasie.

Dla długich kapilar, małych szybkości przepływu i dużych przewodnictw cieczy ($1 \gg \bar{u}\tau$), czynnik eksponencjalny w równaniu (44) znika [86, 100]. Stąd:

$$I = I^{\infty} |1 - \exp - (l / \bar{u} \tau)| \quad (45)$$

gdzie I^{∞} - prąd przepływu dla nieskończenie długich kapilar.

Oznacza to niezależność natężenia prądu przepływu od długości zastosowanej kapilary. Doświadczalnie stwierdzono, że stabilizacja prądu następuje po przepłynięciu przez ciecz odległości równej 20-40 średnic kapilar.

Dla $l \ll \bar{u} \tau$ wyraz w nawiasie ostatniego równania przyjmuje wartość $l / \bar{u} \tau$. Oznacza to wprost proporcjonalną zależność natężenia prądu przepływu od długości kapilary.

Omawiane równania wielokrotnie zostały zweryfikowane eksperymentalnie [111-116, 134, 135]. Szczególnie dobrą zgodność teorii z doświadczeniem zaobserwowano w przypadku kapilar o małych średnicach, dla dużych szybkości przepływu oraz małych przewodnictw właściwych cieczy. Należy przy tym wyraźnie zaznaczyć, że z reguły nie są znane reakcje elektrodowe przebiegające na powierzchni kapilary. Stąd, zgodna z przewidywaniami jest jedynie średnia czasowa bezwzględnej wartości natężenia prądów przepływu uzyskanych z pomiarów przeprowadzonych w różnych warunkach [108, 128].

Wzrost przewodnictwa cieczy z jednej strony zwiększa stężenie jonów mogących ulegać reakcjom elektrodowym, z drugiej zaś zwiększa prąd przewodnictwa oraz zmniejsza wartość potencjału na granicy faz. Z tego powodu ze wzrostem przewodnictwa cieczy początkowo obserwuje się wzrost, następnie zmniejszanie natężenia prądu przepływu. Maksimum tej zależności przesuwają się w kierunku

większych przewodnictw ze wzrostem szybkości przepływu cieczy.

3. Prądy przepływu w roztworach elektrolitów.

Rozważmy roztwór elektrolitu w cieczy polarnej ($\kappa > 10^{-8} \text{ Ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) przepływający przez kapilarę lub przegrodę porowatą wykonaną z dielektryka. Jego ruch dzieli podwójną warstwę elektryczną na część ruchomą i nieruchomą [77-82, 86, 90]. Różnica potencjałów między płaszczyzną poślizgu rozgraniczającą obie te części, a punktem w głębi roztworu nosi nazwę potencjału elektrokinetycznego, ζ . Jeżeli płaszczyznę poślizgu i płaszczyznę w głębi cieczy, o stałym potencjale, potraktować jako okładki kondensatora płaskiego, wówczas potencjał elektrokinetyczny przedstawić można, zgodnie z równaniem Helmholtza, za pomocą wyrażenia:

$$\zeta = q d_m / \epsilon \epsilon_0 \quad (46)$$

gdzie q - powierzchniowa gęstość ładunku, d_m - grubość ruchomej części podwójnej warstwy elektrycznej.

Potencjał elektrokinetyczny w pewnym przybliżeniu uważać można za równoznaczny z potencjałem Sterna (maksymalnego przybliżenia jonów) [79, 94].

Wyrażenie opisujące prąd przepływu otrzymuje się z warunku elektroobojętności całego przekroju kapilary (ładunki elektryczne ruchomej i nieruchomej części warstwy podwójnej są równe co do wartości lecz przeciwnego znaku):

$$I = 2\pi R_d q \bar{u} = \pi s R_d^2 \bar{u} \quad (47)$$

Z kolei zależność liniowej szybkości przepływu cieczy od ciśnienia, ΔP , i odległości od osi kapilary opisuje równanie Hagera-Poiseuille'a [92, 96, 103, 136]:

$$u = \frac{R_d^2 - r^2}{4 \eta l} \Delta P \quad (48)$$

Dla $d_m \ll R_d$ równanie (48) upraszcza się do postaci:

$$u = d_m R_d \Delta P / 2 \eta l \quad (49)$$

Połączenie równań (46) - (49), po przekształceniach, prowadzi do równania Smoluchowskiego, przedstawiającego zależność prądu przepływu od ciśnienia przyłożonego do kapilary [90]:

$$I = \frac{\pi R_d^2 \epsilon \epsilon_0 \zeta \Delta P}{\eta l} \quad (50)$$

Przy jego wyprowadzaniu przyjęto, w stosunku do równania (33), następujące uproszczenia: $\nabla C = \nabla \mu = \nabla \varphi = 0$. Oznacza to, że prąd przepływu jest prądem związanym jedynie z konwekcyjnym przepływem cieczy. Wytworzonemu w kapilarze prądowi przepływu towarzyszy potencjał przepływu, E , mierzony na jej końcach. Ze względu na to, że w roztworze elektrolitu musi być spełniony warunek elektroobojętności cieczy (mały czas relaksacji) wpływającej i wypływającej z kapilary, potencjał przepływu powoduje wstanie w kapilarze prądu opornościowego, I_m :

$$I_m = \pi R_d^2 \kappa E/l \quad (51)$$

Prąd ten ma przeciwny zwrot do prądu przepływu i rozładunku ładunki gromadzące się na końcach kapilary.

W stanie stacjonarnym wartości bezwzględne natężeń obu prądów są sobie równe. Z przyrównania lewych stron równań (50) i (51) otrzymuje się po przekształceniach:

$$E = \zeta \epsilon \epsilon_0 \Delta P / \eta \kappa \quad (52)$$

Z powyższego równania wynika, że stosunek $E / \Delta P$ jest dla danej cieczy stały, niezależny od wymiarów kapilary. Efekt ten wielokrotnie został potwierdzony eksperymentalnie [78, 137-147]. Należy przy tym zaznaczyć, że równanie (52) stosuje się jedynie do kapilar o stosunkowo dużych średnicach i długościach. Dla kapilar bardzo krótkich należy dodatkowo uwzględnić efekty związane z zaburzeniem przepływu cieczy u wlotu do kapilary. W kapilarach cienkich (tzn. gdy stosunek przekroju warstwy podwójnej do powierzchni przekroju kapilary jest duży) należy dodatkowo uwzględnić przewodnictwo powierzchniowe cieczy, λ , [84, 139, 140]:

$$E = \frac{\zeta \epsilon \epsilon_0 \Delta P}{\eta (\kappa + 2\lambda/R_d)} \quad (53)$$

Przewodnictwo to związane jest z przewodnictwem nieruchomej części warstwy podwójnej oraz z dysocjacją grup $\equiv \text{SiOH}$ i $= \text{BOH}$ z powierzchni szkła [142].

W przypadku jeszcze cieńszych kapilar należałoby uwzględnić wpływ natężenia pola elektrycznego na przenikalność elektryczną i lepkość (efekt przeciwelektroosmotyczny) cieczy, a także zastosować do opisu spadku potencjału w warstwie podwójnej i przepływu cieczy bardziej rozwinięte postaci równania Poissona-Boltzmanna i Navier-Stokesa [78,98]. Sformułowanie "cienkie" kapilary jest względne. Zależy ono od stężenia roztworu. Im bardziej rozcieńczony elektrolit tym większa jest grubość podwójnej warstwy elektrycznej (równanie (27)). Tym niemniej nawet dla najbardziej rozcieńczonych roztworów wszystkie powyższe efekty zaczynają odgrywać znaczącą rolę dopiero przy średnicach kapilar mniejszych niż 10 μm . Nie mają więc one większego znaczenia w odniesieniu do detektorów elektrokinetycznych.

Wzrost stężenia elektrolitu obniża wartość potencjału przepływu wskutek zmniejszenia grubości warstwy podwójnej oraz wzrostu przewodnictwa i specyficznej adsorpcji na granicy faz. Podobny efekt powoduje wzrost wartościowości i objętości (mniejsza solwatacja) jonu. Związki powierzchniowo-aktywne dodane w niewielkich ilościach do roztworów wodnych obniżają wartość potencjału przepływu. W miarę zwiększania ich stężenia, czasami obserwuje się na przemian kilkukrotny wzrost i spadek wartości potencjału elektrokinetycznego [78]. Spowodowane jest to najprawdopodobniej tworzeniem się kilku warstw przeciwnie zorientowanych dipoli cząsteczek powierzchniowo-aktywnych.

Kapilarę szklaną w pomiarach potencjału przepływu można traktować jako elektrodę czułą na stężenie jonów wodorowych [139,140]. Wyznaczone doświadczalnie nachylenie krzywej $f(\lg C)$ jest z reguły znacznie mniejsze niż 58mV, której to wartości można by się spodziewać przez analogię do równania Nernsta. Wywołane jest to najprawdopodobniej złożoną zależnością stężenia powierzchniowego jonów od ich stężenia w głębi roztworu. Przy większych stężeniach kationów kapilarę szklaną można traktować jako elektrodę czułą na ich stężenie [80,141]. Należy przy tym zaznaczyć, że całkowity spadek potencjału na granicy faz kapilara-roztwór jest dużo większy od potencjału elektrokinetycznego. Spowodowane jest to tym, że największy spadek potencjału występuje na nieruchomej (adsorbcyjnej) części warstwy podwójnej. Potwierdza to m.in. fakt, że potencjał elektrody szklanej zanurzonej w $5 \times 10^{-4} \text{M}$ roztworze NaOH, a następnie w $5 \times 10^{-4} \text{M}$ HCL zmienia się o 430mV, podczas gdy potencjał przepływu zmienia się wówczas tylko o 15mV [105].

Wprowadzenie cieczy w drgania o kierunku równoległym względem ścianek kapilary powoduje powstanie prądu zmiennego o tej samej charakterystyce jak wymuszające drgania mechaniczne [148,149]. Efekt ten występuje tylko w cieczach polarnych i nosi nazwę efektu II-1.

4. Detektory elektrokinetyczne.

Przykładem praktycznego wykorzystania tworzenia się potencjału i prądu przepływu są detektory elektrokinetyczne. Służą one do wyznaczania stężeń składników w przepływających przez nie roztworach. Znajdują one zastosowanie przede wszystkim w wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Pierwszy taki detektor, z pomiarem potencjału przepływu, skonstruowany został w 1967 r. przez Ando i wsp. [150]. Składał się on z kapilary, lub rurki wykonanej z dielektryka z wypełnieniem drobnoziarnistym będącym również dielektrykiem. Na obu końcach takiego elementu pracującego detektora zamocowane były elektrody wykonane z metalu chemicznie odpornego. Wykrywalność wodnego roztworu KCl przez detektor wynosiła $10^{-8}M$, przy objętości wstrzykiwanej próbki $0,33cm^3$.

W 1970 r. Lauer i Anta [113] zaobserwowali, że pole pod powierzchnią wykresu $I = f(t)$, uzyskiwanego na przegrodzie porowatej wykonanej z Al_2O_3 gdy^wbieg strumienia węglowodoru nasyconego (izooktanu) wstrzykiwana była olefina (heksen-1), proporcjonalne jest do objętości wstrzykiwanej olefiny. Zaobserwowanego efektu nie wykorzystali oni jednak praktycznie.

Zagadnienie elektrokinetycznej detekcji rozwijane było następnie w ośrodku w Brnie [151-160]. Skonstruowano tam kilka modeli detektorów elektrokinetycznych z pomiarem prądu przepływu i zastosowano je do chromatografii faz normalnych. Terabe i wsp. [161-164] zastosowali detektor z pomiarem prądu przepływu w chromatografii faz

odwróconych i chromatografii jonowymiennej.

Krejčí i Šlais [152] zastosowali do konstrukcji detektora wiązkę kilkuset kapilar szklanych. Wytworzony w kapilarach ładunek odprowadzony był za pomocą drutu miedzianego nawiniętego na całej długości wiązki. Zaobserwowali oni, że im dłuższe były kapilary tym szerszy był przedział szybkości przepływu cieczy, w którym odpowiedź detektora nie była zależna od tej szybkości. Wniosek ten jest zgodny z przewidywaniami równania (44).

Rolę detektora elektrokinetycznego może również spełniać metalowa kolumna chromatograficzna, elektrycznie odizolowana od układu pompującego [153]. Wstrzyknięcie próbki do kolumny zaburza jej równowagę elektryczną, co oznacza powstanie sygnału elektrycznego. Zależność gęstości ładunku generującego się na kolumnie chromatograficznej od przebytej przez próbkę drogi, y , opisuje równanie:

$$s = s_{av} |1 - \exp - (Ay/H)| \quad (54)$$

gdzie A - stała charakteryzująca kolumnę.

Ze wzoru tego wynika, że dla $y > 2H$, $s = s_{av}$. Oznacza to, że próbka po przejściu w kolumnie odległości równej dwóm wysokościami półek teoretycznych przestaje generować ładunek elektrokinetyczny różny od poziomu tła. Następny sygnał na chromatogramie jest obserwowany podczas opuszczania ^{przez} próbki kolumny. Gdy na końcu kolumny umieścić dodatkowo metalową rurkę o średnicy na tyle dużej, by nie

generowała własnego prądu przepływu, wówczas mierzony na niej prąd ma tę samą wartość bezwzględną, lecz przeciwny znak w stosunku do prądu generowanego w kolumnie. Spowodowane to jest opisanym poprzednio elektrostatycznym ładowaniem się cieczy dielektrycznych. Na tej samej zasadzie działa detektor zbudowany z kapilary szklanej z wtopionym w nią adsorbentem [156,157,159,160]. Kapilara taka spełnia jednocześnie rolę kolumny chromatograficznej i detektora. Z ciekawszych zastosowań należy wymienić możliwość oznaczania objętości ^{wymycia} kolumny chromatograficznej za pomocą detektora elektrokinetycznego [155], czy też zastosowanie go do oznaczania stopnia czystości wody w przepływie [165,166].

Na podobnej, do detektorów elektrokinetycznych, zasadzie działa detektor rozpryskowy [167,168]. Wykorzystuje się w nim, odkryte w 1892 r. przez Lenarda, zjawisko polegające na nierównomiernym podziale ładunków elektrycznych podczas rozprysku kropelek cieczy na ciele stałym.

Efekt tworzenia się prądu przepływu był również wykorzystany do oznaczania szybkości przepływu fazy ruchomej w układzie chromatograficznym [169].

W momencie gdy rozpoczynałem pracę nad zagadnieniem elektrokinetycznej detekcji w HPLC tylko niektóre z wymienionych powyżej prac były wówczas już opublikowane. Ponieważ wydawało się wówczas, że ten typ detekcji może znaleźć szersze zastosowanie w HPLC, dlatego celowe wydawało się dokładniejsze zbadanie możliwości tego typu detekcji. Przede wszystkim nie znane były wówczas

nawet podstawowe parametry (wykrywalność, zakres dynamiki liniowej, czułość itp.) charakteryzujące ten typ detekcji. Ponadto nigdzie nie były omówione zagadnienia przedstawione w Celu Pracy niniejszej rozprawy.

D. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.

1. Opis zastosowanej aparatury.

Pomiary wykonane zostały z zastosowaniem chromatografu cieczowego T-302 (ICHF PAN, Warszawa). Jego pompa strzykawkowa, napędzana silnikiem krokowym, zapewnia bezpulsacyjny i stały w czasie przepływ fazy ruchomej. Ciśnienie przed kolumną mierzone w nim jest za pomocą tensometrycznego czujnika ciśnienia umiejscowionego w głowicy chromatografu. Pojemność cylindra tłoka (zbiornika fazy ruchomej) wynosi 250 cm^3 . Maksymalne ciśnienie pracy chromatografu wynosi 30 MPa. Płynna regulacja umożliwia ustawienie szybkości przepływu fazy ruchomej w zakresie $5 - 100 \text{ mm}^3/\text{s}$ z dokładnością do $0,1 \text{ mm}^3/\text{s}$. Chromatograf wyposażony jest w wysokociśnieniowy dozownik o objętości $5 \mu\text{l}$. Pomiary w układzie chromatografii faz normalnych wykonywane były przy zastosowaniu dozownika pętlicowego Rheodyne 7120 z pętlą o objętości $1000 \mu\text{l}$. Powtarzalność objętości zastrzyknięć w obu przypadkach była lepsza niż 1%. Kolumna chromatograficzna, wykonana ze stali kwasoodpornej (1H18N 9T) podwieszona jest bezpośrednio do zaworu dozującego. Stosowane były kolumny o długościach 150 i 250 mm i średnicy wewnętrznej 4mm. Kolumna chromatograficzna wraz z dozownikiem znajdowała się w termostacie powietrznym (ICHF PAN, Warszawa) w temperaturze 20°C .

Prąd i potencjał przepływu mierzone były za pomocą układu zbudowanego w oparciu o wysokoomowy wzmacniacz operacyjny (opisany on będzie w następnej części pracy) lub za pomocą elektrometru Z.R. M.Kasprzaka T-219(Warszawa). Potencjał na wyjściu elektrometru odczytywany był za pomocą multimetru V-543 (Mera-Tronik, Warszawa) i rejestratora potencjometrycznego, Sefram PE (Paryż, Francja).

pH roztworu oznaczano za pomocą pehametru Mera-Tronik N-517 (Warszawa).

2. Stosowane odczynniki.

Jako wypełnienia kolumn zastosowano złoża chromatograficzne LiChrosorb Si 100, 10 μm , LiChrosorb RP-18, 10 μm oraz LiChrosorb KAT firmy E. Merck (Darmstadt, RFN). Do badań wstępnych użyto kolumny wypełnionej kulkami szklanymi 80 mesh (BDH, Poole, Wielka Brytania).

Eluenty przygotowywane były z następujących rozpuszczalników: wody czterokrotnie destylowanej z naczynia kwarcowego, spektralnie czystego metanolu, izopropanolu i heksanu (E.Merck).

Nadchloran czteroetyloamoniowy przygotowany został w czystych do analizy - bromku czteroetyloamoniowego (Reachim, ZSRR) i kwasu nadchlorowego (VEB Laborchemie-Apolda, NRD).

Pozostałe związki (analizowane kwasy, odczynniki do przygotowania buforów i eluentów stosowanych w pracach wstępnych), czyste do analizy, spektralnie czyste lub czyste do chromatografii, pochodziły z firm POCh (Polska),

E. Merck (RFN) i Fluka (Austria).

3. Procedura.

W badaniach wstępnych stosowano kolumnę wykonaną (ICHF PAN) ze stali kwasoodpornej, długości 150 mm i średnicy wewnętrznej 4 mm, wypełnioną kulkami szklanymi 80 mesh (BDH) metodą usypową.

Kolumny chromatograficzne ładowane były, złożem LiChrosorb RP-18, 10 μ m, LiChrosorb Si 100, 10 μ m oraz LiChrosorb KAT (E. Merck), metodą lepkościową (równowaga gęstości złoża i cieczy dyspergującej) [170]. Do nabijania kolumn stosowana była pompa gazowo-cieczowa zaprojektowana i wykonana w IChF PAN [170]. Stosowano następującą procedurę postępowania. Odważoną ilość złoża (zależną od wymiarów kolumny) przenoszono do kolbki. Dodawano do niej następnie odpowiednią ilość cieczy dyspergującej. Kolumnę, zabezpieczoną na końcu siatką nylonową, stalową i krążkiem bibuły, mocowano w statywie pompy. Nad nią mocowano zbiornik, do którego wlewano zdyspergowaną w ciągu dziesięciu minut na płucze ultradźwiękowej zawartość kolbki. Do pompy zasysano ciecz tłoczną. Następnie otwierano zawór gazu w pompie. Sprężony gaz, azot, z butli pchał wówczas pod ciśnieniem 420 atm. hydrauliczny tłok i ciecz tłoczną. Ciecz ta wtłaczała i ubijała zawiesinę w kolumnie.

Kolumnę chromatograficzną przed użyciem kondycjonowano przepuszczając przez nią 250 cm³ fazy ruchomej stosowanej następnie do rozdziałów. Kolumnę napełnioną

silikażelem wstępnie kondycjonowano bezwodnym benzenem w celu wymycia z niej rozpuszczalników polarnych.

W pracy stosowano kolumny wykonane ze stali kwaso-odpornej o średnicy wewnętrznej 4 mm oraz długości 150 mm (LiChrosorb RP-18, LiChrosorb KAT) i 250 mm (LiChrosorb Si 100). Złóże RP (1,5g) dyspergowano w 15 cm³ mieszaniny dioksan + czterochlorek węgla (50 + 50) obj./obj., silikażel (1,9g) w 20 cm³ mieszaniny izopropanol + czterochlorek węgla (65 + 35) obj./obj., natomiast złóże jonowymienne (1,5g) w 15 cm³ wody. Jako ciecze tłoczne w dwóch pierwszych przypadkach stosowano metanol, w trzecim wodę.

Do przygotowania eluentów stosowano wodę czterokrotnie destylowaną z destylarki kwarcowej firmy Heraeus (RFN). Pozostałe rozpuszczalniki używano bez wstępnego oczyszczania. Przed użyciem, faza ruchoma była przez piętnaście minut odgazowywana na płuczce ultradźwiękowej, pod próżnią wytworzoną przez pompkę wodną.

Nadchloran czteroetyloamoniowy, TEAP, przygotowany został przez jego wytrącenie z wodnego roztworu bromku czteroetyloamoniowego i kwasu nadchlorowego w temperaturze 60°C [171].

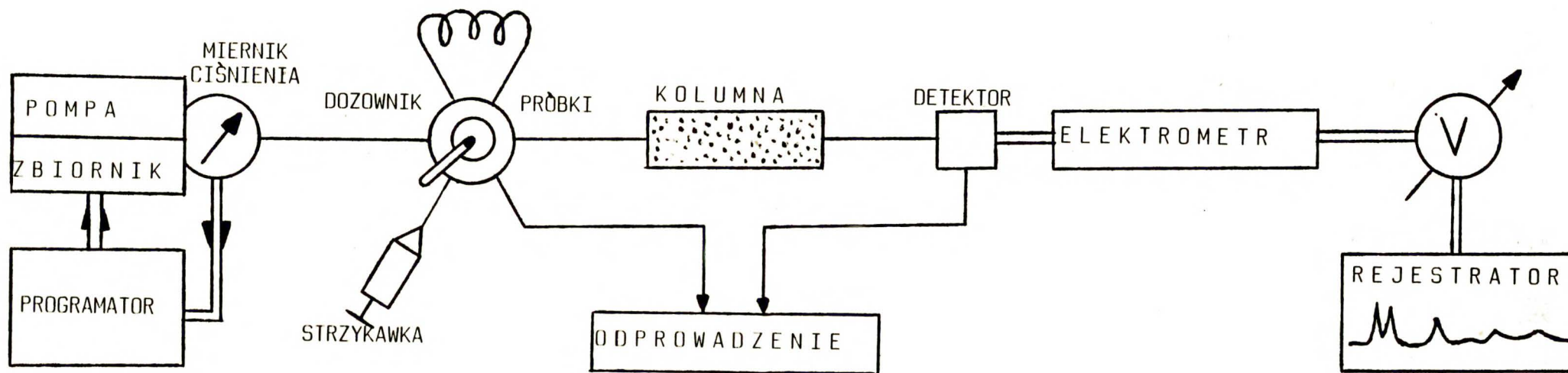
E. KONSTRUKCJA DETEKTORA.

1. Budowa celki pomiarowej detektora elektrokinetycznego.

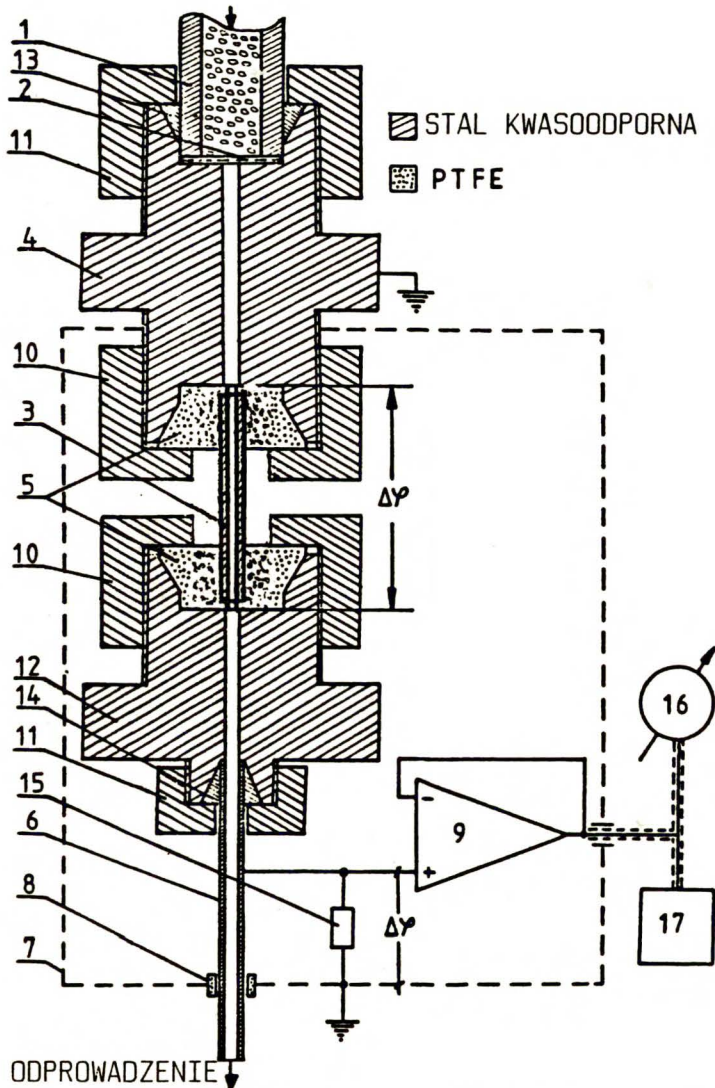
Schemat zestawu chromatograficznego z detektorem elektrokinetycznym przedstawiony został na Rys.1. Składa się on z chromatografu opisanego w poprzedniej części pracy oraz detektora elektrokinetycznego połączonego z elektrometrem, woltomierzem i rejestratorem.

Schemat celki pomiarowej detektora elektrokinetycznego z kapilarą metalową przedstawiono na Rys.2 [172], natomiast detektora z kapilarą wykonaną z dielektryka na Rys.3 [173]. Eluat z kolumny chromatograficznej /1/ odprowadzany był, przez siatkę zabezpieczającą /2/ i złącze /4/, do kapilary pracującej detektora /3/. W pracy stosowane były kapilary wykonane z PTFE (politetrafluoroetylen), szkła borokrzemowego i stali kwasoodpornej. Kapilara stalowa odizolowana była od reszty układu stożkami uszczelniającymi /5/ wykonanymi z PTFE. Eluat odprowadzany był na zewnątrz poprzez kapilarę /6/. Kolumna chromatograficzna wraz z układem pompującym, złączem /4/ i ekranem /7/ była uziemiona. Potencjał lub prąd przepływu mierzone były na złączu /12/ względem ziemi.

W chromatografii faz normalnych w charakterze detektora elektrokinetycznego stosowana była zwykła kolumna chromatograficzna [174]. Kolumna ta, podobnie do kapilary na Rys. 2, odizolowana była od reszty układu i dokładnie ekranowana. Pomiar prądu przepływu dokonywany był na niej poprzez jej połączenie z elektrometrem.

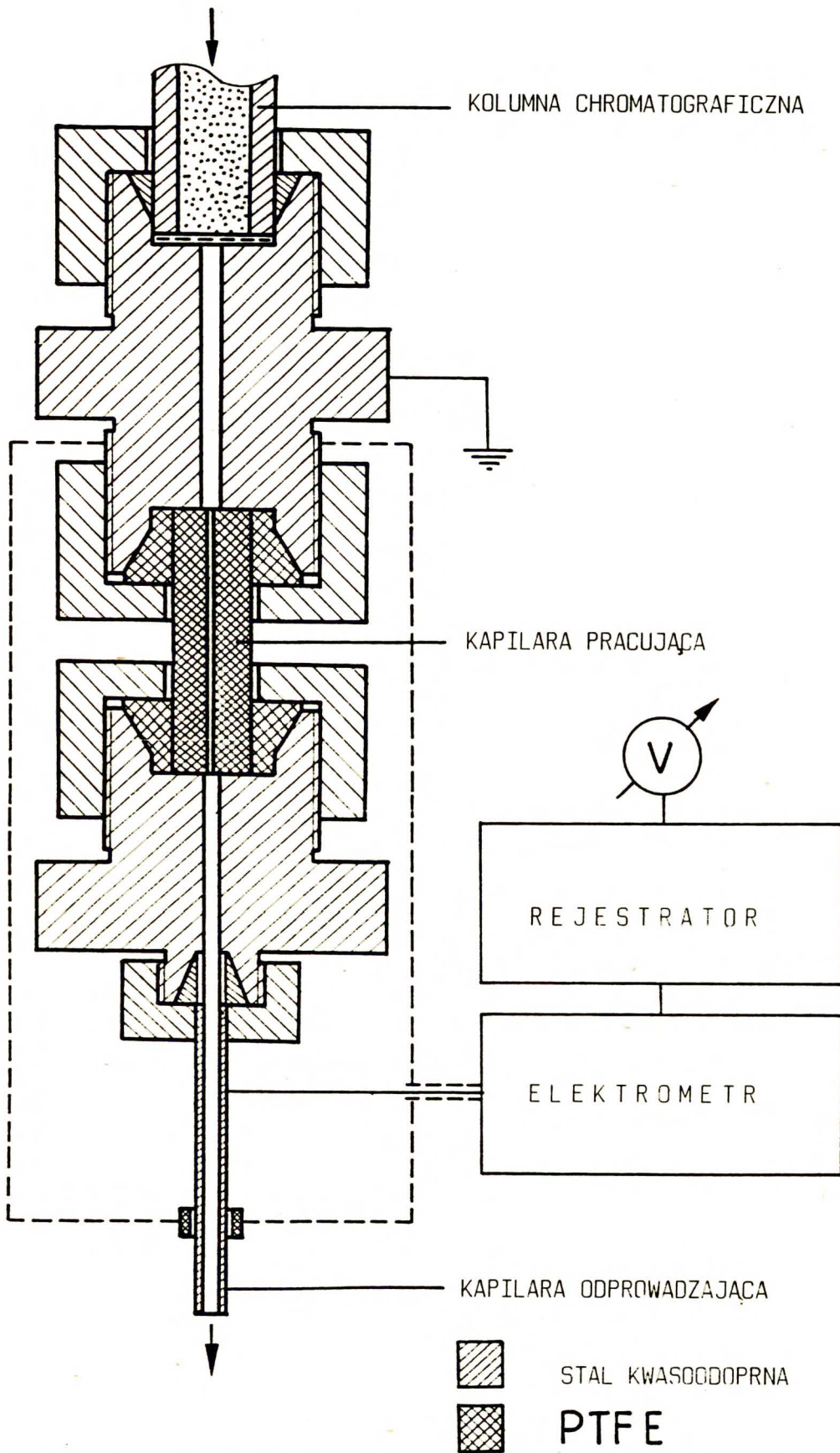


Rys. 1. Schemat układu chromatograficznego z detektorem elektrokinetycznym.



Rys. 2. Schemat celki detektora elektrokinetycznego z kapilarą metalową.

- 1 - kolumna chromatograficzna, 2 - siatka zabezpieczająca, 3 - kapilara pracująca detektora, 4 - złącze M12/M12, 5 - stożki uszczelniające,
- 6 - rurka odprowadzająca, 7 - ekran, 8 - uszczelka izolująca,
- 9 - wzmacniacz operacyjny RCA-715, 10 - nakrętka M12, 11 - nakrętka M6,
- 12 - złącze M12/M6, 13 - stalowy stożek uszczelniający 5/10,
- 14 - stalowy stożek uszczelniający 4/3,5, 15 - opornik 10^{11} Ohm,
- 16 - woltomierz cyfrowy, 17 - rejestrator X-t.



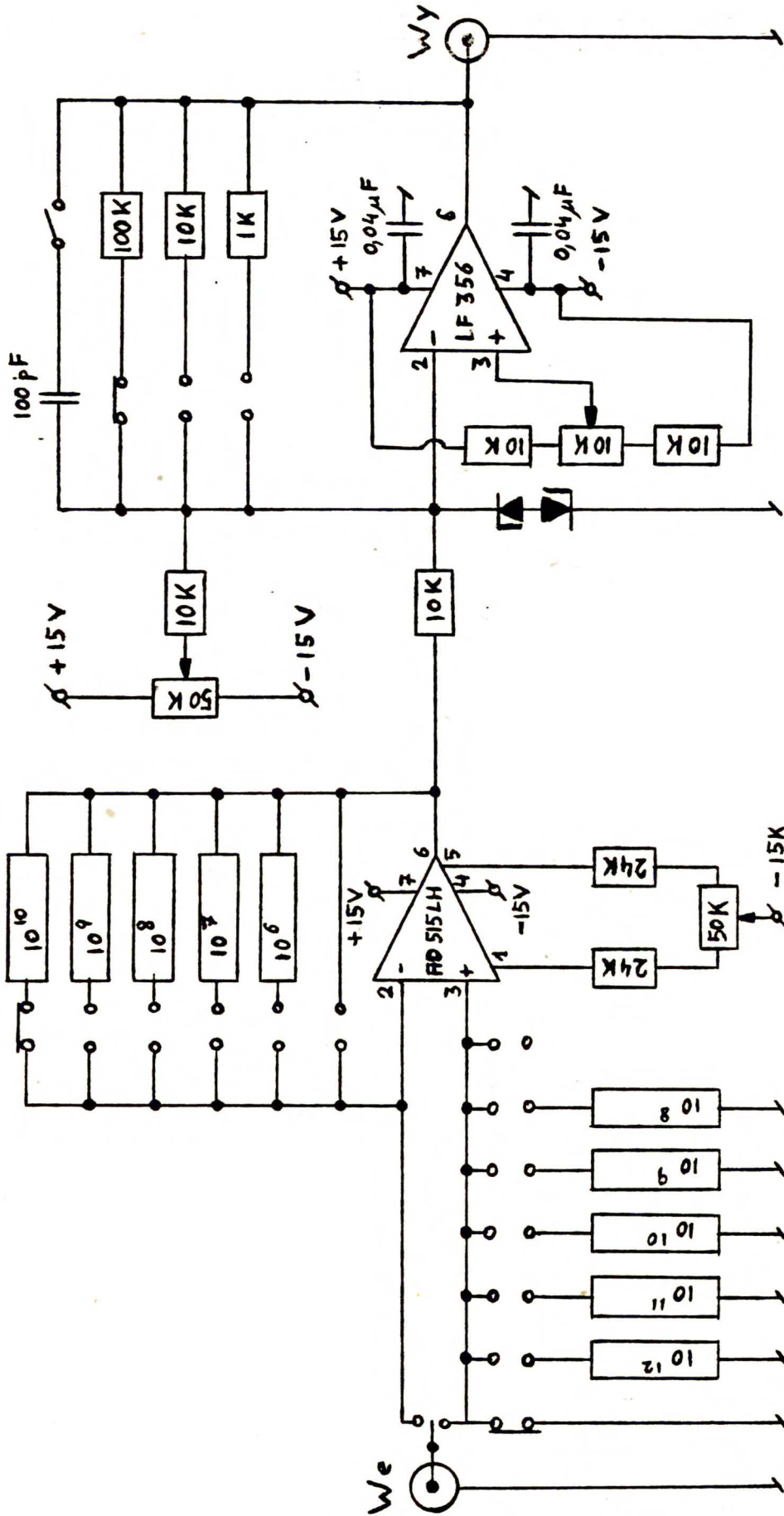
Rys. 3. Celka pomiarowa detektora elektrokinetycznego z kapilarą pomiarową wykonaną z dielektryka.

2. Pomiar potencjału i prądu przepływu w detektorze.

W układzie przedstawionym na Rys.2 potencjał przepływu mierzony był za pomocą układu elektrometrycznego ze wzmacniaczem operacyjnym /9/ RCA-715. Obwód ten charakteryzował się opornością wejściową /15/ 10^{11} Ohm [173]. Wzmacniacz zasilany był ze stabilizowanego zasilacza ZT-980-Z (Unitra-Unima, Warszawa). Wartość mierzonego potencjału odczytywano multimetrem Mera-Tronik V-543 i zapisywano na rejestratorze Sefram PE.

W trakcie pracy okazało się, że konieczne jest zbudowanie układu umożliwiającego pomiar zarówno potencjału, jak i prądu przepływu. Zestaw taki widoczny jest na Rys.3. Oparty on jest na elektrometrze M.Kasprzak T-219. Natomiast na Rys.4 przedstawiono układ zbudowany, wspólnie z Działem Elektroniki i Informatyki Technicznej IChF PAN, w oparciu o wzmacniacz AD 515 LH. Pomiaru wykonywane były z zastosowaniem obu układów.

Pierwszy był wygodniejszy w użyciu ponieważ wszystkie jego przełączniki znajdowały się na płycie czołowej elektrometru. Drugi lepiej nadawał się do pomiarów małych prądów (chromatografia faz normalnych), ponieważ charakteryzował się niższym poziomem szumów. Wykonany on został, łącznie z zasilającymi go bateriami, na jednej płytce. Wadą jego było to, że nie posiadał żadnych wyprowadzonych na zewnątrz przełączników. Z tego powodu zmiana charakteru (pomiar prądu bądź potencjału) lub zakresu jego pracy wymagała odkręcenia jego obudowy i ręczną zmianę położenia odpowiedniego opornika.



Rys. 4. Schemat elektryczny układu do elektrometrycznego pomiaru prądu i potencjału.

Zaletą tego układu była możliwość bezpośredniego, wraz z celką pomiarową, przyłączenia go do kolumny chromatograficznej. Eliminowało to znacznie pozakolumnowe rozmycie piku. Umieszczenie układu pomiarowego tuż przy celce pomiarowej (krótki kabel połączeniowy) oraz zastosowanie zasilania bateryjnego umożliwiło znaczne zmniejszenie poziomu szumów.

Gdy wejście nieodwracalne pierwszego ze wzmacniaczy połączone jest z ziemią, a w obwód jego sprzężenia zwrotnego włączony jest opornik, wówczas wzmacniacz taki pracuje w układzie tzw. wtórnika prądowego [175,176]. Napięcie wyjściowe, E_o , takiego układu jest wówczas wprost proporcjonalne do jego prądu wejściowego, i_i :

$$E_o = - \frac{A_o i_i R_f}{1 + A_o} \approx - i_i R_f \quad (55)$$

gdzie A_o - współczynnik wzmocnienia wzmacniacza operacyjnego bez sprzężenia zwrotnego, R_f - opór sprzężenia zwrotnego.

Równanie (55) można było napisać w uproszczonej formie ze względu na bardzo dużą wartość A_o (w tym przypadku wynosi ona 10^{20}).

Jak wiadomo w przypadku pomiaru prądu, miernik powinien mieć zanedbywalnie mały opór w stosunku do oporu mierzonego źródła. Gdy impedancja wejściowa miernika równa jest 1/100 impedancji mierzonego źródła wówczas błąd pomiaru wynosi 1%. Wejściową impedancję wzmacniacza, Z , obliczyć można, korzystając z praw Ohma i Kirchhoffa, z zależności [175]:

$$Z = \frac{R_f}{1 + A_0 + R_f/R_W} \cong R_f/A_0 \quad (56)$$

gdzie R_W - opór między dwoma wejściami wzmacniacza ($10^6 \Omega$).

Ze względu na dużą wartość współczynnika A_0 impedancja układu jest niezwykle mała. Oczywiście trzeba wziąć pod uwagę również to, aby mierzony prąd większy był od wejściowego prądu polaryzacji (w przypadku wzmacniacza AD 515 LH wynosi on 70 fA). Jeśli chce się osiągnąć 1% dokładności wówczas mierzony prąd powinien być sto razy większy od tej wartości. Ze wzoru (55) wynika, że większą czułość osiąga się dla większych wartości oporu R_f . Z drugiej jednak strony wzrost wartości oporu zwiększa szum temperaturowy układu $|175,177|$.

Po zwarcie sprzężenia zwrotnego pierwszy ze wzmacniaczy, w układzie przedstawionym na Rys.4, pracuje w układzie wtórnika napięciowego. Mierzony potencjał jest wówczas podłączony do wejścia nieodwracającego wzmacniacza (wejście to charakteryzuje się większą impedancją niż wejście odwracające). Współczynnik wzmocnienia takiego układu równy jest jedności. Przy pomiarze napięcia układ pomiarowy powinien się charakteryzować dużo większą opornością wejściową niż oporność mierzonego źródła. Jeżeli ich stosunek wynosi sto wówczas dokładność pomiaru wynosi 1%.

Wzmacniacz LF 356 pracuje w układzie sumatora, wzmacniacza i integratora (tłumienie szumów). Służy on również do korekcji zera sygnału wyjściowego poprzedniego wzmacniacza.

W pomiarach prądu opór elektrometru, R_z , ustawiano tak, aby był on sto razy mniejszy od oporu "ogniwa elektrokinetycznego", r_w , a w pomiarach potencjału przepływu aby R_z był sto razy większy od r_w . "Dynamiczną" wartość r_w oznaczano mierząc potencjał przepływu, $E_{1,2}$, dla dwu różnych wartości R_z |178|:

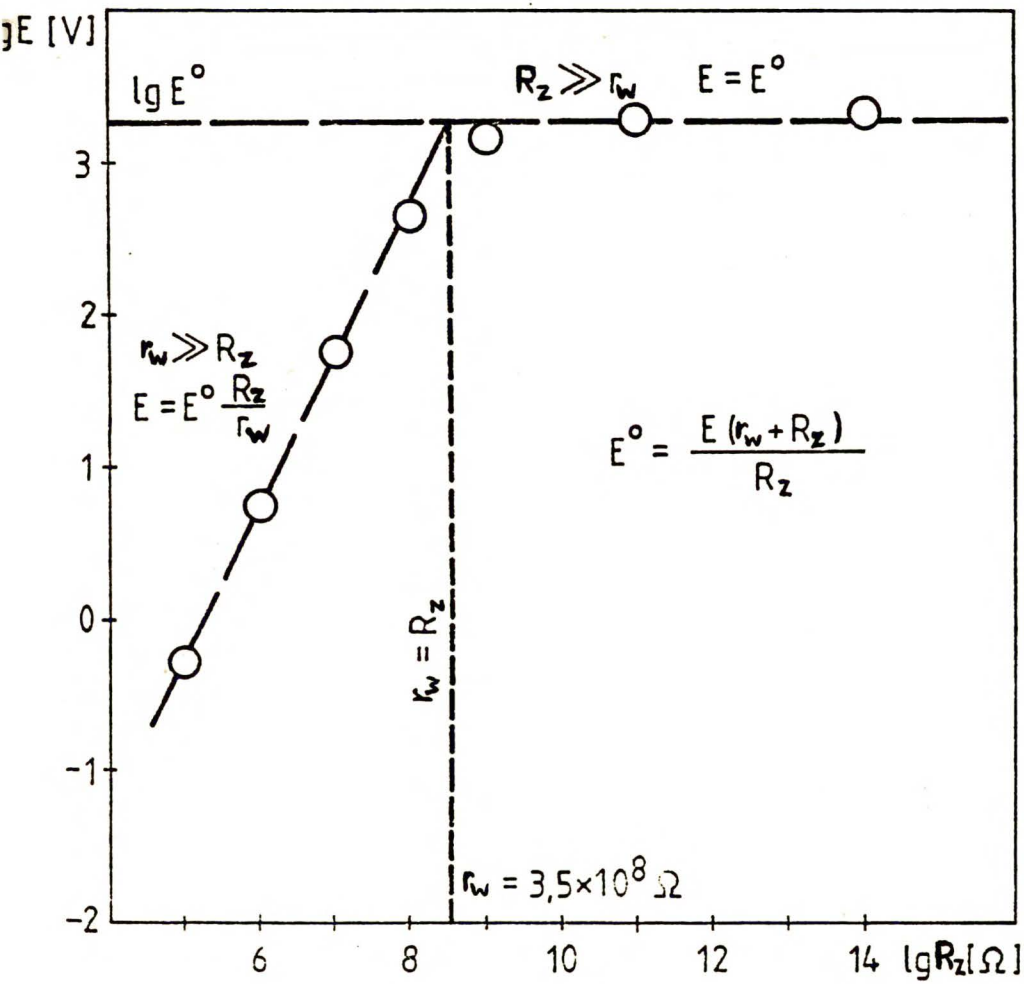
$$r_w = \frac{(E_2 - E_1) R_{z1} R_{z2}}{E_1 R_{z2} - E_2 R_{z1}} \quad (57)$$

Ten sam rezultat otrzymać można wyznaczając r_w metodą graficzną, tak jak to przedstawiono na Rys.5.

Wielkość szumu, zgodnie z równaniami (5) i (6), mówi o wykrywalności danego detektora. Dlatego też poznanie mechanizmów tworzenia się, a przez to metod eliminacji szumów jest bardzo ważne przy konstrukcji detektorów.

Szum termiczny (szum Johnsona) wzmacniacza operacyjnego proporcjonalny jest do jego oporności wejściowej (dla wzmacniacza AD 515 LH wynosi on $30 \mu\text{V}/^\circ\text{C}$) |175,177|. Czułość pomiaru prądu jest natomiast wprost proporcjonalna do tego oporu. Dlatego korzystne jest stosowanie maksymalnie dużego oporu wejściowego elektrometru (musi on być oczywiście dużo mniejszy od oporu mierzonego źródła). W pracy tej opór elektrometru wybierano tak aby był on o dwa rzędy wielkości mniejszy od wartości oporu, r_w .

Szum układu elektronicznego wywołany jest ponadto wpływnością materiałów izolacyjnych, obecnością obcych ładunków w pobliżu układu, polem elektrostatycznym i elektromagnetycznym, przypadkową emisją elektronów



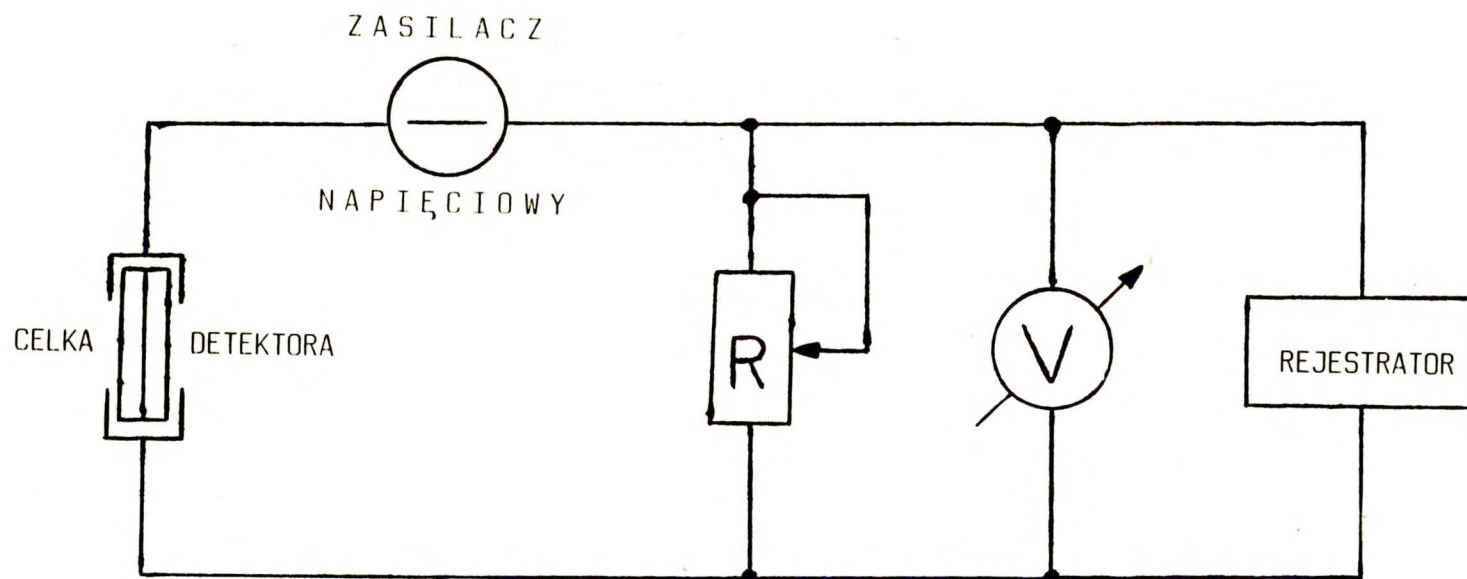
Rys. 5. Zależność potencjału przepływu wody, E , od oporności wejściowej elektrometru, R_z . Detektor elektrokinetyczny z kapilarą ($20 \times 0,4$ mm) wykonaną z PTFE.

w półprzewodnikach itp. ładunki elektryczne mogą być wywołane działaniem czynników mechanicznych na ciało stałe. Ich wytwarzanie może przebiegać w jednym (piezoelektryczność) lub na styku dwu ciał stałych (elektryzacja). Mogą się one tworzyć zarówno w przewodnikach, jak i izolatorach wskutek występowania ciśnienia wewnętrznego, tarcia, przypadkowych zmian pojemności. Aby zmniejszyć do minimum tego typu szumy w opisywanym układzie stosowano połączenie gwintowane między kablem, a płytą montażową. Ponadto stosowano przewody podwójnie ekranowane. Warstwa koloidalnego grafitu zmniejszała w nich tarcie izolator-ekran, ponadto chroniła ona przed polem elektromagnetycznym (sieć, radiofonia, inna aparatura). Obudowa detektora wykonana była ze stali węglowej, charakteryzującej się dużą przenikalnością magnetyczną (ochrona przed polem elektromagnetycznym). Ponadto detektor chroniony był przed wstrząsami. Zamocowany był on na innym stole niż pompa chromatograficzna, a sama pompa znajdowała się na grubej płycie gumowej. Przewody w miarę możliwości proste i krótkie, starano się umieszczać z dala od źródeł sieci elektrycznej. Układ zasilano z baterii charakteryzujących się znacznie stabilniejszą pracą niż zasilacz sieciowy. Wzmacniacze i oporniki zamontowane zostały na wspornikach wykonanych z PTFE, charakteryzującego się dużą opornością właściwą i małą przyczepnością do niego wszelkich zanieczyszczeń. Szumy częściowo likwidowane były przez umieszczenie kondensatora w sprzężeniu zwrotnym wzmacniacza.

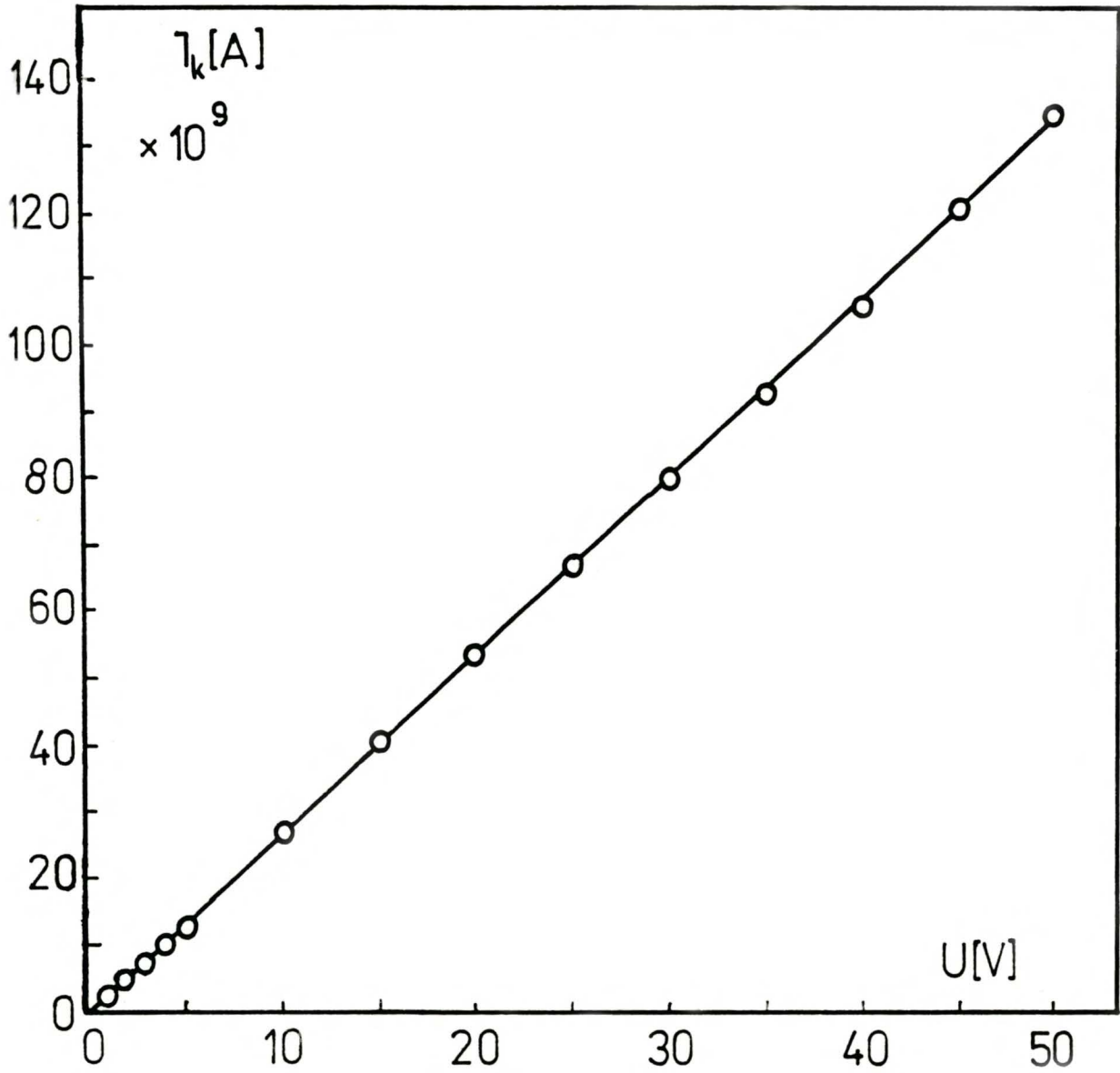
3. Detektor konduktometryczny.

Celka pomiarowa detektora konduktometrycznego była dokładnie tą samą, jaką stosowano w pomiarach elektrokinetycznych. Umożliwiało to porównanie wyników otrzymanych przy użyciu obu detektorów. Obwód elektryczny detektora przedstawiono na Rys.6 [179]. Zasada pomiaru konduktometrycznego polegała na pomiarze spadku potencjału na oporniku R. Układ zasilany był stałym napięciem, U , ze stabilizowanego zasilacza Unitra-Unima ZT-980-2.

Dla określenia stopnia polaryzacji elektrod, wyznaczono zależność prądu płynącego przez detektor od przyłożonego napięcia (Rys.7). Zależność ta była liniowa w całym zakresie stosowanych potencjałów (0 - 50V). Oznacza to, że polaryzacja elektrod nie zakłócała w tym przypadku mierzonych wielkości. Wobec tego do dalszych pomiarów (zmiany prądu płynącego przez detektor) zastosowano napięcie zasilania $U = 50V$.



Rys. 6. Schemat układu pomiarowego detektora konduktometrycznego.



Rys. 7. Zależność prądu, I_k , płynącego przez detektor konduktometryczny od napięcia zasilania, U .

4. Mechanizm działania detektora elektrokinetycznego.

Mechanizmy tworzenia się prądu i potencjału przepływu omówione zostały w Części Literaturowej pracy, w rozdziale C.II. Mechanizmy te są różne w przypadku przepływu przez kapilary cieczy dielektrycznych (nasycone węglowodory) i polarnych (roztwory wodne elektrolitów).

Natężenie prądu przepływu powstającego podczas przepływu cieczy dielektrycznych przez kapilary opisane jest równaniem (44). W cieczach tych obecność jonów związana jest z występującymi w nich zanieczyszczeniami. Dlatego też stężenia jonów i ich rodzaj są na ogół nieznane i trudne do określenia. Ponadto trudno jest przewidzieć, które z nich ulegają reakcjom elektrodowym na ścianie kapilary. Z tego powodu powyższe równanie dobrze zgadza się, z dokładnością do znaku, jedynie z danymi eksperymentalnymi uśrednionymi dla wielu pomiarów [115]. Wynika z tego, że wynik pojedynczego pomiaru w tym układzie jest trudny do przewidzenia. Ponieważ prąd przepływu związany jest z obecnością jonów w cieczy, dlatego należy oczekiwać, że czułość detektora powinna być duża w stosunku do związków dobrze zjonizowanych w fazie ruchomej. Zmiana stężenia jonów oddziałuje na zmianę prądu przepływu poprzez wpływ na przewodnictwo cieczy, jej przenikalność elektryczną i grubość warstwy dyfuzyjnej. Jednakże z powodu małego stopnia dysocjacji elektrolitów w cieczach o małej przenikalności elektrycznej wydaje się, iż detektor powinien się charakteryzować wyższą czułością w cieczach polarnych.

Mechanizmy tworzenia się prądu i potencjału przepływu zostały dokładnie poznane dla przypadku przepływu cieczy polarnych przez kapilary. Dla warunków chromatograficznych występujących w tej pracy (przepływ laminarny, duża średnica i długość kapilary) ich wartości są opisane przez równania Smoluchowskiego (50) i (52). Liczba Reynoldsa nawet dla najszerszych kapilar ($d=0,45$ mm) i największych szybkości przepływu ($J=100$ mm³/s) nie przekracza 500, co oznacza, że przepływ cieczy jest laminarny. Dla małych średnic kapilar w równaniach Smoluchowskiego powinno się uwzględnić zmiany przewodnictwa, przenikalności elektrycznej i lepkości roztworu w pobliżu granicy faz (ścianki kapilary). Zmiany te spowodowane są oddziaływaniem silnego pola elektrycznego podwójnej warstwy elektrycznej z roztworem. Jednakże efekty tego typu zaczynają się objawiać dopiero przy średnicach kapilar mniejszych od 0,1 mm, podczas gdy najcieńsza stosowana w tej pracy kapilara miała średnicę $d=0,13$ mm. Omawiane równania zostały wyprowadzone dla długich kapilar tak, aby można w nich było pominąć efekty związane z zaburzeniem przepływu cieczy (ustalenie się charakterystycznego dla laminarnego przepływu cieczy parabolicznego rozkładu prędkości) przy jej wejściu do kapilary. Czas, a stąd długość, relaksacji tego zaburzenia obliczyć można z równań (38) i (39). Równania te można przekształcić do postaci dogodniejszej do stosowania w przypadku detektorów.

$$\tau_w = 0,02 \xi d^2/\eta \quad (58)$$

$$l_W = 0,024 \xi J / \eta.$$

Dla wody ($\xi = 1\text{g/cm}^3$, $\eta = 1\text{cP}$) płynącej z $J = 1\text{ cm}^3/\text{min.}$, uzyskuje się: $\tau_W = 3 \times 10^{-3}\text{s}$, $l_W = 0,4\text{ mm}$. Długość najkrótszej stosowanej w pracy kapilary wynosiła 15 mm, tzn. była ona dużo większa od l_W .

Pomiary chromatograficzne przedstawione w tej pracy wykonywane były przy zastosowaniu stałej objętościowej szybkości przepływu fazy ruchomej. Dlatego, aby móc przedyskutować wpływ różnych czynników na pracę detektora dogodnie jest równania (50) i (52) przekształcić do postaci, w której zamiast ΔP występuje J :

$$I = \frac{\pi R_d^2 \xi \epsilon_0 \zeta \Delta P}{\eta l} = \frac{2 \xi \epsilon_0 \zeta J}{R_d d_m} = \frac{2\pi \xi \epsilon_0 \zeta R_d u}{d_m} \quad (60)$$

$$E = \frac{\zeta \xi \epsilon_0 \Delta P}{\eta \mu} = \frac{2 \xi \epsilon_0 \zeta l J}{\pi R_d^3 d_m \mu} = \frac{2 \xi \epsilon_0 \zeta l u}{R_d d_m \mu} \quad (61)$$

Jednakże w takim przypadku pojawia się w omawianych równaniach dodatkowa wielkość zależna od stężenia analizowanych związków. Jest nią grubość warstwy podwójnej. Dlatego w pewnych przypadkach korzystne może się okazać pozostanie przy wzorach operujących ΔP . Szczególnie w roztworach rozcieńczonych, gdzie lepkość roztworu równa jest praktycznie lepkości rozpuszczalnika, zmiany ΔP

dokładnie odwzorowują zmiany J. Równanie (61) można następnie przekształcić poprzez wstawienie przewodnictwa właściwego cieczy opisanego prawem niezależnej wędrówki jonów Kohlrausha (40) [180]:

$$\kappa = \sum_i C_i z_i \lambda_i \quad (62)$$

gdzie λ_i - przewodnictwo równoważnikowe i-tego jonu. Przewodnictwo równoważnikowe może tu być odniesione do lepkości poprzez kombinację relacji Stokesa-Einsteina i równania Nernsta-Einsteina [181]:

$$\lambda_i = \frac{z_i e F}{6 \pi \sigma_i \eta} \quad (63)$$

gdzie σ_i - promień i-tego jonu w roztworze.

Kombinacja równań (61) - (63) daje:

$$E = \frac{6 \pi \zeta \epsilon \epsilon_0 \Delta P}{e F} \sum_i \frac{\sigma_i}{C_i z_i^2} \quad (64)$$

Zauważyć w tym miejscu należy, że w ostatnim równaniu nie występuje już, w postaci jawnej, lepkość roztworu.

Z analizy równań (60) i (61) wynika, że badana próbka wpływa na zmianę przewodnictwa, potencjału elektrokinetycznego, grubości warstwy podwójnej, przenikalności elektrycznej i lepkości eluatu. Obecność jonów w próbce w największym stopniu wpływa na zmiany przewodnictwa roztworu. Oznacza to, że detektor elektrokinetyczny powinien być szczególnie czuły na związki jonowe.

Jego wykrywalność powinna być dużo lepsza w układzie chromatografii faz odwróconych (polarna faza ruchoma zapewnia dobrą jonizację próbki) niż faz normalnych. Ponieważ analizowana próbka dąży do likwidacji potencjału przepływu fazy ruchomej, to wyższe piki chromatograficzne (tzn. dla stałego poziomu szumu lepszą wykrywalność) otrzymuje się dla faz ruchomych charakteryzujących się większym E . Wobec powyższego dodatek buforu do fazy ruchomej powinien uniemożliwiać pracę detektora poprzez likwidację potencjału przepływu tła. Z powyższego wynika, że detektor z pomiarem potencjału przepływu powinien się charakteryzować najlepszą wykrywalnością w układzie chromatografii faz odwróconych z fazą ruchomą będącą czystym rozpuszczalnikiem.

Z równania (64) wynika, że obniżenie wartości potencjału przepływu jest odwrotnie proporcjonalne do sumy stężeń jonów w próbce. Ponadto z równania tego wynika, że omawiany detektor powinien być szczególnie czuły na jony wielowartościowe o małym promieniu.

Dobry detektor powinien się nadawać do analizy możliwie jak największej liczby związków w różnych fazach ruchomych. Dlatego do pomiaru potencjału i prądu przepływu powinny być stosowane uniwersalne, odwracalne elektrody. W pomiarach elektrokinetycznych stosuje się najczęściej elektrodę chlorosrebrną. W roztworach nie zawierających jonów srebrnych i chlorkowych dają one jednakże wyniki nieodtwarzalne charakteryzujące się dużym dryftem [138]. W prezentowanym detektorze elektrody wykonane były ze stali kwasoodpornej. Pełniły one

jednocześnie rolę uchwytów kapilary. Elektrody te reagowały na zmiany stężenia wszystkich analizowanych związków. Jednakże trudno jest tu jednoznacznie określić proces potencjałotwórczy. Z możliwych do wystąpienia w czystej wodzie układów redoks rozważać można w zasadzie trzy: H_2/H^+ , O_2/OH^- lub M_e/M_e^{n+} . Ostatni z nich pochodzi z rozpuszczania metalu elektrody. Jedną z takich par określa wartość potencjału elektrody ustalając tym samym aktywności i stężenia składników par początkowo nie znajdujących się w układzie [182]. Czynna będzie para o największej wartości współczynnika stabilizacji, S_c , określanego jako:

$$S_c = \frac{-d \cdot |Ox|}{d \pi} = \frac{-d \cdot |Red|}{d \pi} \quad (65)$$

gdzie $|Ox|$, $|Red|$ oznaczają stężenia składników par będących na wyższym i niższym stopniu utlenienia, π - potencjał odwracalnej elektrody, dla której para ta jest potencjałotwórcza.

Należy przy tym zaznaczyć, że potencjał elektrody pierwszego rodzaju przestaje być określony i wykazuje dużą chwiejność swojej wartości, gdy stężenie kationu materiału elektrody spadnie do niewielkiej wartości. Te graniczne wartości stężeń są rozmaite dla różnych elektrod i mieszczą się w granicach 10^{-4} do $10^{-8} M$. W badanym układzie (stal kwasoodporna w wodzie) najprawdopodobniej zachodzi proces redukcji wodoru. Ta sama reakcja przebiega również w roztworach kwasów.

Z tego wynika, że należy oczekiwać zależności czułości detektora od stałej dysocjacji kwasów (dla danego stężenia kwasu wpływa ona na stężenie jonów hydroniowych w roztworze). Trudno jest jednakże przewidzieć dokładną zależność wartości potencjału przepływu od stężenia analizowanego kwasu w próbce. Spowodowane jest to tym, że jego stężenie w różny sposób wpływa na parametry występujące w równaniach (60) i (61).

F. WYNIKI I ICH DYSKUSJA.

I. Praca i własności detektora elektrokinetycznego.

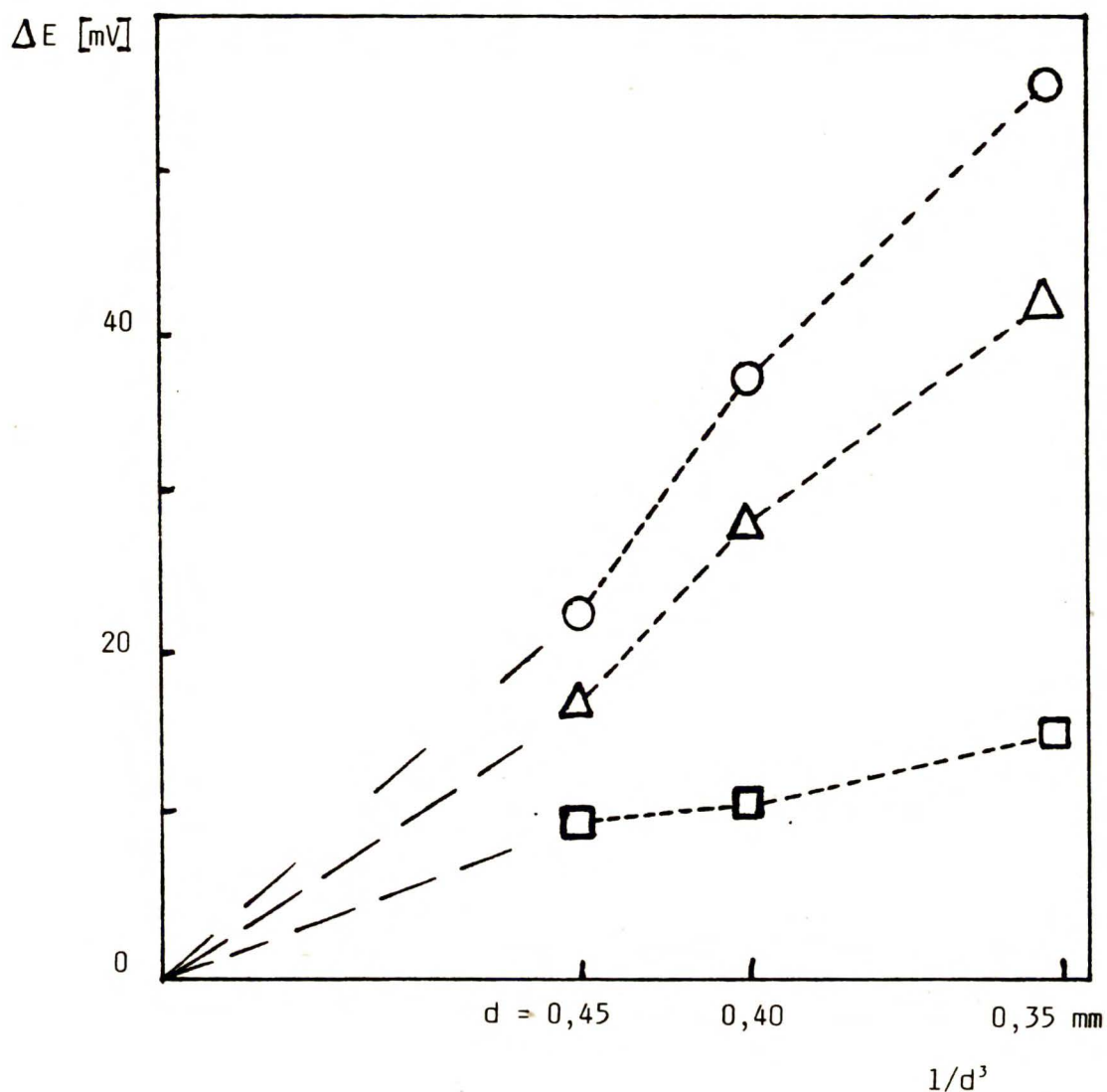
1. Wpływ konstrukcji detektora na jego pracę i własności.

W części eksperymentalnej pracy omówione zostały zasady wyboru oporności wewnętrznej elektrometru do pracy w określonych warunkach. W tym rozdziale scharakteryzowany zostanie wpływ materiału oraz wymiarów kapilary detektora na jego pracę i własności. Charakterystykę tę przeprowadzono dla detektora z pomiarem potencjału przepływu w układzie chromatografii faz odwróconych. Detektor ten charakteryzuje się lepszą wykrywalnością od detektora z pomiarem prądu przepływu i był wykorzystywany do dalszych pomiarów chromatograficznych. Detektor elektrokinetyczny w układzie chromatografii faz normalnych charakteryzuje się znacznie gorszymi parametrami pracy (wykrywalność, odtwarzalność), ponadto wpływ wymiarów kapilary na jego pracę jest znacznie mniejszy.

W pracy stosowano detektor elektrokinetyczny z kapilarą pracującą wykonaną z PTFE, szkła borokrzemowego lub stali kwasoodpornej. W obu pierwszych przypadkach wysokości pików chromatograficznych i poziom szumu, a stąd wykrywalności detektora, były sobie równe. Wysokości pików chromatograficznych uzyskane za pomocą detektora z kapilarą stalową były niższe niż w poprzednich przypadkach. Przy porównywalnym poziomie szumów, równanie (3), powodowało to, że charakteryzował się on

gorszą wykrywalnością. Wykrywalność detektora z kapilarą stalową 20 x 0,2 mm wynosiła, dla kwasu octowego w MeOH + H₂O (10 + 90) obj./obj., 5 x 10⁻⁵M, podczas gdy dla detektora z kapilarą wykonaną z PTFE - 5 x 10⁻⁷ M. Powtarzalność wyrażona jako względne odchylenie standardowe, RSD, wysokości pików chromatograficznych dla dziesięciu kolejnych zastrzyków próbki dla obydwu detektorów wynosiła odpowiednio 10% i 1%. Gorsza wykrywalność i odtwarzalność detektora z kapilarą stalową spowodowane były nieodtwarzalnością powierzchni metalu, pokrytej najprawdopodobniej warstwą tlenków. Zaletą jego była natomiast mała zależność potencjału przepływu od szybkości przepływu przez niego eluatu.

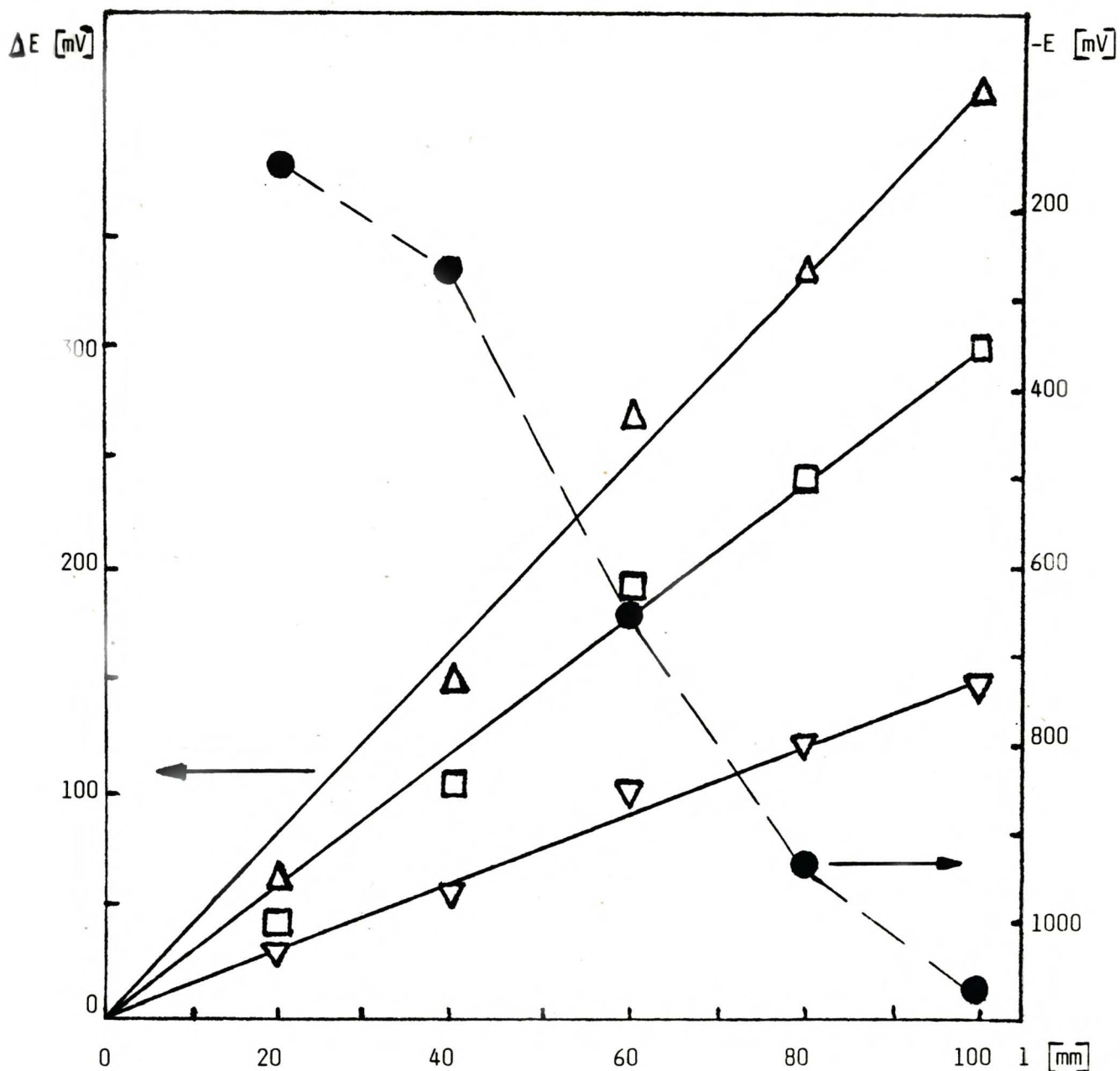
Z analizy równania (61) wynika, że wzrost wartości potencjału przepływu powinno się obserwować ze wzrostem długości i zmniejszeniem średnicy kapilary. Ponieważ zgodnie z tym co zostało powiedziane w poprzednim rozdziale analizowana próbka dąży do likwidacji potencjału przepływu fazy ruchomej, więc wyższy poziom potencjału przepływu tła (linii podstawowej) oznacza wyższe piki chromatograficzne. Zależności tego typu zostały istotnie zaobserwowane [183,184]. Na Rys.8 przedstawiona została zależność wysokości pików chromatograficznych 10⁻³M kwasów propionowego masłowego i walerianowego od odwrotności sześciangu średnicy kapilary. Z równania (61) wynika, że potencjał przepływu jest wielkością zależną od szybkości przepływu cieczy. Oznacza to, że fluktuacje przepływu eluatu wpływają na poziom szumu detektora.



Rys. 8. Zależność wysokości pików chromatograficznych, mierzonych jako zmiana potencjału przepływu, ΔE , od odwrotności trzeciej potęgi średnicy kapilary wykonanej z PTFE, d^3 . Długość kapilary: 15 mm. Kolumna: 150x4 mm, LiChrosorb RP-18, 10 μm . Objętość próbki: 5 μl . Faza ruchoma: 10^{-4}M TEAP w MeOH + H₂O (10+90) obj./obj. Szybkość przepływu: 10 mm³/s. Próbka: 10^{-3}M kwasy: (o) - propionowy, (Δ) - masłowy, (\square) - walerianowy.

Z tego powodu zmniejszenie średnicy kapilary detektora nie prowadziło do polepszenia jego wykrywalności, gdyż powodowało to jednoczesny wzrost wysokości pików chromatograficznych i poziomu szumu tła. Kapilary o mniejszej średnicy charakteryzowały się ponadto większym dryfem, a przez to wymagały dłuższego czasu stabilizacji przed pomiarami. Wpływ długości kapilary na wysokość pików chromatograficznych przedstawiono na Rys.9. Podobnie jak poprzednio zmiana długości kapilary nie wpływała na wykrywalność detektora. Z rysunku tego widać, że wyższe piki otrzymuje się dla większych wartości bezwzględnych potencjału przepływu fazy ruchomej.

W układzie chromatografii faz normalnych możliwe również było zastosowanie kolumny chromatograficznej jako detektora [153,174]. Rozwiązanie to jest szczególnie interesujące w przypadkach, gdy bardzo ważna jest minimalizacja poza-kolumnowego rozmycia próbki (chromatografia kapilarna). Niestety wykrywalność takiego detektora okazała się słaba. Problem ten zostanie szerzej omówiony w dalszej części pracy.

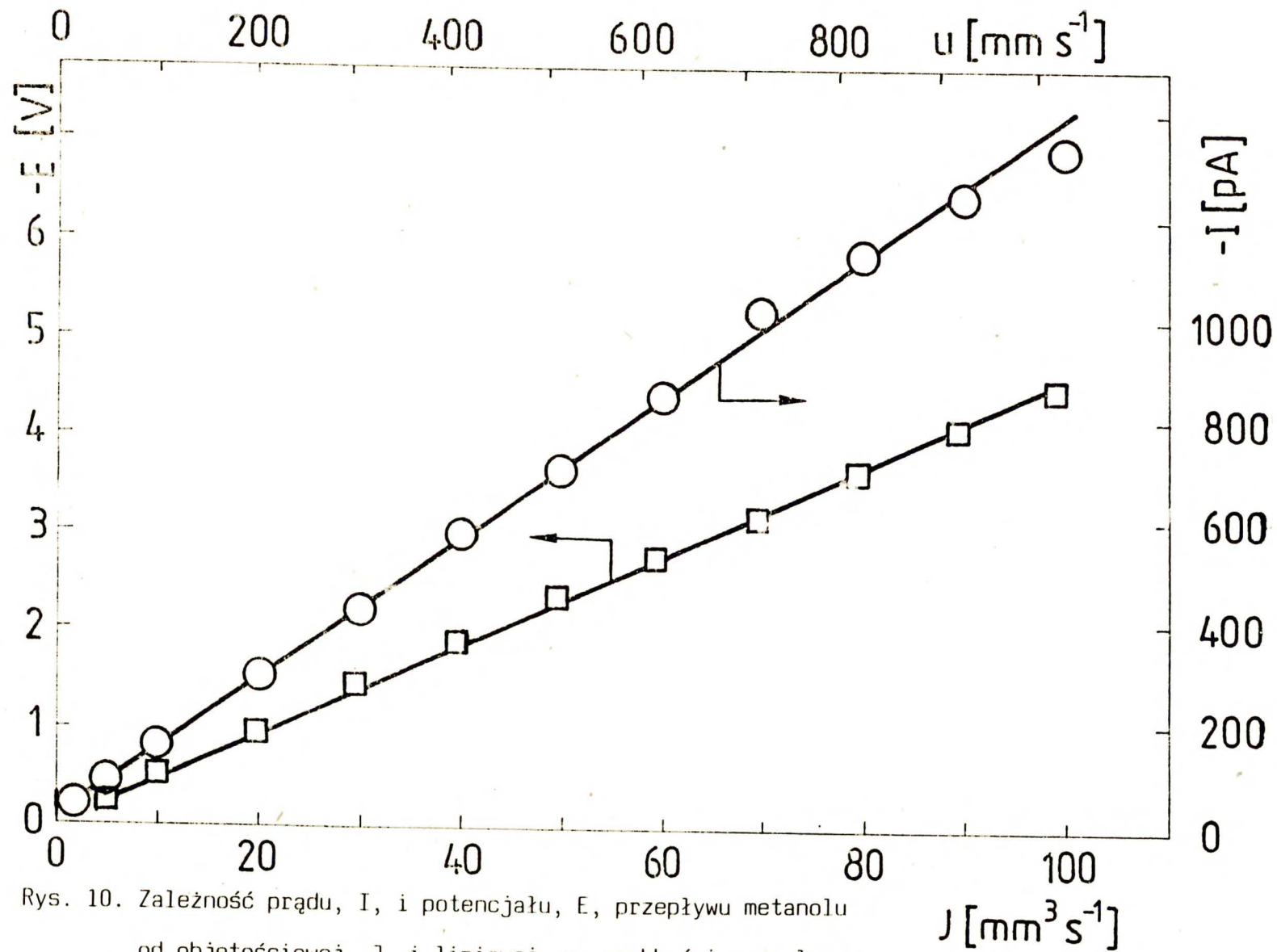


Rys. 9. Zależność wysokości pików chromatograficznych, ΔE , i potencjału przepływu tła (fazy ruchomej), E , od długości kapilary (wykonanej z PTFE, o średnicy wewnętrznej 0,2 mm). Próbka: 10^{-3} M kwas (Δ) - propionowy, (\square) - masłowy, (∇) - walerianowy. Pozostałe warunki jak na Rys. 8.

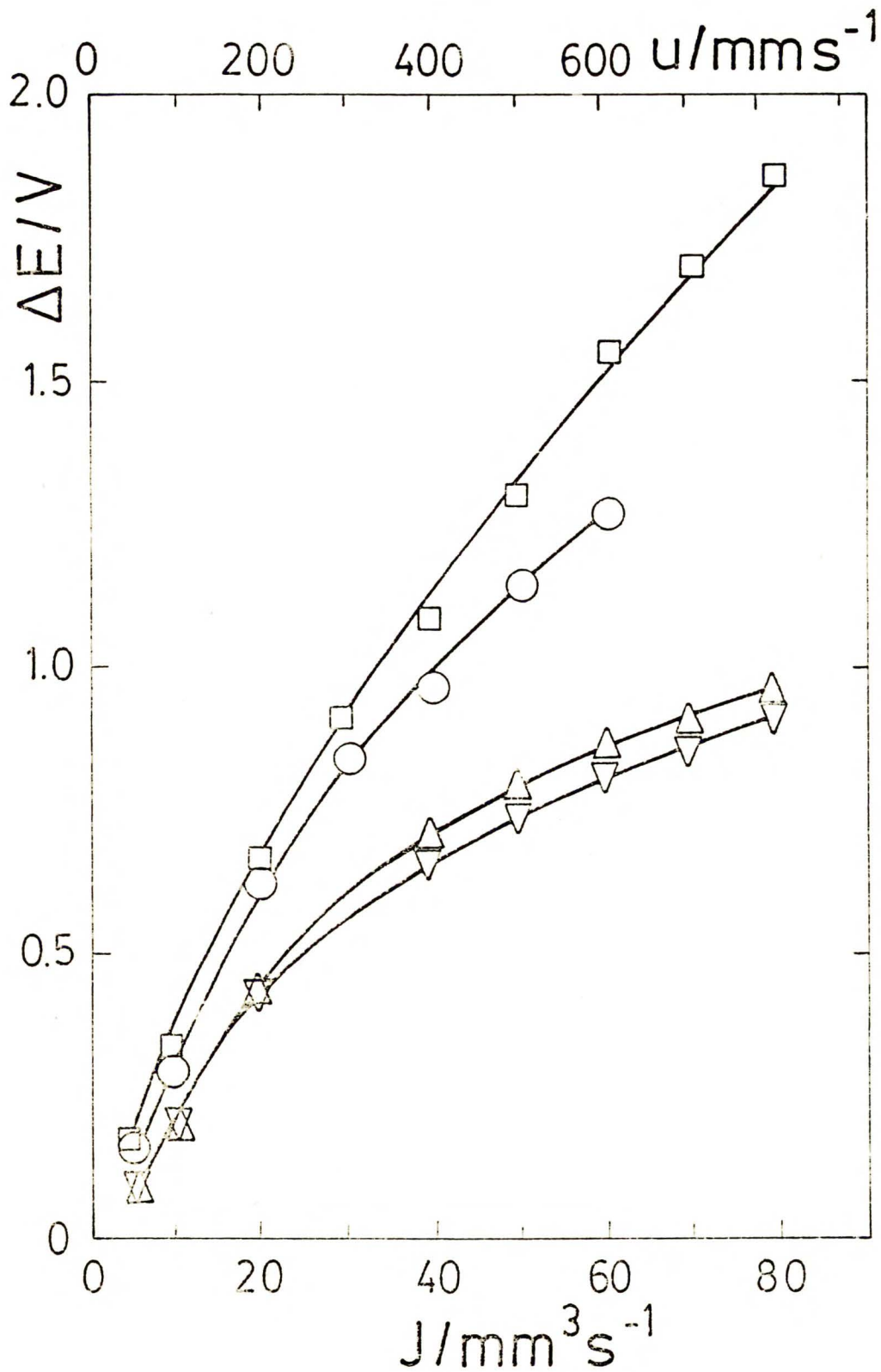
2. Wpływ szybkości przepływu fazy ruchomej na wartości potencjału i prądu przepływu.

Z analizy równań (60) i (61) wynika, że wzrost objętościowej szybkości przepływu cieczy polarnej przez kapilarę pomiarową powoduje wzrost wartości potencjału i prądu przepływu. Zależność ta jest liniową i przechodzi początek układu współrzędnych tzn. prąd i potencjał przepływu nie powstają, gdy nie ma przepływu cieczy. Tego typu zależność przedstawiona została, dla metanolu, na Rys.10. Również wysokości pików chromatograficznych, tzn. różnice potencjałów lub prądów przepływu próbki i fazy ruchomej, powinny być wprost proporcjonalne do szybkości przepływu fazy ruchomej. Wykresy tego typu zależności przedstawione zostały na Rys. 11 i 12. Widać z nich, że powyższe stwierdzenia są spełnione tylko częściowo. W przypadku detektora SPD omawiane wykresy przechodzą przez początek układu współrzędnych ale dla większych szybkości są nieliniowe. Natomiast w przypadku detektora SCD są one liniowe ale nie przechodzą przez początek układu współrzędnych.

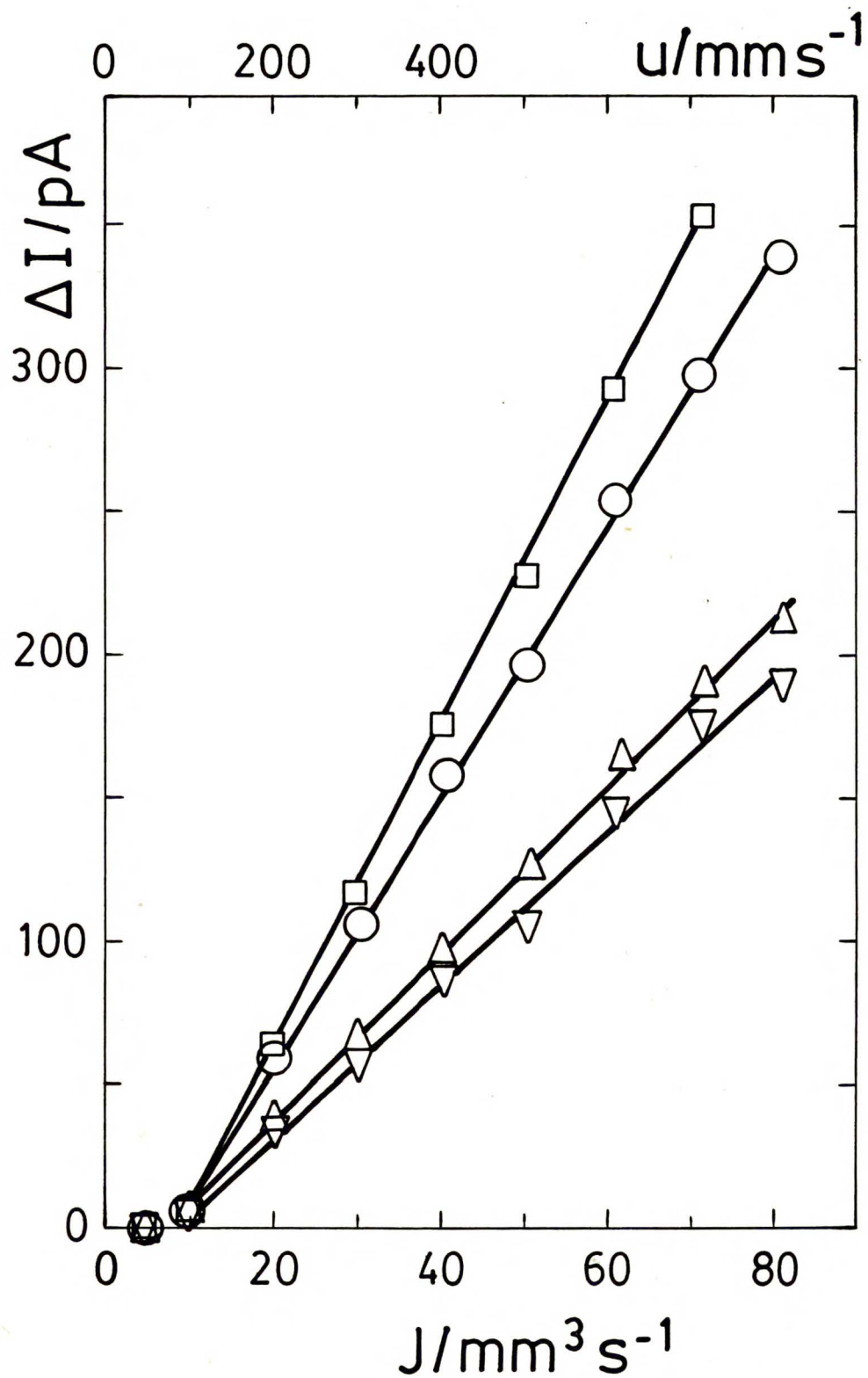
Ten ostatni efekt, tzn. występowanie w układzie pewnego prądu lub potencjału nawet wtedy, gdy ciecz nie płynie przez kapilarę, jest jeszcze bardziej widoczny w roztworach wodnych. Zależność wysokości pików chromatograficznych, a także potencjału przepływu fazy ruchomej (tł_a) o składzie MeOH+H₂O(10+90) obj./obj. od szybkości przepływu przedstawiona została na Rys. 13.



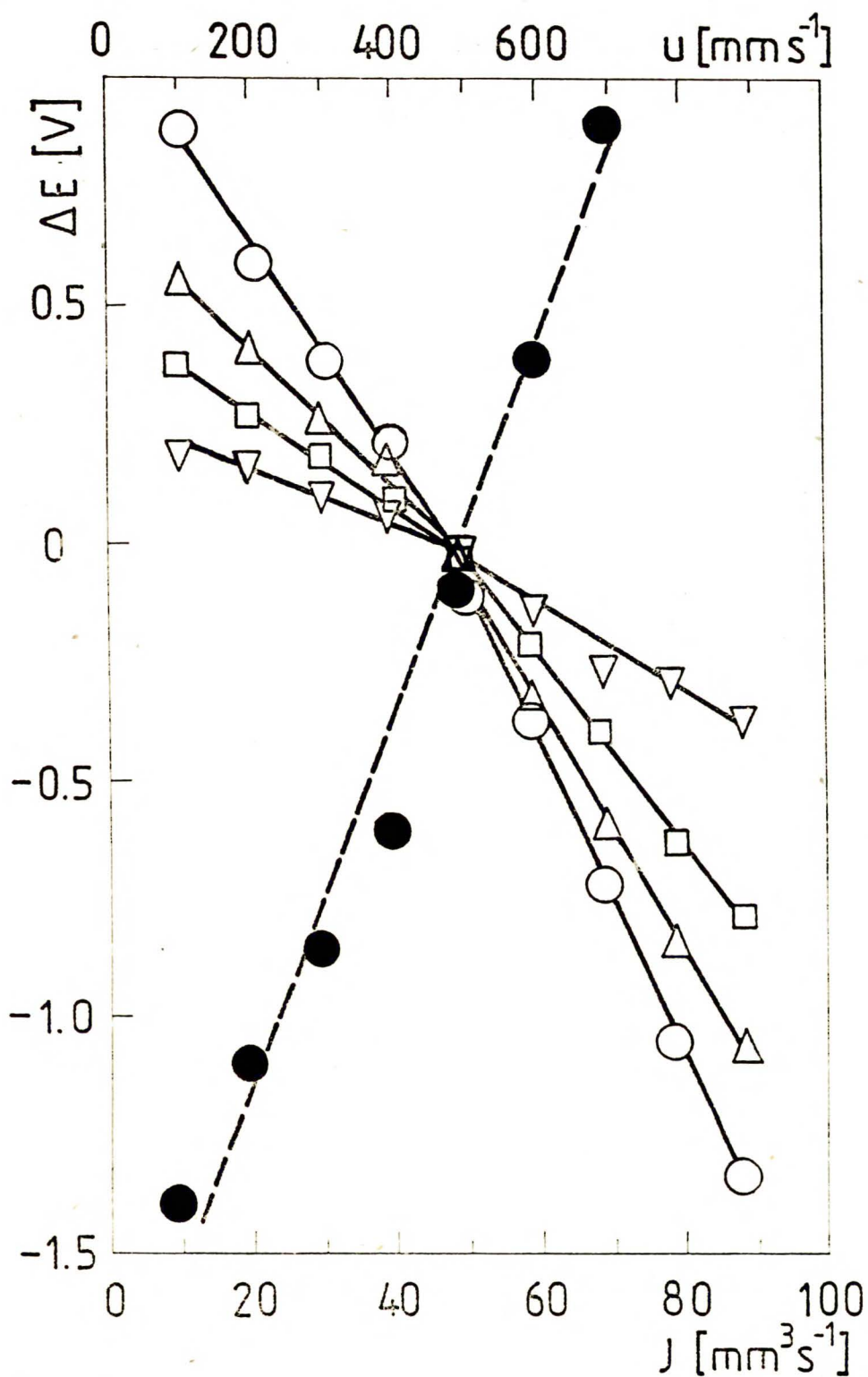
Rys. 10. Zależność prądu, I , i potencjału, E , przepływu metanolu od objętościowej, J , i liniowej, u , szybkości przepływu. Detektor elektrokinetyczny z kapilarą z PTFE (15x0,35 mm).



Rys. 11. Zależność wysokości pików chromatograficznych mierzonych jako zmiany potencjału przepływu, ΔE , od szybkości przepływu J lub u . Analizowane kwasy: o - laurowy, \square - myrystynowy, Δ - stearynowy, ∇ - arachidowy. Faza ruchoma: metanol. Detektor elektrokinetyczny z kapilarą wykonaną z PTFE (15x0,35 mm). Objętość próbki: 5 μ l.



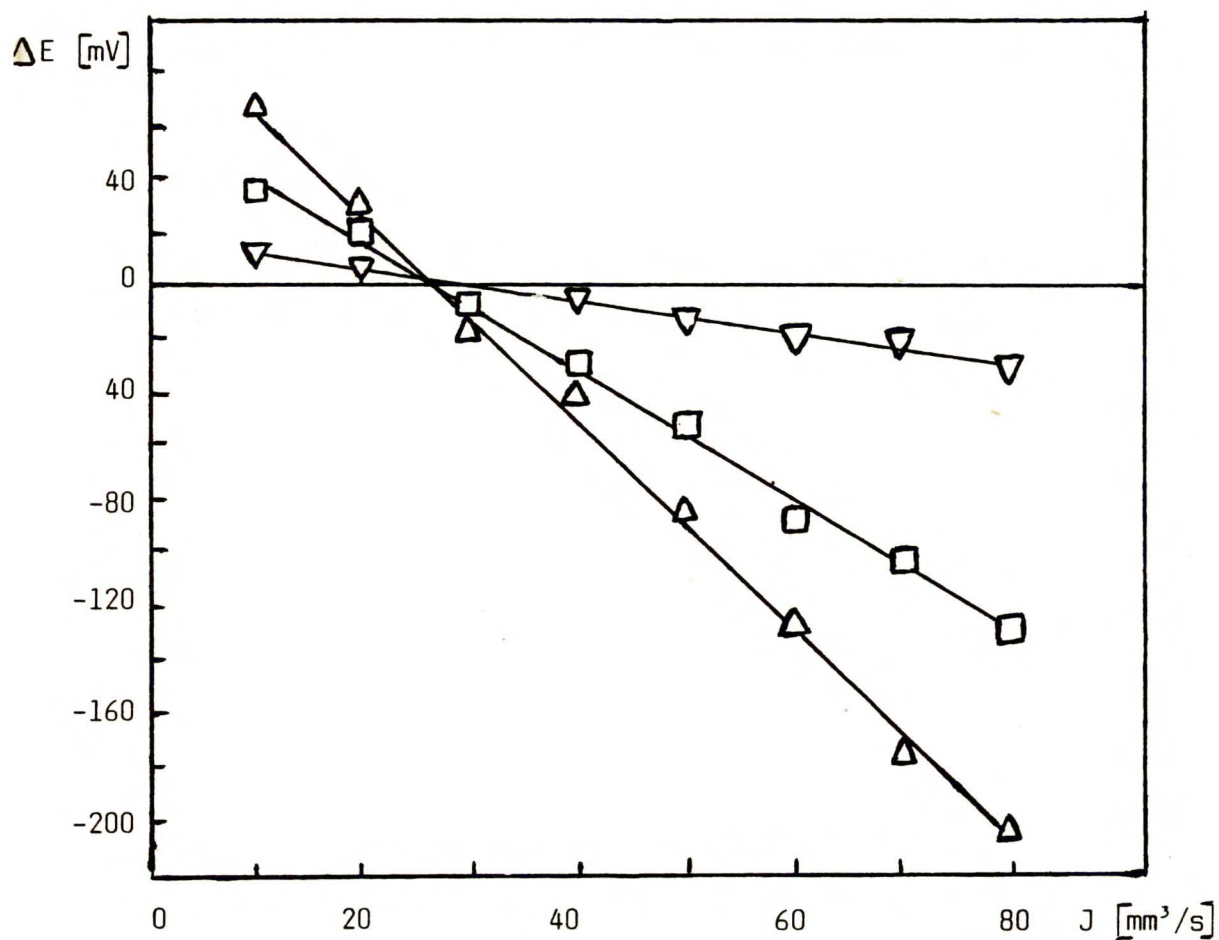
Rys. 12. Zależność wysokości pików chromatograficznych mierzonych jako zmiany prądu przepływu, ΔI , od szybkości przepływu J lub u . Pozostałe warunki jak na Rys. 11.



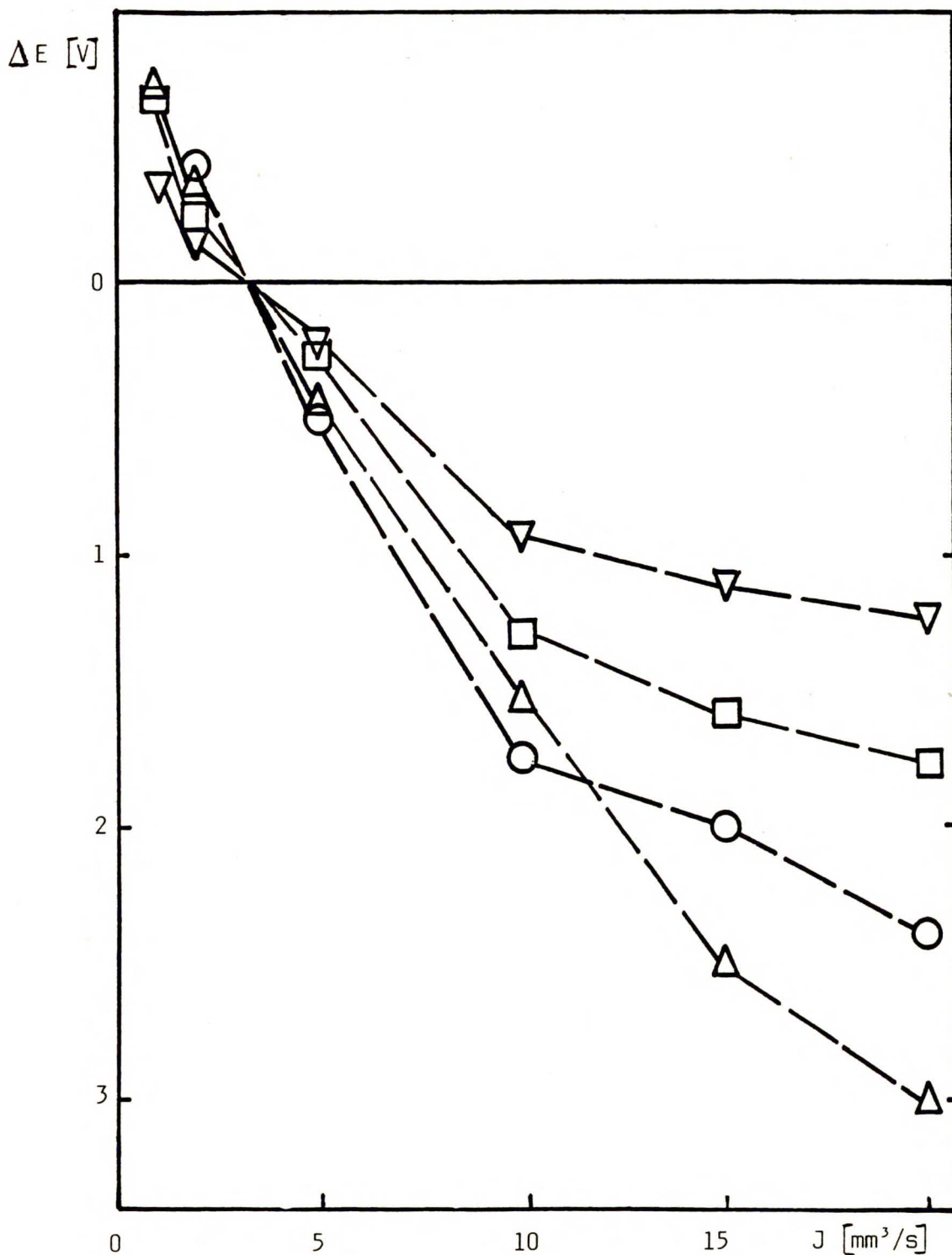
Rys. 13. Zależność wysokości pików chromatograficznych mierzonych jako różnica potencjału przepływu, ΔE , od szybkości przepływu, J lub u , fazy ruchomej. Detektor elektrokine-tyczny z kapilarą wykonaną z PTFE (20x0,4 mm). Faza ruchoma (●): MeOH + H₂O (10+90) obj./obj.. Próbka: 5 μl , 10^{-3}M kwasy: (o) - octowy, (Δ) - propionowy, (\square) - masłowy, (∇) - walerianowy.

Widać z niej, że dla najmniejszej możliwej do uzyskania na zastosowanym chromatografie szybkości przepływu ($J=1\text{mm}^3/\text{s}$) znak pików chromatograficznych wyrażonego jako różnica potencjałów przepływu, ΔE , jest dodatni, natomiast potencjał przepływu fazy ruchomej (tła) jest ujemny. Ze wzrostem szybkości przepływu potencjał przepływu fazy ruchomej zwiększa się, a wysokości pików zmniejszają się. Dla J równego ok. $45\text{mm}^3/\text{s}$ potencjał przepływu fazy ruchomej wynosi zero. Jednocześnie obserwuje się zanik pików chromatograficznych. Dalszy wzrost J powoduje zmianę znaków E i ΔE oraz wzrost ich bezwzględnych wartości. Z powyższego widać, że E i ΔE są przeciwnego znaku i znikają dla podobnych wartości J .

Na Rys. 14 i 15 przedstawiony został wpływ szybkości przepływu fazy ruchomej na wysokości pików chromatograficznych w układzie chromatografii par jonowych. Na pierwszym z nich wykreślono zależność wysokości pików chromatograficznych kwasu propionowego o stężeniu $1 \times 10^{-4}\text{M}$, $5 \times 10^{-4}\text{M}$ i $10 \times 10^{-4}\text{M}$ od szybkości przepływu fazy ruchomej. Analogiczne krzywe otrzymane zostały dla innych analizowanych kwasów (octowy, masłowy i walerianowy). W tym przypadku piki znikają na chromatogramie przy $J = 28\text{mm}^3/\text{s}$. Z rysunku widać, że szybkość przepływu, przy której znikają piki na chromatogramie, J° , nie zależy od stężenia analizowanego kwasu. Analogiczną zależność dla kapilary wykonanej ze szkła borokrzemowego ($20 \times 0,13\text{mm}$) przedstawiono na Rys. 15. J° w tym przypadku wynosi $3,5\text{mm}^3/\text{s}$. Z powyższego wynika, że J° rośnie ze wzrostem średnicy kapilary. Dla $d = 0,13$;



Rys. 14. Zależność wysokości pików chromatograficznych, ΔE , od szybkości przepływu fazy ruchomej, J . Próbkę: kwas propionowy o stężeniu: (∇) - $1 \times 10^{-4} M$, (\square) - $5 \times 10^{-4} M$, (\triangle) - $10 \times 10^{-4} M$. Detektor elektrokinetyczny z kapilarą PTFE (20x0,35 mm). Pozostałe warunki jak na Rys. 8.



Rys. 15. Zależność wysokości pików chromatograficznych, ΔE , 10^{-3}M kwasów: (o) - octowego, (Δ) - propionowego, (\square) - masłowego i (∇) - walerianowego od szybkości przepływu eluatu, J . Detektor elektrokinetyczny z kapilarą szklaną (20x0,13 mm). Pozostałe warunki jak na Rys. 8.

0,35; 0,40 i 0,45 mm wartości J° wynoszą odpowiednio: 3,5; 28; 57 i 253 mm³/s. Zależność ta przedstawiona została na Rys. 16.

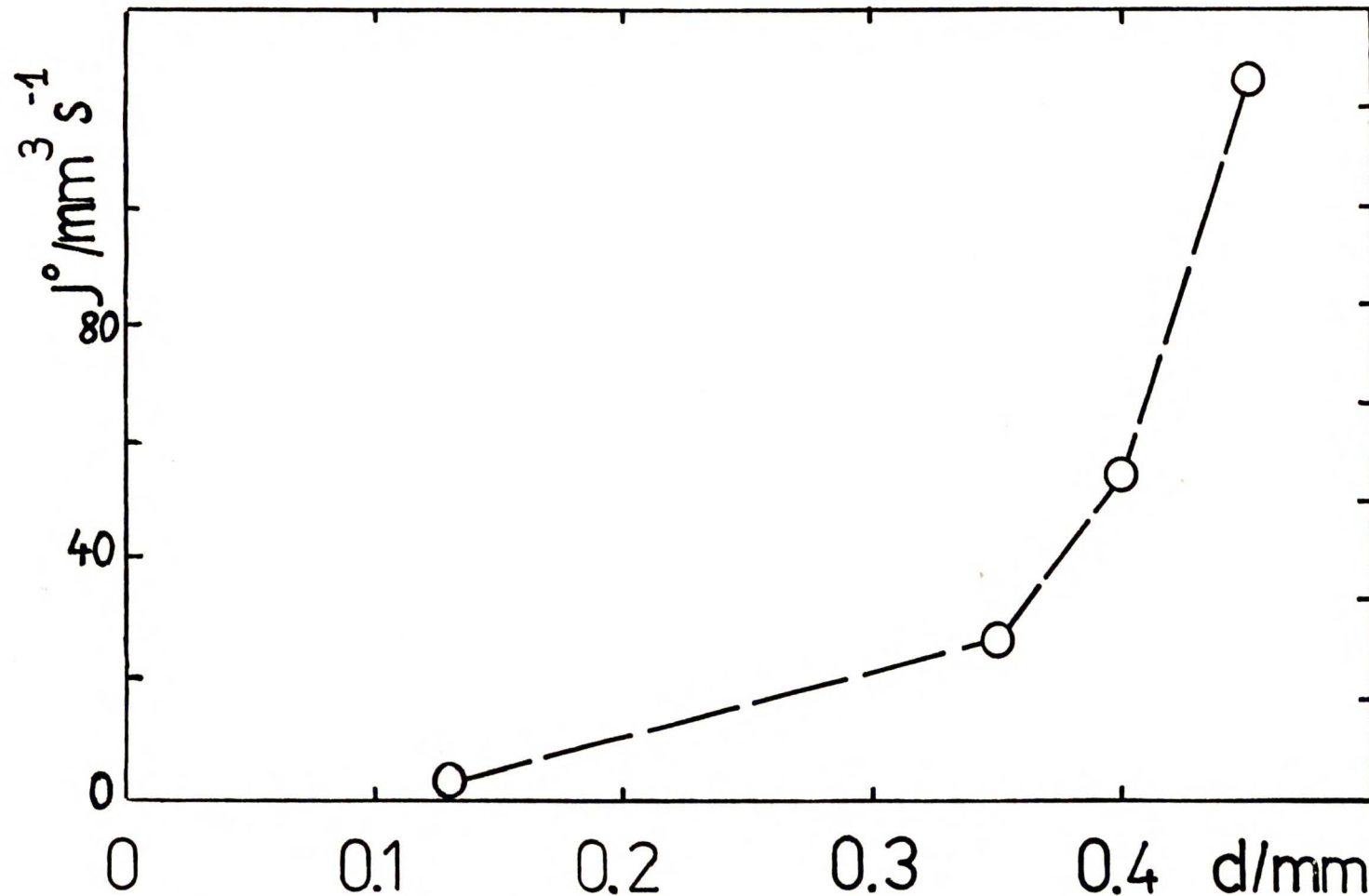
W przypadku kapilary metalowej nie zaobserwowano zmian znaku przy wyznaczaniu zależności wysokości pików chromatograficznych od szybkości przepływu fazy ruchomej w całym zakresie badanego J , tzn. 1 - 100 mm³/s. Ponadto zmiana J nieznacznie tylko wpływała na mierzony potencjał.

Mierzony w detektorze potencjał E_M , składa się z kilku addytywnych składników [184-187]:

$$E_M = E + U_E + U_C + U_{d-h} + U_{d-l} \quad (66)$$

gdzie: E - potencjał przepływu, różnica potencjałów między dwoma identycznymi roztworami znajdującymi się pod różnym ciśnieniem, U_E - potencjał asymetrii pracy elektrod, U_C - różnica potencjałów spowodowana różnicą stężeń przy braku różnicy ciśnienia, U_{d-h} i U_{d-l} - potencjał dyfuzyjny po stronie wysokiego i niskiego ciśnienia kapilary.

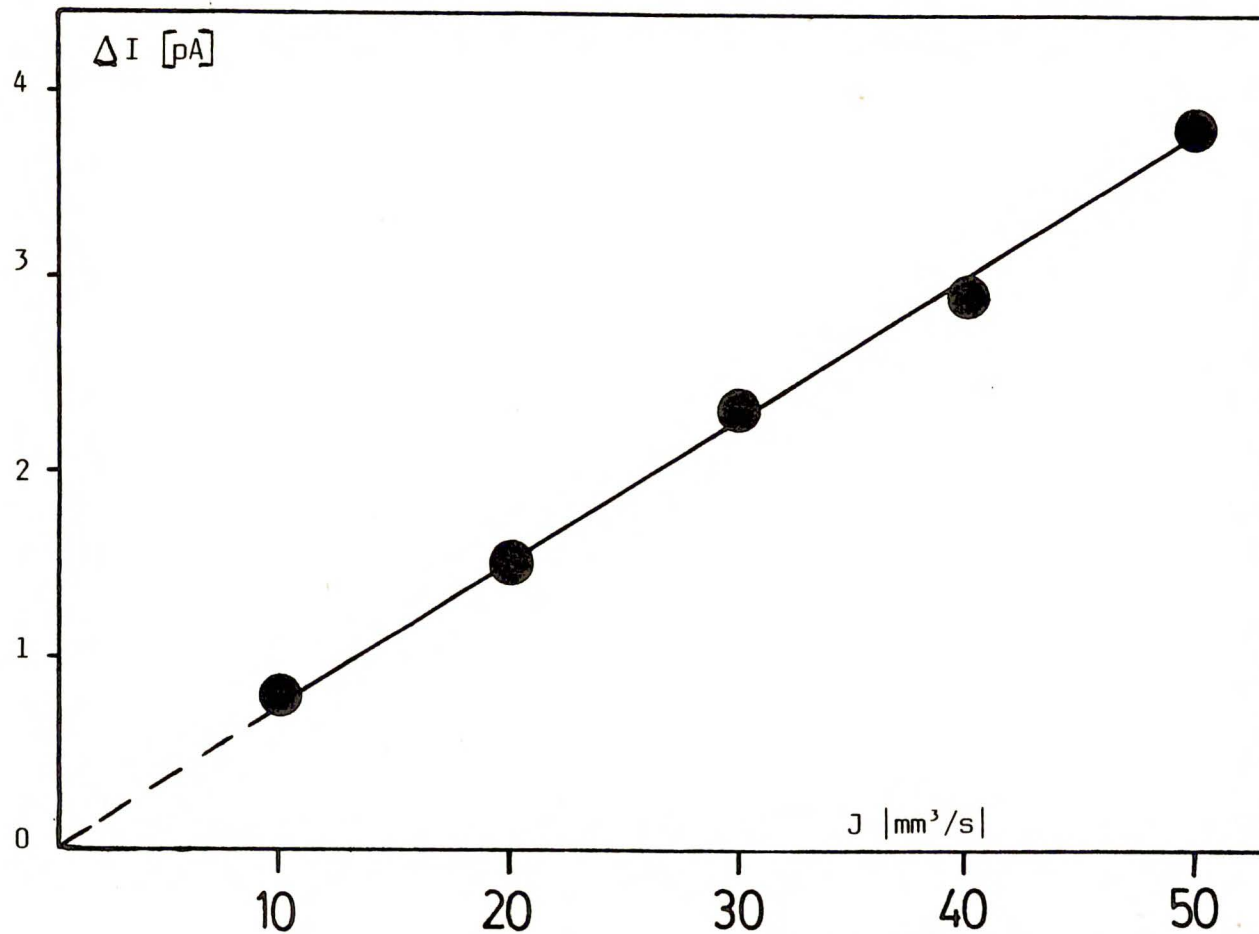
Największy wkład w mierzony potencjał dają potencjał przepływu i potencjał asymetrii elektrod. Wartość pierwszego z nich, jak to omówiono poprzednio, jest wprost proporcjonalna do J . Wartość drugiego natomiast, nie zależy od J . Dlatego przy braku przepływu cieczy mierzony potencjał równy jest U_E . Przy małych szybkościach przepływu znak mierzonego potencjału jest taki sam jak U_E . Ze wzrostem J zwiększa się jego wartość, aż przy



Rys. 16. Zależność szybkości przepływu eluatu przy której nie obserwuje się pików na chromatogramie, J^0 , od średnicy kapilary (PTFE, $l = 20 \text{ mm}$). Pozostałe warunki jak na Rys. 8.

pewnym J , równym J^* (przy którym $E = U_E$), obserwuje się zmianę jego znaku. W ten sam sposób można również wytłumaczyć zmianę ΔE , I i ΔI ze wzrostem J .

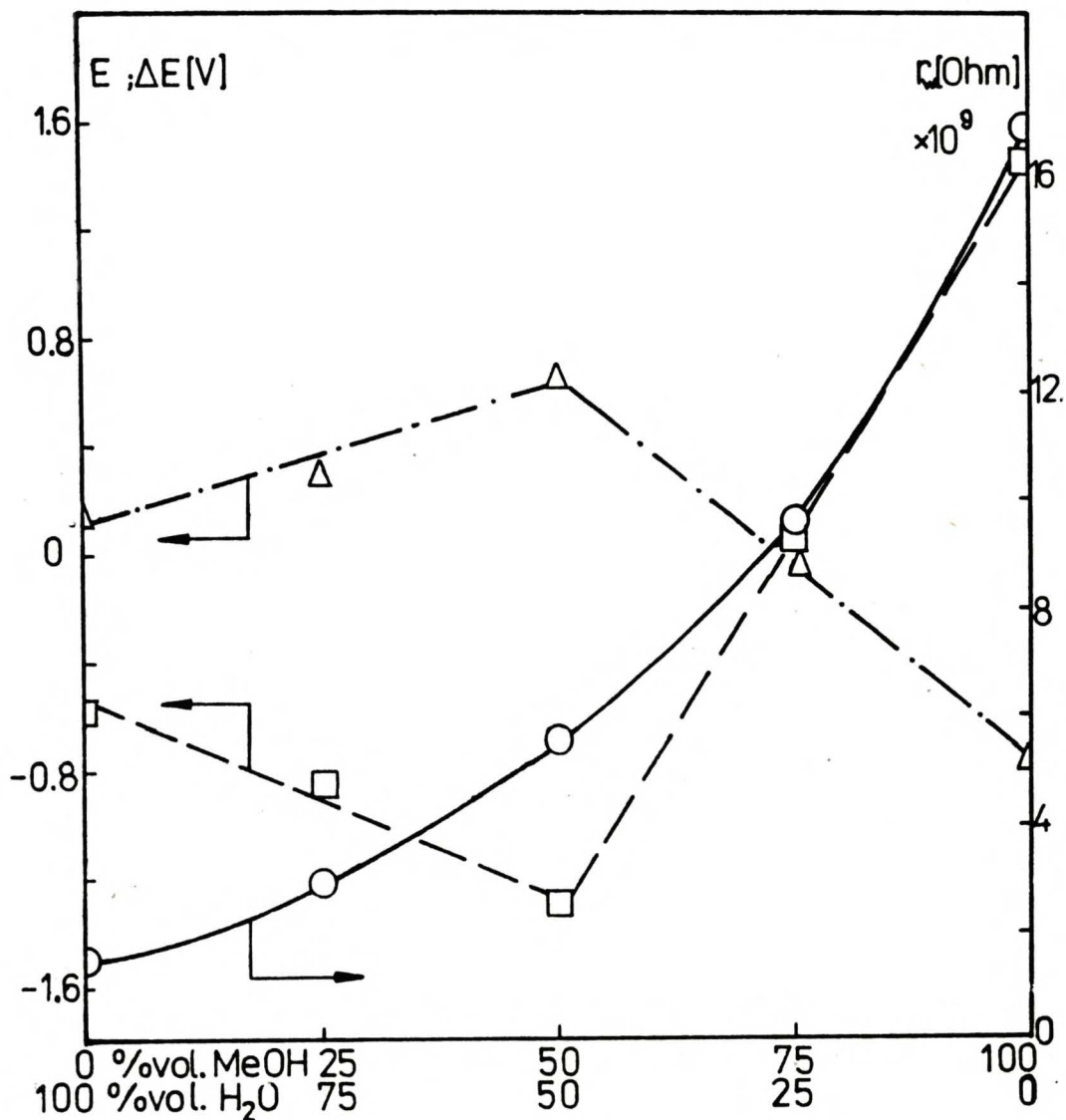
Mechanizm tworzenia się prądów przepływu przy przepływie cieczy dielektrycznych przez kapilary opisany został w rozdziale C.II.2. Wynika z niego, że w tym przypadku mechanizm ten jest mniej poznany. W równaniu (44) szybkość przepływu występuje explicite w czynniku eksponencjalnym. Wpływa ona jednakże również na grubość warstwy dyfuzyjnej i powierzchniowe stężenie jonów. Dlatego trudno jest teoretycznie przewidzieć zależność wysokości pików od szybkości przepływu eluatu. Tego typu eksperymentalną zależność przedstawiono na Rys.17. Widać z niej, że w badanym zakresie J zależność ta jest liniowa.



Rys. 17. Zależność wysokości pików chromatograficznych, ΔI , 10^{-4}M kwasu walerianowego od szybkości przepływu eluatu, J . Detektor elektrokinetyczny z kapilarą stalową (20x0,2 mm). Kolumna ze stali kwasoodpornej (250x4 mm) ze złożem LiChrosorb Si 60, 10 μm . Faza ruchoma: heksan + izopropanol (90+10) obj./obj. Objętość: 1000 μl .

3. Wpływ własności i składu fazy ruchomej na pracę detektora.

Bardzo istotnym parametrem wpływającym na pracę detektora są własności i skład fazy ruchomej. Przy czym czynnikiem decydującym jest tu jej przewodnictwo. Przede wszystkim w zależności od tego czy fazą ruchomą jest ciecz polarna czy dielektryczna mamy do czynienia z różnymi mechanizmami tworzenia się prądu i potencjału przepływu. Szerzej problem ten omówiony został w części literaturowej pracy. Przewodnictwo cieczy decyduje również o doborze oporu wewnętrznego elektrometru tak, jak to opisano w części eksperymentalnej pracy. Również wartość potencjału przepływu przepływającego przez detektor eluatu jest w dużym stopniu zależna od jego przewodnictwa (równanie (61)). Ten ostatni efekt zobrazowany został na Rys. 18 i 19 oraz w Tabeli 2. Na Rys. 18 przedstawiony został wpływ zmian składu fazy ruchomej, tzn. stosunku zawartości metanolu i wody, na wartość oporu elektrycznego, potencjału przepływu tła oraz na wysokości pików chromatograficznych 10^{-3} M kwasu octowego. Widać z niego, że początkowo ze wzrostem zawartości metanolu w fazie ruchomej zwiększa się jej oporność, potencjał przepływu, a w konsekwencji zmniejsza się wysokość pików. Potencjały przepływu obu cieczy charakteryzują się przeciwnymi znakami. Dlatego też dalszy wzrost stężenia metanolu zmienia znak pików chromatograficznych.



Rys. 18. Wpływ zmiany składu fazy ruchomej (stosunku MeOH do H₂O) na wartości jej (o) - oporu elektrycznego, r_w , (\square) - potencjału przepływu, E , oraz (Δ) - wysokości pików chromatograficznych 10^{-3} M kwasu octowego. Kolumna stalowa wypełniona kulkami szklanymi (80 mesh B.D.H., Poole, W. Brytania) metodą usypową. Szybkość przepływu: 5 μ l/s. Detektor z kapilarą wykonaną z PTFE (20x0,4 mm).

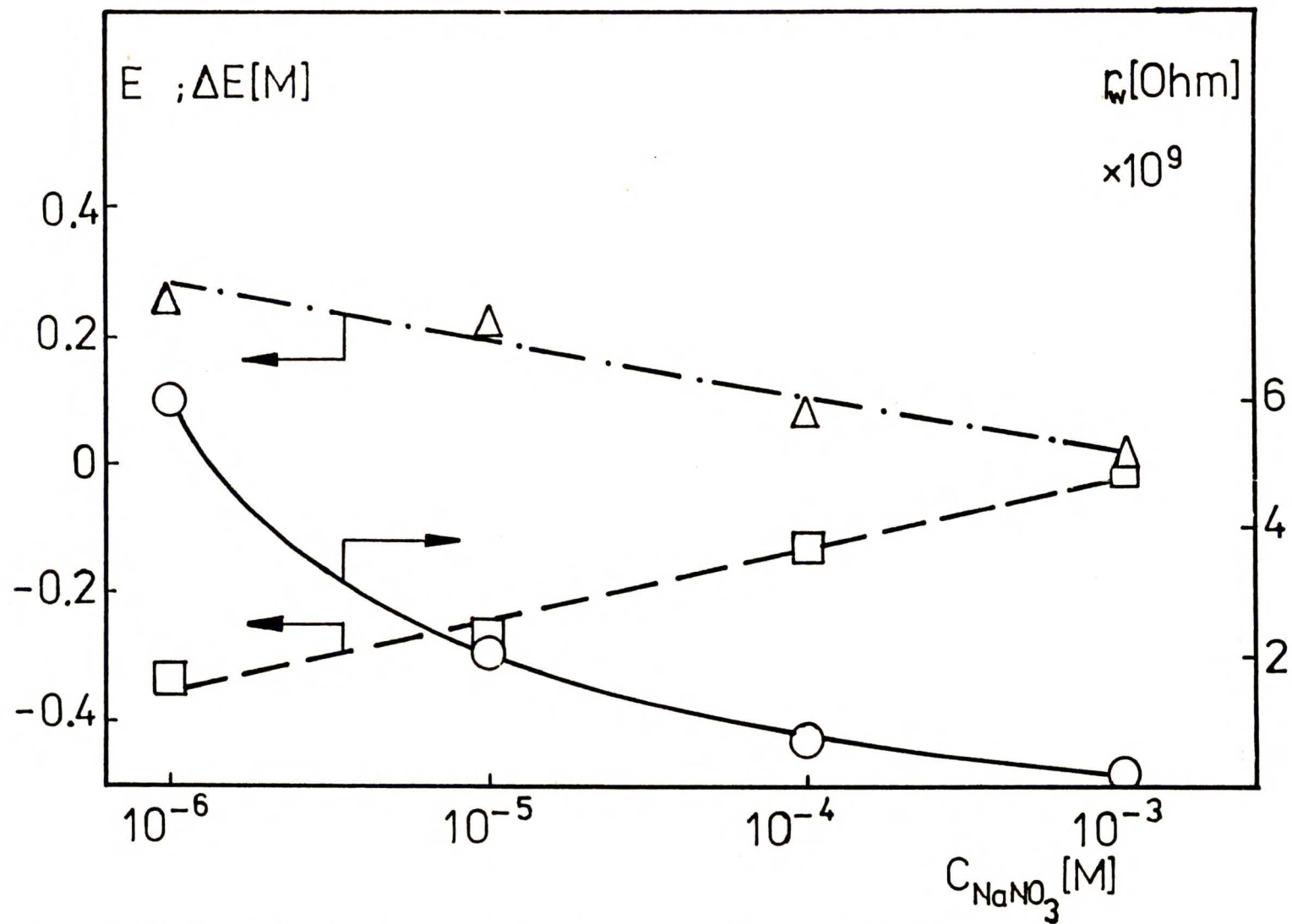
Na przewodnictwo fazy ruchomej duży wpływ ma również stężenie zawartego w niej elektrolitu. Wzrost jego stężenia (Rys. 19) zmniejsza opór cieczy, a w konsekwencji wysokości pików. Oznacza to pogorszenie wykrywalności detektora. Pogorszenie wykrywalności detektora obserwuje się również ze wzrostem stężenia jonów czteroalkiloamoniowych w fazie ruchomej. Spowodowane to jest ich wpływem na przewodnictwo cieczy oraz, przede wszystkim, na grubość warstwy podwójnej i wartość potencjału elektrokinetycznego (nieodwracalna adsorpcja na wewnętrznej powierzchni kapilary). Nie zaobserwowano natomiast wpływu pH (przy stałej mocy jonowej roztworu) w zakresie 4 do 10 na potencjał przepływu fazy ruchomej i wykrywalność detektora.

Podobną współzależność między opornością fazy ruchomej i wysokością pików zaobserwować również można w Tabeli 2. Widać z niej, że powyższe rozważania są słuszne jedynie w przypadku cieczy polarnych. W przypadku cieczy niepolarnych (benzen) znaki potencjału przepływu fazy ruchomej i pików chromatograficznych są ze sobą zgodne.

Tabela 2

Wartości oporów elektrycznych różnych cieczy w celce detektora, r_w , wartości ich potencjałów przepływu, E , oraz wysokości pików chromatograficznych 10^{-3} M kwasu octowego, ΔE .

Faza ruchoma	r_w Ohm	E V	ΔE V
woda	$1,5 \times 10^9$	-0,6	0,14
metanol	$1,2 \times 10^{10}$	1,5	-0,75
acetonitryl	$4,6 \times 10^{10}$	9,1	-5,0
benzen	$1,5 \times 10^{12}$	10,2	2,2



Rys. 19. Wpływ stężenia NaNO₃ w wodzie na wartości (○) - oporu elektrycznego, (◻) - potencjału przepływu oraz (Δ) - wysokości pików chromatograficznych 10⁻²M kwasu octowego. Pozostałe warunki jak na Rys. 18.

4. Wpływ własności analizowanego związku na wykrywalność detektora.

W poprzednich rozdziałach pracy omówiono wpływ materiału i wymiarów kapilary, szybkości przepływu oraz składu fazy ruchomej na pracę detektora. Wynika z nich, że wyższe piki chromatograficzne i lepszą wykrywalność detektora uzyskuje się dla większych wartości potencjału przepływu czystej fazy ruchomej. Analizowana próbka powoduje obniżenie wartości potencjału i prądu przepływu fazy ruchomej. Dzieje się tak z powodu wpływu stężenia jonów na przewodnictwo cieczy, potencjał elektrokinetyczny, grubość podwójnej warstwy elektrycznej i przenikalność elektryczną. Największy udział dają dwa pierwsze składniki.

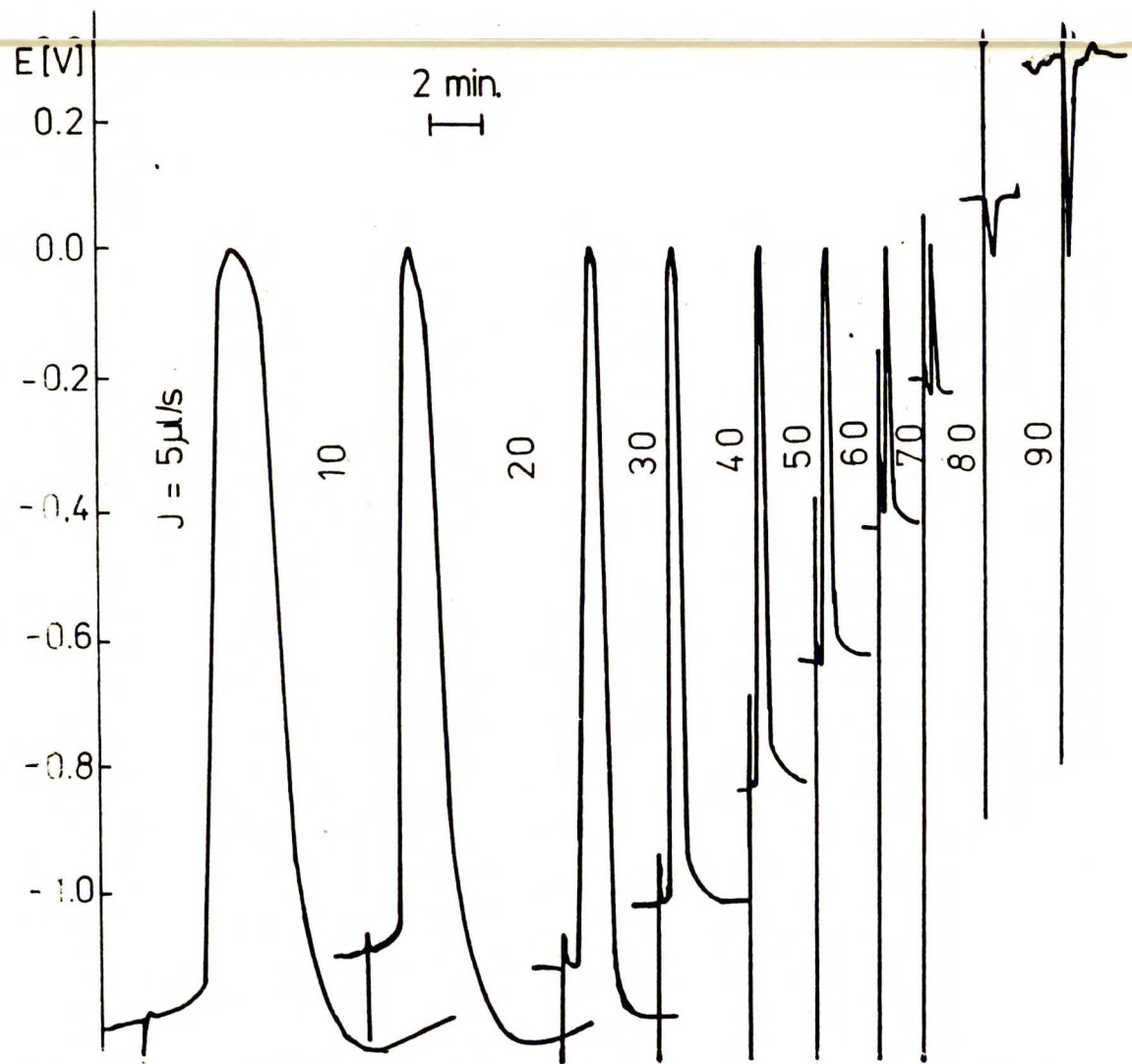
Ze wzrostem stężenia jonów, zgodnie z równaniem Kohlrauscha, obserwuje się liniowy wzrost przewodnictwa cieczy. Towarzyszyć temu powinien liniowy spadek wartości potencjału przepływu. Potencjał elektrokinetyczny z kolei można w przybliżeniu uznać za równy potencjałowi maksymalnego zbliżenia jonów [99, 141, 188]. Z tego powodu obserwuje się jego logarytmiczną zależność od stężenia jonów. Należy przy tym zauważyć, że wzrost stężenia jonów wodorowych zwiększa przewodnictwo cieczy i zmniejsza potencjał elektrokinetyczny. Wobec tego, zgodnie z równaniem (61), działanie ich jest zgodne - zmniejszanie wartości potencjału przepływu. Wzrost stężenia jonów wodorotlenowych zwiększa potencjał elektrokinetyczny [80]. Tym więc należy tłumaczyć niższą wykrywalność zasad niż kwasów o tej samej mocy [161].

Z powyższych rozważań wynika, że w przypadku detektora SPD analizowana próbka dąży do likwidacji potencjału przepływu. Efekt ten jest szczególnie widoczny przy dużych stężeniach analizowanych kwasów (Rys. 20).

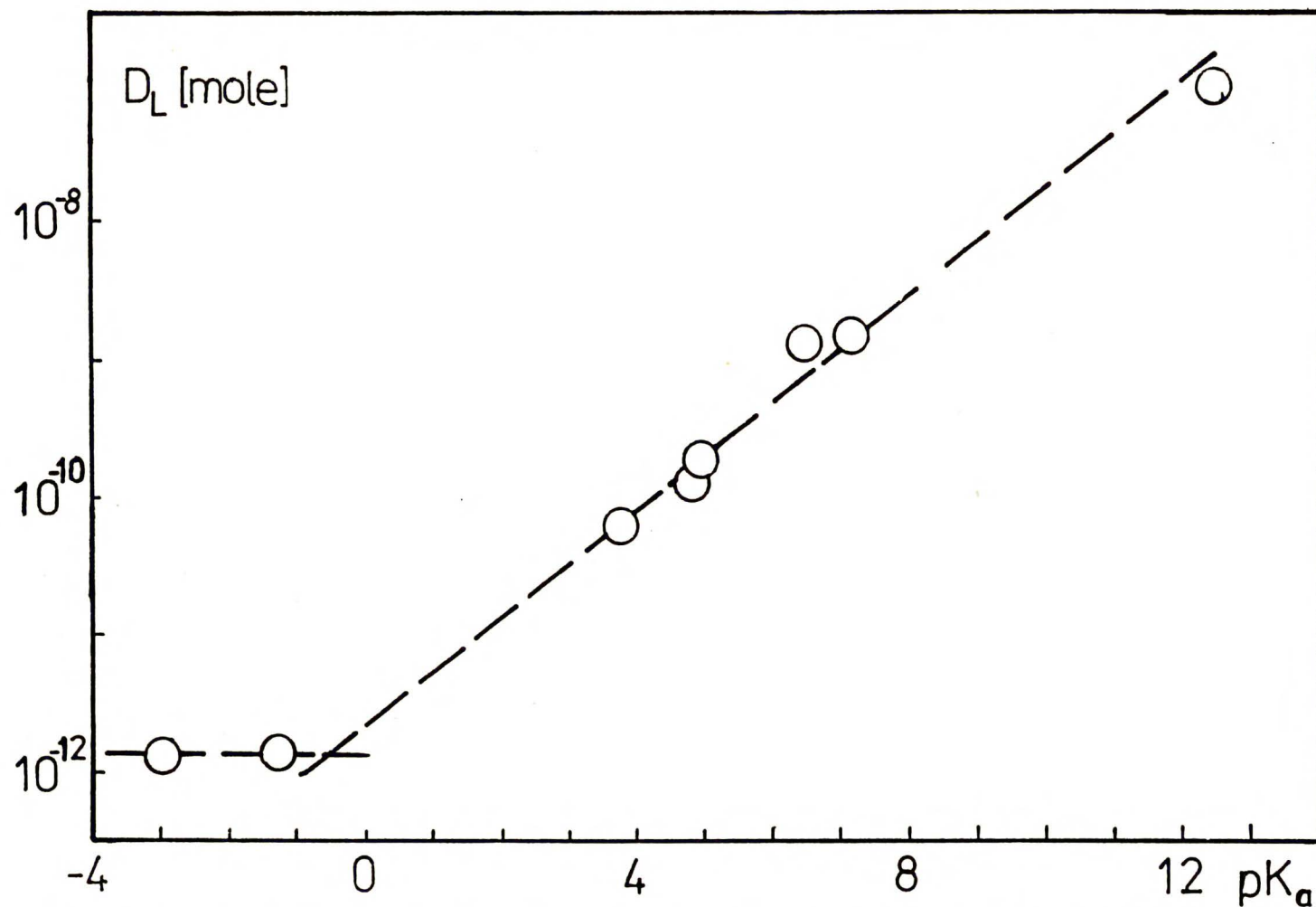
Z Rys. 20 widać ponadto, że ze wzrostem szybkości przepływu eluatu obserwuje się wzrost wartości jego potencjału przepływu. Tak, jak poprzednio, przy pewnym J obserwuje się zmianę znaku potencjału przepływu. Jednakże bez względu na ten znak obserwuje się zawsze działanie zjonizowanej próbki w kierunku likwidacji potencjału przepływu tła.

Wpływ na stężenie jonów w próbce ma wartość stałej dysocjacji analizowanych kwasów. Stąd należy oczekiwać zależności wykrywalności detektora od pK_a kwasów. Zależność tę zobrazowano na Rys. 21 i w Tabeli 3. Wynika z nich niezależność wykrywalności mocnych kwasów od ich wartości pK_a .

Wykrywalność obu typów detektorów (SCD i SPD), słabych kwasów są wprost proporcjonalne do ich wartości pK_a |178,188|. Z Tabeli 3 wynika ponadto, że lepszą wykrywalnością charakteryzuje się detektor z pomiarem potencjału przepływu.



Rys. 20. Wysokości pików chromatograficznych $10^{-1}M$ kwasu propionowego zarejestrowane przy różnych szybkościach przepływu fazy ruchomej (wody). Detektor elektrokinetyczny z kapilarą wykonaną z PTFE (20x0,4 mm). Stalowa kolumna chromatograficzna wypełniona kulkami szklanymi (80 mesh, B.D.H.) metodą usypową.



Rys. 21. Wpływ wartości pK_a analizowanych kwasów na ich wykrywalności, D_L . Detektor elektrokinetyczny z pomiarem potencjału przepływu z kapilarą wykonaną z PTFE (20x0,4 mm). Faza ruchoma: woda. Szybkość przepływu: 10 mm³/s.

Tabela 3

Wykrywalności różnych kwasów uzyskane przy zastosowaniu detektora z pomiarem potencjału. SPD, i prądu, SCD, przepływu.

No	Kwas	pKa	Wykrywalność			
			SPD		SCD	
			C M	n mole	C M	n mole
1.	siarkowy	-3,0	3×10^{-7}	$1,5 \times 10^{-12}$	7×10^{-7}	$3,5 \times 10^{-12}$
2.	azotowy	-1,4	3×10^{-7}	$1,5 \times 10^{-12}$	7×10^{-7}	$3,5 \times 10^{-12}$
3.	mrówkowy	3,75	2×10^{-5}	$1,6 \times 10^{-10}$	7×10^{-5}	$3,5 \times 10^{-10}$
4.	octowy	4,76	5×10^{-5}	$2,5 \times 10^{-10}$	1×10^{-4}	$5,0 \times 10^{-10}$
5.	propionowy	4,87	8×10^{-5}	$4,0 \times 10^{-10}$	5×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-10}$
6.	węglowy	6,45	11×10^{-3}	$5,0 \times 10^{-9}$	4×10^{-3}	$2,0 \times 10^{-8}$
7.	nitrofenole	7,17	1×10^{-3}	$5,0 \times 10^{-9}$	4×10^{-3}	$2,0 \times 10^{-8}$
8.	glukoza	12,4	2×10^{-2}	$1,0 \times 10^{-7}$	4×10^{-2}	$2,5 \times 10^{-7}$

5. Rozmycie próbki w detektorze.

Bardzo ważnym czynnikiem mówiącym o tym czy dany detektor może być zastosowany do konkretnych warunków chromatograficznych jest rozmycie próbki w detektorze. Zbyt duże rozmycie próbki objawia się na chromatogramie niższymi, szerszymi i przesuniętymi w czasie pikami chromatograficznymi. Problem ten omówiony został szerzej w części literaturowej pracy.

Wpływ na rozmycie próbki ma objętość własna detektora oraz czas jego odpowiedzi. Aby zmniejszyć do minimum objętość połączeń detektor prezentowany w tej pracy zamocowany został bezpośrednio na kolumnie chromatograficznej.

Jeśli tolerujemy 5% stratę zdolności rozdzielczej kolumny przez detektor wówczas maksymalną objętość detektora obliczyć można z równania (18), maksymalną jego średnicę z równania (23) natomiast maksymalny czas odpowiedzi z równania (25). Dla chromatografii jonowo-wymiennej z kolumną stalową 150x4mm LiChrosorb KAT i wodą jako fazą ruchomą spełnione są następujące warunki eksperymentalne [189-191]: $V_0 = 0,8 \text{ cm}^3$, $N = 1500$, $D = 2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, $J = 0,01 \text{ cm}^3/\text{s}$, $l = 1,5 \text{ cm}$. Z powyższych równań, dla tych warunków otrzymuje się : $V_D = 6,6 \text{ mm}^3$, $R_d = 0,52 \text{ mm}$ oraz $\tau = 0,66\text{s}$. Natomiast zastosowany w tym układzie detektor charakteryzował się: $V_D = 1,4 \text{ mm}^3$, $d = 0,35 \text{ mm}$ oraz $\tau = 0,2\text{s}$. Wynika z tego, że użyty detektor może pracować w danych warunkach chromatograficznych nie wpływając na pogorszenie rozdzielczości.

Maksymalne objętości detektora dla różnych kolumn chromatograficznych przedstawione zostały w Tabeli 4. Objętości próbki w kolumnie i detektora były obliczane odpowiednio z równań (20) i (21). Z danych przedstawionych w tej tabeli wynika, że problem miniaturyzacji detektora znacznie zwiększa się ze zmniejszaniem średnicy kolumny chromatograficznej (chromatografia mikrokolumnowa). W trakcie pracy nad detektorem stosowane były kapilary o długości 15 mm i średnicach wewnętrznych: 0,003; 0,13; 0,35; 0,40 i 0,45 mm. Objętości detektorów z tymi kapilarami wynosiły odpowiednio: 0,01; 0,20; 1,44; 1,89 i 2,39 mm³. Z tego wynika, że pierwsze trzy kapilary mogą być wykorzystane jako elementy pracujące detektora w chromatografii mikrokolumnowej.

Tabela 4

Objętości niezatrzymywanej na kolumnie próbki ($k'=0$) oraz odpowiadające im maksymalne objętości detektora, obliczone z równań (20) i (21) dla różnych warunków chromatograficznych.

L mm	150	150	250	250	250
d_c mm	4,6	4,6	4,6	1	1
N	1500	6000	10000	10.000	25.000
V_p mm ³	83	41	53	5,2	3,4
V_d mm ³	8,3	4,1	5,3	0,5	0,3

6. Kalibracja detektora elektrokinetycznego.

Konstruując nowy typ detektora dąży się do tego, aby charakteryzował się on możliwie jak najniższą wykrywalnością oraz liniową charakterystyką odpowiedzi w dużym zakresie stężeń. Problem ten w odniesieniu do detektora elektrokinetycznego omówiony będzie w tym rozdziale.

O ile nie będzie to zaznaczone inaczej dotyczyć to będzie detektora z kapilarą wykonaną z PTFE (20x0,4 mm).

Krzywe kalibracyjne detektora elektrokinetycznego w różnych chromatograficznych systemach rozdzielczych przedstawione zostały na Rys. 22-30. W przypadku detektora elektrokinetycznego trudno jest przewidzieć kształt krzywej kalibracyjnej. Analizowana próbka w różnym stopniu wpływa na zmianę kilku wielkości występujących w równaniach (60) i (61) (np. dla małego stężenia jonów jego wzrost powoduje liniowy wzrost przewodnictwa roztworu i logarytmiczny potencjału elektrokinetycznego). Wynika z tego, że w szerszym zakresie stężeń odpowiedź detektora nie jest liniowa. W takim przypadku można jedynie dla danych warunków (wymiary kapilar, rodzaj fazy ruchomej i analizowanego związku) eksperymentalnie ustalić zakres liniowej odpowiedzi detektora. W tym celu można tu wykorzystać równanie (1), które przekształcić można do postaci logarytmicznej:

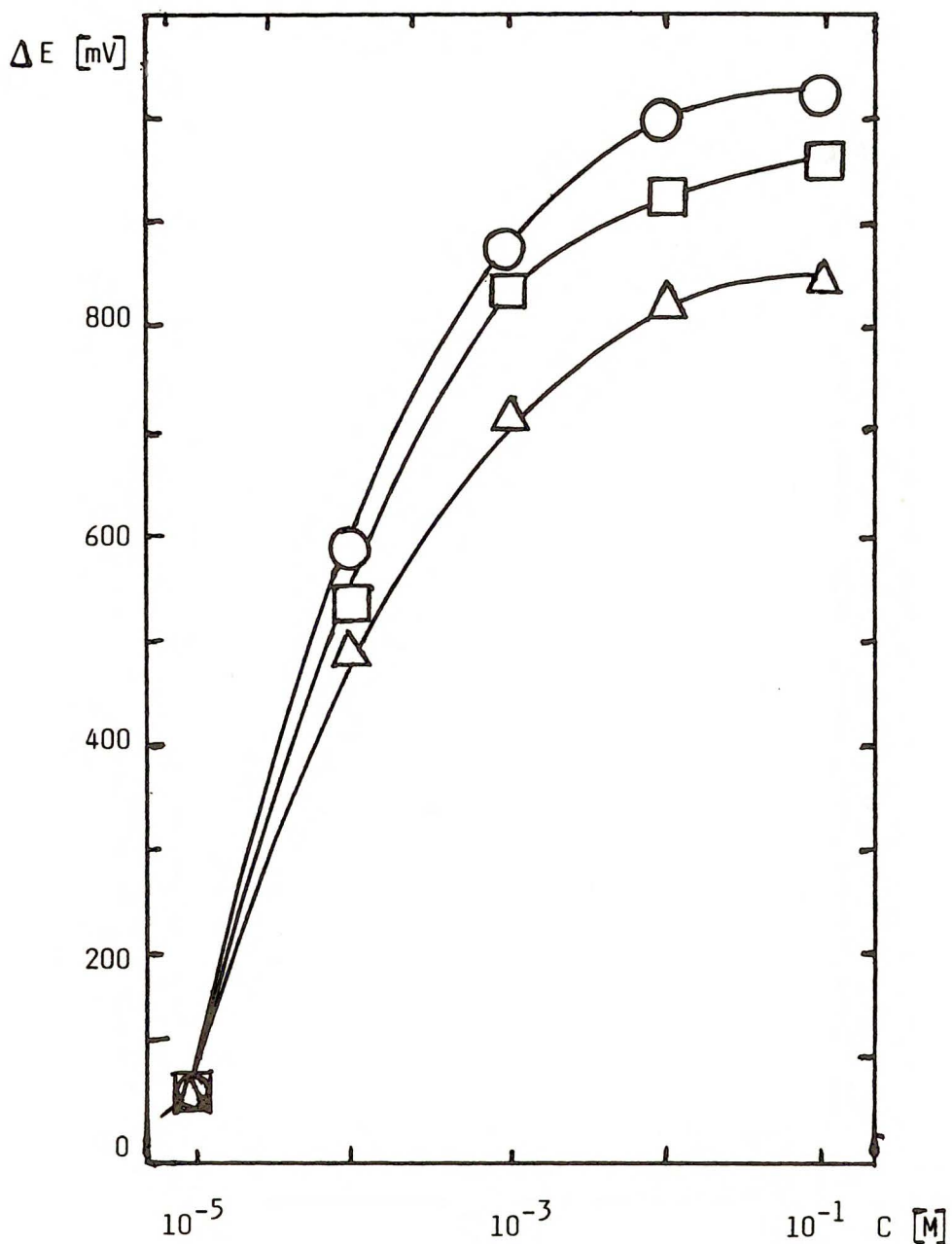
$$\lg R = \lg k + r \lg C \quad (67)$$

Z równania tego wynika, że logarytmiczna krzywa kalibra-

cyjna detektora charakteryzuje się liniową zależnością ($\lg R$ od $\lg C$) nawet w przypadku, gdy indeks odpowiedzi detektora nie jest równy jedności. Z tego typu krzywej kalibracyjnej wyznaczyć można czułość i indeks odpowiedzi detektora.

Wstępne prace prowadzone były na samym detektorze, bez użycia kolumny chromatograficznej. Uzyskane krzywe kalibracyjne kwasu propionowego dla różnych szybkości przepływu fazy ruchomej przedstawione zostały na Rys.22. Fazą ruchomą był w tym przypadku roztwór $\text{MeOH} + \text{H}_2\text{O}$ (10+90) obj./obj. stosowany następnie do oznaczeń chromatograficznych w układzie faz odwróconych. Z rysunku tego widać, że w podanych warunkach detektor charakteryzuje się liniową odpowiedzią w zakresie powyżej jednego rzędu wielkości. Dolny zakres dynamiki liniowej detektora wynosi 10^{-5}M (5×10^{-11} mola), natomiast jego wykrywalność dla stosunku sygnał/szum równego dwa, jest o rząd wielkości niższa. Wykrywalność detektora z kapilarą stalową (20 x 0,2 mm) wynosiła 10^{-4}M . Podobne zależności otrzymano dla innych analizowanych związków (KCl, kwas octowy, masłowy i walerianowy) w fazach ruchomych składających się z różnych stosunków wody i metanolu. Z analizy omawianego rysunku wynika również, że wysokości pików chromatograficznych, tak jak omówiono to poprzednio, zmniejszają się ze wzrostem szybkości przepływu.

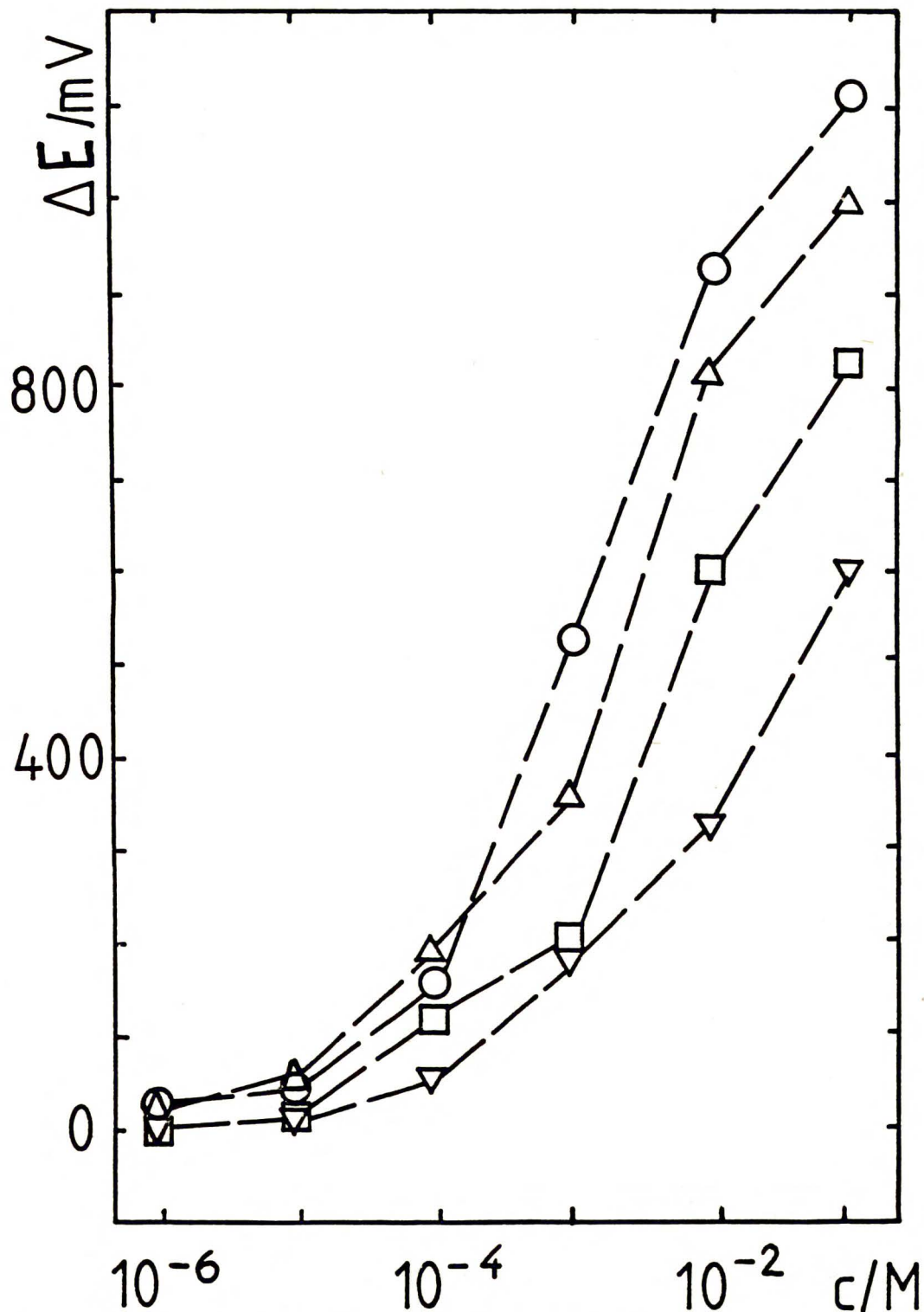
Zależności wysokości pików chromatograficznych i pola ich powierzchni, uzyskane dla różnych kwasów (octowy, propionowy, masłowy, walerianowy) rozdzielonych



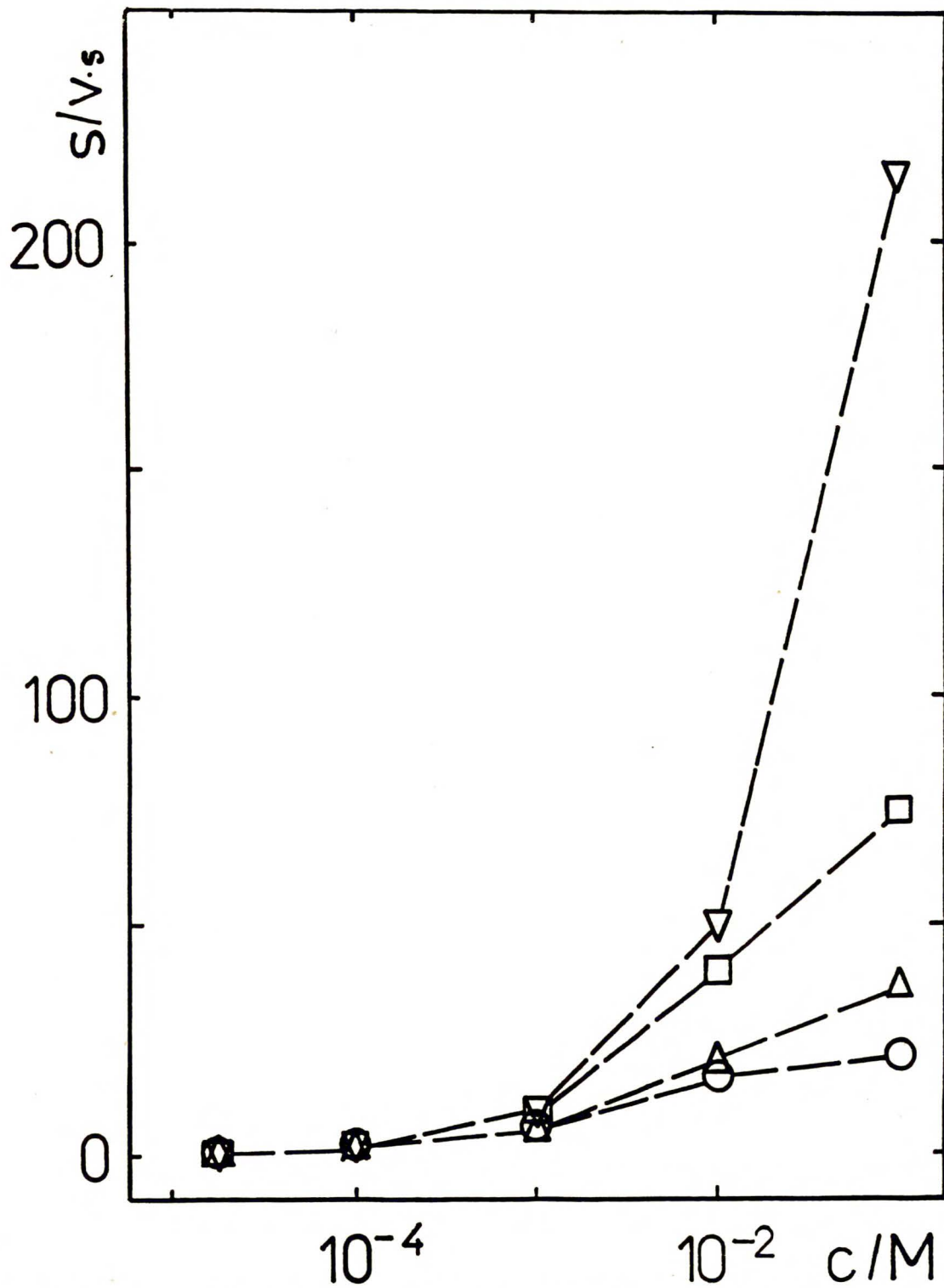
Rys. 22. Zależność wysokości pików chromatograficznych od stężenia wstrzykiwanej próbki (kwas propionowy).
Faza ruchoma: MeOH + H₂O (10+90) obj./obj.
Objętość próbki: 5 μ l. Szybkość przepływu:
(o) - 10, (□) - 30, (Δ) - 50 mm³/s.

na kolumnie 150 x 4 mm LiChrosorb RP-18, od stężenia analizowanych kwasów przedstawiono na Rys. 23 i 24. Wyniki te odnoszą się do konkretnych rozdziałów chromatograficznych, tzn. uwzględniają one rozcieńczenie próbki na kolumnie. Dlatego też, mimo że analizowane kwasy charakteryzują się podobnymi stałymi dysocjacji, wysokości ich pików chromatograficznych zmniejszają się ze wzrostem ich czasu retencji (tzn. długości łańcucha alifatycznego). Z tych samych powodów pola powierzchni pików zwiększają się ze wzrostem czasów retencji (większe rozmycie próbki). Z rysunków tych widać, że dogodniejsze do badań są wysokości pików niż ich pola powierzchni. Również odtwarzalność pola powierzchni pików, mierzonego planimetrem jest gorsza, względne odchylenie standardowe dla dziesięciu kolejnych zastrzyków wynosi 10%, niż jego wysokość (2%).

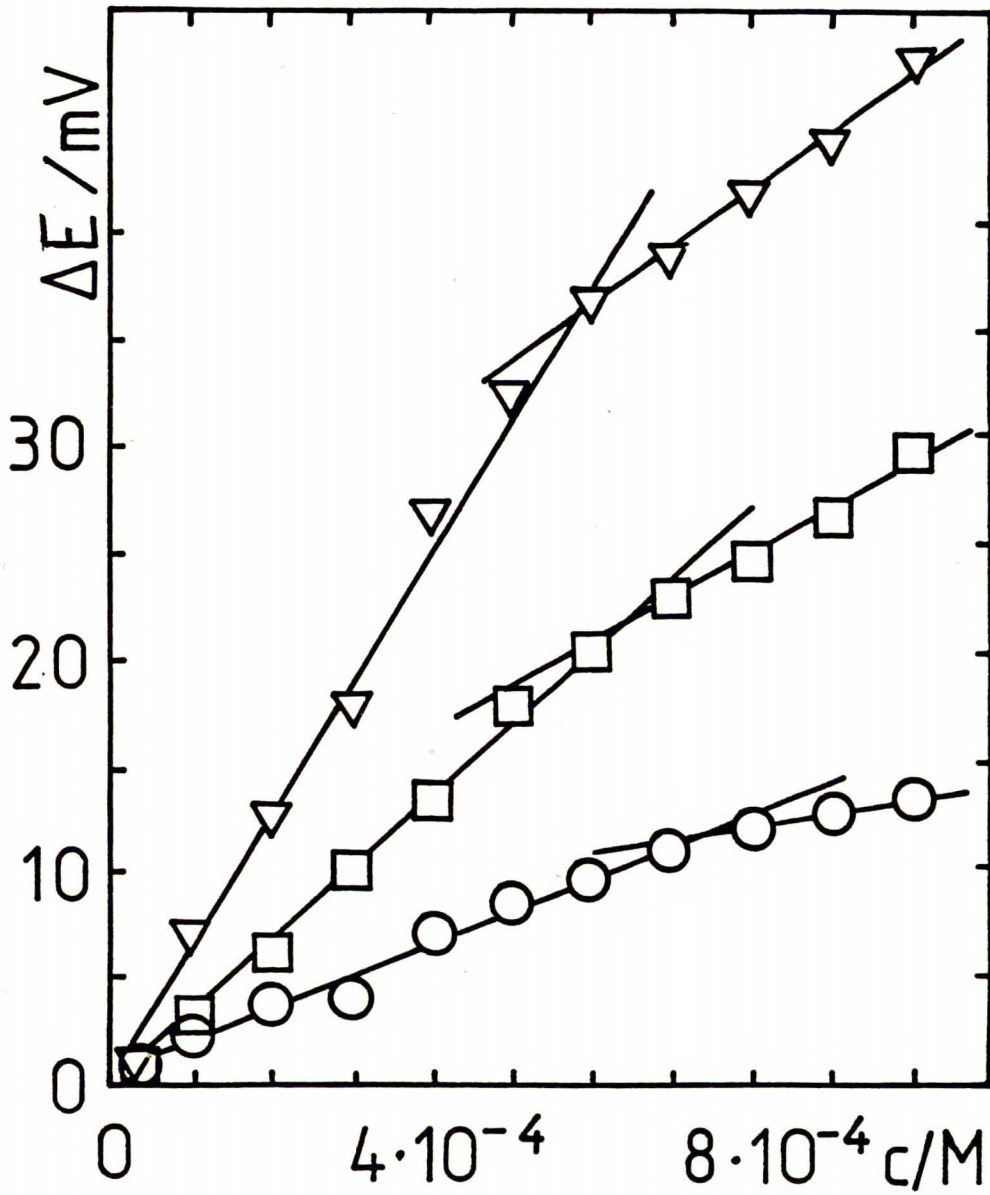
Na Rys. 25 i 26 przedstawione zostały krzywe kalibracyjne tych samych kwasów rozdzielonych w układzie chromatografii par jonowych. Fazą ruchomą był w tym przypadku 10^{-4} M roztwór nadchloranu tetrætyloamoniowego, TEAP, w MeOH + H₂O (10+90) obj./obj. Z Rys. 25 wynika, że w tych warunkach detektor charakteryzuje się liniową odpowiedzią w zakresie jednego rzędu wielkości stężeń. Zakres ten zwiększa się w przybliżeniu dwukrotnie w układzie logarytmicznym (Rys. 26). Czułość detektora mieściła się w granicach 18-70V/M.



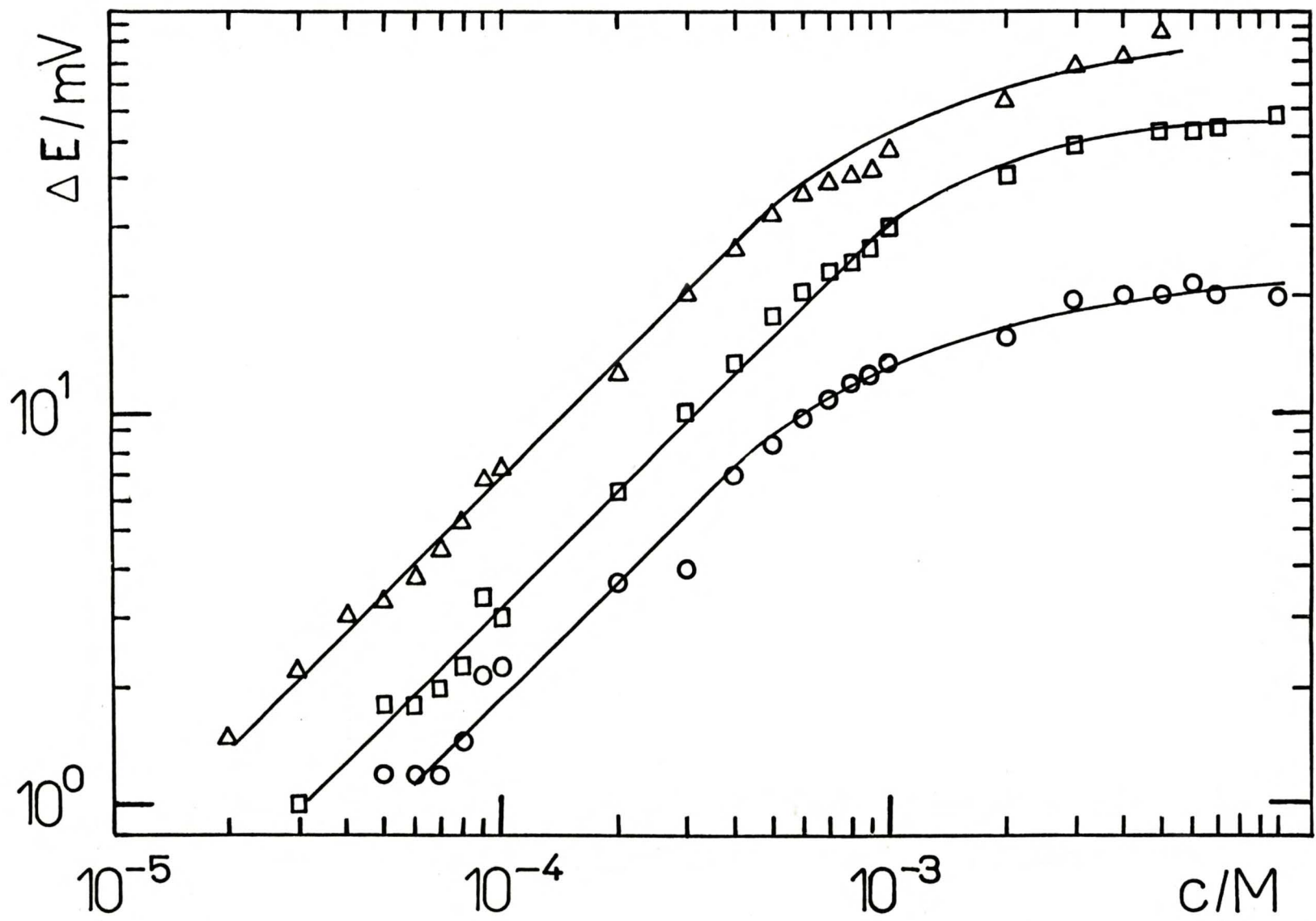
Rys. 23. Zależność wysokości pików chromatograficznych, ΔE , od stężenia próbki: (o) - kwas octowy, (Δ) - propionowy, (\square) - masłowy, (∇) - walerianowy. Szybkość przepływu: $20 \text{ mm}^3/\text{s}$. Kolumna ($150 \times 4 \text{ mm}$) ze złożem LiChrosorb RP-18, $10 \mu\text{m}$. Pozostałe warunki jak na Rys. 22.



Rys. 24. Zależność pola powierzchni piku chromatograficznego, S , od stężenia próbki. Pozostałe warunki jak na Rys. 23.



Rys. 25. Krzywe kalibracyjne detektora elektrokinetycznego w układzie chromatografii par jonowych. Faza ruchoma: 10^{-4}M TEAP. Szybkość przepływu: $10 \text{ mm}^3/\text{s}$. Pozostałe warunki jak na Rys. 23.

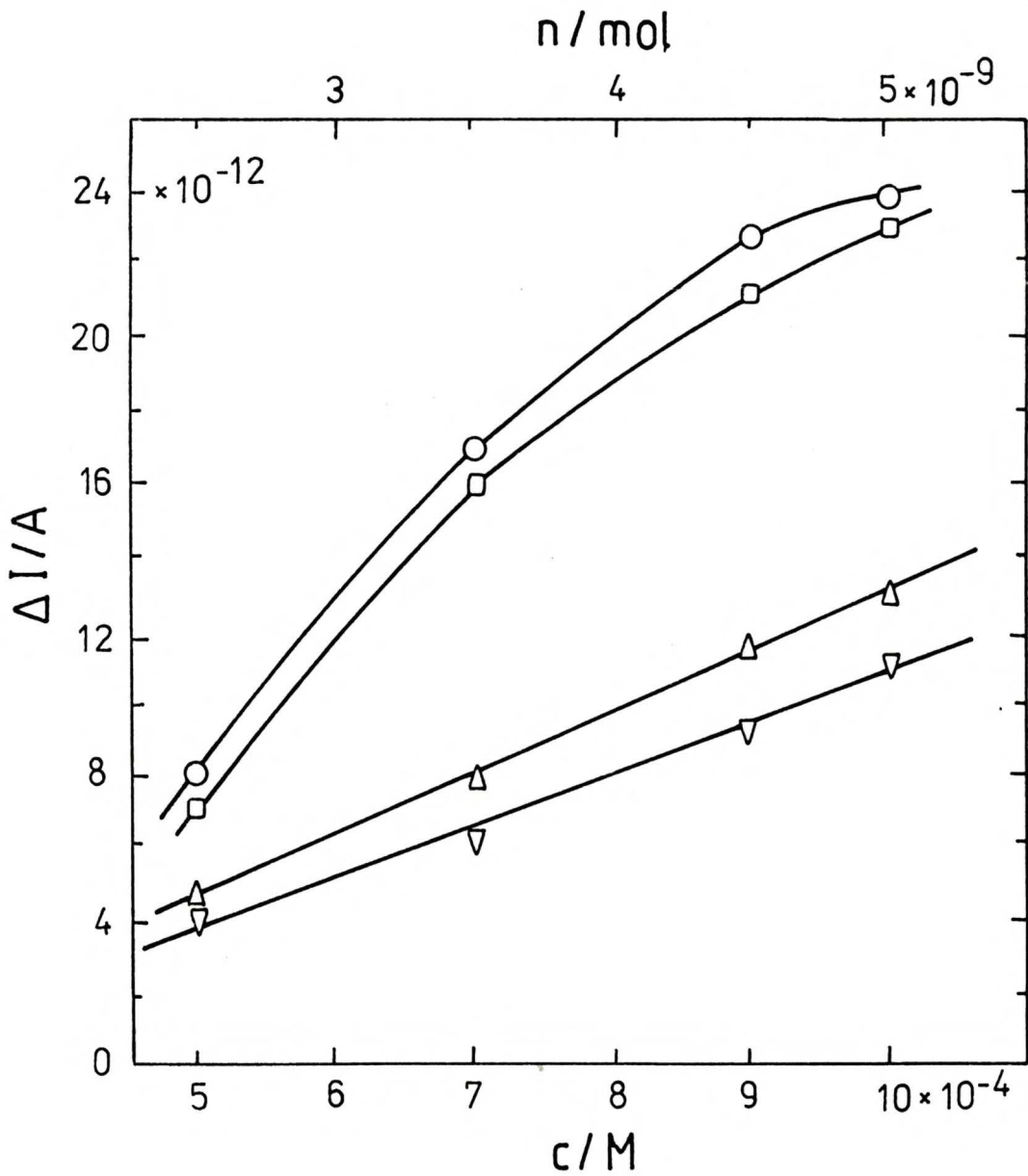


Rys. 26. Zależność logarytmu wysokości pików chromatograficznych od logarytmu stężenia próbki. Warunki jak na Rys. 25.

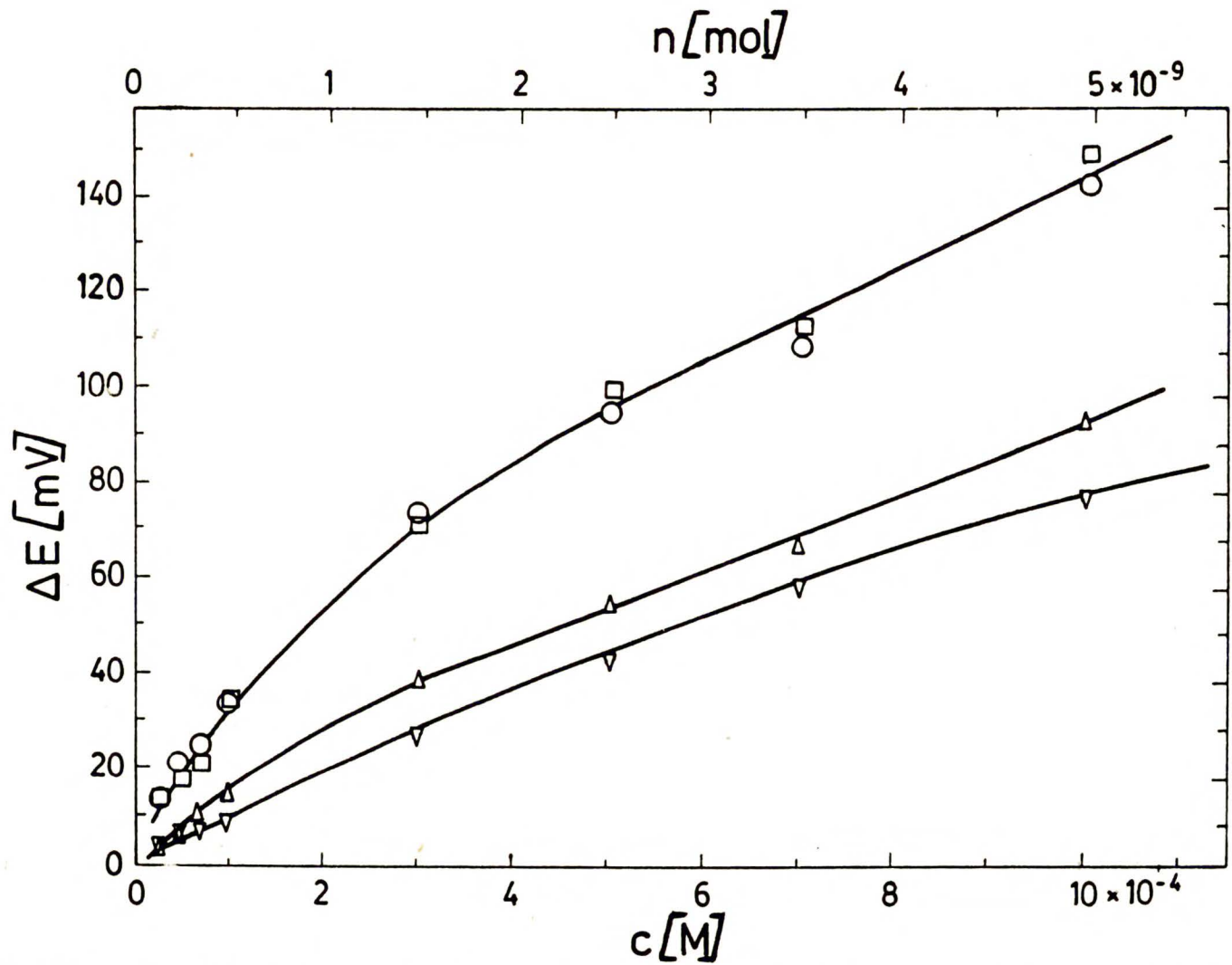
Na Rys. 27 i 28 przedstawiono krzywe kalibracyjne wyższych kwasów tłuszczowych rozdzielonych w układzie chromatografii faz odwróconych z metanolem jako fazą ruchomą. Pierwszy z nich odnosi się do detektora z pomiarem prądu przepływu, drugi do detektora z pomiarem potencjału przepływu. Z rysunków tych wynika, że lepszą wykrywalnością charakteryzuje się detektor z pomiarem potencjału przepływu ($2 \times 10^{-5} \text{M}$, tzn. 1×10^{-10} mola) niż detektor z pomiarem prądu przepływu ($15 \times 10^{-4} \text{M}$, tzn. $2,5 \times 10^{-9}$ mola). Podobnie jest z od-twarzalnością. Dla obydwu typów detektorów wynosi ona odpowiednio, RSD = 1% i 2%.

Porównania obu typów detektorów dokonano również na Rys. 29. Przedstawiono na nim logarytmiczne krzywe kalibracji kwasu siarkowego w wodzie. Wynika z nich, że SPD charakteryzuje się lepszą wykrywalnością i mniejszym zakresem liniowej dynamiki odpowiedzi ($3 \times 10^{-7} \text{M}$, trzy rzędy wielkości) niż SCD ($7 \times 10^{-7} \text{M}$, pięć rzędów wielkości). Indeks odpowiedzi, obliczony z równania (67), pierwszego z nich wynosi 0,5, drugiego 1. Lepszą wykrywalność SPD wytłumaczyć można wpływem na wartość potencjału przepływu przewodnictwa roztworu, które jest z kolei silnie zależne od stężenia jonów w roztworze. Również szybsze nasycenie jego krzywej kalibracyjnej spowodowane jest nasyceniem przewodnictwa.

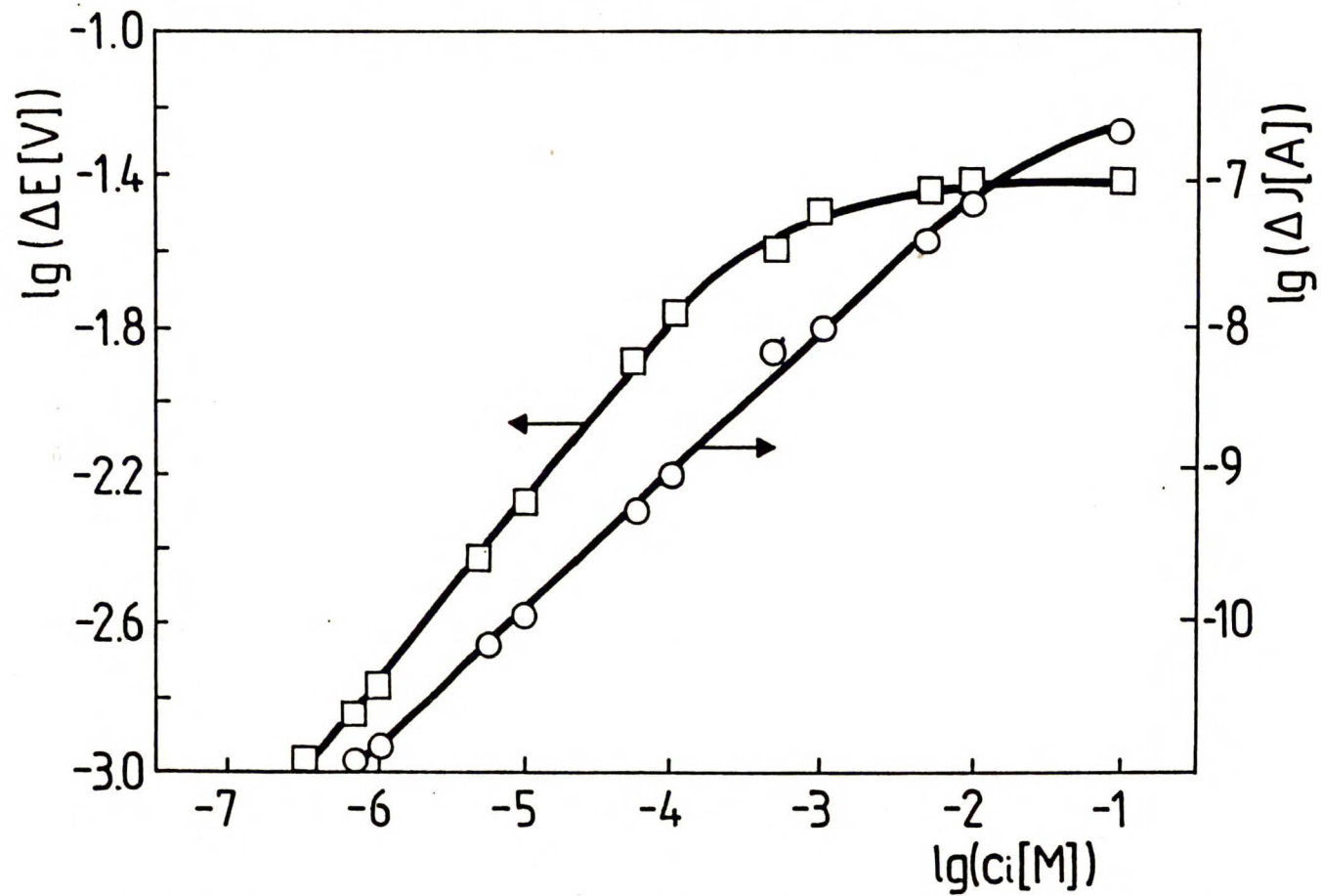
Podobny zakres dynamiki liniowej, jak prezentowany w tej pracy, dla kwasów tłuszczowych rozdzielonych w układzie chromatografii faz odwróconych uzyskał Terabe i wsp. [161] na detektorze SCD oraz Bush i wsp. [192]



Rys. 27. Krzywe kalibracyjne detektora elektrokinetycznego z pomiarem prądu przepływu. Faza ruchoma: metanol. Szybkość przepływu: 20 mm³/s. Kolumna: 150x4 mm, LiChrosorb RP-18, 10 μm. Próbkę: 5 μl. Analizowane kwasy: (o) - laurowy, (◻) - myristynowy, (Δ) - stearynowy. (▽) - arachidowy.



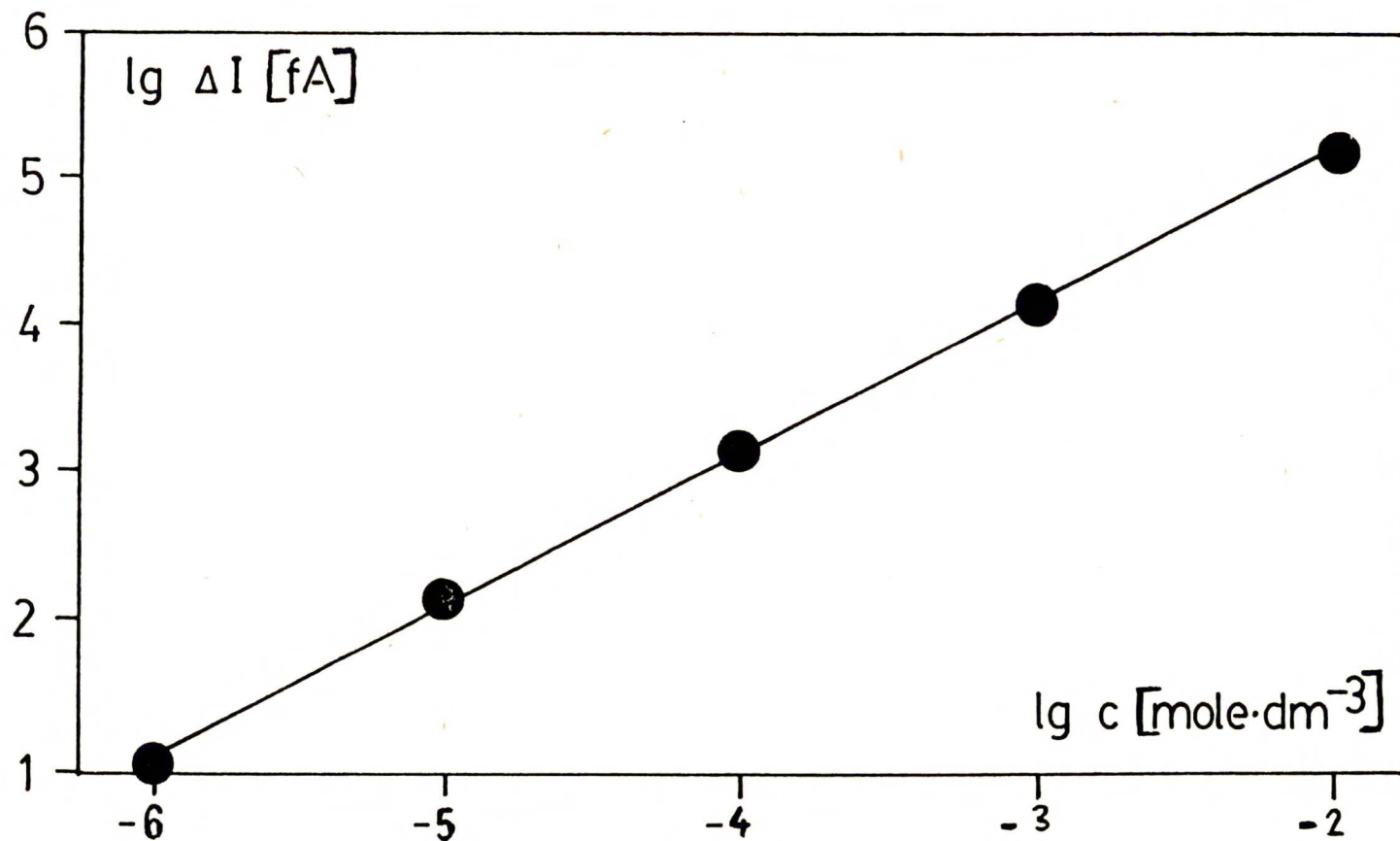
Rys. 28. Krzywe kalibracyjne detektora elektrokinetycznego z pomiarem potencjału przepływu. Warunki jak na Rys. 27.



Rys. 29. Krzywe kalibracyjne detektora elektrokinetycznego z pomiarem potencjału i prądu przepływu dla kwasu siarkowego. Faza ruchoma: woda. Szybkość przepływu: 10 mm³/s.

na detektorze UV - 210 mm. Wykrywalność pierwszego detektora wynosiła $2,5 \times 10^{-11}$ mola, drugiego $2,5 \times 10^{-7}$ mola.

Krzywa kalibracyjna detektora SCD, w układzie chromatografii faz normalnych, dla kwasu walerianowego przedstawiona została na Rys.30. Elementem pracującym detektora była kapilara stalowa (20x0,1 mm), fazą ruchomą heksan + izopropanol (90+10) obj./obj. Jak widać wykrywalność detektora (10^{-9} mola) była w tym przypadku dużo gorsza niż w przypadku wykrywalności kwasów w układzie chromatografii faz odwróconych. Ponadto, jak to zostanie pokazane w dalszej części pracy, wykrywalność bardziej zatrzymywanych na kolumnie kwasów jest jeszcze o dwa rzędy wielkości wyższa. Z tej to głównie przyczyną znacznie mniej uwagi poświęcono w niniejszej pracy zastosowaniu detektora elektrokinetycznego w układzie chromatografii faz normalnych. Zakres liniowej dynamiki odpowiedzi detektora wynosił w tym układzie cztery rzędy wielkości. Z zależności (67) wyznaczono czułość i indeks odpowiedzi detektora. Wyniki zestawiono w Tabeli 5. Przedstawiono w niej również szum i wykrywalność omawianego detektora oraz detektorów, których elementami pracującymi była kapilara wykonana z PTFE i kolumna chromatograficzna [174]. Ten ostatni typ detektora charakteryzuje się wprawdzie całkowitym brakiem rozmycia próbki na nim, jednakże jego wykrywalność jest wyjątkowo wysoka.



Rys. 30. Krzywa kalibracyjna detektora elektrokinetycznego z pomiarem prądu przepływu z kapilarą ze stali kwasoodpornej (20x0,2 mm). Faza ruchoma: heksan + izopropanol (90+10) obj./obj. Kolumna stalowa (250x4 mm) napełniona złożem LiChrosorb Si 60, 10 μm . Szybkość przepływu: 20 mm^3/s . Próbkę: kwas walerianowy. Objętość próbki 5 μl .

Tabela 5

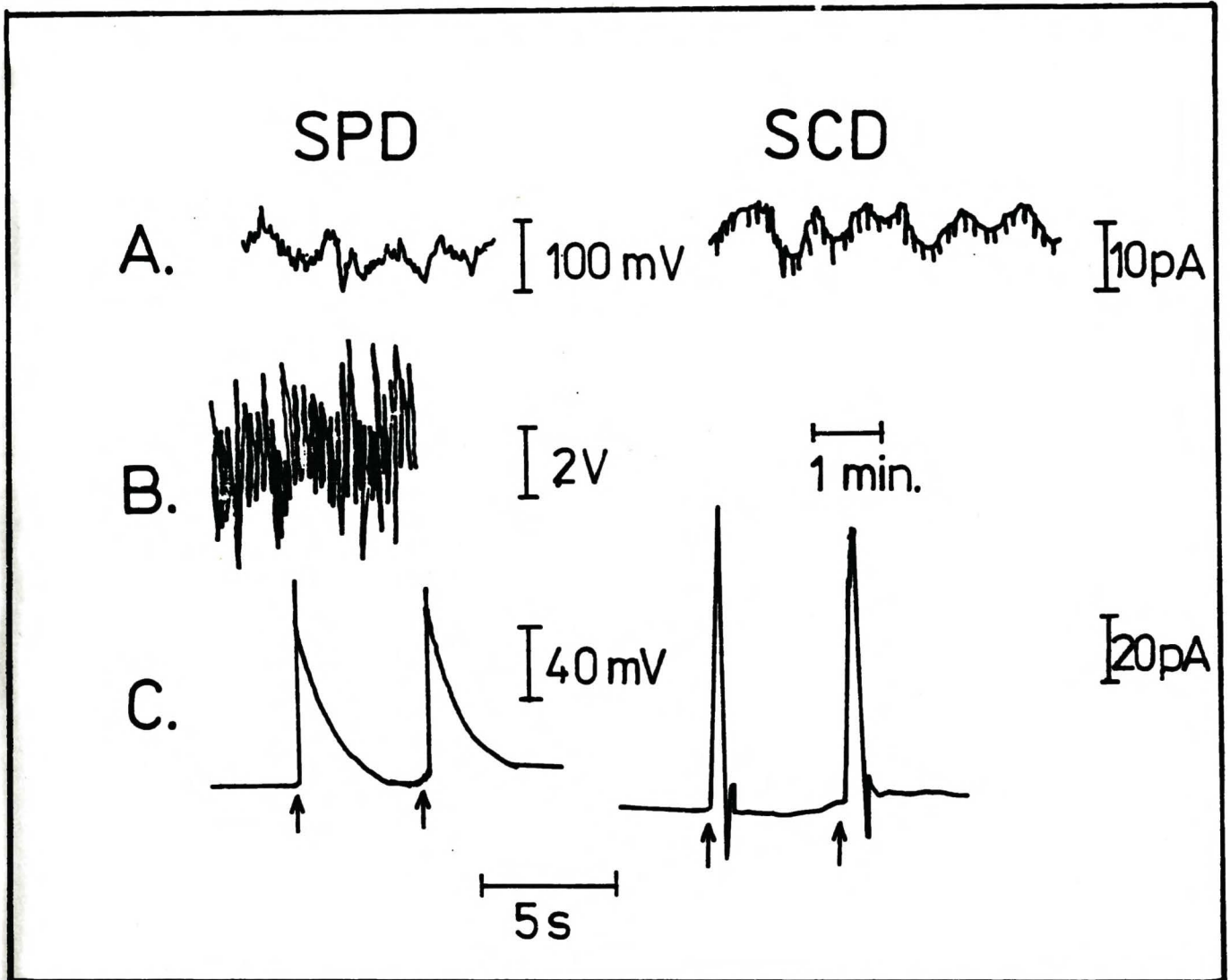
Charakterystyka detektora z pomiarem prądu przepływu z różnymi elementami pracującymi w układzie chromatografii faz normalnych.

Element pracujący	r	$k A/mol $	$N_L A $	$D_L mol $
kapilara z PTFE (100x0,1 mm)	1	6×10^{-8}	1×10^{-14}	3×10^{-10}
kapilara stalowa (20x0,2 mm)	1	3×10^{-8}	2×10^{-14}	1×10^{-9}
kolumna chromato- graficzna (250x4 mm)	1	2×10^{-8}	4×10^{-14}	4×10^{-9}

7. Zakłócenia pracy detektora.

Pierwszym krokiem w kierunku likwidacji szumów i zakłóceń pracy detektora jest poznanie przyczyn pochodzenia poszczególnych ich typów. Typowe szумы pojawiające się w trakcie pracy detektora elektrokinetycznego, ich przyczyny tworzenia się oraz sposoby likwidacji przedstawione zostały w Tabeli 6 i zobrazowane na Rys. 31. Na uwagę zasługuje to, że zaburzenia pracy detektora pojawiające się w momencie zastrzyku próbki odgrywają rolę markerów, oznaczających początek chromatogramu.

Niektóre typy, źródła powstawania i sposoby likwidacji zakłóceń pików chromatograficznych zarejestrowanych na detektorze elektrokinetycznym omówione zostały w Tabeli 7, a ich kształty przedstawione zostały na Rys.32. Wielokrotne piki przedstawione na Rys. 32A są obserwowane w układzie chromatografii faz normalnych w przypadku zbyt dużych objętości lub stężeń analizowanej próbki, szczególnie w przypadku małych średnic kapilar. Występują one wtedy, gdy próbka znacznie się różni lepkością od fazy ruchomej i związane są najprawdopodobniej z zaburzeniem przepływu cieczy w pobliżu ścianki kapilary (środek próbki płynie szybciej niż jej brzegi). W momencie gdy dokonuje się szybkiej zmiany cieczy przepływających przez detektor wówczas początkowo obserwuje się bardzo dużą zmianę mierzonego potencjału, który następnie powoli osiąga nową wartość równowagową. Spowodowane to jest polaryzacją stężeniową elektrod [17,115, 193, 194].



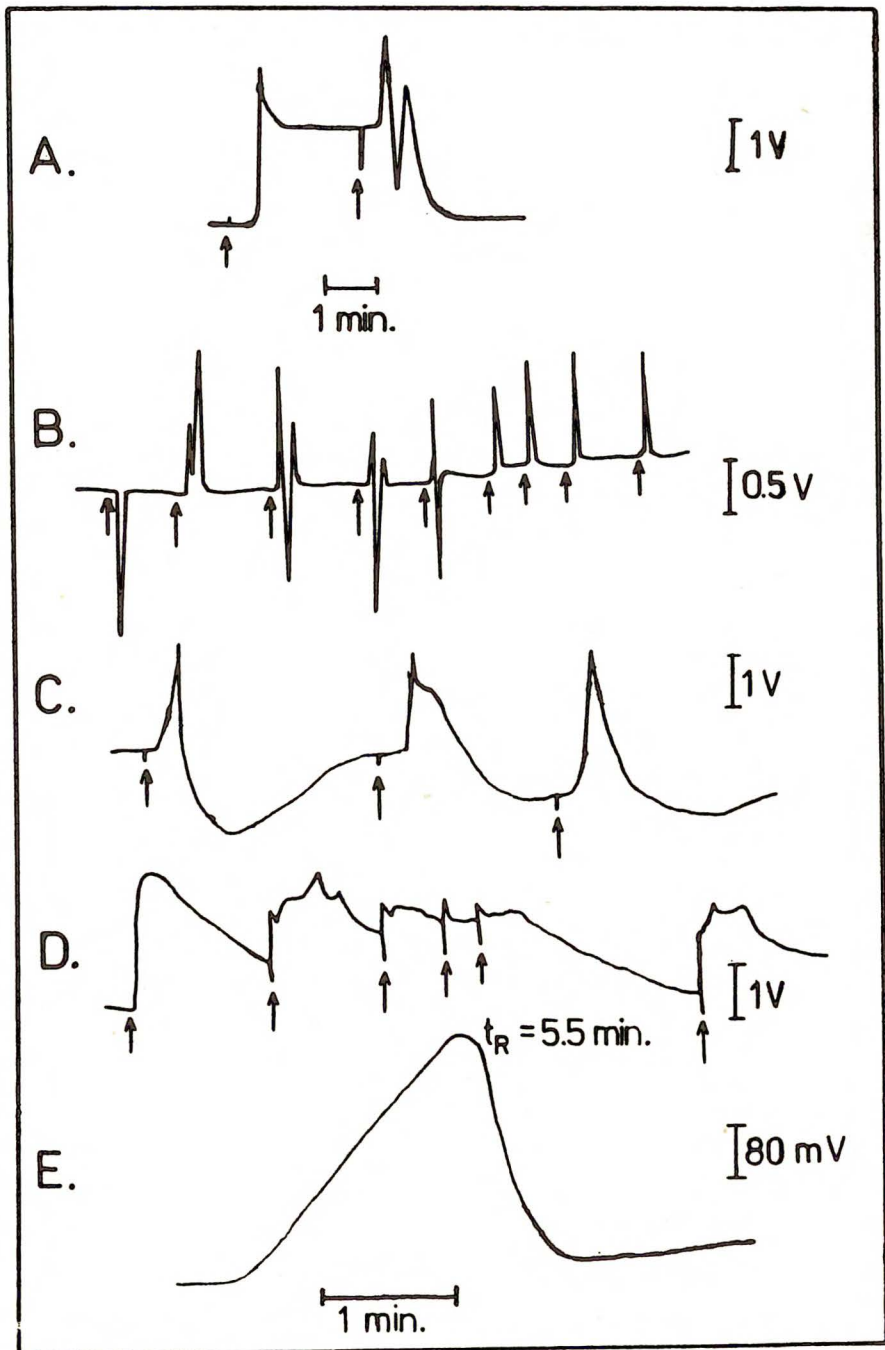
Rys. 31. Problemy stabilności linii odniesienia na wyjściu detektora elektrokinetycznego. Litery odnoszą się do symptomów opisanych w Tabel VI.

Tabela 6

Tabela zakłóceń. Problemy stabilności linii odniesienia na wyjściu detektora elektrokinetycznego.

Symptom*	Przyczyna	Sposób likwidacji
Nieregularna lub niestabilna linia odniesienia. A.	Przepływ prądu elektrycznego z kolumny do detektora. Elektroniczne zaburzenia z zewnętrznego źródła.	Izolacja detektora od reszty chromatografu. Dokładne uziemienie i ekranowanie detektora.
Szum linii podstawowej. B.	Pęcherzyki gazu przechodzące przez celkę detektora.	Odgazowanie fazy ruchomej. Uszczelnienie układu przed przedostawaniem się powietrza do fazy ruchomej.
Piki pojawiające się w momencie zastrzyku próbki. C.	Zaburzenie przepływu cieczy w momencie zastrzyku.	Pełnią one pozytywną rolę markerów momentu zastrzyku.
Dryft.	Adsorpcja związków powierzchniowo-czynnych na wewnętrznej powierzchni kapilary. Niekompletnie wymyta poprzednia faza ruchoma.	Wymycie kapilary odpowiednim rozpuszczalnikiem. Przepuszczenie przez układ nowej fazy ruchomej.

* Litery odnoszą się do Rys. 31.



Rys. 32. Zakłócenia pików chromatograficznych na wyjściu detektora elektrokinetycznego.

Litery odpowiadają symptomom opisanym w Tabeli VII.

A - naprzemienny przepływ kwasu walerianowego i heksanu przez detektor. B - zastrzyki $10^{-1}M$ próbki kwasu octowego przy obecności, z poprzedniego zastrzyku, $1M$ TEAP zaadsorbowanego na wewnętrznej powierzchni kapilary. C - piki chromatograficzne odpowiadające kolejnym zastrzykom próbki $1M$ KCl w wodzie. D - piki chromatograficzne odpowiadające kolejnym zastrzykom próbki $1M$ butanonu w heksanie. E - odpowiedź detektora na zastrzyk próbki $1M$ kwasu octowego w wodzie.

Tabela 7

Tabela zakłóceń. Zakłócenia pików chromatograficznych na wyjściu detektora elektrokinetycznego.

Symptom*	Przyczyna	Sposób likwidacji
Piki pojawiające się w momencie wejścia i opuszczania celki detektora przez próbkę. A.	Zbyt duża próbka.	Zmniejszenie próbki.
Zmiana odpowiedzi detektora (kształt piku) dla kolejnych zastrzyków próbki. B.	Zabrudzona wewnętrzna powierzchnia kapilary.	Przemycie kapilary świeżą fazą ruchomą lub odpowiednim rozpuszczalnikiem.
Spadek linii podstawowej po pikie. C.	Adsorpcja niektórych składników i zatrucie miejsc aktywnych kapilary detektora.	Zmniejszyć próbkę. Zdeaktywować układ.
Wzrost linii podstawowej po pikie. D.	Przeładowania adsorpcji próbki na wewnętrznej ściance kapilary detektora.	Zmniejszyć próbkę. Detektor nie nadaje się do analizy silnie adsorbujących się próbek.
Frontalne rozmycie próbki. E.	Frontalne rozmycie próbki kwasu w niebuforowanej fazie ruchomej spowodowane różną retencją dwóch jego form występujących w roztworze.	Zastosować buforowaną fazę ruchomą.

* Litery odnoszą się do Rys. 32.

Z kolei na Rys. 32B przedstawiony został proces "oczyszczania" przez próbkę zabrudzonej (roztworem TEAP) wewnętrznej części ścianki kapilary. W przypadku, gdy analizowany związek charakteryzuje się dużą zdolnością do adsorpcji na ściance kapilary, szczególnie wtedy gdy jest on zastrzykiwany w dużym stężeniu, wówczas (Rys. 32C i 32D) na chromatogramie nie obserwuje się odtwarzalności poziomu linii podstawowej po zarejestrowanym pikie. Prowadzi to do nieodtwarzalności wysokości pików chromatograficznych.

Na Rys. 32E zobrazowane zostało frontalne rozmycie próbki. Zakłócenie to z detekcją elektrokinetyczną związane jest pośrednio. Obserwuje się je, gdy oznaczane są kwasy w fazach ruchomych nie zawierających buforów. Obecność buforu pogarsza wykrywalność detektora z powodu występowania efektu zwarcia. Natomiast w przypadku jego nieobecności stopień dysocjacji, a więc stosunek ilości cząsteczek zdysocjowanych do niezdisocjowanych, kwasu jest zależny od jego stężenia. W układzie chromatografii faz odwróconych cząsteczki niezdisocjowane są silniej zatrzymywane przez złożę niż zdysocjowane. W wyniku tego w początkowej fazie pik chromatograficznego (tzn. ze wzrostem stężenia analizowanego kwasu i stosunku ilości jego cząsteczek niezdisocjowanych do zdysocjowanych) obserwowany jest wzrost czasu retencji kolejnych jego porcji dochodzących do detektora. Po przejściu przez maksimum pik sytuacja ulega odwróceniu [173, 191, 195]. W konsekwencji kształt pik przyjmuje formę przedstawioną na omawianym rysunku.

Zgodnie z równaniami (60) i (61) ze wzrostem długości i zmniejszeniem średnicy kapilary obserwuje się wzrost wartości potencjału i prądu przepływu. Przy czym, jednocześnie obserwuje się wzrost wartości poziomu tła, wysokości pików chromatograficznych i szumu detektora. Oznacza to, że zmiany te nie wpływają na wykrywalność detektora. Zależność wielkości szumu detektora od wymiarów kapilary przedstawiona została w Tabeli 8.

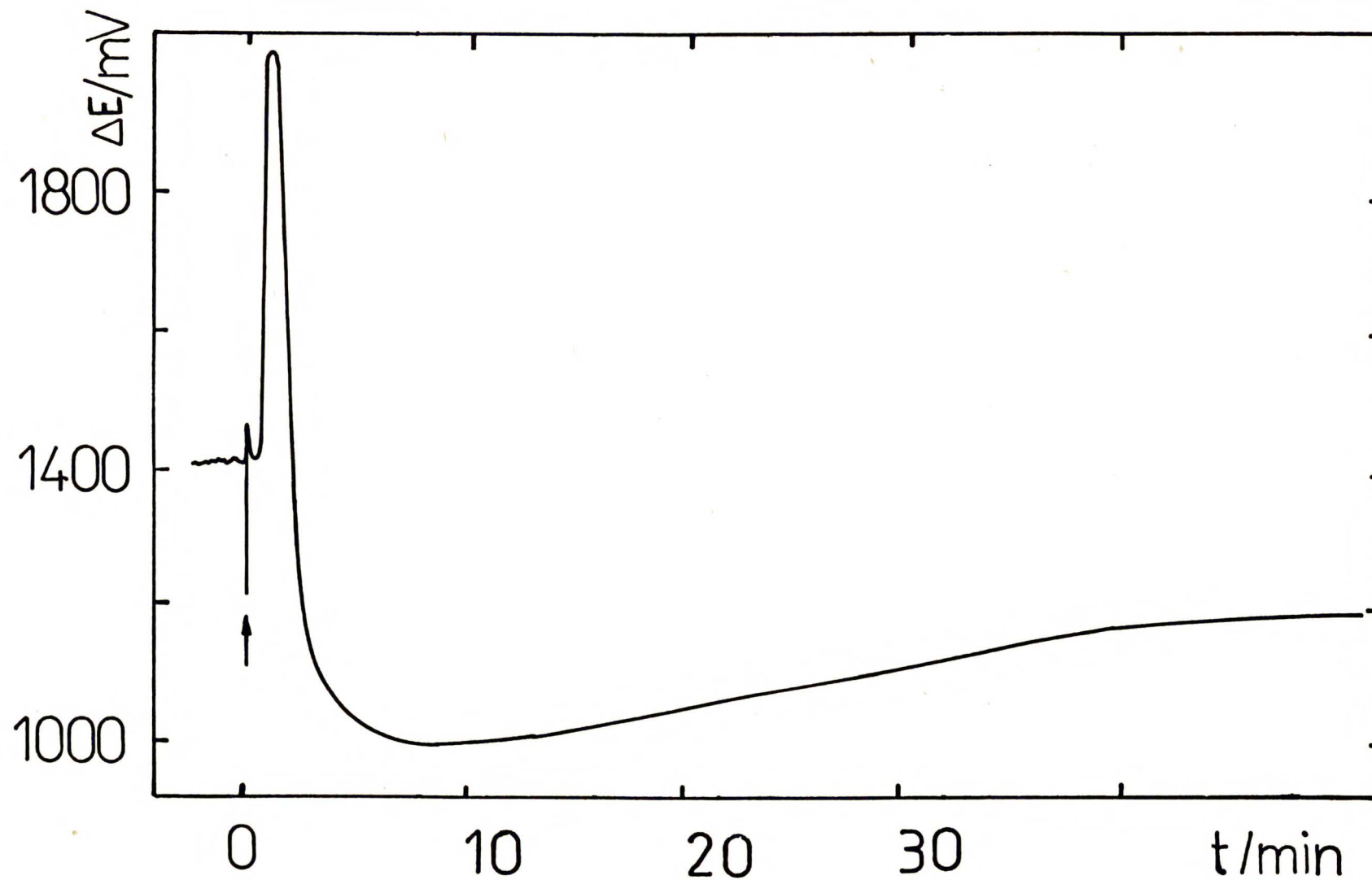
Tabela 8

Zależność wielkości szumu detektora, N_L , od długości, l , i średnicy, d , wykonanej z PTFE, kapilary pracującej detektora.

l mm	d mm	N_L mV	l mm	d mm	N_L mV
40	0,2	8	20	0,35	3,2
60	0,2	10	20	0,40	1,6
80	0,2	12	20	0,45	1,0
100	0,2	20	20	0,50	0,8

Aby zmniejszyć do minimum szum detektora należy chronić go przed wpływami zewnętrznych pól elektrostatycznych i elektromagnetycznych. Uzyskano to, zgodnie z tym, co napisano w Części Eksperymentalnej, poprzez dokładne uziemienie i ekranowanie detektora (ekrany ze stali węglowej, dwukrotnie ekranowany kabel z polietylenu i z warstwą koloidalnego grafitu), a także chronienie go przed wstrząsami. Nie zaobserwowano natomiast wpływu

temperatury, w zakresie 10-30°C, na pracę detektora. Duże zakłócenia pracy detektora powodowało "zatrucie" wewnętrznej powierzchni ścianki kapilary związkami powierzchniowoaktywnymi, np. jonami czteroalkiloamonio- wymi. Oczyszczyć je można było przepuszczając przez detektor 20 do 200 cm³ fazy ruchomej. Czasami dobre rezultaty dawało kilkakrotne zastrzykiwanie analizowanej próbki. Na początku pracy z detektorem przepuszczano przez niego fazę ruchomą przez ok. 30 min. w celu ustalenia stałego poziomu tła. Również tego samego czasu wymagało oczyszczenie z zaadsorbowanych na jej powierzchni substancji (Rys. 33), czy też stabilizacja poziomu tła po zmianie szybkości przepływu fazy ruchomej. Faza ruchoma stosowana we wszystkich pomiarach opisanych w tej pracy była odgazowywana. Duża różnica ciśnień występująca wzdłuż kolumny powodowała tworzenie się pęcherzyków gazu u jej wylotu, co znacznie zakłócało pomiary (przerwanie obwodu elektrycznego).

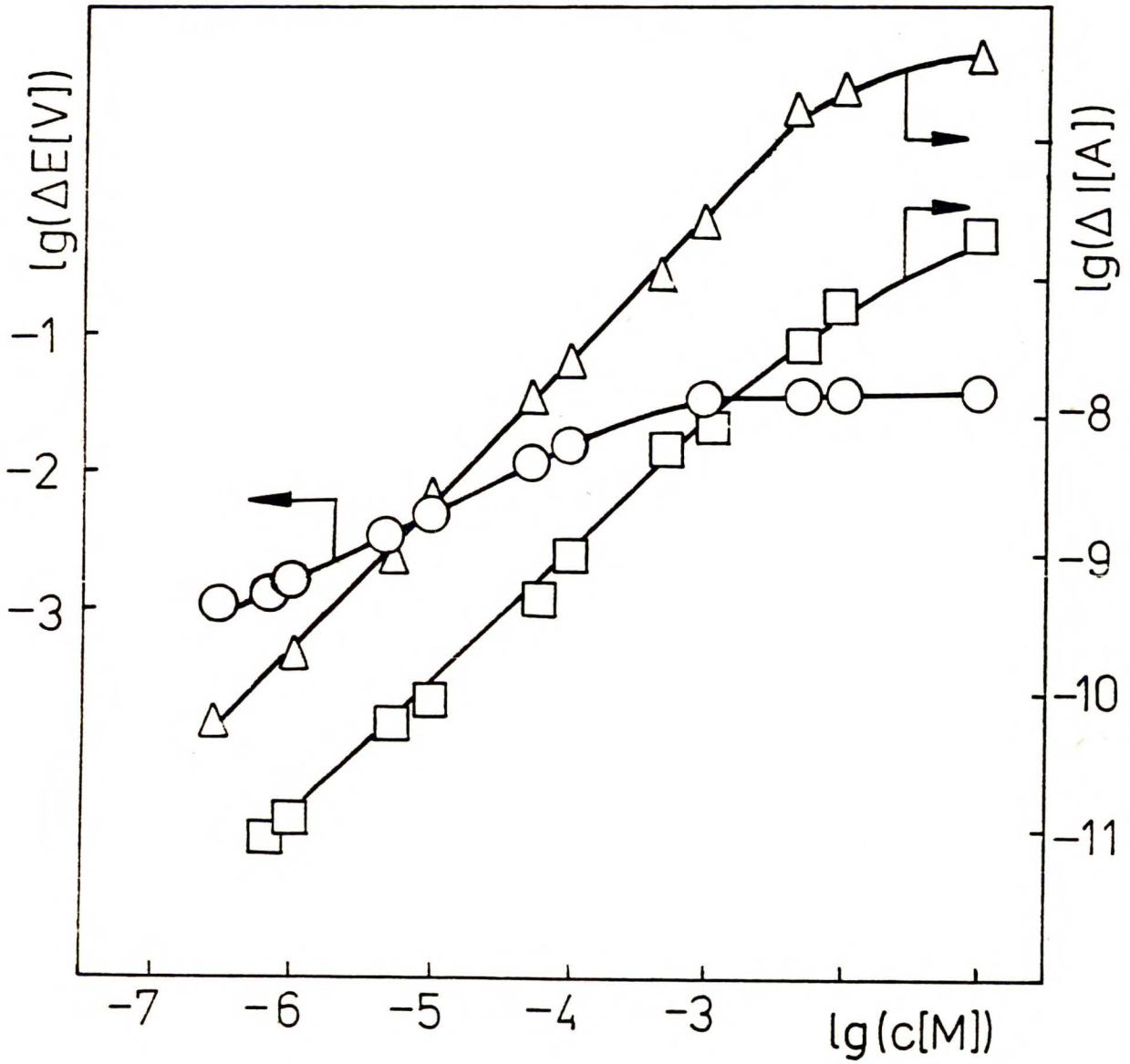


Rys. 33. Chromatogram próbki 1M roztworu kwasu propionowego. Kolumna: 150x4 mm upakowana kulkami szklanymi 80 mesh. Szybkość przepływu: 20 mm³/s. Faza ruchoma: MeOH + H₂O (10+90) obj./obj.

8. Porównanie własności detektora elektrokinetycznego i konduktometrycznego.

Z dotychczas przeprowadzonych rozważań wynika, że detektor elektrokinetyczny jest pod względem własności najbardziej podobny do detektora konduktometrycznego. Oba detektory rejestrują zmiany stężenia jonów w przepływającym przez nie eluacie. Oba charakteryzują się tymi samymi ograniczeniami - nie mogą pracować w fazach ruchomych zawierających duże stężenie związków zjonizowanych. Ponadto przewodnictwo cieczy wchodzi explicite w równanie opisujące potencjał przepływu (równanie (61)). Z tego wynika, że omawiane detektory powinny być czułe na te same klasy związków oraz charakteryzować się podobnymi wykrywalnościami. Jednakże kierunki zmian mierzonych wielkości w obu detektorach są przeciwne. Z porównania wzorów (62) i (64) wynika, że ze wzrostem stężenia jonów obserwuje się wzrost przewodnictwa i spadek potencjału przepływu. Ponadto detektor elektrokinetyczny, jak to zostanie omówione w dalszej części pracy, łączy w sobie własności detektora konduktometrycznego i dielektrycznego.

Na Rys. 34 przedstawione zostały krzywe kalibracji kwasu siarkowego zarejestrowane z zastosowaniem detektora konduktometrycznego, CD, oraz elektrokinetycznego z pomiarem prądu, SCD, i potencjału, SPD, przepływu. Elementem pracującym wszystkich detektorów była ta sama kapilara. W pomiarach zastosowano stałoprądowy detektor konduktometryczny, przy czym w części eksperymentalnej wykazano, że w badanych warunkach nie obserwuje się



Rys. 34. Krzywe kalibracyjne detektorów: SPD - (o), SCD - (■) i CD - (Δ) dla kwasu siarkowego w wodzie. Kapilara pracująca wykonana z PTFE (20x0,4 mm). Objętość próbki: 5μl. Szybkość przepływu: 10 mm³/s.

polaryzacji jego elektrod. W przypadku detektora konduktometrycznego mierzony był prąd w układzie przedstawionym na Rys.6. Z Rys. 34 wynika, że CD i SPD charakteryzują się tą samą wykrywalnością. Inne parametry charakteryzujące omawiane detektory przedstawione zostały w Tabeli 9. Czułości i indeksy odpowiedzi detektorów obliczone zostały z równania (67).

Przykładowe chromatogramy zarejestrowane za pomocą trzech omawianych detektorów przedstawione zostały na Rys.35. Przedstawiają one rozdział niższych kwasów tłuszczowych (mrówkowy, octowy i walerianowy) w układzie chromatografii jonowo-wykluczającej.

Tabela 9

Porównanie własności detektora elektrokinetycznego z pomiarem prądu, SCD, i potencjału, SPD, przepływu oraz detektora konduktometrycznego, CD.

Kapilara pracująca detektora wykonana z PTFE (20x0,4mm).

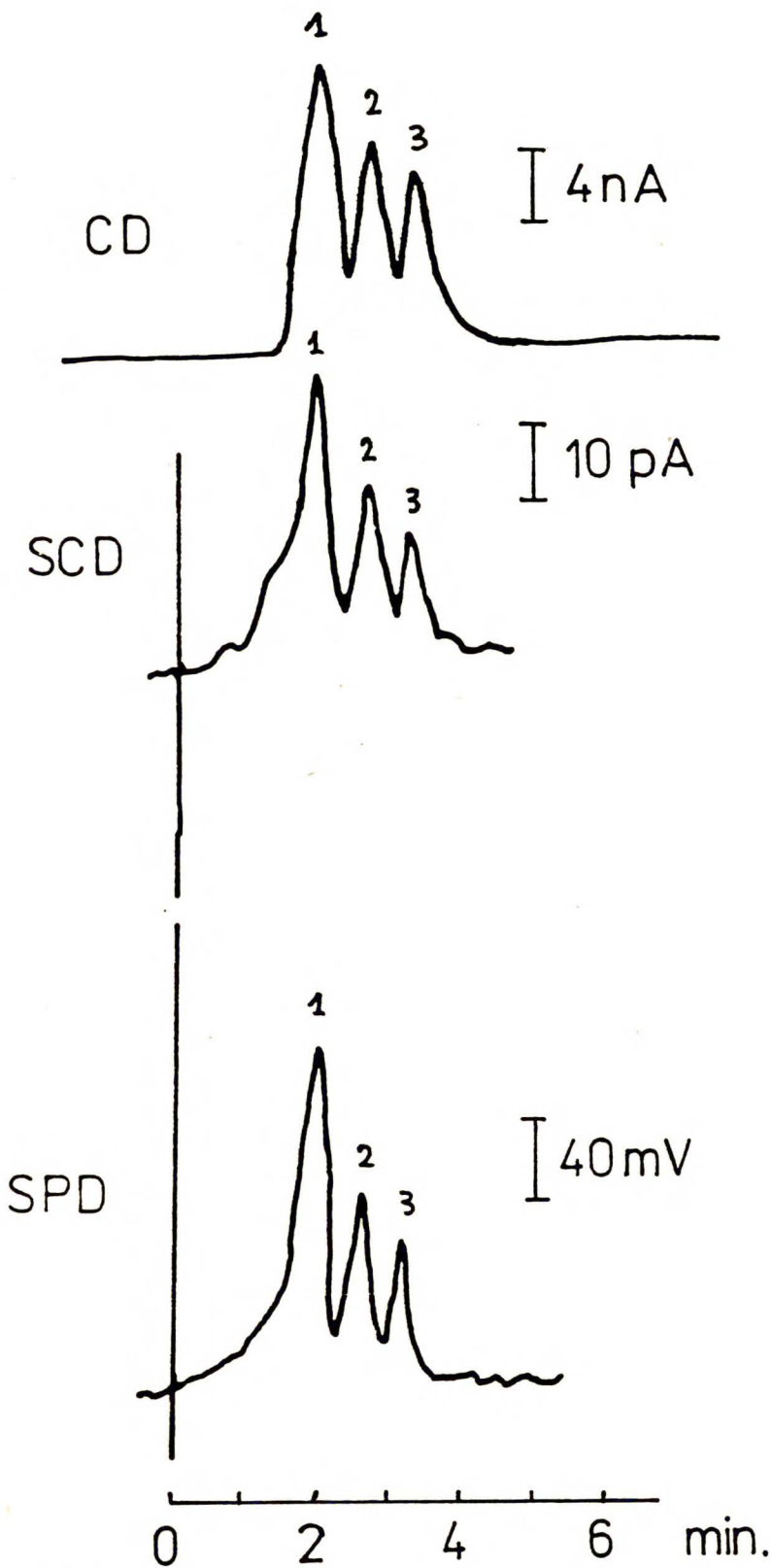
Próbka: kwas siarkowy. Objętość próbki: 5 μ l. Faza ru-

choma: woda. k - czułość, r - indeks odpowiedzi, D_L -

wykrywalność, L_D - zakres dynamiki liniowej, RSD - od-

twarzalność.

	k	r	D_L mol	D_L M	L_D	RSD %
SCD	21A/mol	1,0	$3,5 \times 10^{-12}$	7×10^{-7}	5	2
SPD	$3,3 \times 10^8$ V/mol	0,5	$1,5 \times 10^{-12}$	3×10^{-7}	3	1
CD	63A/mol	1,0	$1,5 \times 10^{-12}$	3×10^{-7}	5	1



35. HPLC chromatogramy mieszaniny 10^{-3} M kwasów: 1 - mrówkowego, 2 - octowego, 3 - walerianowego zarejestrowane za pomocą detektorów: SPD, SCD i CD. Kolumna: 150x4 mm LiChrosorb KAT, 10 μ m. Pozostałe warunki jak na Rys. 34.

II. Zastosowanie detekcji elektrokinetycznej w różnych systemach rozdzielczych wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej.

1. HPLC faz normalnych.

W chromatografii faz normalnych fazą ruchomą jest ciecz o małym przewodnictwie elektrycznym i małej przenikalności elektrycznej. Ciecz taka charakteryzuje się, jak to zostało omówione w Części Literaturowej, dużym czasem relaksacji elektrycznej i grubą podwójną warstwą elektryczną. W wyniku tego opuszczająca kapilarę ciecz jest elektrycznie naładowana. W cieczach tych tworzenie się prądu przepływu związane jest z obecnością w nich zanieczyszczeń. Dlatego trudno jest tu przewidzieć wpływ różnych czynników na pracę detektora.

Silikażel charakteryzuje się własnością wyjątkowo silnej adsorpcji na swojej powierzchni wszystkich związków polarnych. Z tego powodu w fazach normalnych adsorpcyjny mechanizm retencji występuje tylko wtedy gdy faza ruchoma i silikażelnie zawierają nawet śladowych ilości związków polarnych. Jest to bardzo trudne do osiągnięcia, ponadto na czystym silikażelu obserwuje się silne rozmycie próbki. Z tego powodu do fazy ruchomej dodaje się, w celu stabilizacji warunków chromatograficznych, kilka procent rozpuszczalnika polarnego. Wtedy jednakże mechanizm retencji jest mieszany, adsorpcyjno - podzia-łowy.

Chromatogramy mieszaniny niższych kwasów tłuszczowych przedstawione zostały na Rys. 36 - 38. Fazą ruchomą była w tym przypadku mieszanina: heksan + izopropanol (90+10) obj./obj. Kwasy wymywane były w kierunku zmniejszania się długości łańcucha alifatycznego, tzn. w kierunku wzrostu ich stałych dysocjacji. Kwasy o łańcuchu dłuższym od kwasu walerianowego wymywane były przy tej samej objętości retencji równej objętości martwej kolumny. Wpływ wartości stałych dysocjacji analizowanych kwasów na ich objętości opisuje równanie [174]:

$$V_R = V_0 + \frac{B}{\left(-\frac{1}{4} + \frac{C \cdot}{K_a}\right)^{1/2} - 1/2} \quad (68)$$

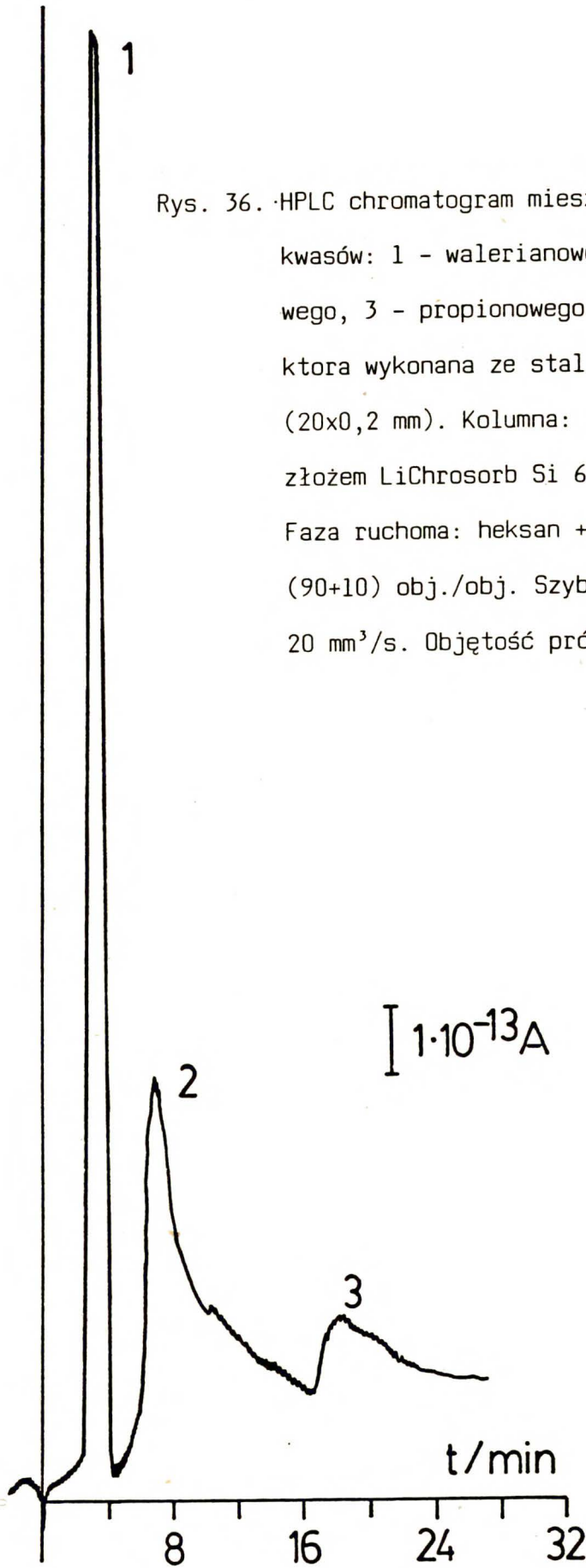
gdzie B - stała zależna od wymiarów kolumny i pola powierzchni złoża.

Równanie powyższe wyprowadzone zostało przy założeniu, że na powierzchni silikazelu adsorbują się tylko zdysocjowane cząsteczki kwasów. Kwasy karboksylowe mają niewielki moment dipolowy. W rozpuszczalnikach niepolarnych występują na ogół w postaci dimerów. Dlatego w układach polarna faza stacjonarna - niepolarny rozpuszczalnik znajdują się niemal wyłącznie w rozpuszczalniku.

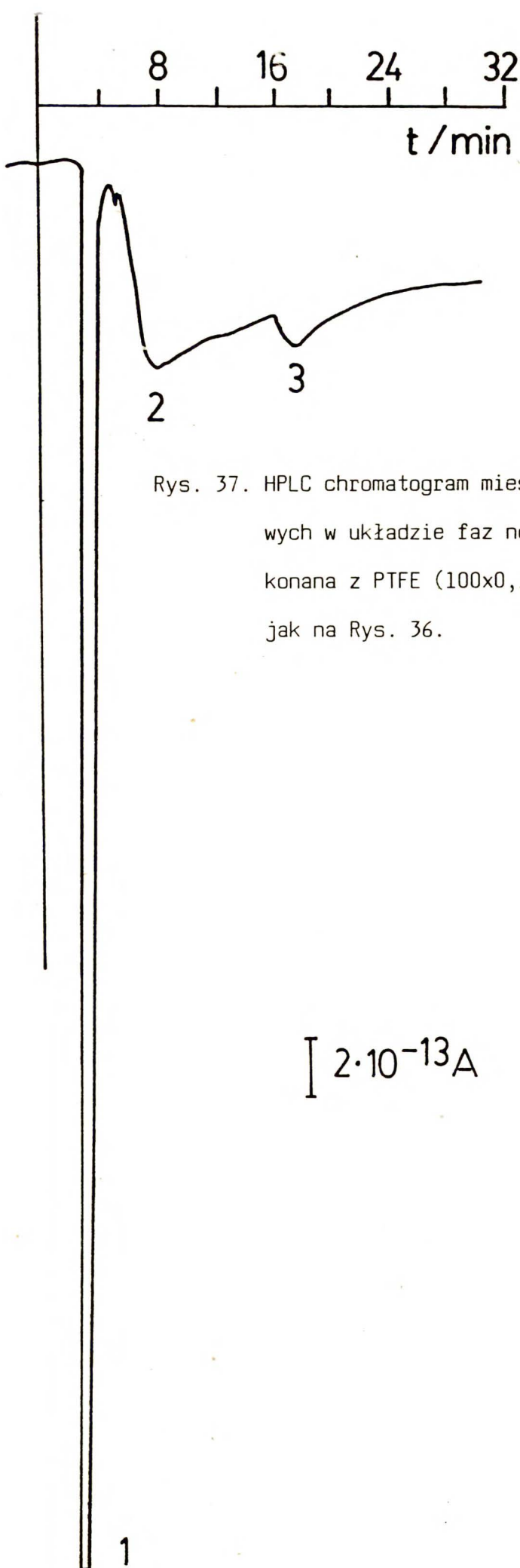
Wykrywalność detektora elektrokinetycznego w chromatografii faz normalnych była stosunkowo wysoka i dla kwasu walerianowego wynosiła 10^{-9} mola. Ponadto, jak widać to na przedstawionych rysunkach, ze wzrostem retencji kwasu jego wykrywalność jeszcze bardziej pogarsza się.

Dla kwasu propionowego wynosiła ona 10^{-7} mola. Z tego powodu w pracy poświęcono znacznie mniej uwagi chromatografii faz normalnych niż faz odwróconych.

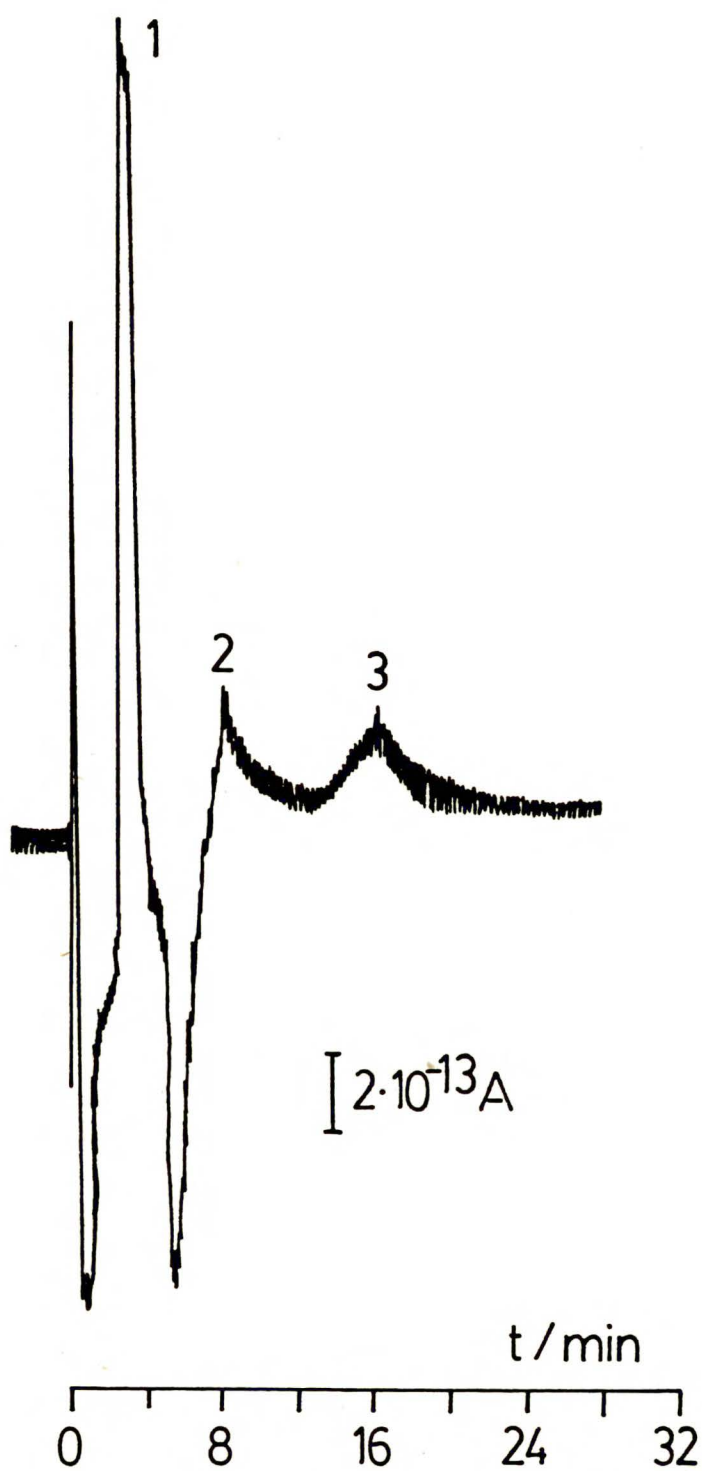
Należy przy tym zaznaczyć, że w powyższych warunkach nie można by wogóle zastosować detektora konduktometrycznego.



Rys. 36. HPLC chromatogram mieszaniny 10^{-4} M kwasów: 1 - walerianowego, 2 - masłowego, 3 - propionowego. Kapilara detektora wykonana ze stali kwasoodpornej (20x0,2 mm). Kolumna: 250x4 mm ze złożem LiChrosorb Si 60, 10 μm . Faza ruchoma: heksan + izopropanol (90+10) obj./obj. Szybkość przepływu: 20 mm^3/s . Objętość próbki: 5 μl .



Rys. 37. HPLC chromatogram mieszaniny kwasów tłuszczowych w układzie faz normalnych. Kapilara wykonana z PTFE (100x0,1 mm). Pozostałe warunki jak na Rys. 36.



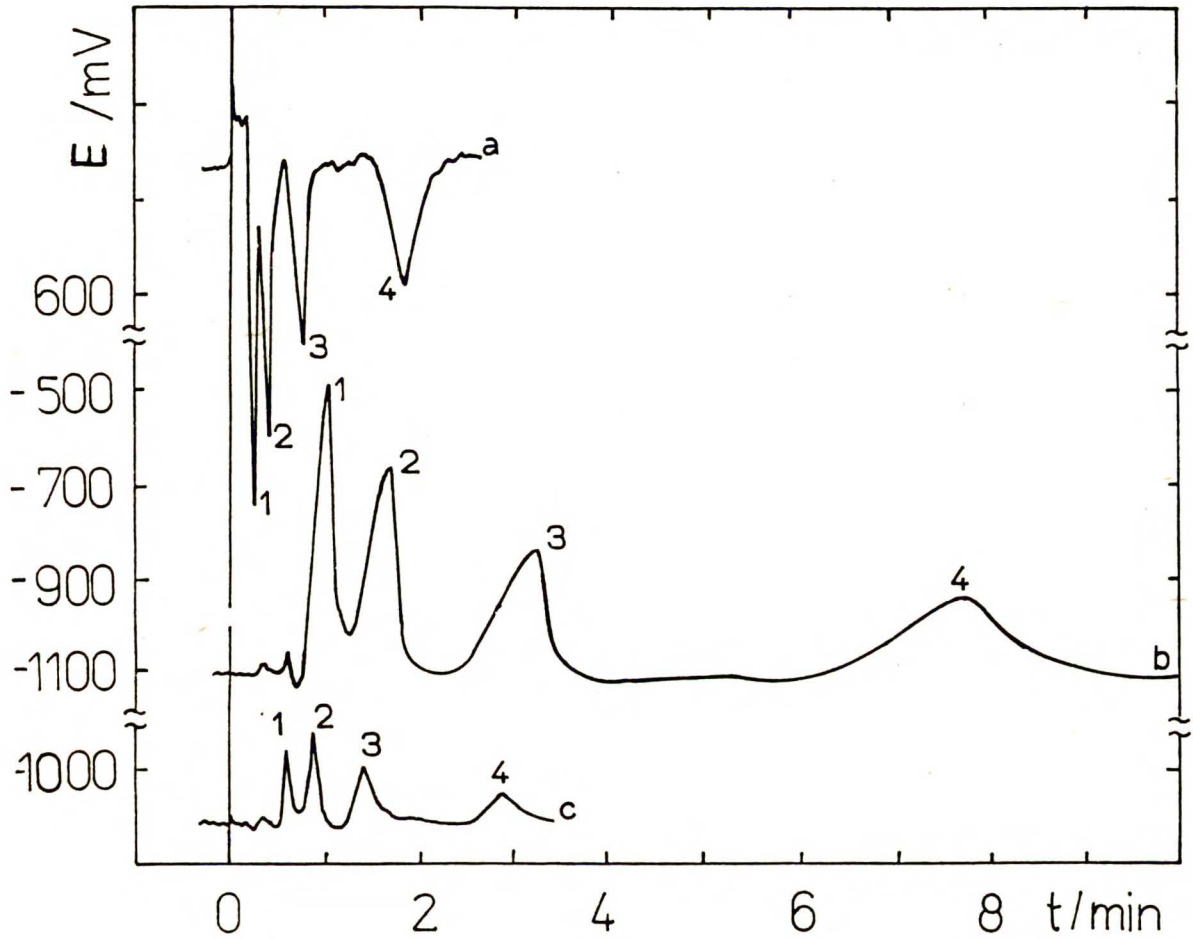
Rys. 38. HPLC chromatogram mieszaniny kwasów tłuszczowych w układzie chromatografii faz normalnych. Element pracujący detektora: kolumna chromatograficzna (250x4 mm). Pozostałe warunki jak na Rys. 36.

2. HPLC faz odwróconych.

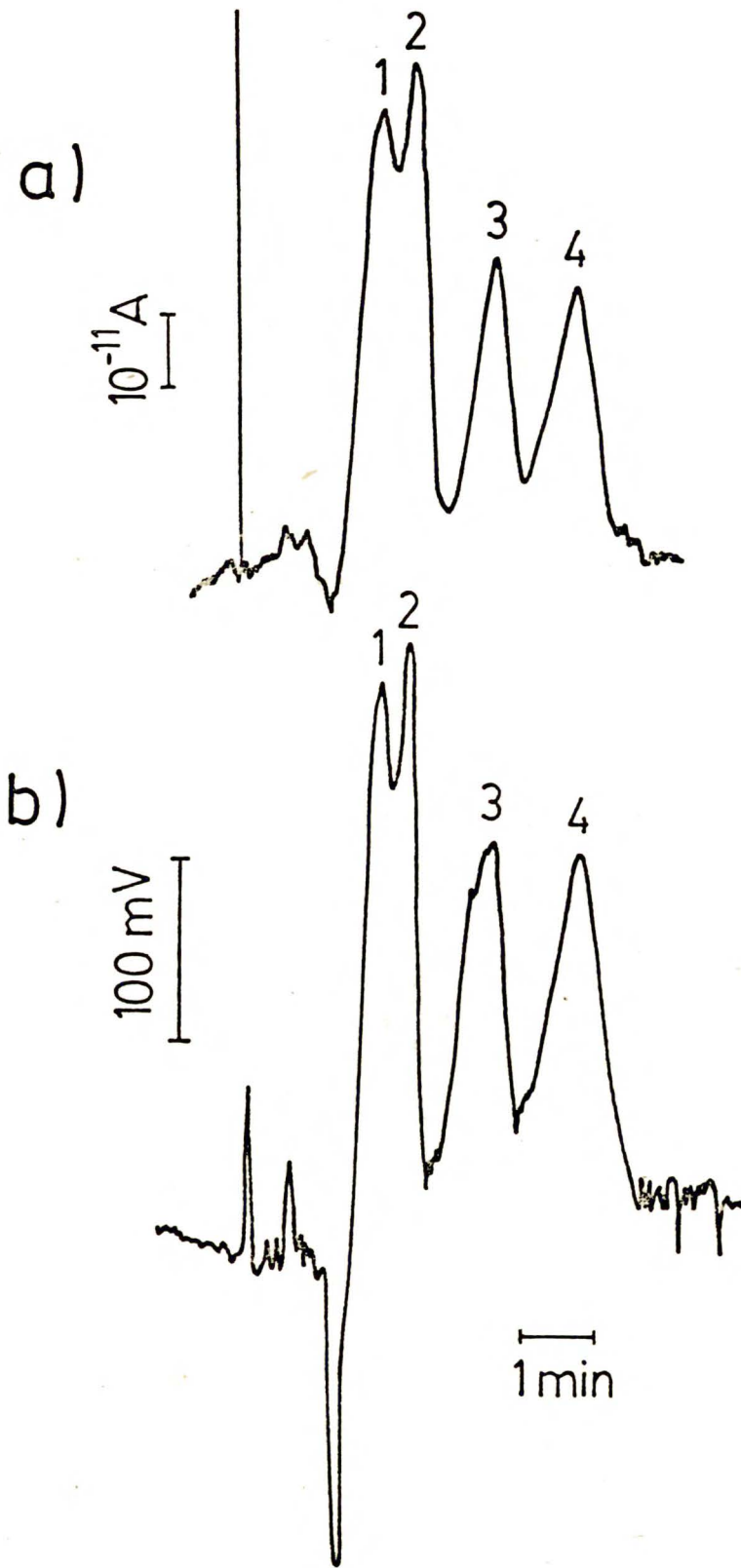
Z dotychczasowych rozważań wynika, że detektor elektrokinetyczny jest bardziej czuły w fazach będących rozpuszczalnikami polarnymi. W chromatografii rozpuszczalnik bardziej polarny niż złoże oznacza, że mamy do czynienia z układem faz odwróconych. Chromatogramy mieszaniny 10^{-4}M i 10^{-3}M roztworów kwasów: octowego, propionowego, masłowego i walerianowego w fazie $\text{MeOH}+\text{H}_2\text{O}$ (10+90) obj./obj. przedstawione zostały na Rys. 39.

Pomiary wykonywane były przy dwóch szybkościach przepływu, 20 i $70\text{ mm}^3/\text{s}$. Z Rys. 39a i 39b wynika, że ze wzrostem szybkości przepływu obserwuje się zmianę znaku potencjału przepływu fazy ruchomej oraz wychylenia pików chromatograficznych. Zagadnienie to omówione zostało w rozdziale F.I.3. Zastrzykowi próbki towarzyszy pojawienie się na chromatogramie dwóch bardzo wąskich pików (na Rys. 39 nie są one rozdzielone i widoczne są w postaci jednej linii). Piki te tworzą się w wyniku zaburzeń przepływu cieczy i odgrywają rolę markerów początku chromatogramów. Pierwszy z nich, ujemny, związany jest z chwilowym zachamowaniem przepływu cieczy, drugi, dodatni, ze wzrostem szybkości przepływu cieczy tuż po zastrzyku próbki.

Chromatogramy wyższych kwasów tłuszczowych przedstawione zostały na Rys. 40. Zostały one zarejestrowane z zastosowaniem detektora z pomiarem prądu i potencjału przepływu.



Rys. 39. HPLC chromatogramy niższych kwasów tłuszczowych: 1 - octowego, 2 - propionowego, 3 - masłowego i 4 - walerianowego. Detektor elektrokinetyczny z kapilarą wykonaną z PTFE (20x0,4 mm). Kolumna stalowa (150x4 mm) wypełniona złożem LiChrosorb RP-18, 10 μm . Faza ruchoma: MeOH + H₂O (10+90) obj./obj. Objętość próbki: 5 μl . Szybkość przepływu: a - 70 mm³/s, b i c - 20 mm³/s. Stężenia kwasów: a - 10⁻³M, b - 10⁻³M, c - 10⁻⁴M.



Rys. 40. HPLC chromatogramy wyższych kwasów tłuszczowych: 1 - laurowy, 2 - myrystynowy, 3 - stearynowy, 4 - arachidowy, o stężeniu 10^{-4} M zarejestrowane z użyciem SCD (a) i SPD (b) detektorów. Szybkość przepływu - $20 \text{ mm}^3/\text{s}$. Pozostałe warunki jak na Rys. 39.

Omówione do tej pory rozdziały uzyskane zostały z zastosowaniem czystych rozpuszczalników jako faz ruchomych. Dodatek elektrolitu do fazy ruchomej powoduje bowiem wzrost jej przewodnictwa, a w konsekwencji zmniejszenie wysokości pików i pogorszenie wykrywalności.

Na Rys. 39 zaobserwować można również, że czasy retencji analizowanych kwasów zależne były od ich stężenia. Przy czym kolejność wymywania kwasów była odwrotna niż w układzie faz normalnych. Mocniej zatrzymywane były na kolumnie kwasy o dłuższym łańcuchu. Zależność czasów retencji od stężenia kwasów wyjaśnić można gdy przyjmie się założenie, że w procesie chromatograficznym tylko niezdisocjowane cząsteczki są zatrzymywane na fazie RP. Zdisocjowane cząsteczki kwasów (aniony) występują natomiast tylko w fazie ruchomej. Zależność czasu retencji od współczynnika pojemnościowego opisuje dobrze znana zależność [194]:

$$t_R = t_0 (k' + 1) \quad (69)$$

gdzie t_0 - czas martwy kolumny, k' - współczynnik pojemnościowy.

Z kolei współczynnik pojemnościowy opisać można równaniem:

$$k' = K_D \frac{A_S}{V_0} \quad (70)$$

gdzie: K_D - współczynnik podziału, A_S - pole powierzchni fazy stacjonarnej w kolumnie.

Prawo rozcieńczeń Ostwalda [93] wyrazić można w postaci zależności:

$$\alpha = K_a / C \quad (71)$$

gdzie α - stopień dysocjacji.

Z równań (69) - (71) otrzymać można zależność:

$$k' = \frac{1 - \alpha}{\alpha} \cdot \frac{A_S}{V_0}, \quad (72)$$

a następnie:

$$t_R = \frac{L}{u} \left[1 + \frac{A_S}{V_0} \left(\frac{C}{K_a} \right)^{1/2} - 1 \right] \quad (73)$$

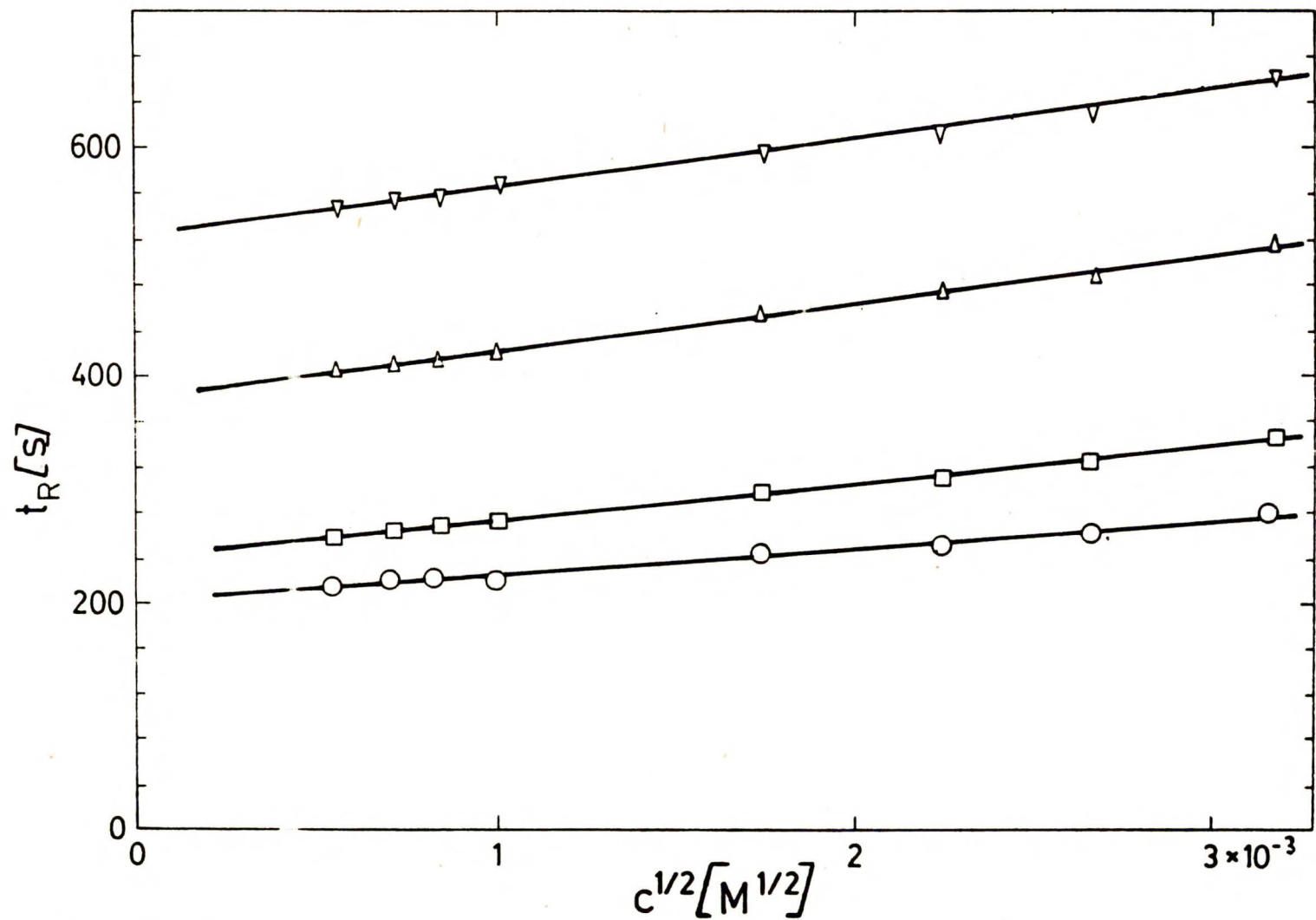
Równanie to zapisać można w przybliżonej postaci opisującej zależność t_R od C_m :

$$t_R = \text{const.}(1) + \text{const.}(2) \cdot C_m^{1/2} \quad (74)$$

Ostatnie równanie potwierdzone zostało z wyznaczoną eksperymentalnie zależnością czasów retencji kwasów tłuszczowych od pierwiastka kwadratowego ze stężenia C_m (Rys. 41).

Zależność czasów retencji od stężenia analizowanych związków jest oczywiście niekorzystna z analitycznego punktu widzenia. Zlikwidować ją można stosując buforowane fazy ruchome. Powoduje to jednakże pogorszenie wykrywalności detektora. Nie powiodły się próby zastosowania rozcieńczonych roztworów buforów fosforanowych

i cytrynowych, charakteryzujących się dużą pojemnością buforową w obszarze pKa analizowanych kwasów. Przy zbyt małym stężeniu nie likwidowały one omawianej zależności, przy zbyt dużym zbytnio pogarszały wykrywalność detektora. Dodatek rozpuszczalnika organicznego (MeOH+AcCN) do fazy ruchomej powodował szybsze wmywanie kwasów nieznacznie tylko zmniejszając omawianą zależność. Zależność tę zlikwidowano rozdzielając kwasy w układzie chromatografii par jonowych z zastosowaniem fazy ruchomej nie zawierającej buforu. Problem ten dokładniej zostanie omówiony w następnym rozdziale.



Rys. 41. Zależność czasów retencji, t_R , wyższych kwasów tłuszczowych: (o) - laurowego, (□) - myristynowego, (Δ) - stearynowego i (∇) - arachidowego, od pierwiastka kwadratowego z ich stężenia, $c_m^{1/2}$. Warunki jak na Rys. 40.

3. HPLC par jonowych.

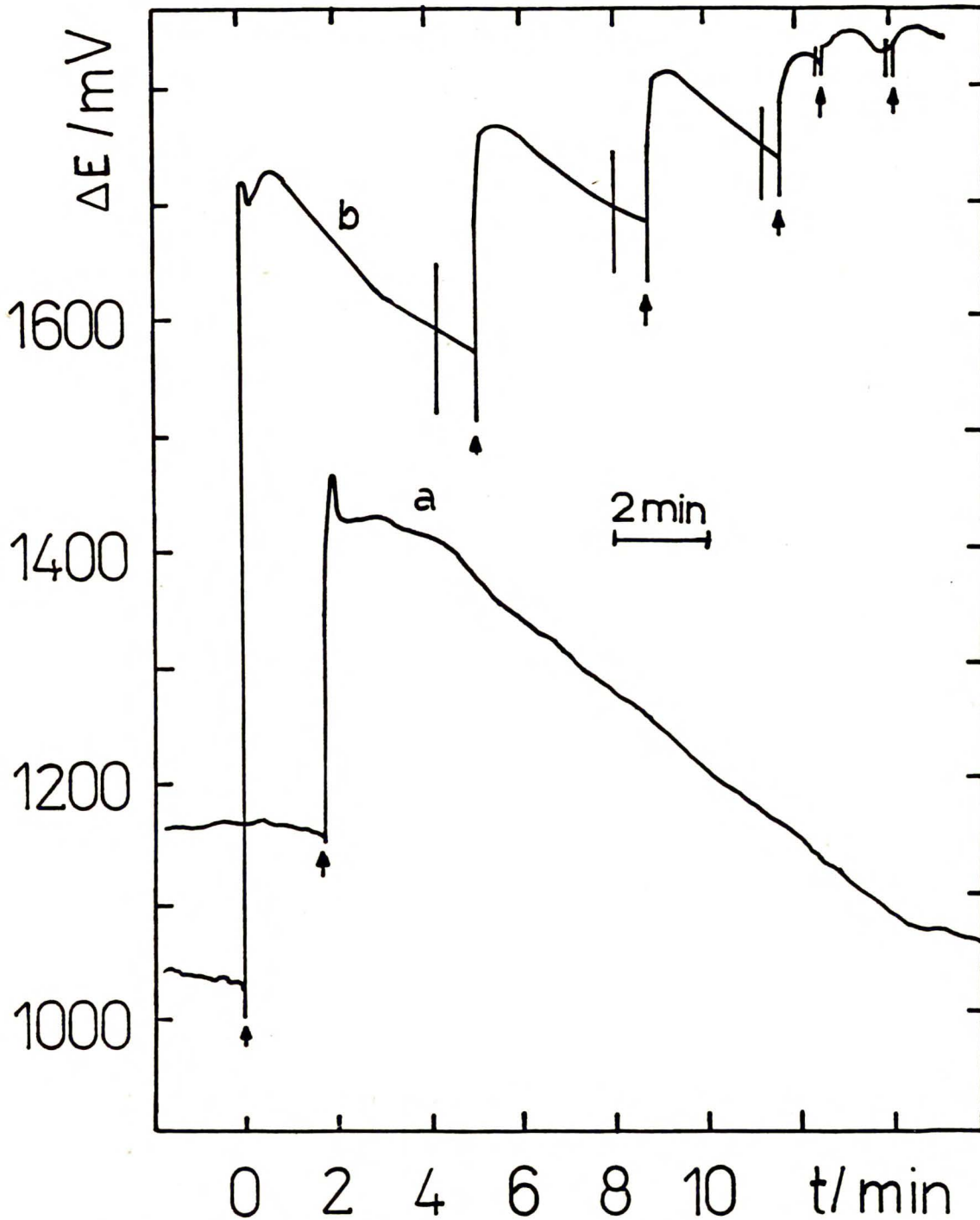
W układzie chromatografii faz odwróconych zaobserwowany został wpływ stężenia analizowanych kwasów na ich czasy retencji. Zagadnienie to zostało obszernie omówione w poprzednim rozdziale. Wpływ ten można wyeliminować poprzez rozdzielanie kwasów w układzie chromatografii par jonowych z zastosowaniem fazy ruchomej nie zawierającej buforów.

Wstępnie próbowano rozdzielić kwasy w układzie chromatografii par jonowych faz normalnych. Obecność buforu w tym przypadku nie powinna pogarszać wykrywalności detektora gdyż bufor wraz z jonami czterobutyloamoniowymi znajdował się w fazie stacjonarnej zatrzymanej na nośniku LiChrosorb Si 100, 10 μm [197, 198]. Jako fazę stacjonarną stosowano 0,6M roztwór wodorotlenku czterobutyloamoniowego w wodzie natomiast jako fazę ruchomą - izopropanol + + chlorek metylenu + heksan (20+60+20) obj./obj./obj. Mechanizm podziału polegał tu na zatrzymywaniu przez wodną fazę stacjonarną kwasów wstrzykiwanych do organicznej fazy ruchomej, a następnie na ich przechodzeniu w postaci par jonowych z jonami czterobutyloamoniowymi pochodzącymi z fazy stacjonarnej z powrotem do fazy ruchomej. Powyższe zachowanie się kwasów powodowane było tym, że czyste kwasy charakteryzują się większą rozpuszczalnością w wodzie, podczas gdy pary jonowe mogą występować w zasadzie tylko w rozpuszczalnikach organicznych. Okazało się jednakże, że pary jonowe utworzone w tym procesie adsorbują się nieodwracalnie na wewnętrznej

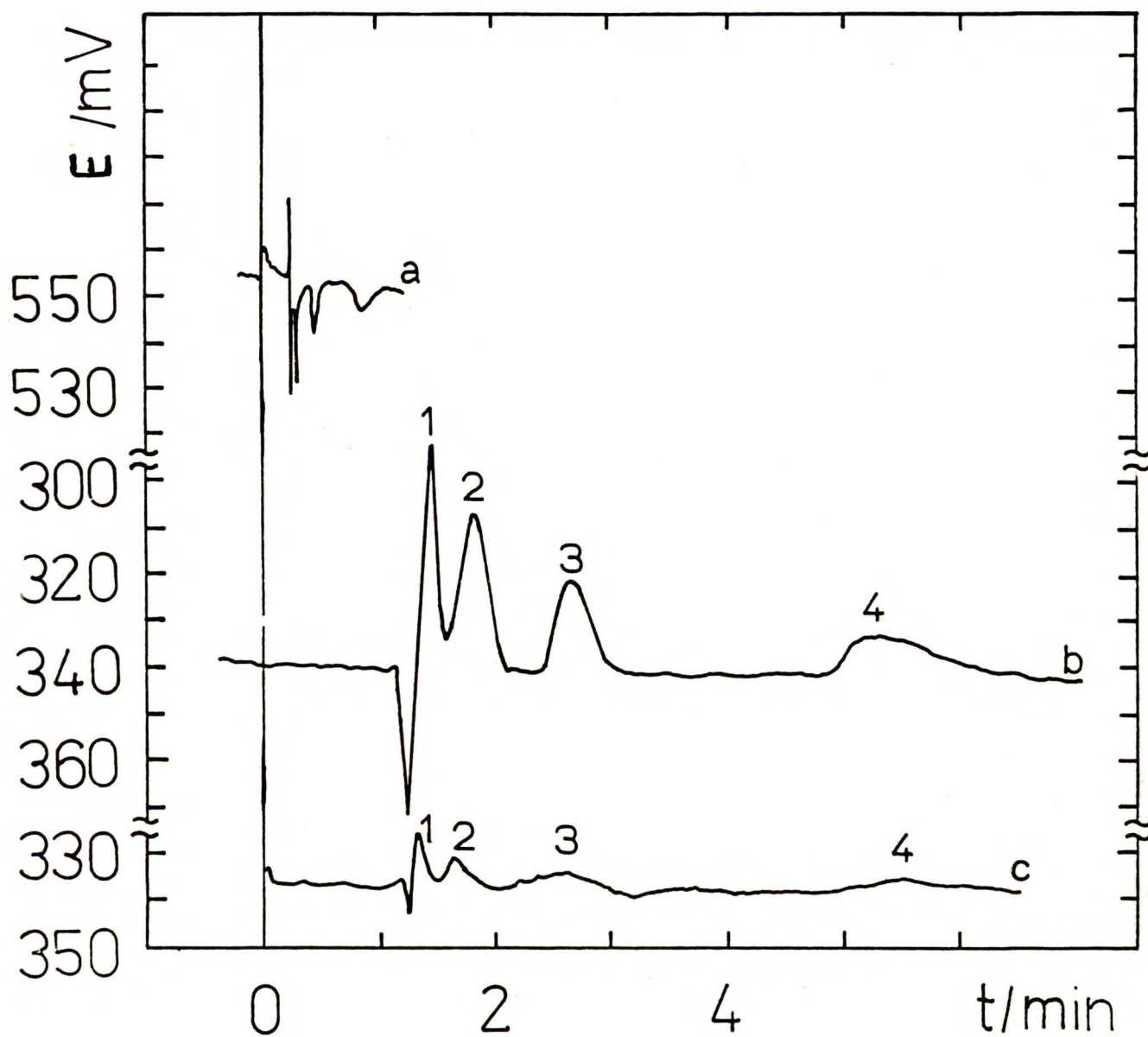
powierzchni ścianki kapilary. Zachowanie takie zobrazowane zostało na Rys. 42. Widać z niego, że po zastrzyku próbki potencjał przepływu poziomu tła odtwarza się bardzo powolnie. Wstrzyknięcie kolejnych próbek przed ustaleniem się poziomu tła prowadzi do niepowtarzalnych wyników.

Chromatogramy niższych kwasów tłuszczowych rozdzielonych w układzie par jonowych faz odwróconych przedstawione zostały na Rys. 43. Widać z niego (porównaj Rys.39), że dodatek do fazy ruchomej jonów czteroetyloamoniowych o stężeniu $10^{-4}M$ spowodował niezależność czasów retencji analizowanych kwasów od ich stężenia (Rys. 43b i c). Z porównania Rys. 39 i 43 widać ponadto, że w obu przypadkach obserwuje się zmianę znaku potencjału przepływu fazy ruchomej i wysokości pików chromatograficznych ze wzrostem szybkości przepływu. Dodatek jonów czteroalkilamoniowych do fazy ruchomej spowodował kilkunastokrotne zmniejszenie wysokości pików chromatograficznych, co oczywiście wpływało na pogorszenie wykrywalności detektora. Efekt ten spowodowany był wzrostem przewodnictwa fazy ruchomej po dodaniu do niej TEAP, a ponadto adsorpcją jonów TEA⁺ na ściance kapilary. Dlatego, aby uniknąć pogorszenia wykrywalności detektora pomiary były wykonywane z fazą ruchomą zawierającą rozcieńczony roztwór TEAP bez dodatku buforu. Chromatogramy przedstawione na Rys. 43 uzyskane były z zastosowaniem fazy ruchomej zawierającej TEAP o stężeniu $10^{-4}M$. Z przedstawionej na Rys. 44 zależności objętości retencji od stężenia analizowanych kwasów widać, że objętości te były niezależne

od stężenia w jego zakresie 10^{-5} ÷ 2×10^{-3} M. Z tym, że aż do stężenia 5×10^{-3} M zmiany te były na tyle małe, że nie powodowały zmiany sekwencji wymywania kwasów. Z rysunku tego wynika ponadto, że w tym samym zakresie stężeń objętości retencji kwasów rozdzielanych w układzie chromatografii faz odwróconych zwiększyły się około dziesięciokrotnie. Dodatek TEAP do fazy ruchomej powodował ponadto znaczne zmniejszenie objętości retencji kwasów. Z powyższych rozważań wynika, że nawet przy tak małym stężeniu TEAP w fazie ruchomej, jak 10^{-4} M i przy braku buforu objętości retencji analizowanych kwasów były niezależne od ich stężenia (Rys. 39b i c oraz 43b i c). Wpływ stężenia TEAP na wykrywalność detektora i maksymalne stężenia analizowanych kwasów, przy których nie następuje zmiana sekwencji ich wymywania przedstawiony został w Tabeli 10. Widać z niej, że wzrost tego stężenia zwiększa obie te wielkości.



Rys. 42. Zmiany potencjału przepływu po wstrzyknięciu do fazy ruchomej 5 μl 1M roztworu benzoesanu czteroalkiloamoniowego. Faza ruchoma: izopropanol + chlorek metylenu + heksan (20+60+20) obj./obj./obj. Szybkość przepływu: 10 mm^3/s .

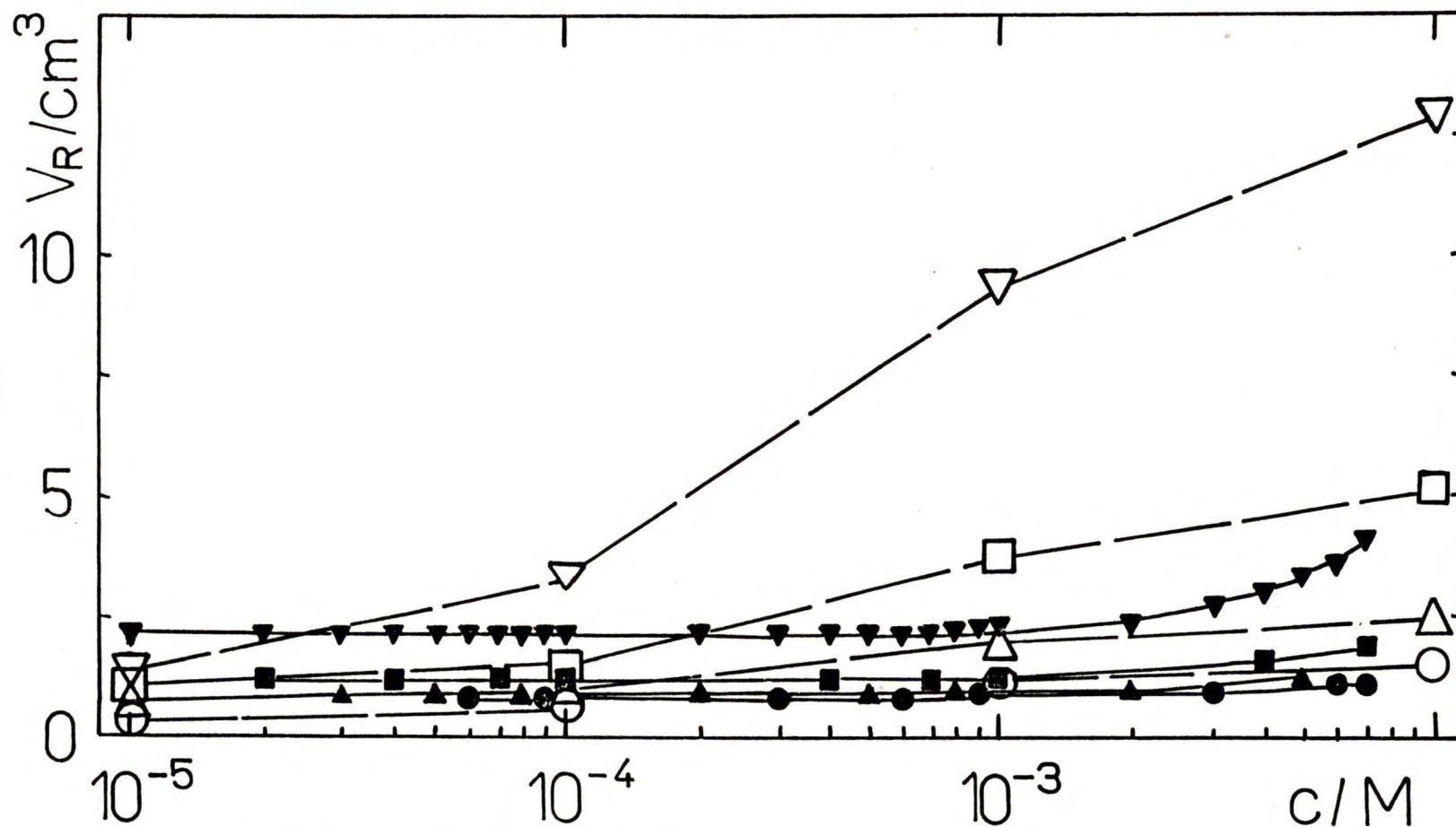


Rys. 43. HPLC chromatogramy niższych kwasów tłuszczowych.

Faza ruchoma: 10^{-4} M TEAP w MeOH + H₂O (10+90) obj./obj.

Szybkość przepływu: a - 70 mm³/s, b i c - 10 mm³/s.

Pozostałe warunki jak na Rys. 39.



Rys. 44. Zależność objętości retencji niższych kwasów tłuszczowych, (o) - octowy, (Δ) - propionowy, (\square) - masłowy i (∇) - walerianowy, rozdzielonych w układzie faz odwróconych (linia przerywana) i par jonowych (linia ciągła), od ich stężenia. Pozostałe warunki jak na Rys. 39 i 43

Tabela 10

Zależność wykrywalności detektora, D_L , i maksymalnego stężenia kwasów, przy którym zmiany ich objętości retencji są na tyle małe, że nie powodują zmiany sekwencji ich wymywania, L_S , od stężenia jonów TEA⁺ w fazie ruchomej, C_p .

C_p M	D_L M	L_S M
0	5×10^{-7}	5×10^{-5}
10^{-6}	5×10^{-7}	5×10^{-5}
10^{-5}	5×10^{-6}	5×10^{-4}
10^{-4}	5×10^{-5}	5×10^{-3}
10^{-3}	5×10^{-4}	-
10^{-2}	5×10^{-3}	-

Ponadto z tabeli tej wynika, że objętości retencji bardzo rozcieńczonych kwasów (całkowicie zdysocjowanych) również są niezależne od ich stężenia.

Tak jak w poprzednim rozdziale, pomiary były wykonywane z zastosowaniem kapilar wykonanych z PTFE, szkła i stali kwasoodpornej. Również i w tym przypadku wykrywalność detektora z kapilarą stalową była kilkanaście razy wyższa niż dla pozostałych kapilar.

4. HPLC jonowo - wykluczająca.

Z dotychczasowych rozważań i wyników okazuje się, że detektor elektrokinetyczny jest szczególnie czuły na mocne kwasy oznaczone w czystym, niebuforowanym, rozpuszczalniku polarnym charakteryzującym się wysoką przenikalnością elektryczną. Warunki takie występują często w układzie chromatografii jonowo-wykluczającej.

Technika ta stosowana była do rozdzielania związków jonowych od niejonowych, a także do analizy kwasów znacznie różniących się strukturą [199-204]. Rozdział kwasów zachodzi w niej na wymienniczu kationowym (nie jak zwykle na anionowym) o formie wodorowej. Mechanizm ich podziału polega na tworzeniu się równowagi membranowej Donnana. Aniony (ujemnie naładowane) są odpychane (wykluczane) od ujemnie naładowanego złoża. Ładunek złoża pochodzi z dysocjacji jego grup funkcyjnych, w tym przypadku - SO_3H . Cząsteczki elektrycznie obojętne (np. cząsteczki niezdysonowanych kwasów) mogą wchodzić do wewnętrznych części złoża. Dlatego należy się spodziewać zależności objętości retencji kwasów od ich wartości pK_a ($\text{pK}_a = \lg K_a$, gdzie K_a - stała dysocjacji). Tego typu zależność została istotnie znaleziona w pracy Tanaki i wsp. [202]. W rozdziale tym dokładniej przedyskutowany zostanie problem mechanizmu rozdziału kwasów w układzie chromatografii jonowo-wykluczającej. Prezentowane wyniki uzyskane zostały na złożu LiChrosorb KAT. Elementem pracującym detektora była kapilara wykonana z PTFE (100x0,2 mm). Pomiaru wykonywane były w temperaturze 22°C.

Objętości retencji 39 kwasów o stężeniu $10^{-3}M$ przedstawione zostały w Tabeli 11. Aminokwasy (No 34-39) umieszczone zostały razem na końcu tabeli gdyż charakteryzują się one podobnymi wartościami stałych dysocjacji, a stąd i objętości retencji. Mocne kwasy, całkowicie zdysocjowane, ($pK_a = -10 \div 2,5$) wymywane były wszystkie razem przy objętości retencji równej $0,80 \text{ cm}^3$. Zakładając, że są one kompletnie wymywane wartość ta równa jest objętości martwej (objętości fazy ruchomej) kolumny (Rys. 45). Objętości retencji kwasów słabszych ($pK_a = 2,5 \div 6,5$) były proporcjonalne do wartości ich pK_a . Najsłabsze kwasy ($pK_a = 6,5 \div 8,5$) były podobnie jak kwasy mocne, wymywane nierozdzielone, ale na końcu chromatogramu |190 - 206|. Zakładając całkowitą przepuszczalność złoża dla tych kwasów wewnętrzną objętość kolumny (objętość fazy stacjonarnej) obliczyć można z różnicy objętości retencji słabych i mocnych kwasów tak, jak to zostało przedstawione na Rys. 45. Innymi słowy objętość wewnętrzną kolumny oznaczana jest z granic ekskluzji i przepuszczalności kolumny. Należy przy tym zauważyć analogię tego wykresu do zależności objętości retencji od logarytmu masy cząsteczkowej oznaczanej substancji. Zależność ta obserwowana jest w chromatografii żelowo-permeacyjnej. W Tabeli 11 przedstawione zostały również wartości współczynników podziału i pojemnościowych analizowanych kwasów. Obliczone one zostały z równań:

$$K_d = \frac{V_R - V_o}{V_i}, \quad (75)$$

$$k' = \frac{V_R - V_o}{V_o} \quad (76)$$

Pierwsze z tych równań pochodzi również z chromatografii żelowej. Z Tabeli 11 widać, że wartości współczynników podziału mieszczą się w granicach od 0 do 1 dla mocnych i słabych kwasów odpowiednio. Te wartości oraz wykres z Rys. 45 potwierdzają przewagę mechanizmu ekskluzji jonów w rozdziale kwasów.

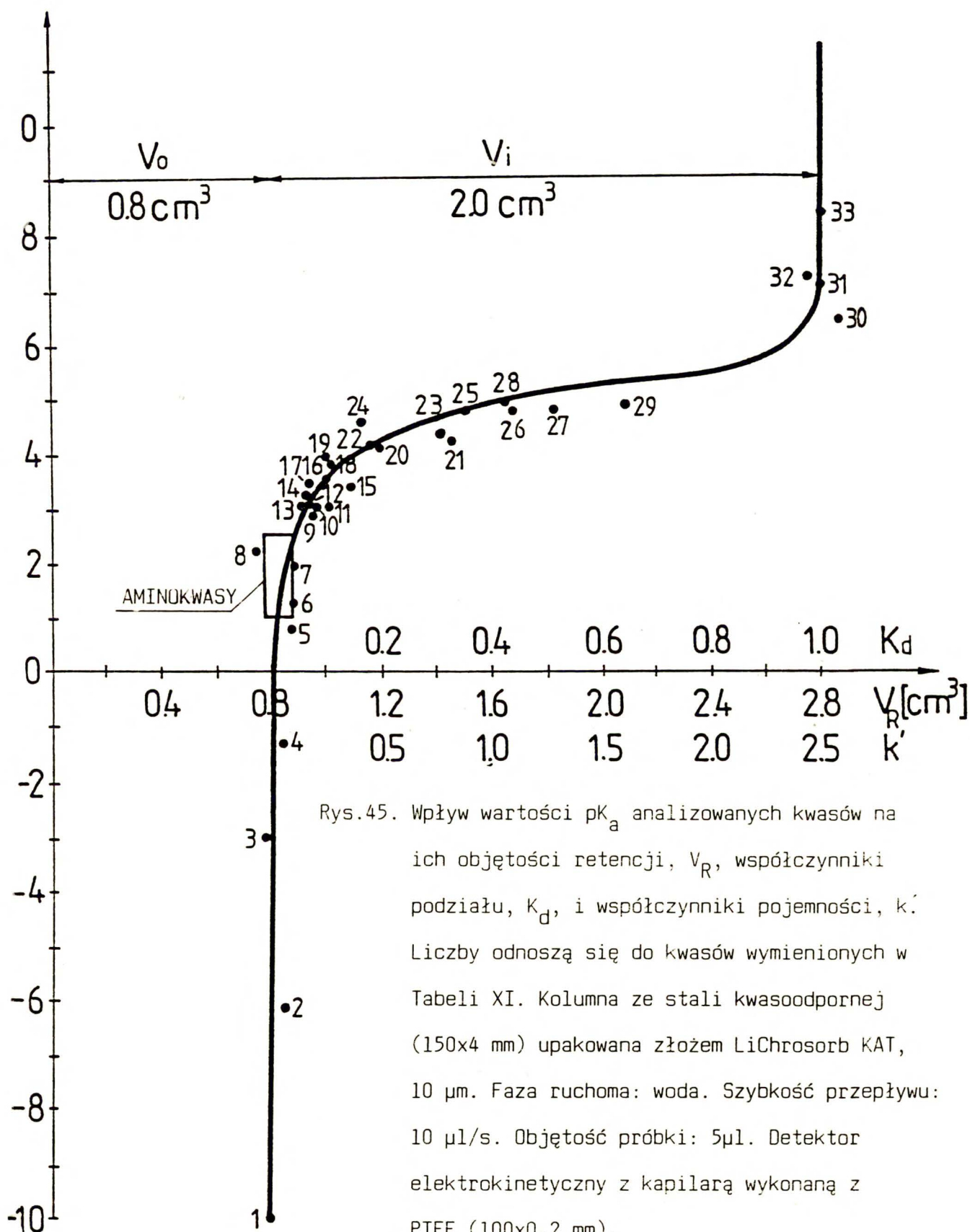
Jednakże, w ich rozdziale odgrywają również rolę inne czynniki, jak na przykład podział w układzie chromatografii faz odwróconych. Jako przykład tego można podać kwasy karboksylowe (octowy-kapronowy). Choć charakteryzują się one bardzo podobnymi wartościami pK_a to wymywają się one przy różnych objętościach retencji zgodnie ze wzrostem długości ich łańcucha (Rys. 45, Tabela 11). Innym przykładem jest podobieństwo objętości retencji kwasów salicylowego i ~~aceto~~^{yl}salicylowego (a również ftalowego i tereftalowego) mimo, że ich wartości pK_a znacznie się różnią między sobą. To podobieństwo objętości retencji spowodowane jest podobieństwem ich struktury. Objętości retencji kwasów, podobnie jak w przypadku chromatografii faz odwróconych, wzrastały ze wzrostem ich stężenia (Rys. 46).

Tabela 11

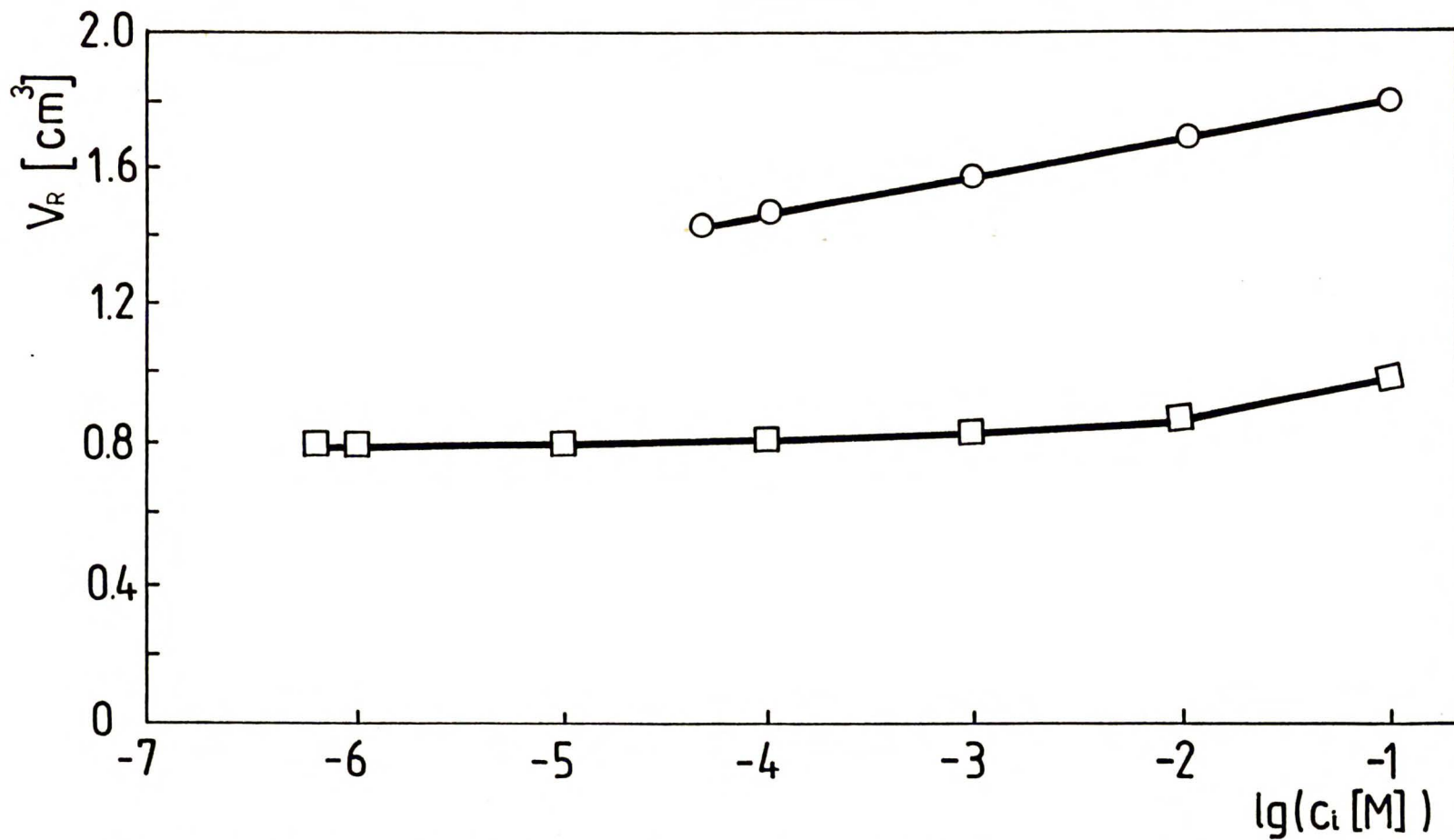
Wpływ wartości pK_a na parametry chromatograficzne (objętość retencji, współczynniki podziału i pojemności) analizowanych kwasów.

Stężenie kwasów: 10^{-3} M. Kolumna: 150x4mm. Złoże: LiChrosorb KAT. Faza ruchoma: woda. Szybkość przepływu: $10 \text{ mm}^3/\text{s}$. Temperatura: 20°C .

No	Kwas	pK_a	$V_R \text{cm}^3 $	K_d	k'
1	nadchlorowy	-10	0,80	0	0
2	chlorowodorowy	-6,1	0,84	0,02	0,05
3	siarkowy	-3,0	0,78	0	0
4	azotowy	-1,4	0,84	0,02	0,05
5	jodowy	0,80	0,87	0,03	0,09
6	szczawiowy	1,27	0,88	0,04	0,10
7	maleinowy	1,95	0,89	0,05	0,11
8	o-nitrobenzoesowy	2,17	0,76	0	0
9	chlorooctowy	2,87	0,96	0,08	0,20
10	ftalowy	2,94	0,94	0,07	0,16
11	salicylowy	3,00	1,05	0,13	0,31
12	fumarowy	3,02	0,94	0,07	0,18
13	winowy	3,03	0,92	0,06	0,15
14	cytrynowy	3,13	0,93	0,07	0,16
15	p-nitrobenzoesowy	3,44	1,10	0,15	0,38
16	m-nitrobenzoesowy	3,49	1,02	0,11	0,28
17	tereftalowy	3,54	0,96	0,07	0,18
18	mrówkowy	3,75	1,10	0,15	0,38
19	mlekowy	3,86	1,03	0,12	0,29
20	benzoesowy	4,20	1,45	0,33	0,82
21	askorbinowy	4,21	1,20	0,20	0,50
22	bursztynowy	4,21	1,17	0,19	0,46
23	metoksyfenylooctowy	4,32	1,44	0,32	0,80
24	p-aceto-salicylowy	4,57	1,14	0,17	0,43
25	octowy	4,76	1,51	0,35	0,89
26	izomasłowy	4,81	1,66	0,45	1,11
27	walerianowy	4,84	1,84	0,52	1,30
28	propionowy	4,87	1,66	0,43	1,08
29	kapronowy	4,88	2,09	0,65	1,61
30	węglowy	6,45	2,86	1,03	2,58
31	p-nitrofenol	7,10	2,80	1,00	2,50
32	o-nitrofenol	7,23	2,76	0,98	2,45
33	m-nitrofenol	8,40	2,80	1,00	2,50
34	histydyna	1,77	0,88	0,04	0,10
35	arginina	2,10	0,88	0,04	0,10
36	tyrozyna	2,20	0,81	0,01	0,01
37	walina	2,29	0,76	0	0
38	alanina	2,35	0,78	0	0
39	tryptofan	2,38	0,78	0	0



Rys.45. Wpływ wartości pK_a analizowanych kwasów na ich objętości retencji, V_R , współczynniki podziału, K_d , i współczynniki pojemności, k' . Liczby odnoszą się do kwasów wymienionych w Tabeli XI. Kolumna ze stali kwasoodpornej (150x4 mm) upakowana złożem LiChrosorb KAT, 10 μm . Faza ruchoma: woda. Szybkość przepływu: 10 $\mu\text{l/s}$. Objętość próbki: 5 μl . Detektor elektrokinetyczny z kapilarą wykonaną z PTFE (100x0.2 mm).



Rys. 46. Zależność objętości retencji kwasu octowego (o) i siarkowego (□) od ich stężenia. Pozostałe warunki jak na Rys. 43.

Aby opisać wykres przedstawiony na Rys. 45 rozważmy dowolny kwas, HR, który dysocjuje zgodnie z równaniem:



Zarówno zdysocjowane jak i niezdisocjowane formy kwasów istnieć mogą w obydwu fazach ruchomej i stacjonarnej (w dalszej części pracy będą one oznaczane odpowiednio przez M i S). Jak wspomniano poprzednio rozdział kwasów metodą chromatografii jonowo-wykluczającej rządzonej jest mechanizmem równowagi membranowej Donnana. Załóżmy, że woda we wnętrzu złoza znajduje się jakby po drugiej stronie hipotetycznej membrany. Przy czym pod względem fizykochemicznym nie różni się ona od wody znajdującej się na zewnątrz ziarna złoza.

W stanie równowagi termodynamicznej potencjały chemiczne kwasu po obu stronach membrany muszą być sobie równe. W przypadku rozcieńczonych kwasów, gdy aktywności mogą być zastąpione stężeniami, powyższy warunek przyjmuje postać:

$$|\text{H}^+|_M |\text{R}^-|_M |\text{HR}|_M = |\text{H}^+|_S |\text{R}^-|_S |\text{HR}|_S \quad (78)$$

W obu fazach równowagę reakcji (77) opisuje stała dysocjacji kwasu:

$$K_a = \frac{|\text{H}^+|_M |\text{R}^-|_M}{|\text{HR}|_M} = \frac{|\text{H}^+|_S |\text{R}^-|_S}{|\text{HR}|_S} \quad (79)$$

Warunki elektroneutralności obu faz wyrazić można następująco:

$$|H^+|_M = |R^-|_M \quad (80)$$

$$C_f = |H^+|_S - |R^-|_S \quad (81)$$

gdzie C_f - stężenie zdysocjowanych grup funkcyjnych fazy stacjonarnej.

Całkowita ilość kwasu we wstrzykniętej próbce jest dana przez iloczyn stężenia i objętości wstrzykiwanej próbki, $C_i V_i$, i jest równa sumie stężeń zdysocjowanych i niezdysocjowanych form kwasu w obu fazach (stacjonarnej i ruchomej) pomnożonych przez objętość pików, V_p :

$$C_i V_i = V_p (|R^-|_M + |HR|_M + |R^-|_S + |HR|_S) \quad (82)$$

V_p opisane jest równaniem:

$$V_p = \frac{(2 \pi)^{1/2} V_R}{N^{1/2}} \quad (83)$$

Podstawiając równanie (83) do (82) otrzymuje się, zgodnie z (4) :

$$C_m = |R^-|_M + |HR|_M + |R^-|_S + |HR|_S \quad (84)$$

W tym przypadku obie formy kwasu mogą być zatrzymywane przez złożę. Stąd współczynnik podziału przyjmuje postać:

$$K_d = \frac{|R^-|_S + |HR|_S}{|R^-|_M + |HR|_M} \quad (85)$$

Po podstawieniu równań (79) i (84) do równania (85) otrzymuje się:

$$K_d = \frac{C_m |R^-|_M - |R^-|_M^2 / K_a}{|R^-|_M + |R^-|_M^2 / K_a} \quad (86)$$

W powyższym równaniu $|R^-|_M$ jest nieznaną. Wyznaczyć ją można z rozwiązania równania czwartego stopnia wyprowadzonego z równań (79) - (84). Gdy:

$$C_m \ll C_f \quad \text{ i } \quad K_a \ll C_f \quad (87)$$

wówczas omawiane równanie stopnia czwartego redukuje się do równania kwadratowego. Stąd $|R^-|_M$ łatwo otrzymać z rozwiązania tego równania kwadratowego. Po podstawieniu $|R^-|_M$ do równania (86) otrzymuje się:

$$K_d = \frac{4 C_m + K_a - \sqrt{K_a^2 + 8 K_a C_m}}{4 C_m - K_a + \sqrt{K_a^2 + 8 K_a C_m}} = \frac{2 C_m + K_a - \sqrt{K_a^2 + 8 K_a C_m}}{2 C_m - 2 K_a} \quad (88)$$

Ostatnie równanie opisuje zależność współczynnika podziału od stężenia i stałej dysocjacji analizowanych kwasów. Wówczas objętość retencji obliczyć można z równania (75). Warto w tym miejscu zauważyć, że zgodnie z równaniem (88), współczynnik podziału nie zależy od stężenia grup funkcyjnych złoza. Oczywiście spełniony musi być warunek (87). Równanie (88) przekształcone może być następnie do postaci:

$$\begin{aligned}
 K_d &= \frac{4 \frac{C_m}{K_a} + 1 - \sqrt{1 + 8 \frac{C_m}{K_a}}}{4 \frac{C_m}{K_a} - 1 + \sqrt{1 + 8 \frac{C_m}{K_a}}} = \\
 &= \frac{1 + 2 \frac{C_m}{K_a} - \sqrt{1 + 8 \frac{C_m}{K_a}}}{2 \frac{C_m}{K_a} - 2} \quad (89)
 \end{aligned}$$

z której wynika, że K_d (stąd i V_R) zależne jest tylko od jednej wielkości eksperymentalnej, ilorazu C/K_a . Obliczone z równań (75) i (89), dla założonego ilorazu C_m/K_a , wartości K_d i V_R zestawione zostały w Tabeli 12. Zależność ta w postaci wykresu przedstawiona została na Rys. 47 (linia ciągła). Stężenia C_m i stosunek C_m/K_a analizowanych kwasów zestawione zostały w Tabeli 13. Zostały one również przedstawione na Rys. 47 (punkty). Z tabel 12 i 13 oraz Rys. 47 widać dobrą zgodność eksperymentalnie uzyskanych i obliczonych z równania (89) wartości współczynnika podziału i objętości retencji.

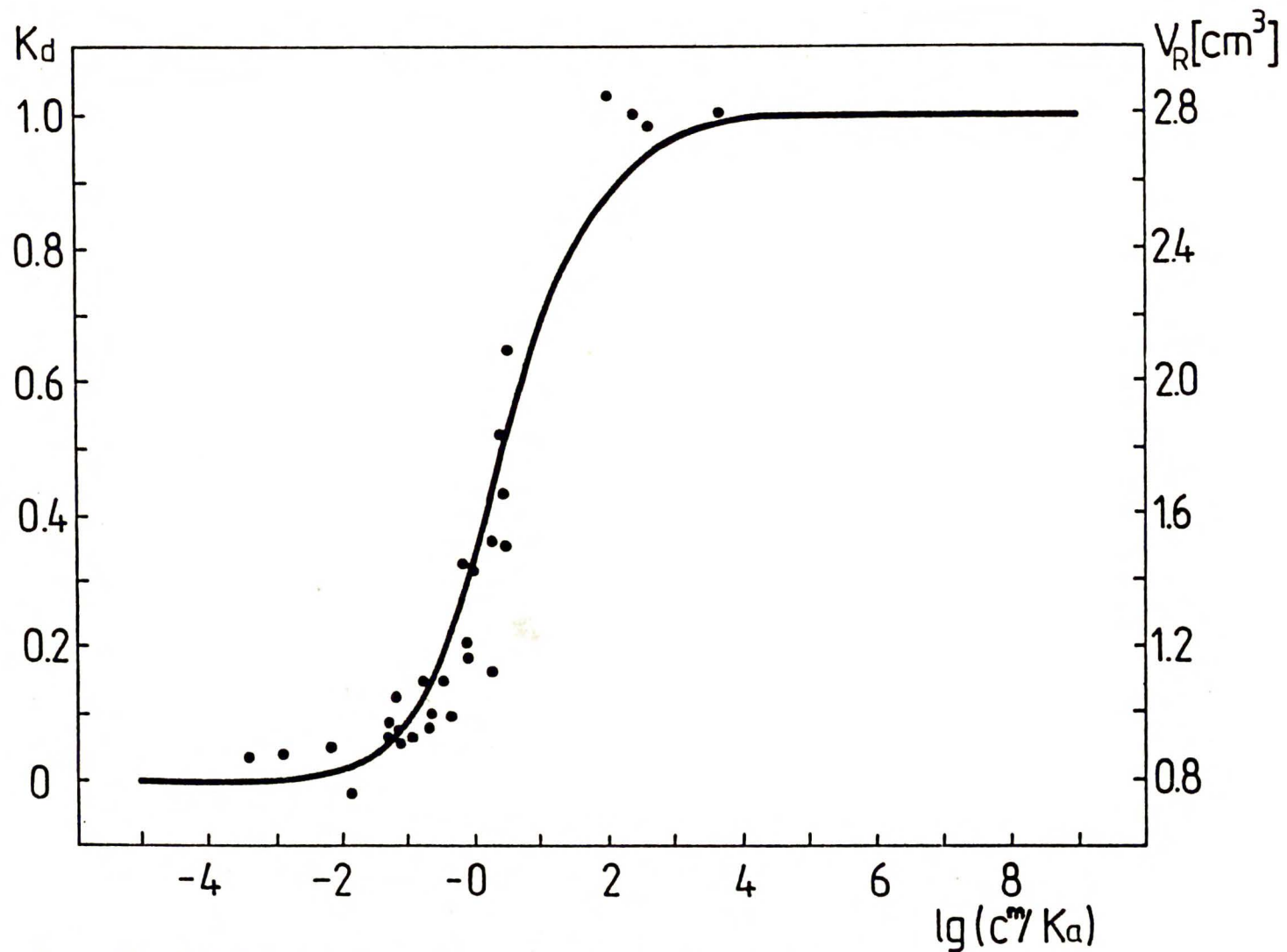
Z Rys. 45 odczytać można, że w danych warunkach na kolumnie mogą być podzielone kwasy, których wartości pK_a mieszczą się w zakresie 2,5 do 6,5. Na Rys. 48-50 przedstawione zostały trzy przykładowe grupy takich kwasów: (1) - nitrobenzoesowe, (2) - dwukarboksylowe i (3) - podstawione benzoesowe. Jako przykład praktycznego zastosowania na Rys. 51 pokazana została możliwość oznaczania kwasu benzoesowego w musztardzie. Kwas ten dodawany jest jako środek konserwujący do wielu produktów przemysłu spożywczego. Na omawianym rysunku

przedstawiony jest jego rozdział od innych związków jonowych (niejonowe nie są monitorowane przez detektor elektrokinetyczny) zawartych w musztardzie (2,56g w 25 cm³ H₂O). Metoda ta jest szczególnie atrakcyjna, gdyż można ją zastosować do bezpośredniej analizy wodnego ekstraktu musztardy, bez potrzeby jego dalszego przygotowania.

Tabela 12

Współczynniki podziału, K_D , i objętości retencji, V_R , obliczone z równania (88) dla założonego ilorazu C_m/K_a (stężenie próbki w maksimum pików do stałej dysocjacji kwasu).

C_m/K_a	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
K_D	10^{-4}	$9,97 \times 10^{-4}$	$9,71 \times 10^{-3}$	$7,87 \times 10^{-2}$	0,333	0,667	0,870	0,960	0,986	0,996
V_R	0,800	0,802	0,819	0,957	1,467	2,133	2,544	2,714	2,772	2,791

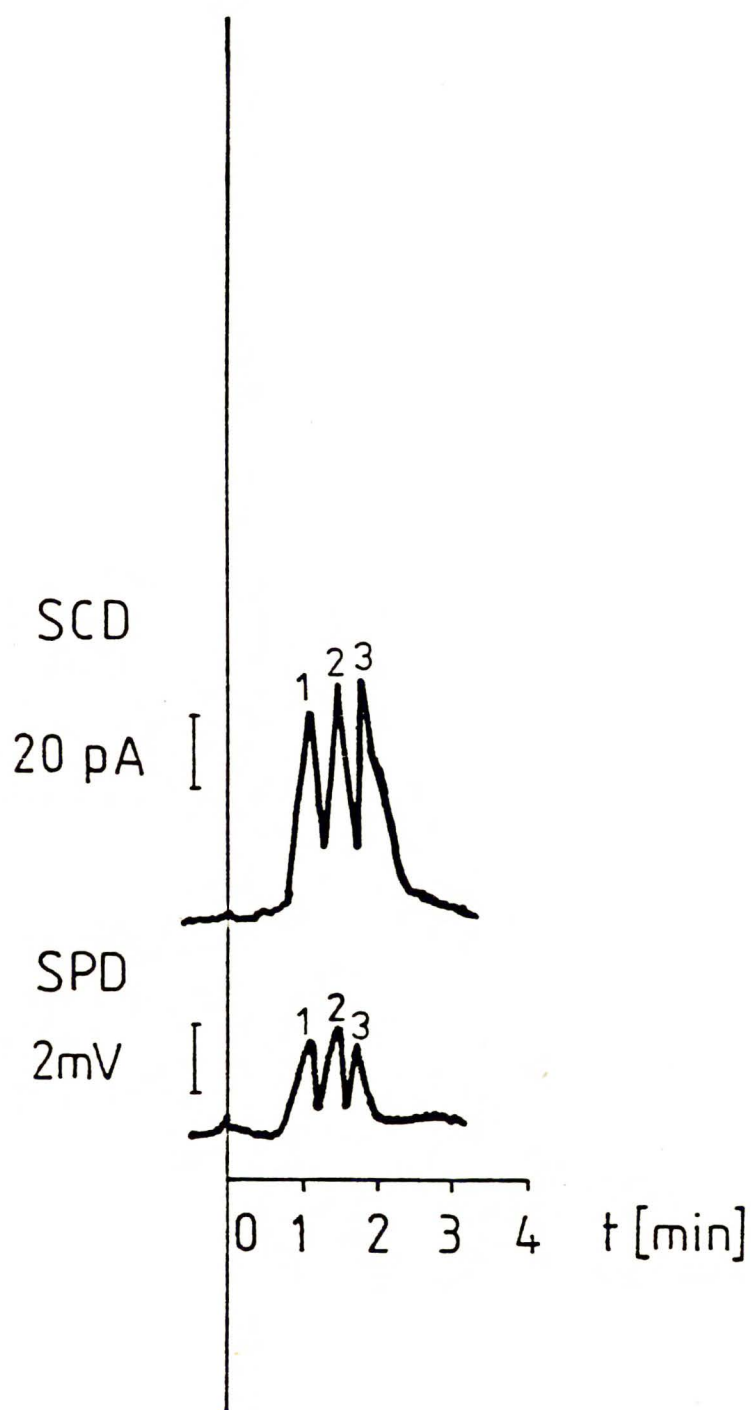


Rys. 47. Wartości współczynnika podziału, K_d , i objętości retencji, V_R , w funkcji ilorazu stężenia próbki w maksimum piku do stałej dysocjacji kwasu, c^m/K_a . Porównanie eksperymentalnie otrzymanych wartości K_d i V_R (punkty) z obliczonymi z równania (83) (linia).

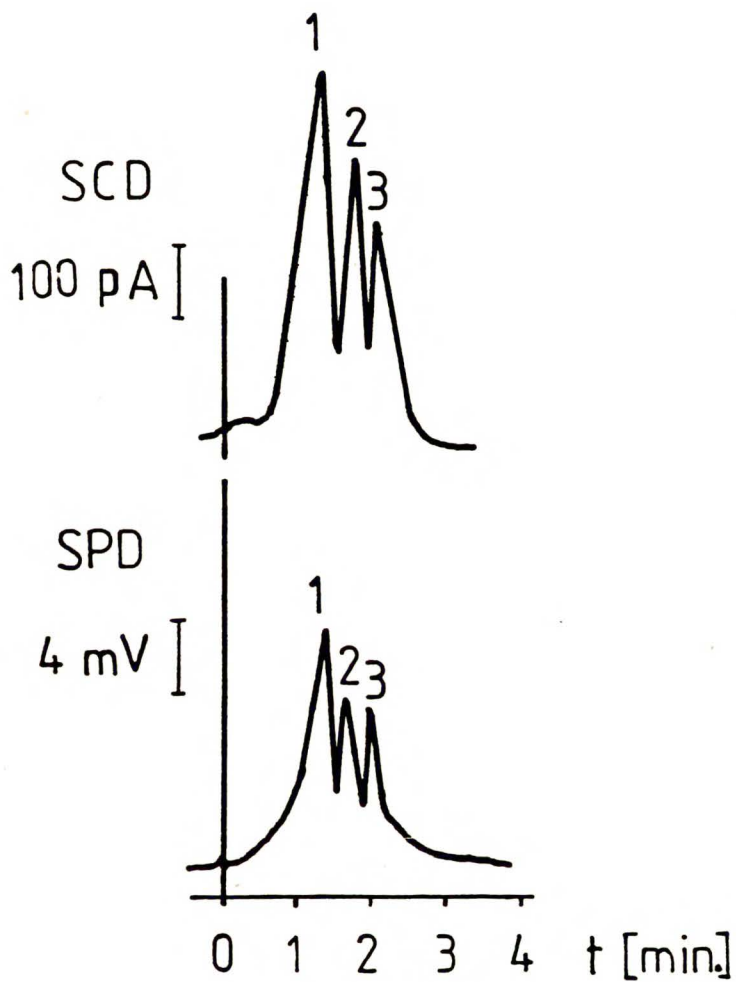
Tabela 13

Stężenia analizowanych kwasów w maksimum pików, C_m , i wartości ilorazu C_m/K_a . Liczby odpowiadają kwasom wymienionym w Tabeli 11.

No	$C_m/M \times 10^{-5}$	C_m/K_a
1	7,48	$7,48 \times 10^{-15}$
2	7,12	$5,66 \times 10^{-10}$
3	7,67	$7,67 \times 10^{-8}$
4	7,12	$2,84 \times 10^{-6}$
5	6,88	$4,34 \times 10^{-4}$
6	6,80	$1,27 \times 10^{-3}$
7	6,72	$5,99 \times 10^{-3}$
8	7,87	$1,17 \times 10^{-2}$
9	6,23	$4,62 \times 10^{-2}$
10	6,37	$5,55 \times 10^{-2}$
11	5,70	$5,70 \times 10^{-2}$
12	6,37	$6,67 \times 10^{-2}$
13	6,51	$6,97 \times 10^{-2}$
14	6,44	$8,68 \times 10^{-2}$
15	5,44	$1,50 \times 10^{-1}$
16	5,87	$1,81 \times 10^{-1}$
17	6,23	$2,16 \times 10^{-1}$
18	5,44	$3,06 \times 10^{-1}$
19	5,81	$4,21 \times 10^{-1}$
20	4,13	$6,54 \times 10^{-1}$
21	4,97	$8,09 \times 10^{-1}$
22	5,12	$8,30 \times 10^{-1}$
23	4,16	$8,49 \times 10^{-1}$
24	5,25	1,95
25	3,96	2,28
26	3,61	2,33
27	3,25	2,25
28	3,61	2,67
29	2,86	2,17
30	2,86	$2,07 \times 10$
31	2,14	$2,69 \times 10^2$
32	2,17	$3,68 \times 10^2$
33	2,14	$5,37 \times 10^3$



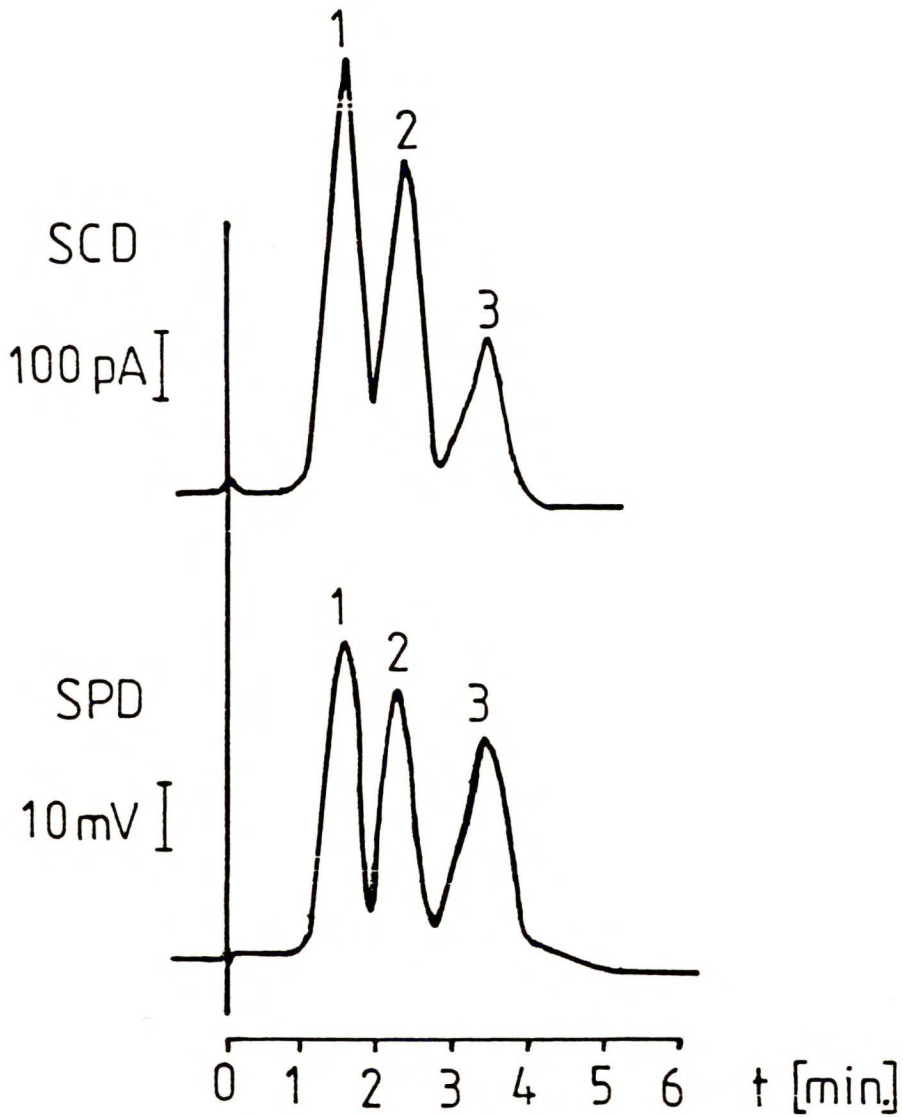
Rys. 48. Rozdział 10^{-3} M o - (1), m - (2) i p - (3) nitrobenzoesowych kwasów. Detektory: SPD - z pomiarem potencjału przepływu, SCD - z pomiarem prądu przepływu. Pozostałe warunki jak na Rys. 43.



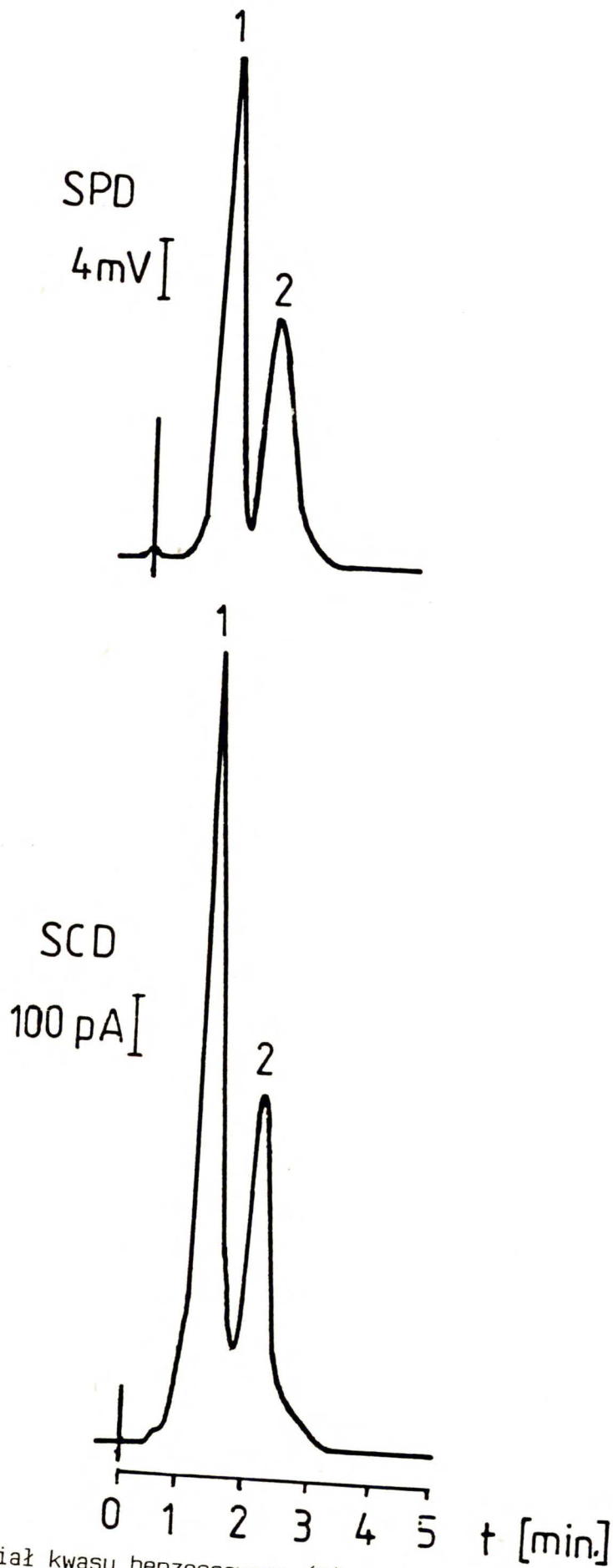
Rys. 49. Rozdział 10^{-3}M kwasów dwukarboksylowych:

1 - szczawiowy, 2 - bursztynowy i 3 -

winowy. Pozostałe warunki jak na Rys. 43.



Rys. 50. Rozdział 10^{-3} M kwasów: 1 - p-aminobenzoesowego,
2 - benzoesowego i 3 - p-metylobenzoesowego.
Pozostałe warunki jak na Rys. 43.



Rys. 51. Rozdział kwasu benzoowego (2) od innych jonowych składników musztardy (1). Warunki rozdzielania jak na Rys. 43.

G. PODSUMOWANIE.

W trakcie badań wstępnych nad detektorem elektrokinetycznym okazało się, że nadaje się on szczególnie do analizy roztworów elektrolitów w cieczach polarnych. Jako modelowe związki do testowania detektora wybrane zostały kwasy karboksylowe. Ich oznaczanie jest ważne w wielu dziedzinach nauki i praktyki. Chociaż opracowano już wiele metod ich chromatograficznego rozdzielania, to jednak ich detekcja, szczególnie niższych kwasów tłuszczowych, przedstawia nadal poważny problem. W pracy wykazano możliwość zastosowania detektora elektrokinetycznego do analizy tych kwasów w różnych systemach rozdzielczych HPLC. Chodziło w tym przypadku o pokazanie możliwości zastosowania tej detekcji w układach rozdzielczych różniących się znacznie składem i własnościami fazy ruchomej. Ponadto w pracy pokazano, że możliwe jest dobranie takiego składu fazy ruchomej, aby umożliwić z jednej strony dobre rozdzielanie chromatograficzne, z drugiej zaś dobrą wykrywalność detektora. Problem ten jest bardzo ważny w przypadku detekcji elektrokinetycznej, gdyż z reguły fazy ruchome dające dobre rozdzielanie uniemożliwiają tego typu detekcję (np. buforowane fazy ruchome). Dlatego też w takim przypadku należy dokonywać pewnych optymalnych wyborów.

Oznaczanie kwasów karboksylowych ma bardzo duże znaczenie w przemyśle spożywczym i w technologii żywności. Jako środki smakowe i zapachowe występują one w winie, a także w mleku, owocach i warzywach oraz ich przetworach.

Ponadto są one świadectwem występowania pleśni lub bakterii gnilnych w tych produktach. Są więc one doskonałym wskaźnikiem jakości produktu. Analiza ich znajduje również zastosowanie w przemyśle fermentacyjnym do oznaczania stopnia zabrudzenia bakteriami półproduktów i powierzchni aparatury produkcyjnej. W mikrobiologii pomiary stężenia niższych kwasów tłuszczowych stanowią przypuszczalny test na infekcję bakteriami beztlenowymi. Oznaczanie ich w moczu, krwi i naczyniach limfatycznych pozwala na śledzenie dróg metabolizmu węglowodanów, aminokwasów i tłuszczów ssaków. Ich stężenie mówi również o występowaniu niektórych chorób, np. kamieni nerkowych. Kwas sorbinowy i benzoesowy używane są jako środki konserwujące w wielu produktach spożywczych. Oznaczanie ich stężenia przeprowadza się w celu sprawdzenia, czy występują one w minimalnej ilości i w dopuszczalnym limicie stężenia. Kwasy tłuszczowe o małej masie odgrywają również znaczną rolę w wielu metodach oznaczania stopnia czystości wody. Ich obecność w wodzie jest bardzo istotna. Oczyszczanie z nich wody jest bardzo kosztowne. Ich obecność zwiększa natomiast rozpuszczalność niepolarnych zanieczyszczeń. Mają one znaczenie biologiczne bądź jako pożywka z węglem, bądź jako związki trujące. Występują w znacznych ilościach w wodzie po przeróbce węgla.

Kwasy karboksylowe oznaczają metodą chromatografii cienkowarstwowej [217] i gazowej [218]. Techniki te nie dają jednak zadowalających wyników. Pierwsza z nich nie daje wyników ilościowych. Druga wiąże się

z kłopotliwą derywatyzacją próbek, a stosowana w niej wysoka temperatura często prowadzi do dekompozycji i izomeryzacji oznaczanych związków.

Kwasy karboksylowe oznaczane były również w różnych systemach rozdzielczych chromatografii cieczowej. Do najważniejszych z nich, a jednocześnie stosowanych w tej pracy, zalicza się:

- Chromatografię w układzie faz normalnych. W tym przypadku możemy mieć do czynienia z adsorpcyjnym lub podziałowym mechanizmem rozdziału. Fazą stacjonarną jest w tej technice na ogół silikażel. W przypadku adsorpcji faza ruchoma nie powinna zawierać nawet śladowych ilości rozpuszczalników polarnych ponieważ one same bardzo dobrze adsorbują się na silikażelu. Aby otrzymać powtarzalne rozdziały, do fazy ruchomej dodaje się kilka procent rozpuszczalnika polarnego. Mechanizm rozdziału jest jednak wówczas mieszany, podziałowo-adsorpcyjny [209, 210]. Ze względu na trudności operacyjne technika podziałowa jest obecnie rzadko stosowana [199, 211]. W pracy przedstawiono możliwość oznaczeń kwasów w układzie chromatografii faz normalnych. Wykrywalność detektora elektrokinetycznego w tym przypadku była jednak bardzo słaba (3×10^{-10} mola dla kwasu walerianowego).
- Podział w układzie faz odwróconych. W tym przypadku faza ruchoma jest bardziej polarna niż faza stacjonarna. Niezdysocjowane kwasy są na niej silniej zatrzymywane niż zdysocjowane. Z tego względu, w celu

zmniejszenia stopnia dysocjacji kwasów, do fazy ruchomej dodaje się buforu [61, 161, 192, 212-216].

Retencją można również sterować zmieniając stężenie soli (wpływ na napięcie powierzchniowe) lub rozpuszczalnika organicznego (wpływ na rozpuszczalność kwasów) w fazie ruchomej. Obecność jonów (buforu) w fazie ruchomej likwidowała efekt elektrokinetyczny.

Dlatego w pracy stosowano czyste rozpuszczalniki polarne. Powodowało to zależność czasów retencji analizowanych kwasów od ich stężenia (równania (74)) oraz frontalne rozmycie pików chromatograficznych. Efekty te zlikwidowano analizując kwasy w układzie chromatografii par jonowych.

- Chromatografię par jonowych. Metoda ta wprowadzona została przez Schilla i wsp. [217, 218]. Rozdziału próbki dokonuje się w niej w pięciu systemach: chromatografii podziałowej lub adsorpcyjnej par jonowych w układzie faz normalnych lub odwróconych oraz chromatografii jono-wymiennej. Ponadto "jony parujące" mogą się znajdować w fazie ruchomej bądź stacjonarnej. Wykorzystuje się w niej fakt, że pary jonowe charakteryzują się małym ładunkiem i polarnością i mogą występować w postaci trwałej tylko w rozpuszczalnikach organicznych. Na czasy retencji analizowanych kwasów ma wpływ rodzaj i stężenie "jonów parujących", pH eluentu, stężenie i rodzaj buforu oraz stężenie rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej [197, 198, 217-220]. W pracy stosowano rozcieńczone roztwory TEAP bez buforu. Powodowało to nieznaczne tylko pogorszenie

wykrywalności detektora elektrokinetycznego likwidując jednocześnie zależność czasów retencji kwasów od ich stężenia i frontalne rozmycie piku chromatograficznego.

Chromatografię jonową. Termin ten został wprowadzony przez Smalla [221]. Oznaczał on początkowo rozdział anionów nieorganicznych na anionicie, usunięciu z fazy ruchomej buforu za pomocą kolumny z kationitem (ang. stripper lub suppressor column), a następnie ich konduktometryczną detekcją. Obecnie technika chromatografii jonowej nie różni się specjalnie od innych technik HPLC [221-230]. Rozdzielanie związków dokonuje się w niej w układzie chromatografii jono-wymiennej, jono-wykluczającej i par jonowych. W przypadku wymiany jonowej rozdział anionów przeprowadza się na żywicach jono-wymiennych - anionitach [199,200, 231-238]. W tym przypadku konieczne jest stosowanie buforowanych faz ruchomych. W pracy rozdziału kwasów dokonano techniką wykluczania jonów. W technice tej, jako złoża chromatograficzne stosuje się kationity [201-204, 239-244]. Można w niej stosować czyste polarne rozpuszczalniki jako fazy ruchome, co jest bardzo korzystne z punktu widzenia detekcji elektrokinetycznej. Mechanizm podziału kwasów między fazą ruchomą i stacjonarną oparty jest w tym przypadku na równowadze membranowej Donnana [202,203]. Niezdysocjowane kwasy adsorbują się na złożu. Natomiast aniony zdysocjowanych reszt kwasowych są odpychane od ujemnie naładowanego złoża. W wyniku tego kwasy eluują zgodnie ze wzrostem ^{ich} wartości

pK_a . W pracy wyprowadzono równanie opisujące tego typu efekty.

Detekcja aromatycznych kwasów karboksylowych nie przedstawia obecnie żadnego problemu. Najczęściej do ich oznaczeń stosuje detektor pomiaru absorpcji światła w zakresie ultrafioletowym, 250-280 nm [119,200]. Znacznie trudniejsza jest detekcja kwasów alifatycznych.

Do oznaczeń kwasów alifatycznych również można stosować detektor pomiaru absorpcji światła w ultrafiolecie. Wykorzystuje się tu zakres 205-220 nm [209,216,233,245,246]. Praca z takim detektorem nastrocza jednak znaczne trudności techniczne. Wprawdzie niektóre kwasy można analizować przy tych długościach fal światła, jednakże pojawia się wówczas problem występowania znacznych zakłóceń poziomu odniesienia. Zakłócenia te spowodowane są absorpcją zanieczyszczeń lub też niektórych rozpuszczalników lub buforów. Poniżej 210 nm nie można stosować wielu buforów. Przykładowo, przy długości fali 206 nm bufor fosforanowy charakteryzuje się dwudziestokrotnie, natomiast metanol trzykrotnie, większą absorpcją niż przy długości fali 214 nm. Zastosowanie ich w fazie ruchomej prowadzi do powstania dużych szumów i niemożności wyregulowania linii odniesienia. Już jednoprocetowa zmiana absorpcji światła przez bufor zawarty w fazie ruchomej, spowodowana fluktuacją temperatury lub oddziaływaniem eluentu z kolumną oznacza dryft lub pik pozorny o wysokości często większej od wysokości normalnego pik chromatograficznego.

W chromatografii jonowej wykorzystuje się często pośrednią detekcję absorpcji światła w ultrafiolecie. Polega ona na pomiarze obniżenia absorpcji (ujemne piki) eluatu przez nieabsorbującą próbkę [237,238].

Do analizy kwasów karboksylowych stosuje się również czasami detektor refraktometryczny [238]. Jest on jednakże mało czuły, ponadto jest bardzo wrażliwy na niewielkie nawet zmiany temperatury.

Detektory elektrochemiczne (amperometryczne, kulometryczne) nadają się tylko do specjalnych przypadków [202,213,221,247]. Najczęściej znajdują one zastosowanie do oznaczania kwasów mających znaczenie biologiczne [235,248].

Detektor konduktometryczny wykorzystuje się na ogół w chromatografii jonowej [212,221,249]. Obecność elektrolitu w eluacie pogarsza znacznie wykrywalność detektora. Z tego powodu tuż przed detektorem instaluje się specjalną kolumnę likwidującą przewodnictwo fazy ruchomej [201]. Stosować można również specjalne złoża chromatograficzne zbudowane na bazie polistyrenu-dwuwinylbenzenu. Złoża te charakteryzują się małą pojemnością dlatego też można wówczas stosować bufony o małym stężeniu. Przy czym wystarczające jest zastosować tu, charakteryzujące się szczególnie małym przewodnictwem, rozcieńczone roztwory kwasów aromatycznych [243]. Odpowiedź detektora konduktometrycznego maleje ze wzrostem liczby atomów węgla w łańcuchu analizowanego kwasu (zmniejsza się ruchliwość jego anionu). Kwasy wielokarboksylowe są mocniej solwatowane przez rozpu-

szczalnik przez co ich wykrywalność jest gorsza. Dla dużych stężeń odpowiedź detektora jest nieliniowa ze względu na zmiany aktywności jonów [61,212,214,246]. Detektor wymaga termostatowania (przewodnictwo roztworu zmienia się o 2% przy zmianie temperatury o jeden stopień Celsjusza) [246].

Kwasy karboksylowe oznaczano również potencjometrycznie przy zastosowaniu elektrody srebrnej lub miedzianej [221,225,250]. Detektory tego typu nie znalazły jednak do chwili obecnej szerszego zastosowania analitycznego.

Terabe i wsp. zastosowali detektor elektrokinetyczny z pomiarem prądu przepływu do analizy kwasów tłuszczowych [161] i żółciowych [162]. Zaobserwowali oni bardzo silną zależność poziomu linii podstawowej od szybkości przepływu fazy ruchomej. Zmiana szybkości przepływu o $0,1 \text{ cm}^3/\text{min}$ powoduje powstanie piku pozornego o wysokości często większej od wysokości pików chromatograficznych.

Alifatyczne kwasy karboksylowe analizować można również przeprowadzając najpierw ich derywatyzację, a następnie ich oznaczanie za pomocą detektora fotometrycznego lub fluorometrycznego [251-253]. Wiąże się to oczywiście z pewnym dodatkowym nakładem pracy związanym z przeprowadzeniem odpowiedniej reakcji. Reakcję taką można jednak często przeprowadzić przy zastosowaniu automatycznego dozownika próbki. Z tego powodu technika ta, szczególnie w połączeniu ze spektroskopią masową będzie się z pewnością w przyszłości rozwijała [220,253,

254|. Podobną techniką jest wprowadzenie do fazy ruchomej związku reagującego z analizowanymi kwasami. Fotometrycznie oznacza się wówczas zmniejszenie stężenia substratu, lub zwiększenie stężenia produktu reakcji |200|.

W pracy starano się możliwie najdokładniej scharakteryzować detektor elektrokinetyczny. Okazało się, że łączy on w sobie własności detektora dielektrycznego z konduktometrycznym, tzn. reaguje na zmiany przewodnictwa i przenikalności elektrycznej przepływającego przezeń roztworu.

Najogólniej detektor elektrokinetyczny można scharakteryzować następująco:

1. reagujący na sumaryczne zmiany wielkości fizycznej przepływającego przez niego eluatu, tzn. mierzy on różnicę potencjału lub prądu przepływu próbki i fazy ruchomej,
2. czuły na stężenia - reaguje na zmianę stężenia (nie masę) oznaczanej próbki,
3. liniowy - odpowiedź jego ^{jest} liniowo zależna od stężenia próbki,
4. uniwersalny - nadaje się do detekcji wszystkich związków jonowych,
5. niedestrukcyjny - nie niszczący próbki,

Ponadto jest on prosty w konstrukcji, tani, łatwy w wykonaniu, obsłudze i utrzymaniu. Charakterystyka detektora dla kwasu siarkowego, modelowego związku do przetestowania jego własności, przedstawiona została w Tabeli 14.

Tabela 14

Charakterystyka detektora elektrokinetycznego.

1. średnica wewnętrzna kapilary	$d=0,3 \text{ mm}$
2. długość kapilary	$l=20 \text{ mm}$
3. objętość detektora	$V_d=1,4 \text{ mm}^3$
4. wykrywalność	$D_L=1,5 \times 10^{-12} \text{ mola}$
5. zakres dynamiki odpowiedzi	$D_R=8 \text{ rzędów wielk.}$
6. liniowy zakres dynamiki (SCD)	$L_D=5 \text{ rzędów wielk.}$
7. indeks odpowiedzi	$r=0,5-1$
8. czułość	$k=3 \times 10^8 \text{ V/mol};$ 21 A/mol
9. poziom szumu	$N_L=10^{-4} \text{ V}; 10^{-14} \text{ A}$
10. czas relaksacji	$\tau=0,2 \text{ s}$
11. temperaturowa zależność odpowiedzi (10-30°C)	$T_D=0,5\%/^{\circ}\text{C}$

Porównanie charakterystyki detektora elektrokinetycznego z innymi detektorami powszechnie stosowanymi w HPLC [4,6-8,14-19,24,37,38,42,44,47] przedstawione zostało w Tabeli 15. Wynika z niej, że ED porównywalny jest z innymi detektorami chromatograficznymi. Jego ograniczenia są podobne do ograniczeń innych detektorów reagujących na sumaryczne zmiany wielkości fizycznych przepływającego przez nie eluatu. Detektor ten jest szczególnie czuły w stosunku do związków jonowych oznaczanych z zastosowaniem fazy ruchomej będącej czystym rozpuszczalnikiem polarnym. Znaleźć on może zastosowanie do detekcji organicznych i nieorganicznych kwasów,

jonów metali alkalicznych i ziem alkalicznych amin, analizy wody itp. W Tabeli 16 przedstawione zostały wykrywalności różnych związków w różnych fazach ruchomych uzyskane z zastosowaniem detektora elektrokinetycznego. Wyniki w niej prezentowane pochodzą z pomiarów własnych przedstawionych w tej pracy, jak również z innych prac dostępnych w literaturze. Widać z nich, że wykrywalność detektora zależy od własności analizowanej próbki, składu fazy ruchomej i materiału kapilary.

Tabela 15

Porównanie charakterystyki detektorów stosowanych w HPLC.

Detektor	Jednostka		Liniiowy zakres dynamiki (rzędy wielkości)	Liniiowość L-liniowy, I-całkowy, D-różniczkowy	Typ detektora C-czuły na stężenie, M-masa	Wykrywalność [mol/l]	Zależność od szybkości przepływu	Zależność od temperatury	Objętość detektora [μl]	Możliwość zastąpienia gradientu elucji	Selektywność S-specyficzny, U-universalny	Poziom szumu (w jednostkach sygnału)	Destrukcyjność D-destrukcyjny, N-niedestrukcyjny	Typ detektora czuły na: B-przeływający eluat, S-rozpuszczoną próbkę
SPD	V	4	L	C	10^{-11}	+	0,5%/°C	0,01	-	U	2×10^{-4}	N	B	
SCD	A	5	L	C	10^{-11}	+	0,5%/°C	0,01	-	U	2×10^{-14}	N	B	
UV	AU	6	L	C	10^{-13}	-	nie zal.	0,5	+	U	2×10^{-4}	N	S	
RI	RIU	4	L	C	10^{-11}	+	10^{-4} °C	3,0	-	U	5×10^{-8}	N	B	
Polarograficzny	A	5	L	C	10^{-12}	+	1,5%/°C	1,0	-	S	10^{-9}	N	S	
Amperometryczny	A	5	L	C	10^{-12}	+	1,5%/°C	0,5	-	S	10^{-9}	N	S	
Kulometryczny	C	5	I	C	10^{-13}	-	-	10	+	S	10^{-10}	D	S	
Konduktometryczny	S	5	L	C	10^{-12}	-	2,0%/°C	0,01	-	U	10^{-8}	N	B	
Dielektryczny	F	5	L	C	10^{-12}	+	-	0,5	-	U	10^{-7}	N	B	
Potencjometryczny	V	5	L	C	10^{-11}	+	-	1,0	-	S	10^{-3}	N	S	
Absorpcyjny	°C	2	D	C	10^{-11}	+	5×10^{-5} °C	8,0	-	U	-	N	B	
Fluorometryczny	AU	6	L	C	10^{-13}	-	-	1,0	+	U	-	N	S	
Jonizacji płomieniowej	A	5	L	M	10^{-12}	-	-	1,0	+	U	-	D	S	

Tabela 16

Wykrywalność, D_L , detektora elektrokinetycznego w różnych systemach rozdzielczych.

Próbka (kwas)	Faza ruchoma *	D_L mol	Detektor Elektrokinetyczny **	Literatura
KCl	H ₂ O	$3,3 \times 10^{-11}$	SPD/G	150
pikrynowy	MeOH+H ₂ O (40+60)	$2,5 \times 10^{-11}$	SCD/G	161
kapronowy	MeOH+H ₂ O (50+50)	$5,0 \times 10^{-11}$	SCD/G	161
p-nitrofenol	MeOH+H ₂ O (60+40)	$3,6 \times 10^{-9}$	SCD/G	161
pirydyna	MeOH+H ₂ O (80+20)	$6,3 \times 10^{-9}$	SCD/G	161
m-nitrofenol	MeOH+H ₂ O (60+40)	$5,8 \times 10^{-8}$	SCD/G	161
fenol	MeOH+H ₂ O (80+20)	$2,7 \times 10^{-6}$	SCD/G	161
etanol	heptan+izopropanol(95+5)	$4,4 \times 10^{-8}$	SCD/G	152
propionowy	MeOH+H ₂ O (10+90)	$5,0 \times 10^{-12}$	SPD/PTFE	173
propionowy	MeOH+H ₂ O (10+90)	$5,0 \times 10^{-10}$	SPD/SS	173
laurowy	MeOH	$1,0 \times 10^{-10}$	SPD/PTFE	177
laurowy	MeOH	$2,5 \times 10^{-9}$	SCD/PTFE	177
octowy	MeOH+H ₂ O (10+90)	$2,5 \times 10^{-12}$	SPD/PTFE	178
octowy	-/- +10 ⁻⁶ M TEAP	$2,5 \times 10^{-12}$	SPD/PTFE	178
octowy	-/- +10 ⁻⁵ M TEAP	$2,5 \times 10^{-11}$	SPD/PTFE	178
octowy	-/- +10 ⁻⁴ M TEAP	$2,5 \times 10^{-10}$	SPD/PTFE	178
octowy	-/- +10 ⁻³ M TEAP	$2,5 \times 10^{-9}$	SPD/PTFE	178
octowy	-/- +10 ⁻² M TEAP	$2,5 \times 10^{-8}$	SPD/PTFE	178
walerianowy	heksan+izopropanol	$3,0 \times 10^{-10}$	SCD/PTFE	174
walerianowy	heksan+izopropanol	$1,0 \times 10^{-9}$	SCD/SS	174
walerianowy	heksan+izopropanol	$4,0 \times 10^{-9}$	SCD/CC	174
siarkowy	H ₂ O	$1,5 \times 10^{-12}$	SPD/PTFE	179
mrówkowy	H ₂ O	$1,0 \times 10^{-10}$	SPD/PTFE	179
octowy	H ₂ O	$2,5 \times 10^{-10}$	SPD/PTFE	179
propionowy	H ₂ O	$4,0 \times 10^{-10}$	SPD/PTFE	179
węglowy	H ₂ O	$5,0 \times 10^{-9}$	SPD/PTFE	179
p-nitrofenol	H ₂ O	$5,0 \times 10^{-9}$	SPD/PTFE	179
glukoza	H ₂ O	$1,0 \times 10^{-7}$	SPD/PTFE	179
zółciowy	H ₂ O+MeOH+ACN (62+18+20)	$5,2 \times 10^{-11}$	SCD/G	162
zółciowy	-/- +0,1 M (NH ₄) ₂ CO ₃	$2,8 \times 10^{-10}$	SCD/G	162
zółciowy	-/- +1,0 M (NH ₄) ₂ CO ₃	$1,3 \times 10^{-9}$	SCD/G	162
zółciowy	-/- +4,0 M (NH ₄) ₂ CO ₃	$1,3 \times 10^{-8}$	SCD/G	162

Tabela 16, ciąg dalszy

* MeOH - metanol

ACN - acetonitryl

TEAP - nadchloran czteroetyloamoniowy

** Detektory elektrokinetyczne:

SPD - z pomiarem potencjału przepływu

SCD - z pomiarem prądu przepływu.

Element pracujący detektora (materiał kapilary):

PTFE - policzterofluoroetylen

G - szkło borokrzemowe

SS - stal kwasoodporna

CC - kolumna chromatograficzna.

H. WNIOSKI KOŃCOWE.

W pracy przedstawiono konstrukcję detektora elektrokinetycznego z pomiarem potencjału lub prądu przepływu i elementem pracującym będącym pojedynczą kapilarą wykonaną z PTFE, szkła lub stali kwasoodpornej. Jako modelowe związki do testowania detektora wybrano kwasy tłuszczowe, które trudne są do oznaczeń za pomocą innych detektorów. Przedstawiono możliwość zastosowania detektora do ich analizy w różnych systemach rozdzielczych wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Okazało się, że jego zakres zastosowań pokrywa zakresy detektora konduktometrycznego i dielektrycznego, a jego własności są porównywalne z własnościami innych detektorów stosowanych w HPLC.

Mechanizm działania detektora polega na rejestracji zmian potencjału lub prądu przepływu przy przepływie przez niego analizowanej próbki. W przypadku pomiaru potencjału przepływu największy wpływ na jego zmianę ma zmiana przewodnictwa eluatu. Próbką dąży więc do likwidacji potencjału przepływu tła (fazy ruchomej). Z powyższego wynika, że detektor powinien się charakteryzować dobrą wykrywalnością szczególnie w stosunku do związków dobrze zjonizowanych. Wykrywalność pozostałych związków powinna zwiększać się ze wzrostem ich wartości pK_a . Tego typu zależność istotnie została zaobserwowana. Z drugiej strony wyższe piki chromatograficzne, a więc niższą wykrywalność uzyskuje się w przypadku zastosowania faz ruchomych charakteryzujących

się dużą wartością potencjału przepływu. Uzyskuje się to stosując jako eluaty, czyste rozpuszczalniki (nie zawierające związków jonowych np. buforów) charakteryzujące się małym przewodnictwem właściwym. Inna metoda polega na zastosowaniu dużych szybkości przepływu. Stanowi to oczywiście pewne ograniczenie stosowalności detektora. Inne ograniczenie polega na pogarszaniu wykrywalności detektora przez związki powierzchniowo-aktywne, adsorbujące się na wewnętrznej powierzchni ścianki kapilary. Do związków takich zaliczyć można np. sole czteroalkiloamoniowe. W pracy wykazano jednakże, że w małym stężeniu sole czteroalkiloamoniowe pogarszają wprawdzie nieco wykrywalność detektora ale nie uniemożliwiają z nim pracy. Ze względu na własności fazy ruchomej ^{najbardziej}korzystne warunki dla tego typu detekcji występują w HPLC jnowo-wykluczającej i faz odwróconych z fazą ruchomą będącym czystym rozpuszczalnikiem. W układzie chromatografii faz normalnych detektor charakteryzuje się gorszą wykrywalnością gdyż stopień dysocjacji kwasów w cieczach dielektrycznych jest dużo mniejszy niż w polarnych. Lepszą wykrywalność uzyskuje się dla kapilar wykonanych z dielektryka niż metalu.

W pracy opracowano również warunki chromatograficznego rozdziału kwasów karboksylowych w różnych systemach rozdzielczych HPLC. Składy faz ruchomych dobrano tak, aby uzyskać optymalne warunki detekcji i rozdziału.

W układzie chromatografii faz normalnych przedstawiono możliwość analizy niższych kwasów tłuszczowych. Okazało się, że w tym przypadku wykrywalność jest stosunkowo duża (dla kwasu walerianowego wynosi ona 3×10^{-10} mola). Korzystną była natomiast w tym układzie możliwość zastosowania kolumny chromatograficznej jako detektora. Eliminuje to rozmycie próbki w detektorze i połączeniach

W układzie chromatografii faz odwróconych opracowano warunki rozdziału niższych i wyższych kwasów tłuszczowych. Wykrywalność kwasu octowego wynosiła w tym przypadku $2,5 \times 10^{-12}$ mola, a kwasu laurowego 1×10^{-10} mola. Zaobserwowano, że objętości retencji kwasów były zależne od ich stężenia. Spowodowane to było różną retencją niezdysoncjowanych kwasów i ich anionów. Wykazano, że detektor z pomiarem potencjału przepływu charakteryzuje się lepszą wykrywalnością i odtwarzalnością lecz mniejszym zakresem dynamiki liniowej niż detektor z pomiarem prądu przepływu.

Zmianom objętości retencji kwasów ze zmianą ich stężenia udało się zapobiec dokonując ich rozdziału w układzie chromatografii par jonowych. Okazało się, że możliwy był rozdział kwasów przy zastosowaniu fazy ruchomej zawierającej nadchloran czteroetyloamoniowy o stężeniu tylko 10^{-4} M, bez buforu. W tym przypadku wykrywalność kwasu octowego wynosiła $2,5 \times 10^{-10}$ mola.

Wykazano również możliwość analizy kwasów, różniących się znacznie mocą i budową w układzie chromatografii jonowo-wykluczającej. Ze względu na możliwość zastosowania w tym układzie czystej wody jako fazy

ruchomej okazał się on szczególnie korzystny do zastosowania detekcji elektrokinetycznej. Okazało się, że mocne ($pK_a < 2,5$) jak również słabe ($pK_a > 6,5$) kwasy wmywane są razem nierozdzielone, pierwsze na początku, drugie na końcu elucji. Kwasy o pośredniej mocy wmywane były zgodnie ze wzrostem ich wartości pK_a . Z zależności tej wyznaczono objętość martwą i wewnętrzną kolumny. Opisano ją matematycznie zakładając, że mechanizm podziału kwasów na złożu oparty jest na mechanizmie równowagi membranowej Donanna. Uzyskano dobrą zgodność między wartościami objętości retencji kwasów obliczonych z wyprowadzonego równania i uzyskanych eksperymentalnie.

W podsumowaniu można stwierdzić, że w pracy wykazano możliwość zastosowania elektrokinetycznej detekcji w różnych systemach rozdzielczych HPLC. Detektor okazał się tani, łatwy do wykonania i prosty w obsłudze. Ponadto nadaje się on szczególnie dobrze do miniaturyzacji. Jest to szczególnie ważne tam gdzie dużą rolę odgrywa pozakolumnowe rozmycie próbki np. w cieczowej chromatografii kapilarnej. Detektor praktycznie nie jest czuły na zmiany temperatury. Nie można go stosować w układach gdy faza ruchoma zawiera znaczne stężenia związków jonowych, a także w chromatografii z gradientem elucji i przepływu.

I. STRESZCZENIE.

W pracy przedstawiono zagadnienie elektrokinetycznej detekcji w wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

W części literaturowej omówiono problem detekcji w HPLC, podział, charakterystykę, kryteria stosowalności i główne kierunki rozwoju detektorów. Następnie opisano mechanizmy tworzenia się prądu i potencjału przepływu podczas przepływu zarówno cieczy polarnych, jak i dielektrycznych przez układy kapilarne. Podano również przykłady ich praktycznego zastosowania, szczególnie nacisk kładąc na detektory elektrokinetyczne.

Konstrukcję detektora przedstawiono w części eksperymentalnej. Omówiono w niej również problemy związane z pomiarem prądu i potencjału przepływu.

Następnie przedstawiono charakterystykę detektora (krzywa kalibracji, wykrywalność, zakres dynamiki liniowej, odtwarzalność) oraz jego wpływ na rozmycie próbki. Scharakteryzowano również wpływ różnych parametrów (materiał, długość i średnica kapilary, oporność wewnętrzna) charakteryzujących detektor na jego pracę. Przedyskutowano także wpływ różnych czynników zewnętrznych (własności oznaczanego związku, skład i szybkość przepływu fazy ruchomej, temperatura) na wykrywalność detektora. Wyjaśniono przy tym przyczyny zaobserwowanych zmian wysokości i znaków pików chromatograficznych ze zmianą szybkości przepływu eluatu. Wreszcie scharakteryzowano przyczyny tworzenia się i sposoby likwidacji szumów detektora.

Jako modelowe związki do przetestowania własności detektora wybrano, trudne do detekcji innymi metodami, kwasy tłuszczowe. W pracy przedstawiono warunki ich analizy, z zastosowaniem detekcji elektrokinetycznej, w różnych systemach rozdzielczych HPLC (faz normalnych, faz odwróconych, par-jonowych, jonowo-wykluczających). Wyjaśniono przy tym przyczyny zaobserwowanej zależności objętości retencji kwasów od ich stężenia.

Na zakończenie porównano własności detektora elektrokinetycznego z własnościami innych, opisanych w literaturze, detektorów stosowanych w HPLC.

J. SPIS UŻYTYCH SYMBOLI.

- a - współczynnik proporcjonalności określający wielkość wariancji rozmycia próbki w detektorze.
- a_i - promień i-tego jonu w roztworze.
- A - współczynnik proporcjonalności, charakteryzujący kolumnę chromatograficzną.
- A_0 - współczynnik wzmocnienia wzmacniacza operacyjnego bez obwodu sprzężenia zwrotnego.
- A_s - pole powierzchni fazy stacjonarnej w kolumnie.
- C - stężenie.
- C_f - stężenie zdysocjowanych grup funkcyjnych fazy stacjonarnej.
- C_i - stężenie wstrzykiwanej próbki.
- C_m - stężenie próbki w maksimum pików.
- C_o - stężenie powierzchniowe.
- C_p - stężenie jonów czteroalkiloamoniumowych w fazie ruchomej.
- d - średnica wewnętrzna rurki, kapilary lub detektora.
- d_c - średnica wewnętrzna kolumny chromatograficznej.
- d_e - grubość warstwy dyfuzyjnej.
- d_m - grubość ruchomej części podwójnej warstwy elektrycznej.
- D - współczynnik dyfuzji molekularnej.
- D_e - współczynnik dyfuzji wirowej.
- D_L - wykrywalność detektora.
- D_R - dynamika odpowiedzi detektora.
- e - elementarny ładunek elektryczny.
- E - potencjał przepływu, poziom linii odniesienia.

- E_M - potencjał mierzony w trakcie pracy detektora elektrokinetycznego.
- E_O - napięcie wyjściowe wzmacniacza operacyjnego.
- E° - siła elektromotoryczna.
- F - stała Faradaya.
- h - wysokość piku chromatograficznego.
- H - wysokość teoretycznej półki chromatograficznej.
- i_i - prąd wejściowy wzmacniacza operacyjnego.
- I - prąd przepływu.
- I_K - prąd płynący w detektorze konduktometrycznym.
- I_∞ - prąd przepływu dla nieskończenie długich kapilar.
- j - gęstość prądu elektrycznego.
- j_s - gęstość prądu ściankowego.
- J - objętościowa szybkość przepływu cieczy.
- J' - gęstość przepływu cieczy.
- J_d - dyfuzyjna gęstość przepływu cieczy.
- J_k - konwekcyjna gęstość przepływu cieczy.
- J_m - migracyjna gęstość przepływu cieczy.
- J° - szybkość przepływu fazy ruchomej przy której na chromatogramie nie obserwuje się pików chromatograficznych.
- k - czułość detektora.
- k' - współczynnik pojemnościowy.
- k_B - stała Boltzmana.
- K - przewodnictwo roztworu.
- K_a - kwasowa stała dysocjacji.
- K_d - współczynnik podziału.
- l - długość rurki, kapilary lub detektora.
- l_w - wejściowa długość zaburzenia hydrodynamicznego cieczy płynącej w kapilarze.

- L - długość kolumny chromatograficznej.
- L_D - liniowy zakres dynamiki odpowiedzi detektora.
- L_S - maksymalne stężenie analizowanych kwasów przy którym nie następuje zmiana sekwencji ich wymywania.
- m - moc jonowa roztworu.
- M_D - minimum detekcji.
- n - ilość moli wstrzykiwanej próbki.
- n' - liczba zdysocjowanych molekuł w jednostce objętości.
- N - ilość teoretycznych pól chromatograficznych w kolumnie.
- N_L - poziom szumu detektora.
- q - powierzchniowa gęstość ładunku.
- r - indeks odpowiedzi detektora.
- r' - radialna odległość od osi kapilary.
- r_i - szybkość zmiany stężenia składnika "i" w jednostce objętości w wyniku przebiegu homogennej reakcji chemicznej.
- r_w - opór elektryczny celki detektora elektrokinetycznego.
- R - odpowiedź detektora.
- R' - uniwersalna stała gazowa.
- R_d - promień kapilary detektora.
- R_e - liczba Reynoldsa.
- R_f - opór sprzężenia zwrotnego wzmacniacza operacyjnego.
- R_o - sygnał resztkowy.
- R_w - opór między dwoma wejściami wzmacniacza operacyjnego.
- R_z - opór elektrometru.
- s - objętościowa gęstość ładunku.
- s_{av} - średnia objętościowa gęstość ładunku w kolumnie chromatograficznej.

- S - pole powierzchni.
- S_c - współczynnik stabilizacji.
- t - czas.
- $t_{1/2}$ - czas połowicznego zaniku ładunku.
- t_0 - czas martwy kolumny.
- t_r - czas retencji.
- T - temperatura bezwzględna.
- T_D - temperaturowa zależność odpowiedzi detektora.
- u - liniowa szybkość przepływu.
- u' - ruchliwość jonu.
- U - napięcie zasilania detektora konduktometrycznego.
- U_c - potencjał występujący na końcach kapilary związany z różnicą stężeń jonów przy braku różnicy ciśnienia.
- U_{d-h} - potencjał dyfuzyjny po stronie wysokiego ciśnienia kapilary.
- U_{d-l} - potencjał dyfuzyjny po stronie niskiego ciśnienia kapilary.
- U_E - potencjał asymetrii elektrod.
- v_i - objętość wstrzykiwanej próbki.
- V_d - objętość detektora.
- V_i - objętość wewnętrzna kolumny.
- V_0 - objętość martwa kolumny.
- V_p - objętość próbki w kolumnie.
- V_R - objętość retencji.
- x - osiowa odległość od początku kapilary.
- Y - droga przebyta przez próbkę w kolumnie chromatograficznej.
- z - wartościowość jonu.
- Z - impedancja wejściowa wzmacniacza operacyjnego.

- α - stopień dysocjacji.
- γ - współczynnik aktywności.
- δ - grubość podwójnej warstwy elektrycznej.
- δ_1 - grubość warstwy laminarnej.
- ΔE - różnica potencjałów przepływu, wysokość piku chromatograficznego.
- ΔI - różnica prądów przepływu, wysokość piku chromatograficznego.
- ΔP - różnica ciśnień
- ϵ - względna przenikalność elektryczna ośrodka.
- ϵ_0 - przenikalność elektryczna próżni.
- ϵ_T - porowatość całkowita.
- ζ - potencjał elektrokinetyczny.
- η - współczynnik lepkości dynamicznej.
- π - wartość potencjału odwracalnej elektrody.
- κ - przewodnictwo właściwe.
- λ - przewodnictwo powierzchniowe.
- λ_i - przewodnictwo równoważnikowe i-tego jonu.
- $\tilde{\mu}$ - potencjał elektrochemiczny.
- ρ - gęstość cieczy.
- σ^2 - wariancja szerokości piku.
- $\sigma_{i(k,p,d,w,r)}^2$ - wariancja spowodowana przez dozownik (kolumnę, połączenia, wzmacniacze, rejestrator).
- τ - czas relaksacji.
- τ_w - czas zaburzenia hydrodynamicznego cieczy.
- φ - potencjał elektrody.

K. SPIS ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW.

- ACCN - acetonitryl.
- AU - jednostka absorpcji światła.
- CC - kolumna chromatograficzna (Tabela 16).
- CD - detektor konduktometryczny.
- ED - detektor elektrokinetyczny.
- G - kapilara szklana (Tabela 16).
- HPLC - wysokosprawna chromatografia cieczowa.
- HR - ogólny symbol kwasu.
- IE-HPLC - HPLC jonowo-wykluczająca
- MeOH - metanol.
- NP-HPLC - HPLC faz normalnych.
- PTFE - policzterofluoroetylen.
- RI - detektor pomiaru współczynnika załamania światła.
- RIU - jednostka współczynnika załamania światła.
- RP-HPLC - HPLC faz odwróconych.
- RSD - względne odchylenie standardowe.
- SCD - detektor elektrokinetyczny z pomiarem prądu przepływu.
- SPD - detektor elektrokinetyczny z pomiarem potencjału przepływu.
- SS - kapilara wykonana ze stali kwasoodpornej (Tabela 16).
- TEAP - nadchloran czteroetyloamoniowy.
- UV - detektor pomiaru absorpcji światła.

L. LITERATURA.

1. M. Tswett, Proc. Warsaw Soc. Nat. Sci., Biol. Sect., 14(1903) No. 6.
2. A. Tiselius, D. Claesson, Arkiv. Kemi Mineral. Geol., 15B(No.18) (1942).
3. A.T. James, A.J.P. Martin, J. Biochem., 50 (1952) 679.
4. H. Poppe, J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 2(1984) 233.
5. C.J.O.R. Morris, Laboratory Practice, 23 (1974) 513.
6. R.P.W. Scott, Liquid Chromatography Detectors, Elsevier, Amsterdam 1977.
7. S.H. Byrne, w Współczesna Chromatografia Cieczowa, J.J. Kirkland, red., PWN, Warszawa 1976.
8. R.J. Hamilton, P.A. Sewell, Wysokosprawna Chromatografia Cieczowa, PWN, Warszawa 1982.
9. N.A. Parris, Instrumental Liquid Chromatography, Journal Chromatography Library 5, Elsevier, Amsterdam 1976.
10. J.F.K. Huber, Instrumentation for High-Performance Liquid Chromatography, Elsevier, Amsterdam 1978.
11. H.H. Lauer, C.P. Roziny, Chromatographia, 15(1982) 409.
12. J.P. Foley, J.G. Dorsey, Chromatographia, 18(1984) 503.
13. M. Krejčí, K. Šlais, D. Kouřilová, Chemické listy, 78(1984) 469.
14. J.H. Knox, Anal. Proc., April (1982) 166.
15. B.L. Karger, M. Martin, G. Guiochon, Anal. Chem., 46(1974) 1640.
16. C. Horvath, H.J. Lin, J. Chromatogr., 149 (1978) 43.
17. W.Th. Kok, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, H.B. Hanekamp, F. Nooityedacht, H. Poppe, J. Chromatogr. 237(1982) 357.
18. J.C. Sternberg, Advances in Chromatography vol. II, p. 206, J.C. Giddings, R. Keller, eds., Marcel Dekker, New York 1966.

19. H. Poppe w Instrumentation for High-Performance Liquid Chromatography, J.F.K. Huber, ed., Elsevier, Amsterdam 1978, p.113.
20. J.J. Kirkland, W.W. Yau, H.J. Stoklasa, C.H. Dills, J.Chromatogr. Sci., 15 (1977) 303.
21. J.C. Sternberg, Advances in Chromatography, vol.2, J.C. Giddings, R.A. Keller, ed., Marcel Dekker, New York 1966, str. 205-70.
22. K. Štulík, V. Pacáková, in CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry, 14(1984)297.
23. D. Kouřilová, K. Šlais, M. Krejčí, Collection Czech. Chem. Commun., 48(1983)1129.
24. R.P.W. Scott, P. Kucera, J.Chromatogr. Sci., 9(1971)641.
25. H.B. Hanekamp, P. Bos, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, Fresenius Z. Anal. Chem., 297 (1979) 404.
26. S.A. George, H. Elgass, Int. Lab., Sept. (1984) 42.
27. S.A. Mc Clintock, W.C. Purdy, Int. Lab., Sept. (1984) 70.
28. D.A. Roston, P.T. Kissinger, Anal. Chem., 54 (1982)1417A.
29. P.C. White, Analyst, 109 (1984) 677.
30. R. Weinberger, E. Sapp, Anal. Chem., 54(1982) 80.
31. G.L. Burce, K. Klotter, Int. Lab., July /Aug. (1982) 26.
32. P.C. White, Analyst, 109 (1984) 973.
33. W. Boehme, H. Stenz, O. Bonsignor, Int. Lab., June (1983) 28.
34. S.R. Abbott, J. Tusa, J. Liquid Chromatogr., 6(S-1) (1983) 77.
35. H. Poppe, Anal. Chim. Acta, 114 (1980) 59.
36. H. Poppe, Anal. Chim. Acta, 145 (1983) 17.
37. K. Štulík, V. Pacáková, Chemické listy, 73(1979) 795.
38. E. Soczewiński, E. Żminkowska-Halliop, J. Matysik, Wiad. Chem., 33(1979)775.

39. D. Jauzen, M.Munk, B.Leaver, P.Deland, Int.Lab., March/April (1982) 95.
40. S.R. Bakaluar, Int.Lab., Jan./Febr. (1972) 36.
41. H. Teening, J.Chem.Ed., 47(1970)A549 i 47(1970)A675.
42. L.R.Snyder, J.J.Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley, New York 1980.
43. H.B. Hanekamp, H.J. van Nieuwkerk, Anal.Chim. Acta, 121 (1980) 13.
44. K. Brunt, Pharm. Weekbl., 113 (1978) 689.
45. K. Štulík, T. Pacáková, Die Nakrung, 29 (1985) 501.
46. V.Pacáková, K. Štulík, Die Nakrung, 29 (1985) 651.
47. R.B. Meiris, w Developments in Chromatography, C.E.H. Knapman, red., Applied Science, London 1980.
48. C.N. Kenyon, P.C. Goodley, D.J. Dixon, J.O.Whitney, K.F. Faull, J.D.Barchas, Int. Lab., May (1983) 60.
49. P.J.Arpino, P.Kreis, S.Vajta, G.J.Devant, J.Chromatogr., 203 (1981) 117.
50. S.Okuyama, N.Kokubun. S. Higashidate, D.Uemura, Y. Hirata, Chem. Lett., 12 (1979) 1443.
51. L.Ogren, J.Cisky, L.Risinger; L.G.Nilsson, G.Johansson, Anal. Chim. Acta, 117 (1980) 71.
52. J.F.K. Huber, K.M. Jonker, H. Poppe, Anal.Chem., 52 (1980) 2.
53. L.B. Anderson, C.N. Reilley, J.Electroanal. Chem., 10 (1965) 295.
54. P. Edwards, K.K. Haak, Int. Lab., June (1983) 38.
55. S. Hughes, D.C. Johnson, Anal.Chim. Acta, 132 (1981)11.
56. H.B.Hanekamp, W.H. Voogt, P. Bos, Anal.Chim.Acta, 118(1980)73.
57. L.W.Hershberger, J.B.Callis, G.D.Christian, Anal.Chem., 51 (1979) 1444.

58. S. Haderka, J.Chromatogr., 54(1971)357.
59. J.F. Adler, P.R. Fielden, A.J. Clark, Anal.Chem., 56 (1984) 985.
60. S. Haderka, J.Chromatogr., 91 (1974) 167.
61. Y. Hashimoto, M. Moriyasu, E. Kato, M. Endo, N. Miyamoto, H.Uchida, Mikrochimica Acta |Wien|, 2 (1978) 1159.
62. J.R. Gaut, P.A. Perrone, Int. Lab., April (1985) 24.
63. G.J. Schmidt, R.P.W. Scott, Analyst, 120 (1985) 98.
64. F. Voightman, J.D. Winefordner, J.Liq. chromatogr., 5 (1982) 2113.
65. R.E. Majors, H.G. Barth, G.H. Lochmüller, Anal. Chem., 56(1984)300R.
66. D.N.Buchanan, J.G.Thoene, J.Liq.Chromatogr., 4(1981)1587.
67. R.P.W. Scott, P.J. Kucera, J.Chromatogr., 169(1979)51.
68. T.Tsuda, M.Novotny, Anal.Chem., 50(1978)271.
69. M.Novotny, Anal.Chem., 53(1981)1294A.
70. M.Krejčí, K. Šlais, D.Kouřilova, Chemické Listy, 78 (1984) 469.
71. N.H.C. Cooke, K. Olsen, B.C.Archer, LC, Liq. Chromatogr., HPLC Mag., 2(184)519.
72. D. Ishii, K.Asai, K.Hibi, T.Jonokudii, H.Nagaya, J.Chromatogr., 144 (1977) 157.
73. R.P.W. Scott, P.Kucera, J.Chromatogr., 169(1979)51.
74. J.H.Knox, J.Chromatogr. Sci., 18(1980)453.
75. H.E.Schwartz, B.L.Karger, P.Kucera, Anal.Chem., 55 (1983) 1752.
76. J.F. Alder, P.K.P. Drew, P.R. Fielden, Anal.Chem., 55 (1983) 256.
77. P.Ney, Applied Mineralogy, vol.6, zeta-Potentials and Floability of Minerals, Springer, Berlin 1973.
78. Elektrokineticziskije svojstva kapilarnych sistem, I.I.Zukow, red., Wyd.A.N. ZSRR, Moskwa 1956.

79. S.S. Dukhin, B.V. Derjaguin, Surface and Colloid Science, vol.7, Electrokinetic Phenomena, Wiley, New York 1974.
80. J.Th. Overbeek, w Colloid Science, vol.7, H.R. Kruyt, red., Elsevier, Amsterdam 1952.
81. A. Waczksmundzki, E. Chibowski, Wiad. Chem., 28(1974)749.
82. B.K. Głód, Wiad. Chem., 37 (1983) 731.
83. W. Eremenko, B.E. Platonov, T.A. Polishduk, Kolloidn. Zh., 40 (1978) 655.
84. J.A. Schufle, C. Huang, W. Drost-Hansen, J. Colloid Interface Sci., 54 (1976) 184.
85. Y. Gur, J. Colloid Interface Sci., 72 (1979) 222.
86. A. Klinkenberg, I. van der Minne, Electrostatics in the Petroleum Industry, Elsevier, Amsterdam 1958.
87. S. Srinivasan, P.N. Sawyer, J. Colloid Interface Sci., 32 (1970) 907.
88. W.S. Borowkow, B.M. Grafow, A.A. Nowikow, M.A. Nobiokij, Ł.A. Sokołow, Elektrochimizjeskije priebrazowateli informaczi, Nauka, Moskwa 1966.
89. B. Abedian, A.A. Sonin, J. Fluid Mech., 120 (1982) 199.
90. M. Smoluchowski, Krak. Anz., 192 (1908).
91. A.M. Suchotin, red., Sprawocznik po Elektrochimizii, Chimia, Leningrad 1981.
92. L. Landau, E. Lifszyc, Mechanika ośrodków ciągłych, PWN, Warszawa 1958.
93. W. Libuś, Z. Libuś, Elektrochemia, PWN, Warszawa 1975.
94. A.A. Boumans, Physica, 23 (1957) 1007.
95. A.A. Boumans, Physica, 23 (1957) 1027.
96. W. Olivares, T.L. Croxton, D.A. Mc Quarrie, J. Phys. Chem., 84 (1980) 867.
97. M. Kosmulski, J. Szczypa, Wiad. Chem., 37 (1983) 138.
98. L. Dresner, J. Phys. Chem., 67 (1963) 1635.

99. E.S. Romm, Kolloidn. Zh., 41 (1979) 895.
100. J. Gavis, I. Koszman, J.Colloid Sci., 16 (1961) 375.
101. B. Baranowski, Nierównowagowa termodynamiki w chemii fizycznej, PWN, Warszawa 1974.
102. H.J.M. Hanley, Transport Phenomena in Fluids, Marcel Dekker, New York 1969.
103. H. Walden, J. Stasiak, Mechanika cieczy i gazów w inżynierii sanitarnej, Arkady, Warszawa 1971.
104. K. Wyszowski, Zbiór zadań z mechaniki płynów, Wyd.P.W., Warszawa 1975.
105. B. Kamieński, w Prace Konferencji Elektrochemicznej, PWN, Warszawa 1957, str. 17.
106. J. Sestak, M.E. Charles, Chem. Eng. Sci., 23 (1968) 1127.
107. I. Ginsburch, J. Colloid Interface Sci., 32(1970)424.
108. H.D. Goodfellow, J. Colloid Interface Sci., 32(1970)469.
109. J.A. Carruthers, K.J. Marsh, J. Inst. Petrol., 48(1962)169.
110. J.A. Carruthers, K. Wigley, J. Inst. Petrol., 48(1962)180.
111. J.T. Leonard, H.W. Carhart, J. Colloid Interface Sci., 32(1970)383.
112. R.C. Schwing, J. Colloid Interface Sci., 32 (1970)432.
113. J.L. Lauer, P.G. Antal, J. Colloid Interface Sci., 32 (1970) 407.
114. I. Koszman, J. Gavis, Chem. Eng. Sci., 17(1962) 1013.
115. I. Koszman, J. Gavis, Chem. Eng. Sci., 17(1962)1023.
116. J. Gavis, J.P. Wagner, Chem. Eng. Sci., 23 (1968) 381.
117. J. Gavis, Chem. Eng. Sci., 22 (1967) 359.
118. J. Gavis, Chem. Eng. Sci., 22 (1967) 365.
119. G. Tauchard, J. Electrostatics, 5 (1978) 463.
120. R.S. Engelbrecht, J. Appl. Phys., 45 (1974) 3421.
121. H. Krömer, J. Electrostat., 10 (1981) 89.
122. H. Krömer, Chem. Ing. Tech., 55 (1983) 419.

123. P.W. Huber, A.A.Sonin, J.Colloid Interface Sci.,
61 (1977) 109.
124. P.W. Huber, A.A. Sonin, J.Colloid Interface Sci.,
61 (1977) 126.
125. W.N. Pribyłow, Ł.T. Czernyj, Mech. Żidkosti Gazow,
6 (1979) 41.
126. N. Gibson, F.C. Lloyd, J.Fluid Mech., 38 (1969) 563.
127. N. Gibson, F.C. Lloyd, Chem.Eng.Sci., 25(1970) 87.
128. H.D. Goodfellow, W.F. Graydon, Chem.Eng.Sci.,
23 (1968) 267.
129. A. Klinkenberg, Chem.Ing.Techn., 36 (1964) 283.
130. N.J. Felici, J. Electrost., 15 (1984) 293.
131. J.C. Gibbings, J. Electroanal.Chem., 25 (1970) 497.
132. J. Adamczewski, Jonizacja i przewodnictwo ciekłych
dielektryków, PWN, Warszawa 1965.
133. J.Strojny, Elektryczność statyczna, WNT, Warszawa 1979.
134. A.A. Boumans, Physica, 23 (1957) 1038.
135. A.A. Boumans, Physica, 23 (1957) 1047.
136. W.G. Lewicz, Fizyko-chimiczeskaja gidrodynamika,
Wyd. A.N. ZSRR, Moskwa 1952.
137. H. White, E.Urban, F.Krich, J.Phys.Chem.,36(1932)120.
138. S. Ardizzone, L.Formaro, Chim.Ind.(Milano),60(1978)801.
139. A.J. Rutgers, M. de Smet, Trans. Faraday Soc.
40 (1944) 263.
140. A.J. Rutgers, M. de Smet, Trans. Faraday Soc.,
41 (1945) 758.
141. D.P. Benton, G.A.H. Elton, Proceedings of the Second
International Congress of Surface Activity, vol.3,
Butterworths, London 1957.
142. R.A. van Wagenen, J.D. Andrade, J. Electrochem. Sci.,
123 (1976) 1438.

143. R.A. van Wageningen, J.D. Andrade, J. Colloid Interface Sci., 76 (1980) 305.
144. W. Olivares, D.A. Mc Quarrie, J.Phys.Chem., 84(1980)863.
145. B.D. Bowen, J. Colloid Interface Sci., 98 (1984)236.
146. T. Cserfalvi, T. Meisel, E. Pungor, J. Electroanal. Chem., 74 (1979) 377.
147. J. Lykl^ema, J. Th. Overbeck, J. Colloid Sci., 16 (1961) 501.
148. S. Ueda, F. Tsuji, A. Watanabe, Proceedings of the Second International Congress of Surface Activity, Butterworth, London 1957.
149. A. Watanabe, J.Electrochem. Soc., 110 (1963) 72.
150. N. Ando, Y. Tauizaki, F. Hasegawa, U.S.Pat., 3 352 643 (1967).
151. M. Krejč^íci, K. Š^lais, Czech. Pat., 184 097 (1975).
152. K. Š^lais, M. Krejč^íci, J. Chromatogr., 148 (1978) 99.
153. M. Krejč^íci, K. Š^lais, K.Tesař^{ík}, J. Chromatogr., 149 (1978) 645.
154. K. Š^lais, M. Krejč^íci, J. Chromatogr., 91 (1974) 161.
155. M. Krejč^íci, D. Kouř^ílova, R.Vespalec, K. Š^lais, J. Chromatogr., 191 (1980) 3.
156. R. Vespalec, J. Chromatogr., 210 (1981) 11.
157. M. Krejč^íci, D. Kouř^ílova, R. Vespalec, J. Chromatogr., 219 (1981) 61.
158. J. Neč^á, R. Vespalec, Budapest Chromatography Symposium, Budapest, lipec 1985.
159. R. Vespalec, M. Cigankowa, V Danube Symposium on Chromatography, Jař^{ta}, listopad 1985.
160. R. Vespalec, M. Cigankowa, J. Chromatogr., w druku.
161. S. Terabe, K. Yamamoto, T. Ando, Can.J.Chem., 59 (1981) 1531.
162. S. Terabe, K. Yamamoto, T. Ando, J.Chromatogr., 219 (1982) 515.

163. S. Terabe, K. Yamamoto, T. Ando, Kenkyu Hokoku Asahi Garasu Kogyo Gijutsu Shoreikai, 37 (1980) 151.
164. S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, ibid., 43 (1983) 1.
165. R.P. Cardile, S.D. Clark, J.J. Adams, Proc.Int.Water Conf., 1982, CA 98-149393.
166. P. Roques, C. Jersale, Tech.Sci.Munic., 3 (1985)121.
167. R.A. Mowery, R.G.S. Juvet, J.Chromatogr.Sci., 12 (1974) 687.
168. G.O. Elliot, Streaming Jet Detector for Liquid Chromatography, Ph.D. Thessis, Arizona State University 1984, Diss. Abstr. Int. B -3798.
169. W.L. Winniford, An Electrokinetic Flow Monitor for High Pressure Liquid Chromatography, Ph.D. Thessis, Arizona State University 1984, Diss. Abstr. Int. B - 1184.
170. W. Daniewski, A. Bylina, A. Fiutkowski, A. Krupka, Pol.Pat., 112 126 (1977).
171. J.M. Kolthoff, J.F. Goetzee, J.Am.Chem.Soc., 79 (1957) 870.
172. B.K. Głód, W.Kemula, W. Kutner, Pol.Pat., 240 206,1983.
173. W. Kemula, B.K. Głód, W. Kutner, J. Liquid Chromatogr., 6 (1983) 1823.
174. B.K.Głód, W. Kemula, Chem. Anal., w druku.
175. R. Kalvoda, Operational Amplifiers in Chemical Instrumentation, John Wiley, New York 1975.
176. Z.A. Figaszewski, Własności, miernictwo i zastosowanie elektrody rtęciowej drgającej w kapilarze, Wyd. U.W., Warszawa 1983, str. 196-261.
177. D.M. Smith, w Advances in Chromatography, vol.12 (str. 178-222), J.C. Giddings, E. Grushka, R.A.Keller, J.Cazes, red., Marcel Dekker, New York 1975.
178. B.K. Głód, W. Kemula, Nauch. aparat., 1 (1986)101.

179. B.K. Głód, M. Kemula, J. Electroanal.Chem., w druku.
180. S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, Anal. Chem., 57(1985)834.
181. J. OM, Bockris, A.K.N. Reddy, Modern Electrochemistry, Plenum, New York 1970, Vol. 7, chapter 4.
182. W. Tomassi, Termodynamika chemiczna, PWN, Warszawa 1956
183. W. Kemula, B.K. Głód, W. Kutner, J.Liquid Chromatogr., 6(1983)1837.
184. B.K. Głód, W. Kemula, Fifth European Conference on Analytical Chemistry, "Euroanalysis V", Kraków, sierpień 1984.
185. M. Tasaka, S. Tamura, N. Takemura, J. Membrane Sci., 12(1982)169.
186. B.K. Głód, W. Kemula, J. Chromatogr., 321(1985)433.
187. B.K. Głód, W. Kemula, w Postępy chromatografii i innych metod rozdzielania, E. Soczewiński, red., Lublin 1985, str. 117-126.
188. E.S. Romm, A.A. Bybaszkin, Elektchim., 19(1983)1511.
189. B.K. Głód, W. Kemula, Budapest Chromatography Symposium, the 9-th American Easter European Symposium on Liquid Chromatography, Budapest, June 1985.
190. B.K. Głód, W. Kemula, J. Chromatogr., 366(1986)39.
191. B.K. Głód, W. Kemula, 9-th International Symposium on Column Liquid Chromatography, Edinbrugh, July 1-5 1985.
192. K.J. Bush, R.W. Russel, J.W. Young, J. Liquid Chromatogr., 2(1979)1367.
193. J. Garrido, A.F. Tejerino, J. Non-equilibr. Thermodyn. 3(1978)49.
194. M.J.E. Golay, J.G. Atwood, J. Chromatogr., 186(1979)353.
195. B.K. Głód, W. Kemula, II Krajowe Sympozjum Chromatograficzne, Lublin, wrzesień 1985.

196. Współczesna chromatografia cieczowa, J.J. Kirkland, red., Warszawa 1976, PWN.
197. B.L. Karger, S.C. Su, J. Chromatogr. Sci., 12 (1974) 678.
198. B.A. Persson, B.L. Karger, J. Chromatogr. Sci., 12 (1974) 521.
199. R. Schwarzenbach, J. Chromatogr., 251 (1982) 339.
200. P. Jondera, J. Churáček, J. Chromatogr., 86(1973)351.
201. J. Lehotay, M. Truiter, J. Chromatogr., 91(1974)261.
202. K. Tanaka, T. Ishizuku, H. Sunahara, J. Chromatogr., 174 (1979) 153.
203. G.A. Harlow, D.H. Morman, Anal. Chem., 36(1964)2438.
204. R.M. Wheaton, W.C. Bauman, Ind. Eng. Chem., 45 (1953) 228.
205. B.K. Głód, W. Kemula, V Danube Symposium on Chromatography, Yalta, November 11-16 1985.
206. B.K. Głód, New Advances in Liquid Chromatography, the 6th Annual American-Eastern European Collegium and Symposium on Liquid Chromatography, Balatonszeplak, September 1986.
207. K.-T. Wang, Y.-T. Lin, J.S.Y. Wang, Advances in Chromatography, vol. 11, J.C. Giddings, R.A. Keller, eds. Marcel Dekker, New York 1975, str. 95-97.
208. L.S. Ettre, J.E. Purcell, Advances in Chromatography, vol.10, J.C. Giddings, R.A. Keller, Marcel Dekker, New York 1974, str. 75-78, 81-82.
209. K.W. Stahl, G. Schafer, W. Lamprecht, J. Chromatogr. Sci., 10 (1972)95.
210. K. Kiuchi, T. Ohta, H. Ebine, J. Chromatogr. Sci., 13 (1975) 461.
211. S. Hara, Y. Dobaski, K. Oka, J. Chromatogr. 239 (1982)677.

212. D.L. Manning, M.P. Maskaraniec, J. Liquid Chromatogr., 6 (1983) 705.
213. W. Th. Kok, G. Groenendijk, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, J. Chromatogr., 315 (1984) 271.
214. D. Kouřilova, K. Šlais, M. Krejčí, Coll. Czech.Chem. Commun., 48 (1983) 1129.
215. W. Funasaka, T. Hanai, K. Kujimura, J. Chromatogr. Sci., 13 (1975) 517.
216. A.K. Batta, V. Daya, R.W. Colman, A.K. Sinha, S. Shefer, G. Salen, J. Chromatogr., 284 (1984) 257.
217. A. Tilly-Melin, Y. Askemark, K.G. Wählung, G.Schill, Anal.Chem., 51 (1979) 976.
218. A. Tilly-Melin, M. Ljugerantz, G. Schill, J. Chromatogr., 185 (1979) 225.
219. J.C. Kraak, J.F.K. Huber, J.Chromatogr., 102 (1974) 333.
220. C.P. Tsai, A. Sahil, J.M. Mc Guire, B.L. Karger, P. Vouros, Anal. Chem., 58 (1986) 2.
221. H. Small, T.S. Stevens, W.C. Bauman, Anal.Chem., 47 (1975) 1801.
222. J.S. Fritz, L.C. Magazine, 21 (1984) 446.
223. G. Schmückler, J. Chromatogr., 313 (1984) 47 R.
224. D.T. Gjerde, J.S. Fritz, G. Schmückler, J. Chromatogr., 186 (1979) 509.
225. D.T. Gjerde, J.S. Fritz, G. Schmückler, J. Chromatogr., 187 (1980) 35.
226. D.T. Gjerde, J.S. Fritz, Anal. Chem., 53 (1981) 2324.
227. J.S. Fritz, D.L. Du Val, R.E. Barron, Anal.Chem., 56 (1984) 1177.
228. H. Small, Anal. Chem., 55 (1983) 235 A.
229. H. Small, T.E. Miller, Anal.Chem., 54 (1982) 462.
230. P.K. Dasgupta, R.Q. Bligh, M.A. Mercuria, Anal.Chem., 57 (1985) 484.

231. T. Hanai, J. Hubert, *Chromatographia*, 17 (1983) 633.
232. T. Hanai, J. Hubert, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 7 (1984) 524.
233. R.T. Marsili, *J. Chromatogr. Sci.*, 19 (1981) 451.
234. R.W. Siergiej, N.D. Danielson, *J. Chromatogr. Sci.*, 21 (1983) 362.
235. L.J. Felice, P.T. Kissinger, *Anal. Chem.*, 48 (1976) 794.
236. M.L. Richmond, *J. Dairy Sci.*, 65 (1982) 1394.
237. R.M. Cassidy, S. Elchule, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 615.
238. P.R. Haddad, A.L. Hekenberg, *J. Chromatogr.*, 300(1984)357.
239. M.J. Bennett, C.E. Bradey, *Clin. Chem.*, 30 (1984) 542.
240. M. Grun, F.A. Loewus, *Anal. Biochem.*, 130 (1983) 191.
241. S.H. Ashoor, J. Welty, *J. Chromatogr.*, 287 (1984) 452.
242. E. Rajakylä, *J. Chromatogr.*, 218 (1981) 695.
243. H.F. Walton, *Anal. Chem.*, 48 (1976) 52 A.
244. V.T. Tukelson, H. Richards, *Anal. Chem.*, 50 (1978) 1420.
245. H. J. Cortes, *J. Chromatogr.*, 234 (1982) 517.
246. E.M. Thurman, *J. Chromatogr.*, 185 (1979) 625.
247. Y. Takata, G. Moto, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 1864.
248. S. Matushita, Y. Tada, N. Baba, K. Hosako, *J. Chromatogr.* 259 (1983) 459.
249. S.A. Bouyoucos, *Anal. Chem.*, 45 (1977) 401.
250. R.P. Haddad, P.W. Alexander, M. Trojanowicz, *J. Chromatogr.* 315 (1984) 261.
251. H.C. Jordi, *J. Liquid Chromatogr.*, 1 (1978) 215.
252. R.A. Miller, N.E. Bussell, *J. Liquid Chromatogr.*, 1 (1978) 291.
253. H. Miwa, C. Hiyama, M. Yamamoto, *J. Chromatogr.*, 321 (1985) 165.
254. J.L. Robinson, M. Tsimidou, R. Macrae, *J. Chromatogr.*, 324(1985) 35.



Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

F-B.266/1988



7000000002089