

Chromatografia jest techniką analityczną i preparatywną, która umożliwia rozdział mieszaniny na poszczególne składniki lub frakcje. Wykorzystuje ona różnice w zachowaniu się poszczególnych związków w układzie dwufazowym, w którym jedna z faz nie zmienia swojego położenia (faza stacjonarna), druga natomiast porusza się względem pierwszej w określonym kierunku (roztwór rozwijający). W przypadku chromatografii cieczowej (ang. *Liquid Chromatography*) faza ruchoma jest cieczą.

Chromatografia jest techniką analityczną i preparatywną wykorzystującą rozdzielanie mieszanin substancji na poszczególne składniki, bądź ich grupy (frakcje), dzięki różnicom w zachowaniu się tych składników w układzie dwóch faz, w których jedna nie zmienia swego położenia (faza nieruchoma, stacjonarna), druga zaś porusza się względem pierwszej w określonym kierunku (faza ruchoma, roztwór rozwijający).

Należy podkreślić, że właśnie zdolność do rozdzielania **wielo -składnikowych** mieszanin substancji o bardzo zbliżonych właściwościach stała się przyczyną tak wielkiego spektrum współczesnych zastosowań chromatografii, tak w analityce, jak i w technologii leków ze źródeł pochodzenia naturalnego, w biotechnologii czy w innych obszarach.

Historia

Michaił Siemionowicz CWIET, rosyjski botanik, fizjolog i biochemik, wynalazca chromatografii; 1903 będąc wykładowcą na Politechnice Warszawskiej lub Uniwersytecie Warszawskim opracował chromatografię kolumnową; prowadził badania nad rozdzielaniem barwników roślinnych

Pierwsze prace prowadził, używając roztworu **chlorofilu** w **eterze naftowym**, który przesączał przez ubitą kredę

– rozdzielił chlorofil (zielony) i ksantofil (żółte, czerwone, pomarańczowe) uznawany jest za odkrywcę karotenoidów.

Jako że stosował ją do rozdzielania mieszanin naturalnych barwników nazwał ją chromatografią od greckiego „khromatos” - barwa. Tak się złożyło że po rosyjsku „cwiet” również oznacza barwę.

Układ chromatograficzny

Układ chromatograficzny składa się z trzech składników:

- **mieszaniny** poddawanej rozdzielaniu;
- **fazy stacjonarnej**, sorbentu, czyli stałego lub żelowego złoza, które może oddziaływać międzycząsteczkowo ze związkami tworzącymi analizowaną mieszaninę. Istotna dla rozdziału jest zarówno wielkość powierzchni sorpcyjnej, jak i stopień jej obsadzenia grupami funkcyjnymi;
- **fazy ruchomej**, czyli eluentu lub inaczej czynnika wymywającego. W przypadku

chromatografii cieczowej jest nim ciekły rozpuszczalnik, który przenosi analizowaną substancję przez złożę. Dobry eluent powinien zapewniać wystarczającą selektywność układu chromatograficznego, a przy tym nie reagować ani z fazą stacjonarną, ani z substancjami rozdzielanymi (wyłączając zamierzone działania). Powinien on również charakteryzować się możliwie niską lepkością, niskim ciepłem parowania i nie absorbować światła w tych zakresach fali, które będą wykorzystywane przy detekcji.

Proces chromatograficzny to wielokrotna sorpcja i desorpcja substancji z fazy stacjonarnej do fazy ruchomej i odwrotnie, tzn. z fazy ruchomej do stacjonarnej. Różne związki oddziałują z każdą z faz w charakterystyczny dla siebie sposób i z tego względu przemieszczają się z różną szybkością, co umożliwia ich rozdział. Czas ich wędrówki określa się mianem **retencji**.

Elucja

Proces wymywania składników nazywa się elucją. Istnieją dwa sposoby jej prowadzenia:

Elucja izokratyczna – rodzaj elucji, podczas którego skład jakościowy i ilościowy fazy ruchomej pozostaje stały.

Elucja gradientowa – rodzaj elucji, w którym skład fazy ruchomej zmienia się w sposób ciągły lub stopniowo.

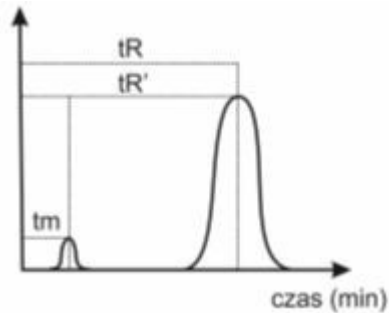
Kolumna – rurka ze znajdującą się w niej fazą stacjonarną, przez którą przepływa faza ruchoma (**eluent**). Faza ruchoma wraz z rozpuszczonymi w niej składnikami próbki, opuszczająca kolumnę nazywa się **eluatem**.

Chromatograf jest to przyrząd lub zestaw przyrządów służący do wykonania rozdzielania chromatograficznego. Najważniejsze części chromatografu to **dozownik** (urządzenie, za którego pomocą wprowadza się próbkę do fazy ruchomej przed złożem chromatograficznym lub na to złożę) kolumna chromatograficzna oraz **detektor** (urządzenie, które określa zmiany w składzie fazy ruchomej przepływającej przez niego, poprzez pomiar jej właściwości fizycznych lub chemicznych. Innymi słowy jest to urządzenie, które monitoruje w sposób ciągły skład fazy ruchomej opuszczającej kolumnę).

Z chwilą pojawienia się substancji w detektorze, pojawia się sygnał chromatograficzny (pik), obrazujący zmiany stężenia w czasie lub zmiany stężenia wraz ze zmianą objętości fazy ruchomej wypływającej z kolumny. Sygnały chromatograficzne zapisywane przez rejestrator (komputer) dają chromatogram.

Wyniki analizy

Wyniki przeprowadzonej analizy przedstawia się zazwyczaj w postaci **chromatogramu**, czyli wykresu pików odpowiadających poszczególnym składnikom. Obraz ten uzyskuje się dzięki zastosowaniu odpowiedniego detektora.



Rys. 1. Chromatogram elucyjny; t_m - zerowy czas retencji lub inaczej czas retencji niezatrzymywanej, wyznaczany dzięki przepuszczeniu przez kolumnę substancji, która nie oddziałuje z fazą stacjonarną; t_R - zredukowany czas retencji, czyli okres, jaki upływa między wprowadzeniem próbki, a pojawieniem się maksimum pików rozpatrywanego składnika; t_R' - zredukowany czas retencji, związany z przebywaniem substancji w kolumnie tylko w wyniku oddziaływania tej substancji z fazą stacjonarną ($t_R' = t_R - t_m$)

Chromatogram może dostarczać dwojakich informacji:

- **jakościowych** - liczba pików może oznaczać ilość substancji zawartych w badanej mieszaninie, natomiast ich lokalizacja na chromatogramie pozwala określić rodzaj, tzn. właściwości fizykochemiczne rozdzielanych substancji;
- **ilościowych** - wielkość rejestrowanego sygnału detektora, tzn. wysokość albo powierzchnia pików chromatograficznych jest funkcją stężenia lub też masy analitu w badanej próbce.

Podział metod chromatograficznych

Ze względu na stan skupienia fazy ruchomej wyróżnia się następujące rodzaje chromatografii: □

- **chromatografia gazowa** (GC) – technika rozdzielania, gdzie fazą ruchomą jest gaz; w chromatografii gazowej zawsze stosuje się kolumny chromatograficzne,
- **chromatografia cieczowa** (LC) – technika rozdzielania, gdzie fazą ruchomą jest ciecz; w chromatografii cieczowej proces rozdzielania można prowadzić w kolumnach (chromatografia niskociśnieniowa lub wysokosprawną chromatografią cieczową, HPLC) bądź techniką planarną,

Ze względu na mechanizm rozdzielania wyróżnia się następujące rodzaje chromatografii:

- **chromatografia adsorpcyjna** – rozdzielanie jest wynikiem różnic pomiędzy składnikami próbki

w zdolności do adsorbowania się na powierzchni ciała stałego (adsorbentu);

- **chromatografia podziałowa** – rozdzielanie jest wynikiem różnej rozpuszczalności składników

próbki w fazie stacjonarnej (w przypadku chromatografii gazowej) lub różnej rozpuszczalności składników w fazie stacjonarnej i ruchomej (w przypadku chromatografii cieczowej);

- **chromatografia jonowa (jonowymienna)** – technika, w której rozdzielanie jest wynikiem różnej zdolności składników próbki do ulegania wymianie jonowej;

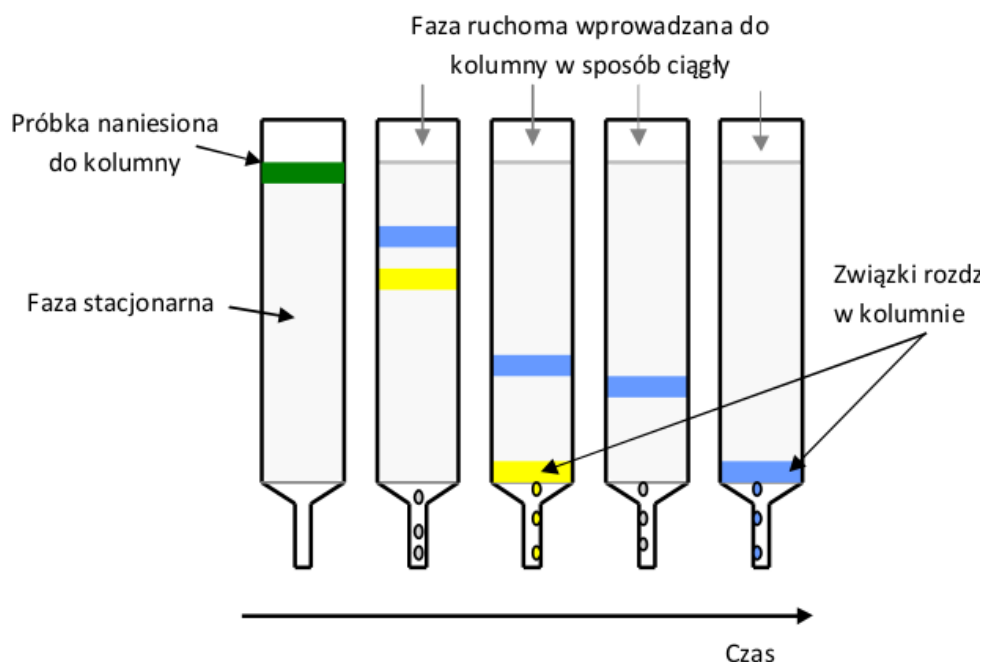
- **chromatografia wykluczania** – technika, w której o rozdzieleniu składników próbki decydują

różnice w wielkościach cząsteczek i/lub w ich kształcie, w przeszłości stosowane były również nazwy: chromatografia żelowa, sączenie molekularne, chromatografia sitowa;

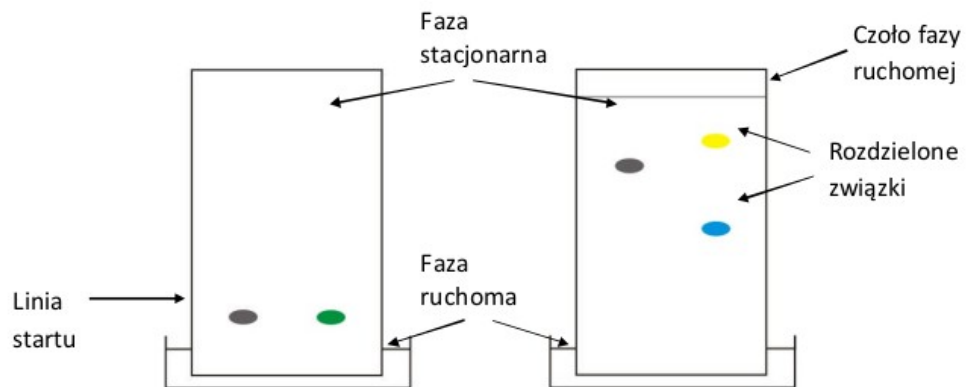
- **chromatografia powinowactwa** - technika, w której rozdzielanie jest wynikiem biologicznej specyficzności oddziaływań składników próbki i ligandu; ten rodzaj chromatografii jest stosowany do izolacji i oczyszczania białek oraz kwasów nukleinowych.

Ze względu na sposób prowadzenia procesu chromatograficznego wyróżniamy chromatografię

kolumnową (rysunek 1) oraz chromatografię cienkowarstwową (rysunek 2).



Rysunek 1. Chromatografia kolumnowa



Rysunek 2. Chromatografia cienkowarstwowa, płytka przygotowana do rozdzielania z naniesionymi plamkami badanych próbek (po lewej), płytka po wykonaniu rozdzielania (po prawej)