

# CZEŚĆ III

## METODY ROZDZIELCZE

*Współczesne metody chromatograficzne*

### 1. Pojęcia podstawowe

# METODY CHROMATOGRAFICZNE

**Technika rozdzielania składników mieszaniny na podstawie względnych ilości każdej z substancji podzielonej pomiędzy poruszającym się strumieniem płynu, zwanym fazą ruchomą i sąsiadującą fazą stacjonarną .**

- Związki chemiczne występują w przyrodzie w postaci mieszanin i w takiej też postaci są najczęściej otrzymywane drogą syntezy, w laboratorium czy w przemyśle. Zagadnienie rozdzielania mieszanin związków chemicznych jest więc podstawowym problemem nauk chemicznych.
- Rozdział mieszanin polega na rozdzieleniu od siebie wszystkich składników lub na wyizolowaniu, z danego środowiska, tylko pożądanej substancji.
- W procesie rozdziału mieszanin wykorzystuje się różne właściwości fizyczne, fizykochemiczne i chemiczne rozdzielanych składników. Opracowano wiele metod rozdziału substancji, i to zarówno na skalę mikro jak i na skalę makro. Jedną z nich jest chromatografia. Chromatografia obejmuje metody rozdziału mieszanin jednorodnych różnych substancji oparte na podziale składników mieszaniny między fazą nieruchomą (stacjonarną) i ruchomą układu chromatograficznego.

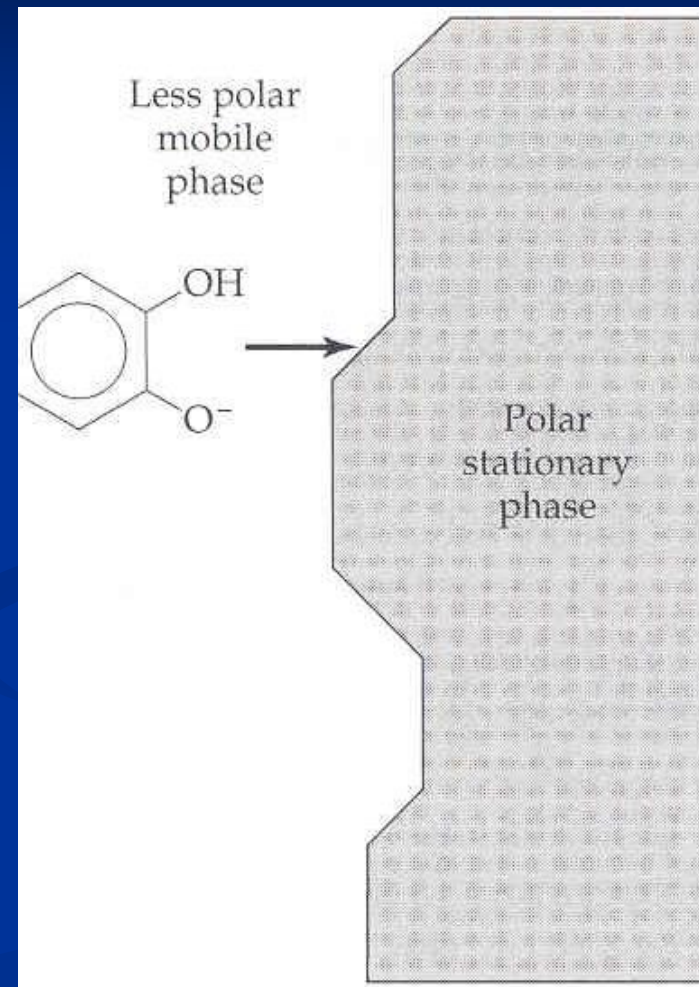
## Klasyfikacja metod chromatograficznych.

### A. KRYTERIUM KLASYFIKACJI:

NATURA ZJAWISK, BĘDĄCYCH  
PODSTAWĄ ROZDZIAŁU  
CHROMATOGRAFICZNEGO.

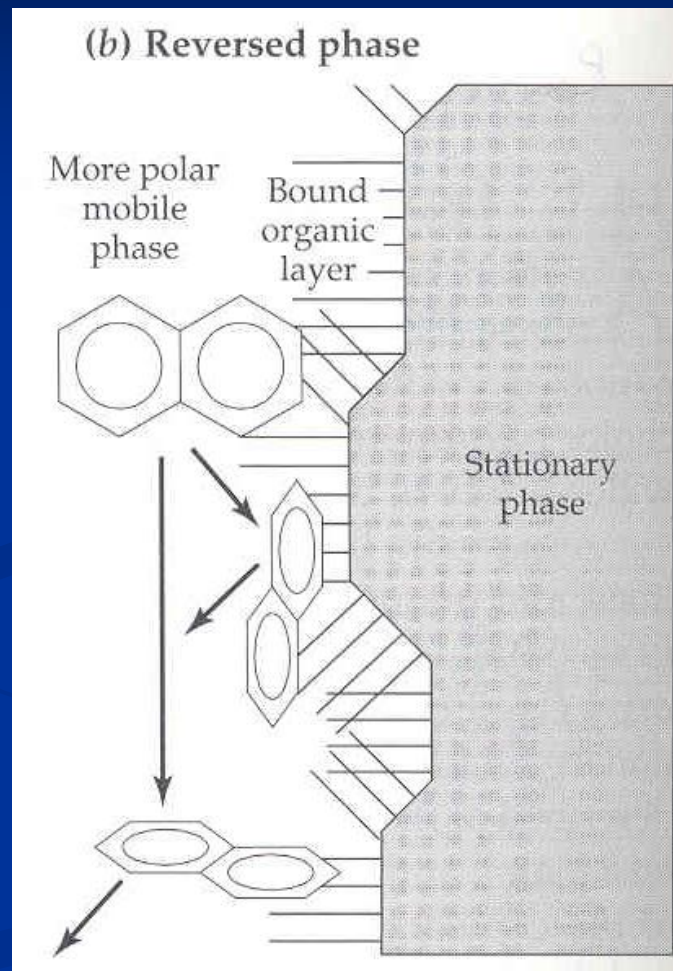
### Chromatografia adsorpcyjna.

Rozdział mieszanin metodą chromatografii adsorpcyjnej jest oparty na zjawisku adsorpcji składników mieszaniny na odpowiednio dobranej powierzchni fazy nieruchomej, zwanej adsorbentem. Głównym warunkiem rozdziału są różne wartości współczynników adsorpcji poszczególnych składników mieszaniny.



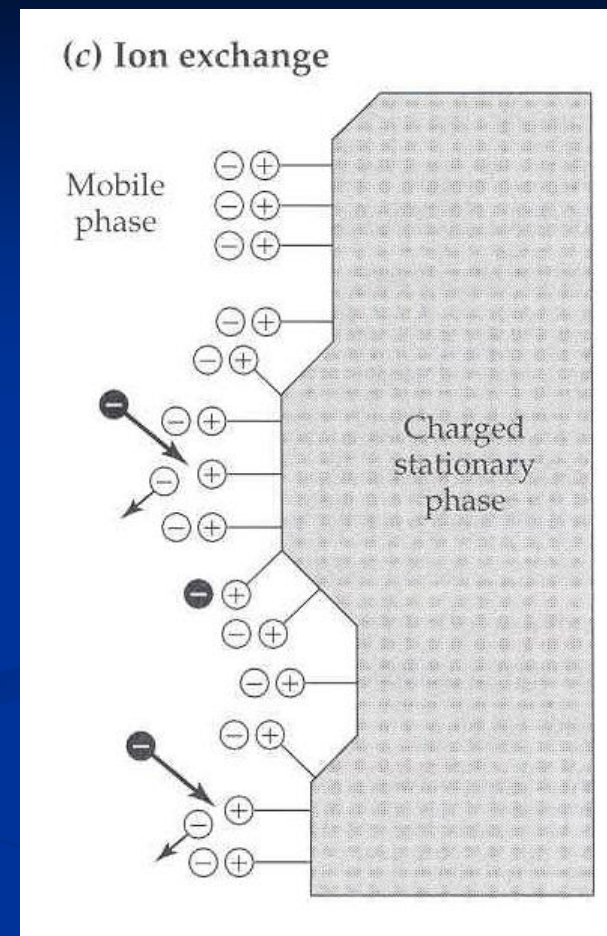
## Chromatografia podziałowa (rozdzielcza).

Rozdzielenie mieszaniny drogą chromatografii podziałowej jest oparte na procesie ekstrakcji, tzn. na podziale składników mieszaniny między dwie nie mieszające się fazy, z których jedna faza stacjonarna (ciecz) jest naniesiona na specjalny nośnik, a druga- faza ruchoma (ciecz lub gaz) przepływa nad fazą stacjonarną. Głównym warunkiem rozdziału są różne wartości współczynników rozpuszczalności poszczególnych składników mieszaniny w ciekłej fazie stacjonarnej.



## Chromatografia jonowymienna.

Metoda ta opiera się na reakcji wymiany jonowej między rozdzielanymi jonami, zawartymi w roztworze, a jonami związanymi z makrocząsteczką wymienniczą jonowego.



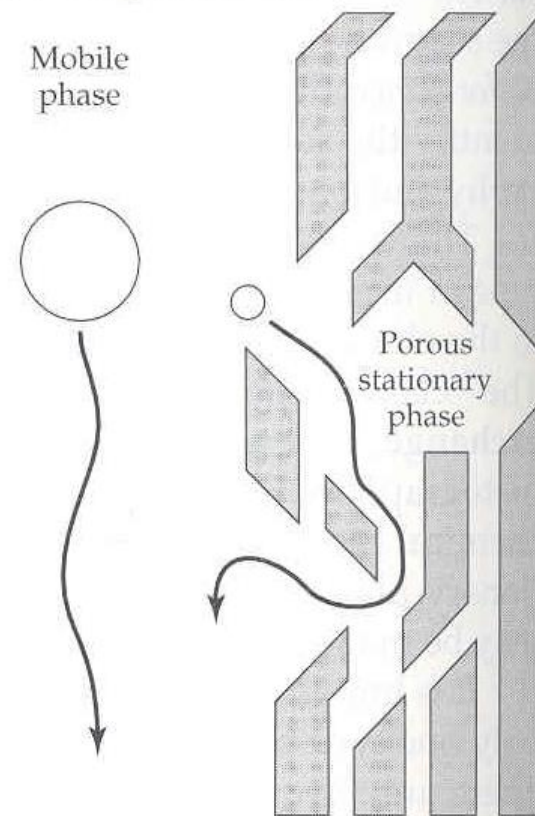
## Chromatografia osadowa.

Rozdział metodą chromatografii osadowej opiera się na wytrącaniu osadów w wyniku reakcji chemicznych, zachodzących między osadzonym na nośniku odczynnikami a znajdującymi się w roztworze rozdzielanymi jonami. Głównym warunkiem rozdziału są różne wartości rozpuszczalności wytrączanych osadów.

## Chromatografia sitowa.

Rozdział metodą chromatografii sitowej opiera się na efekcie sitowym. Głównym warunkiem rozdziału są różne wartości masy cząsteczkowej rozdzielanych związków.

(d) Gel permeation



## B. KRYTERIUM KLASYFIKACJI:

### STAN SKUPIENIA FAZY NIERUCHOMEJ I RUCHOMEJ.

Fazą stacjonarną w procesie chromatograficznym może być ciało stałe mające właściwości adsorpcyjne (chromatografia adsorpcyjna) lub ciecz naniesiona na nośniku w celu wytworzenia na granicy faz większej powierzchni wymiany (chromatografia podziałowa). Fazą ruchomą może być ciecz lub gaz (para substancji lotnej). W wyniku kombinacji ww. faz stacjonarnych i ruchomych otrzymujemy cztery główne rodzaje chromatografii, zestawione w tabeli.

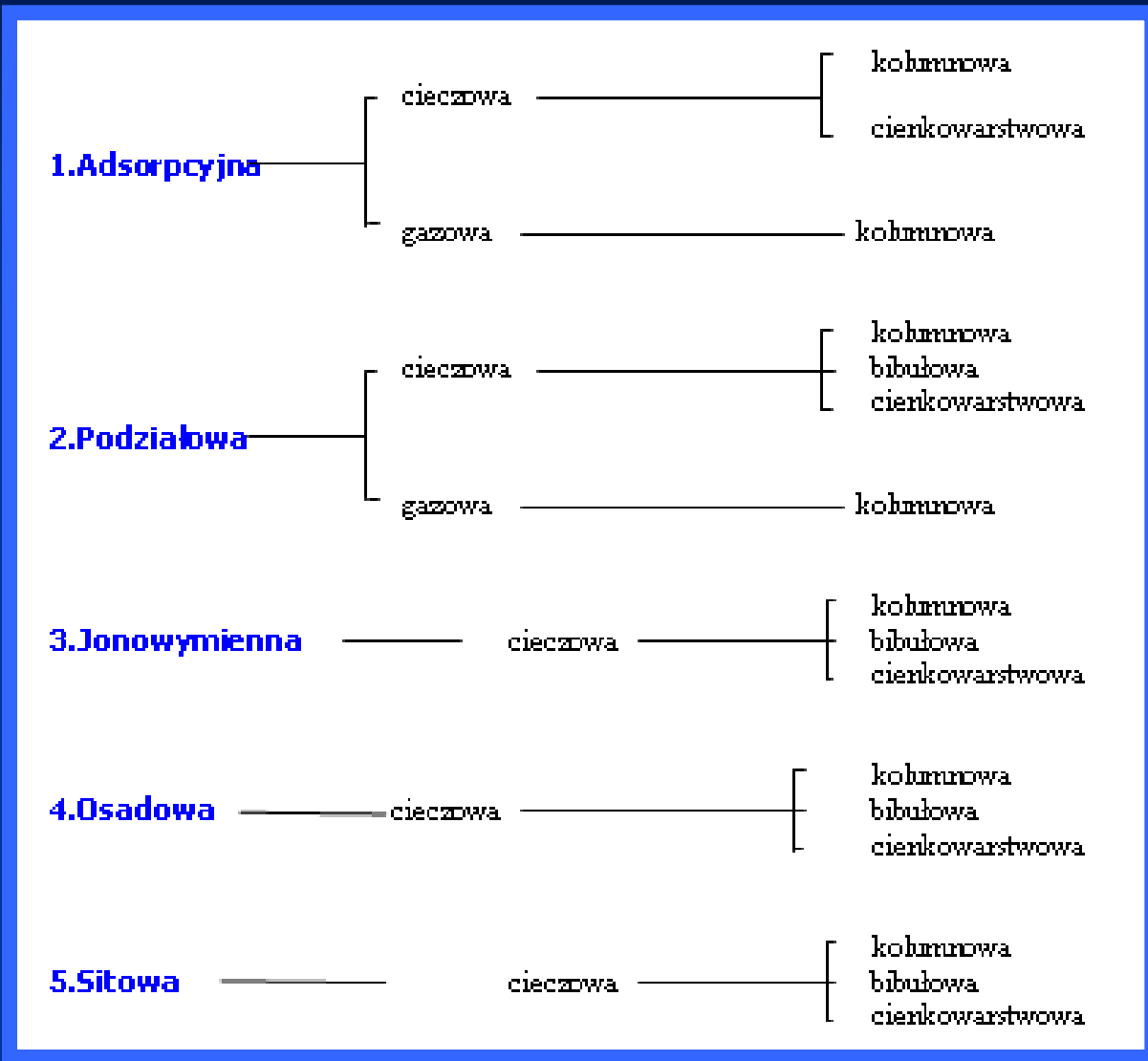
# METODY ROZDZIELCZE - CHROMATOGRAFIA

Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Nazwa polska	Nazwa angielska i skrót
Ciało stałe (adsorbent)	ciecz	chromatografia cieczowa adsorpcyjna	Liquid-Solid Chromatography LSC
Ciało stałe (adsorbent)	gaz	chromatografia gazowa adsorpcyjna	Gas-Solid Chromatography GSC
Ciecz (rozpuszczalnik)	ciecz	chromatografia cieczowa podziałowa	Liquid-Liquid Chromatography LLC
Ciecz (rozpuszczalnik)	gaz	chromatografia gazowa podziałowa	Gas-Liquid Chromatography GLC



## C. KRYTERIUM KLASYFIKACJI: RODZAJ NOŚNIKA

- BIBUŁOWA
- CIENKOWARSTWOWA
- KOLUMNOWA



## D. KRYTERIUM KLASYFIKACJI:

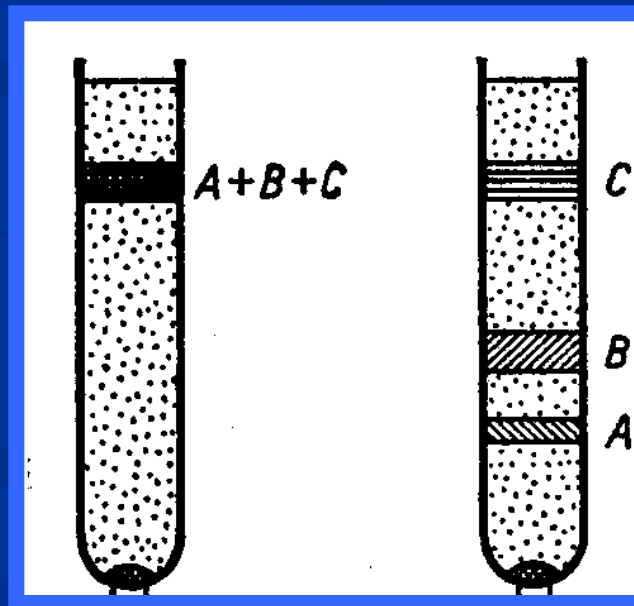
### METODY PRZEPROWADZANIA PROCESU CHROMATOGRAFICZNEGO.

Metody chromatograficzne posługują się kilkoma technikami postępowania, z których najczęściej stosowane są:

1. metoda wymywania (analiza elucyjna),
2. metoda analizy czołowej,
3. metoda rugowania (analiza przez rugowanie).

## Metoda analizy elucyjnej.

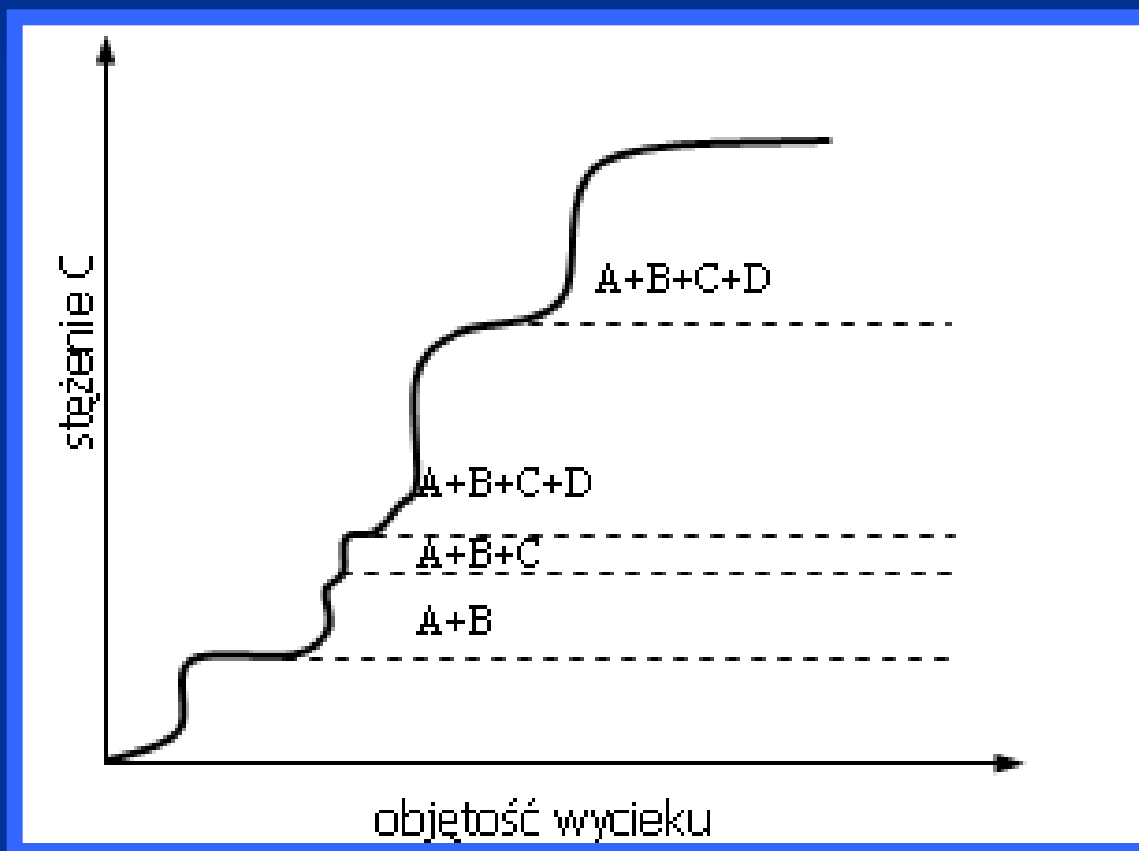
W metodzie tej proces chromatografii przebiega dwustopniowo. W pierwszej fazie na szczyt kolumny wprowadza się rozdzielaną mieszaninę, blisko wierzchołka kolumny następuje proces adsorpcji poszczególnych składników, przy czym nie zachodzi ich całkowite rozdzielanie. W drugiej fazie przez kolumnę przepuszcza się rozpuszczalnik wmywający (faza ruchoma). Może to być ciecz lub gaz. Następuje desorpcja składników zatrzymanych na adsorbencie i ich adsorpcja w innych miejscach kolumny, wskutek czego obserwuje się przesunięcia pasma początkowego, przy jednoczesnym jego rozdzieleniu na szereg odrębnych pasm, odpowiadających określonym składnikom rozdzielanej mieszaniny. Dalsze przemywanie kolumny rozpuszczalnikiem powoduje, że rozdzielone, w procesie rozwijania chromatogramu, pasma przechodzą kolejno do wycieku. Przedstawiając graficznie zależność stężenia poszczególnych składników wycieku od objętości wycieku otrzymuje się wykres zaznaczonych pików.



## Metoda analizy czołowej.

Polega ona na ciągłym przesączaniu przez kolumnę badanego roztworu. Roztwór ten spełnia równocześnie rolę rozpuszczalnika wymywającego. Na krzywej wymywania nie otrzymujemy oddzielnych pików, lecz krzywą „schodkową”. Pierwszy „schodek” odpowiada substancji A, adsorbującej się na kolumnie najslabiej, drugi „schodek” – substancji B z domieszką substancji A, trzeci – substancji C z domieszką substancji B i śladową ilością substancji A itd. Technikę tę stosujemy w celach preparatywnych wówczas, gdy chcemy oddzielić substancję A od pozostałych składników mieszaniny.

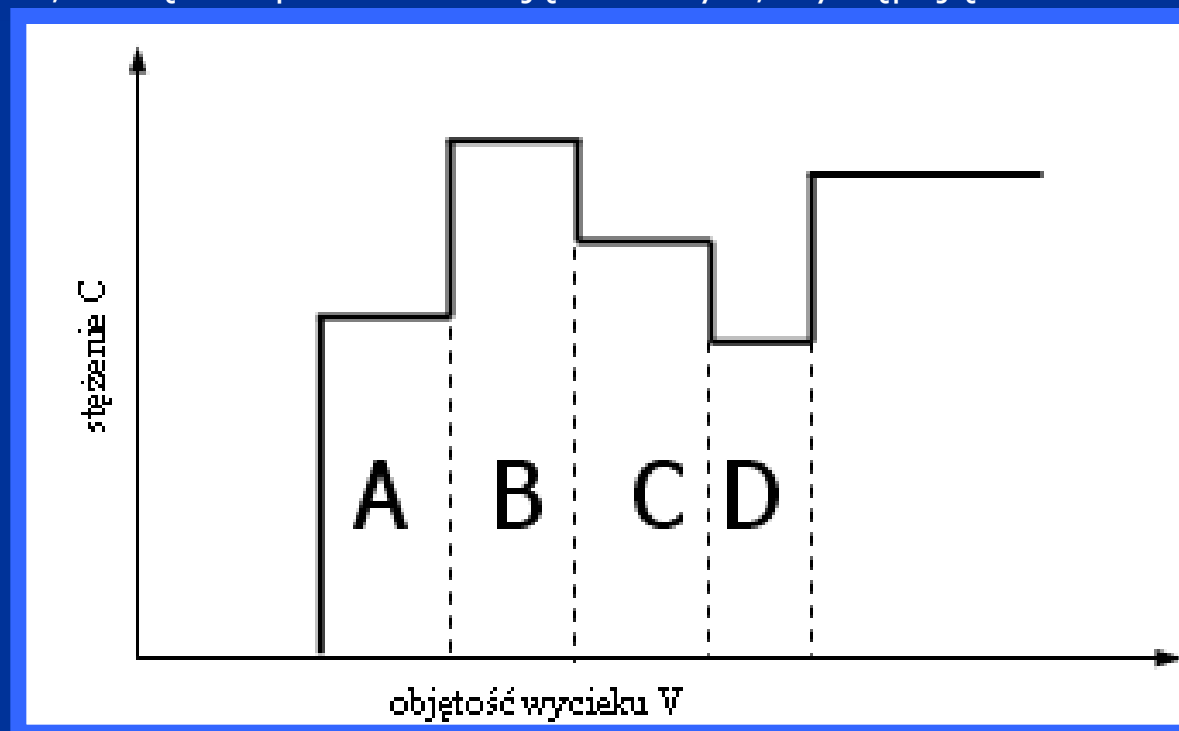
### Krzywa elucji w metodzie analizy czołowej



## Metoda rugowania.

Na wierzchołek kolumny wprowadza się niewielką ilość roztworu substancji badanej. Składniki rozdzielanej mieszaniny ulegają adsorpcji na małej długości kolumny. Następnie, zamiast przemywania kolumny za pomocą czystego rozpuszczalnika (jak w metodzie wymywania), przemywa się ją cieczą lub roztworem, zawierającym substancję rugującą o większym powinowactwie adsorpcyjnym niż rozdzielane składniki. Substancja rugująca wypiera pierwszy, zaabsorbowany na wierzchołku składnik, a ten z kolei wypiera następny o nieco mniejszym powinowactwie adsorpcyjnym itd. W wycieku otrzymuje się poszczególne frakcje, zawierające tylko jeden składnik. Jedynie na granicy faz, w wąskim przedziale objętościowym, występują dwa składniki.

**Krzywa elucji w  
metodzie  
rugowania.**

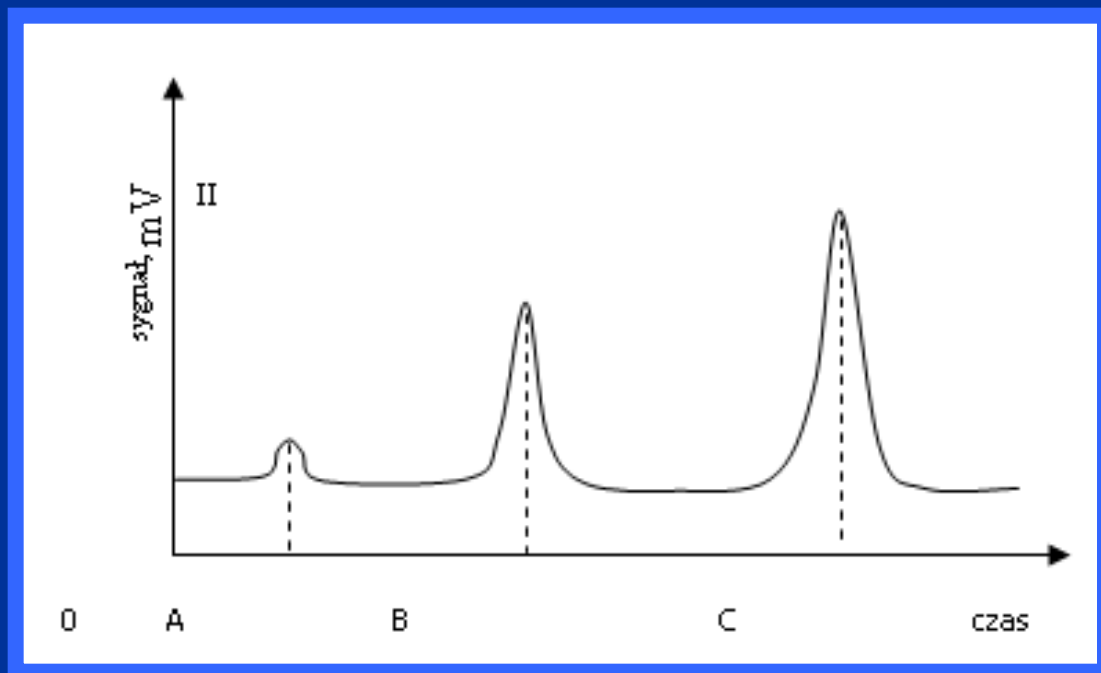


## PODSTAWOWE POJĘCIA I DEFINICJE

### Chromatogram

stanowi wykres przedstawiający zależność wskazań detektora od czasu przepływu lub objętości fazy ruchomej nośnego.

### Typowy chromatogram mieszaniny dwuskładnikowej:



$OA = t_M$  – martwy czas retencji (czas retencji gazu niesorbowanego),

$OB = t_{RI}$  – czas retencji I składnika,

$OC = t_{RII}$  – czas retencji II składnika,

$AB = t'_{RI}$  – zredukowany czas retencji II składnika,

$AC/AB = r_{II/I}$  – retencja względna

## Parametry retencji.

Wielkościami, które w określonych warunkach rozdziału charakteryzują daną substancję pod względem jakościowym, są: czas retencji i objętość retencji.

### 1. Czas retencji

a) *całkowity czas retencji* danego składnika  $t_R$  – czas liczony od momentu wprowadzenia próbki do momentu pojawienia się na chromatogramie maksimum danego piku, tzn. do momentu pojawienia się na wyjściu kolumny maksymalnego stężenia wmywanego związku,

b) *martwy czas retencji*  $t_M$  – czas retencji gazu nie ulegającego adsorpcji (np. He),

c) *zredukowany czas retencji*  $t'_R$  – czas retencji danego składnika liczony od martwego czasu retencji:  $t'_R = t_R - t_M$

d) *względny czas retencji:*

gdzie: indeks  $i$  oznacza dowolną substancję;  
indeks  $w$  - substancję wzorcową.

$$r_{i,w} = \frac{t'_{R_i}}{t'_{R_w}}$$

## 2) Objętość retencji.

a) - całkowita objętość retencji danego składnika  $V_R$ - objętość gazu nośnego potrzebna do wymycia tego składnika, mierzona od momentu wprowadzenia próbki do momentu pojawienia się na chromatogramie maksimum danego piku:

$$V_R = F_o t_R$$

$F_o$ - objętościowa prędkość wypływu gazu nośnego z kolumny (w  $\text{cm}^3/\text{min}$ ), określona w temperaturze i pod ciśnieniem panującym na wylocie kolumny,

b) - martwa (zerowa) objętość retencji  $V_M$ :

$$V_M = F_o t_M$$

c) - zredukowana objętość retencji :

$$V'_R = F_o t'_R \quad \text{czyli} \quad V'_R = V_R - V_M$$

d) - względna objętość retencji:

$$r_{i,w} = \frac{V'_{R_i}}{V'_{R_w}} = \frac{V_{N_i}}{V_{N_w}} = \frac{V_{g_i}}{V_{g_w}} \neq \frac{V_{R_i}}{V_{R_w}}$$

właściwa i względna objętość retencji zależy od temperatury kolumny i współczynnika podziału, a nie zależy od parametrów kolumny.



## Parametry chromatograficzne:

a) współczynnik podziału  $K$ :

$$K = \frac{c_s}{c_m} = \frac{n_s}{V_s} : \frac{n_m}{V_m}$$

Dla gazowej chromatografii podziałowej

$$K = \frac{c_L}{c_G} = \frac{n_L}{V_L} : \frac{n_G}{V_G}$$

gdzie:

$c_L, c_G$  - stężenie substancji chromatografowanej, odpowiednio, w fazie ciekłej (stacjonarnej) i gazowej (mobilnej);

$n_L, n_G$  - liczba moli substancji chromatografowanej, odpowiednio, w fazie ciekłej i gazowej;

$V_L, V_G$  - objętość fazy ciekłej i gazowej w kolumnie.

Często zamiast współczynnika podziału stosuje się wielkość do niej proporcjonalną, zwaną *stosunkiem podziału*  $k'$

$$K = k' \frac{V_m}{V_s}$$

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

b) *stosunek podziału*  $k'$  zwany jest również liczbą podziału lub współczynnikiem pojemności kolumny. B - objętościowy stosunek fazy gazowej i ciekłej w kolumnie ( $\beta = V_G/V_L$ ).

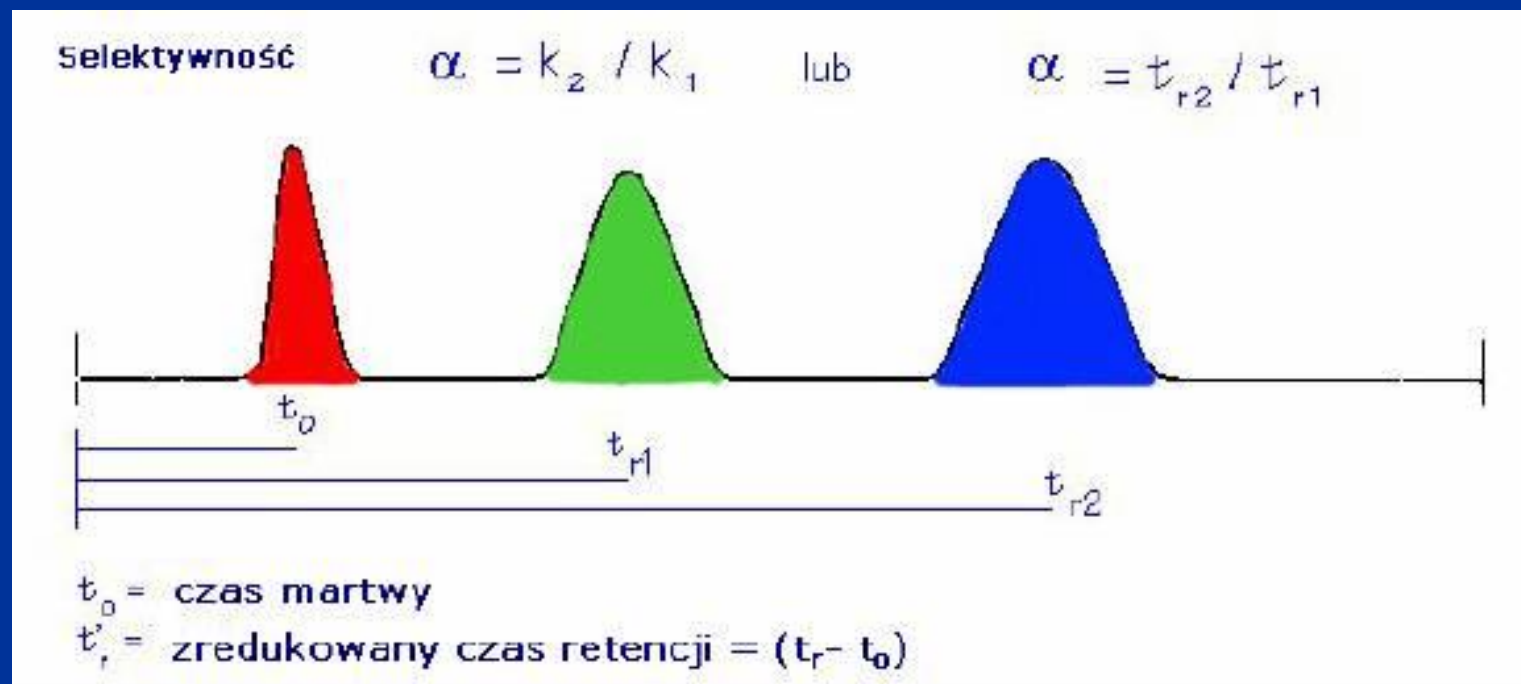
$$k' = K \frac{V_L}{V_G} = \frac{K}{\beta}$$

**Stosunek podziału decyduje o tym, jaki ułamek masy związku chromatografowanego znajdzie się w fazie stacjonarnej, a jaki w fazie ruchomej.**

c) selektywność, współczynnik selektywności  $\alpha, i'$  zwany również stopniem rozdziału S.F. (z j. Angielskiego „Seperation Factor”), określa w sposób ilościowy możliwość rozdzielenia dwóch substancji  $j$  i  $i$ :

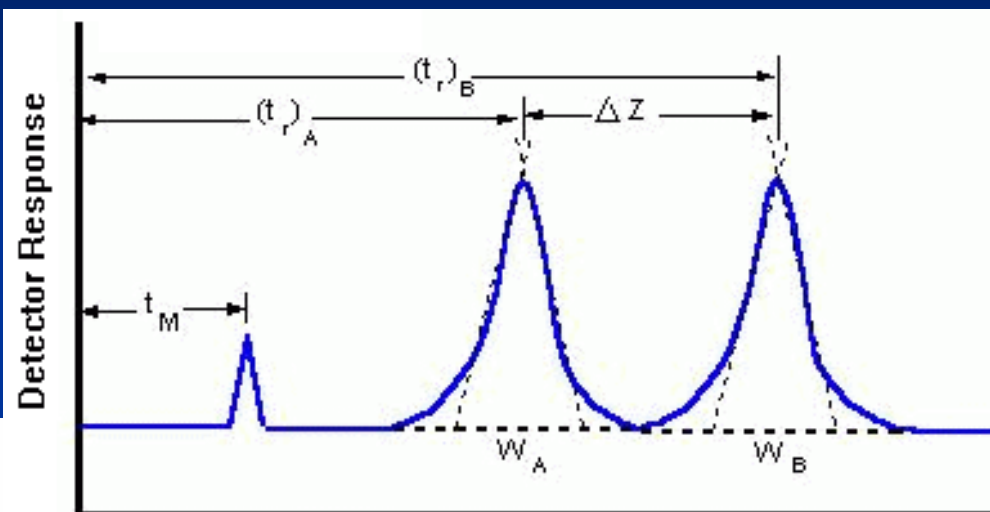
$$\alpha_{j,i} = \frac{K_j}{K_i} = \frac{V'_{Rj}}{V'_{Ri}} = \frac{V_{Nj}}{V_{Ni}}$$

$$\alpha_{j,i} = \frac{k'_j}{k'_i} = \frac{t_{Rj} - t_M}{t_{Ri} - t_M}$$



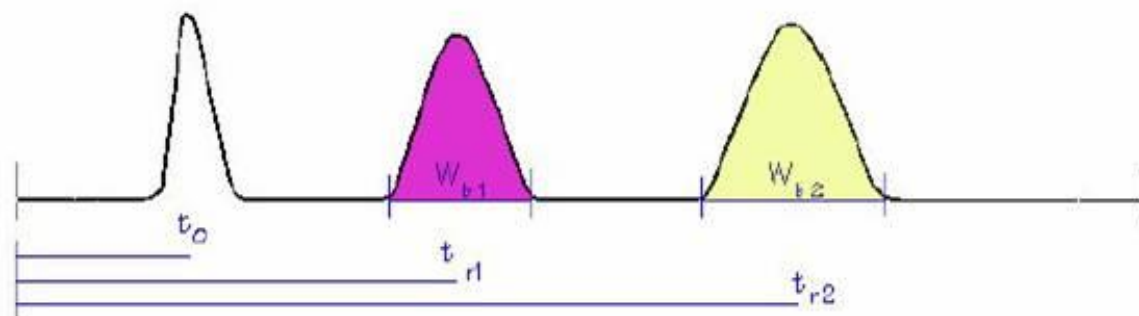
## Rozdzielczość chromatograficzna

Akceptowalny rozdział jest co najmniej  $R_s = 1.0$ , a w praktyce winien być dużo większy.



Rozdzielczość

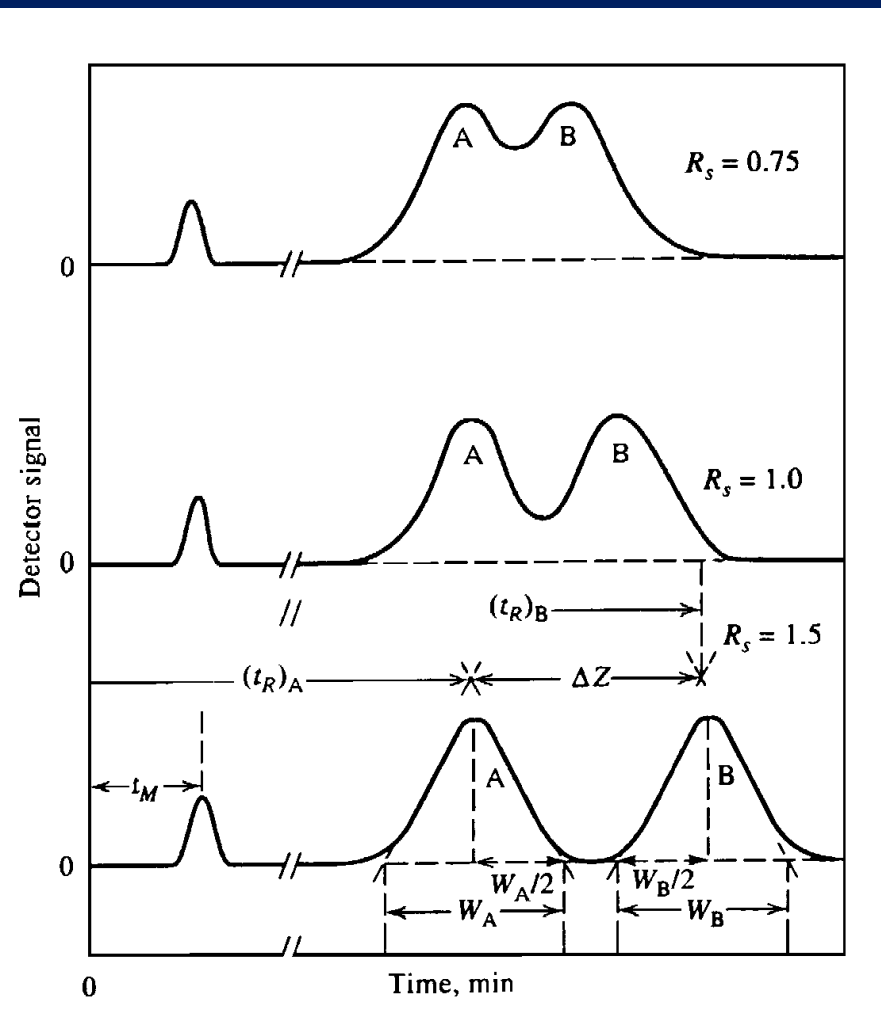
$$R = 2(t'_{r2} - t'_{r1}) / (W_{b1} + W_{b2})$$



$t_0$  = martwy czas retencji  
 $t'_r$  = względny czas retencji =  $(t_r - t_0)$   
 $W_b$  = szerokość piksu w podstawie

$$R_s = \frac{2 \Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2[(t_R)_A - (t_R)_B]}{W_A + W_B}$$

## Rozdzielczość chromatograficzna



$R_s = 0.75 \rightarrow$  niekompletny rozdział

$R_s = 1.0$ , istnieje obszar pokrywania się sygnałów składników

$R_s = 1.5 \rightarrow$  rozdział prawidłowy

**Zazwyczaj konieczny jest kompromis pomiędzy rozdzielczością, a szybkością rozdziału**

## PODSTAWY TEORETYCZNE

### TEORIA PÓŁEK.

Teoria półek opisuje proces zachodzący w kolumnie chromatograficznej w sposób bardzo uproszczony. Wyniki uzyskane za pomocą tej metody należy traktować jako orientacyjne, gdyż odnoszą się do warunków wyidealizowanych. W teorii tej wprowadza się wielkość zwaną wysokością równoważną półce teoretycznej (WRPT). Pod pojęciem półki teoretycznej należy rozumieć część objętości kolumny, w której zostaje osiągnięty stan równowagi między stężeniami substancji chromatografowanej w fazie ruchomej i nieruchomej. Odcinek długości kolumny odpowiadający tej jednostkowej objętości nosi nazwę wysokości równoważnej półce teoretycznej (WRPT).

Kolumna chromatograficzna składa się z N hipotetycznych póltek teoretycznych, czyli:

$$L = NH$$

gdzie: L- długość kolumny, H- wysokość półki teoretycznej.

Liczbę hipotetycznych póltek teoretycznych oblicza się dzieląc długość kolumny przez wysokość półki teoretycznej:

$$N = \frac{L}{H}$$

Po wprowadzeniu substancji na „pierwszą półkę” kolumny ulegnie ona podziałowi między fazę gazową i fazę ciekłą, zgodnie z wartością współczynnika podziału K. Rozkład stężeń substancji chromatografowanej po przejściu przez N kolejnych póltek stanowiących kolumnę opisuje funkcja:

$$y = h \exp \left[ - \frac{(x - m)^2}{2\delta^2} \right]$$

gdzie:

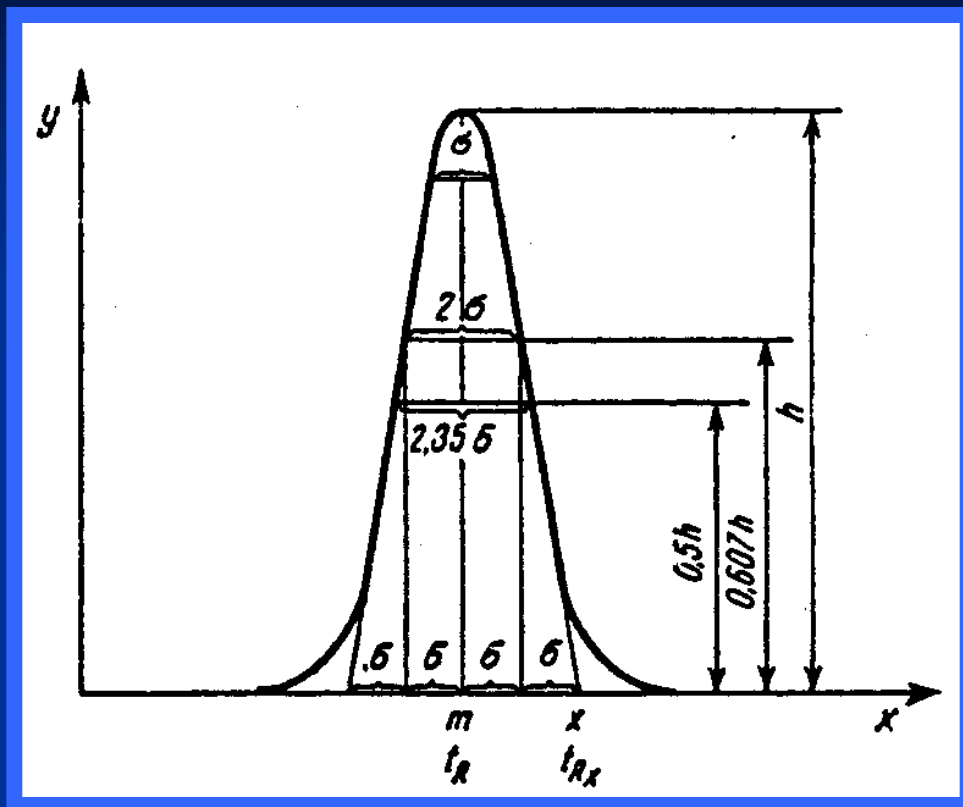
h- wysokość pików,

$\delta$  - parametr kształtu krzywej, zwany odchyleniem standardowym,

m- współczynnik położenia krzywej ( $m = T_R$ ),

x- dowolny czas retencji.

## Wykres krzywej Gaussa i jej charakterystyczne parametry.



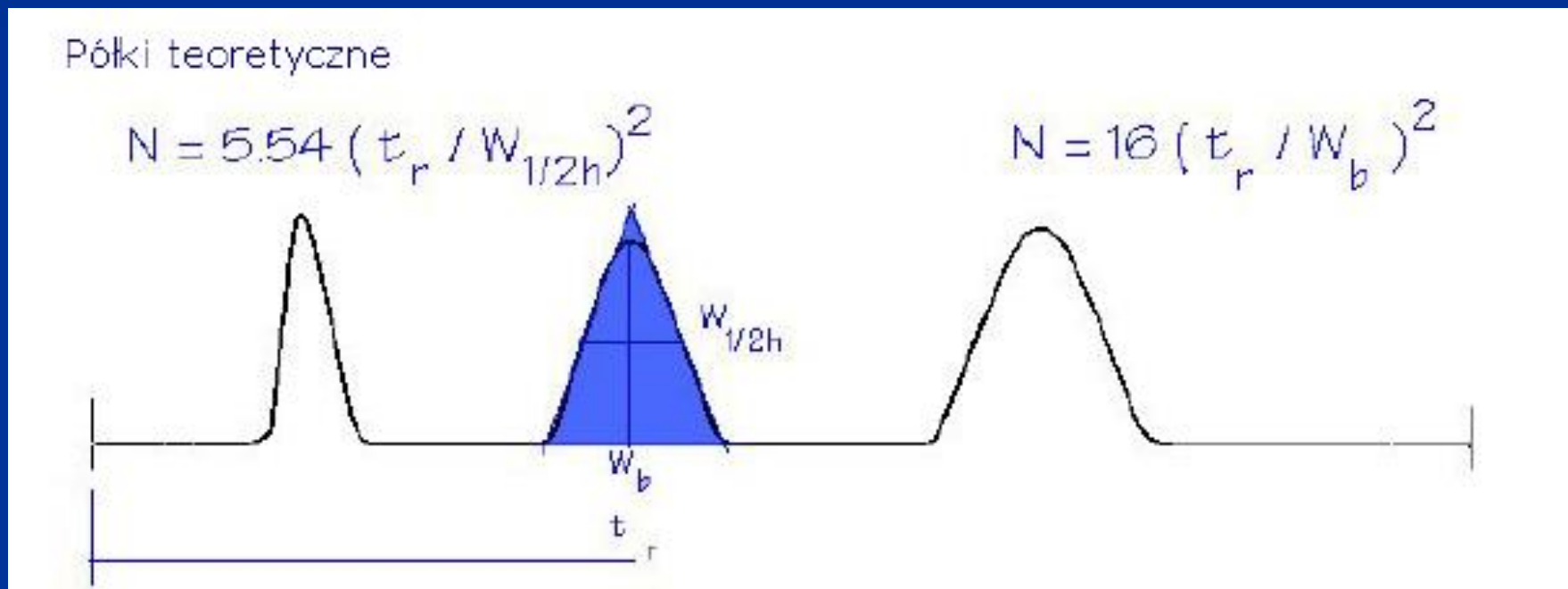
Piki położone w niewielkiej odległości od linii startu mają małe wartości współczynnika  $\delta$ . Ze wzrostem  $x$  wzrasta wartość współczynnika  $\delta$ , co powoduje „rozmywanie” pików. Szerokość piku, wyznaczona na osi odciętych przez styczne, wynosi  $4\delta$ . Między szerokością piku, liczbą półek teoretycznych i czasem retencji istnieje zależność:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{4\delta} \right)^2$$

» Znając liczbę półek teoretycznych danej kolumny chromatograficznej można określić wysokość równoważną półce teoretycznej (WRPT), a tym samym sprawność kolumny. » Duża wartość WRPT wskazuje, że kolumna została źle przygotowana i nie pracuje w warunkach optymalnych. » Teoria półek teoretycznych pozwala obliczyć WRPT lecz nie uwypukla czynników wpływających na jej wartość. Do tych czynników należą między innymi: dyfuzja substancji w fazie gazowej (z półki na półkę), prędkość przepływu gazu nośnego przez kolumnę, opór stawiany przenoszonej masie przez fazę nieruchomą, grubość warstwy fazy nieruchomej. » Efekty te uwzględnia teoria kinetyczna chromatografii gazowej.



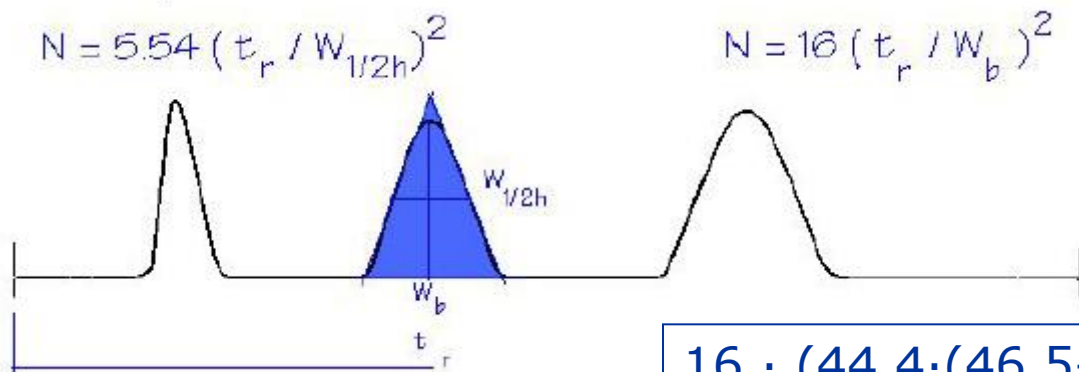
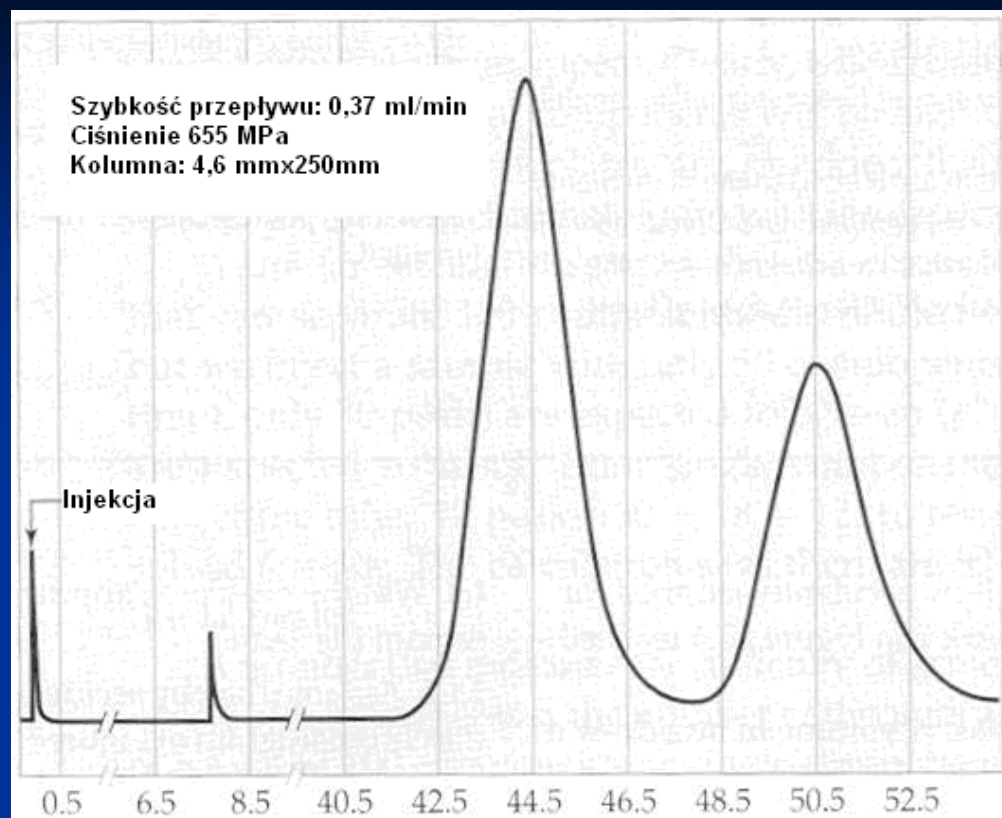
Sposób obliczania liczby pólki teoretycznych na podstawie chromatogramu



## Przykład:

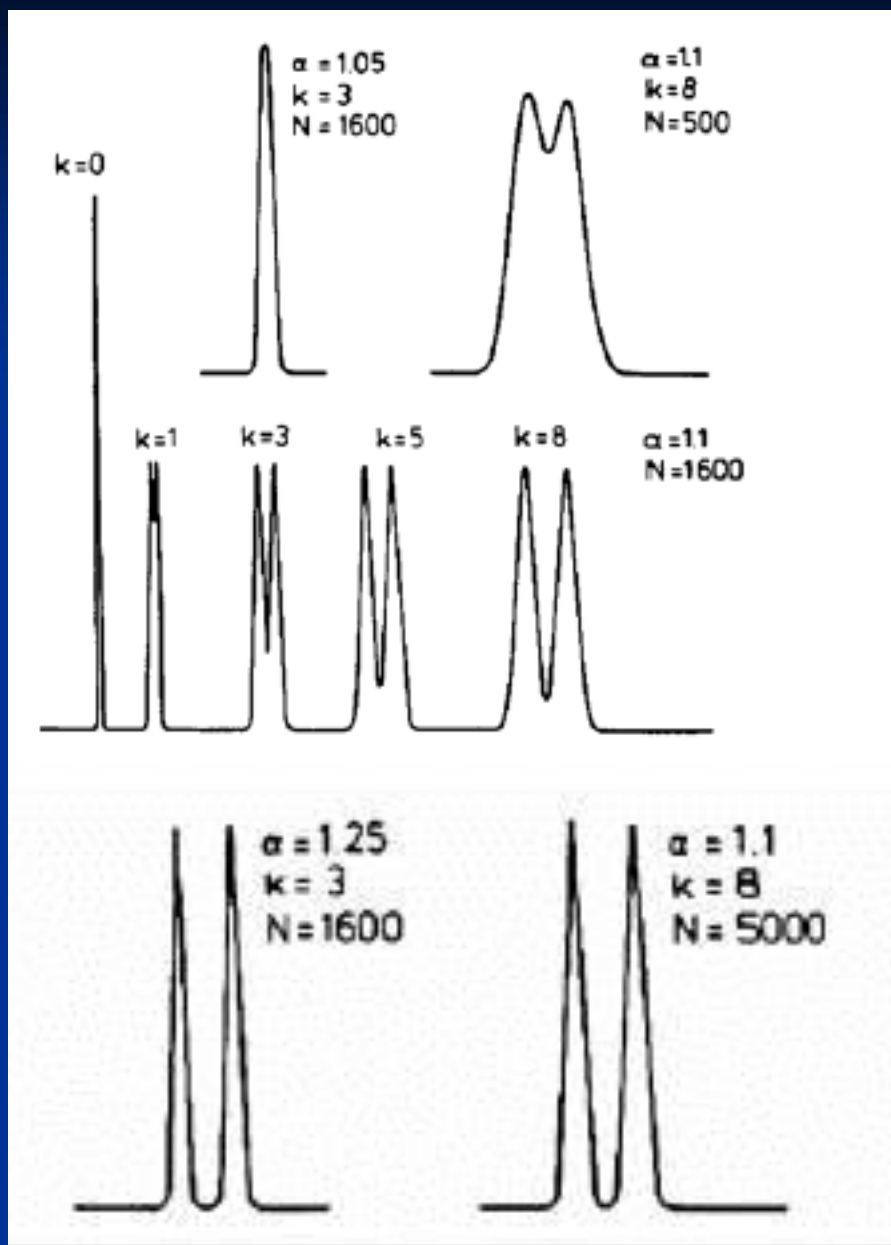
Na podstawie przedstawionego chromatogramu oblicz ilość póltek teoretycznych użytek kolumny.

- A. ok. 500
- B. ok. 1000
- C. ok. 1500
- D. ok. 2000
- E. ok. 2500

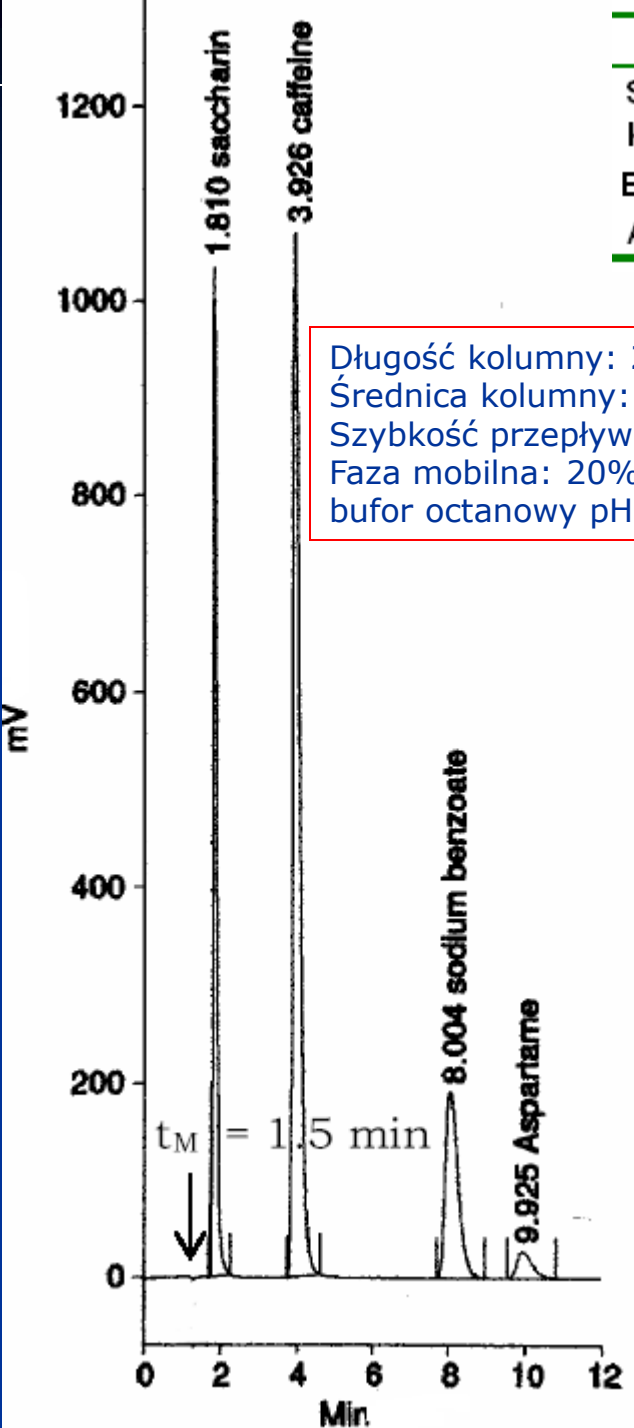


$$16 \cdot (44.4 \cdot (46.5 - 42.5))^2 = 1980$$

**Odp. D**



Korelacja pomiędzy parametrami opisującymi jakość rozdziału:  
**N** - Liczba pól teoretycznych  
**R** - Rozdzielczość  
 $\alpha$  - Selektywność



Długość kolumny: 20cm  
 Średnica kolumny: 2.1 mm  
 Szybkość przepływu: 0.4 ml/min  
 Faza mobilna: 20% metanol +  
 bufor octanowy pH=4.0

	$t_R$ (min)	Powierzchnia	$w_b$ (min)
Sacharyna	1.810	6,909,203	0.169
Kofeina	3.926	13,730,875	0.328
Benzoesan sodu	8.004	4,385,838	0.602
Aspartam	9.925	754,735	0.754

**Na rycinie oraz w powyższej tabeli przedstawiono wynik pewnego rozdzielania chromatograficznego.**

**Oblicz:**

1. liczbę półek teoretycznych dla rozdzielania sacharyny (saccharin) oraz aspartamu (aspartame).
2. liniową szybkość przepływu fazy mobilnej (unoszenia sacharyny)
3. Objętość retencji sacharyny
4. Względny czas retencji sacharyny

**1**  $N = 16(t_R/w_b)^2 = 16(1.81 / 0.169)^2 = 1840$

**2**  $u = L/t_M = 20 \text{ cm} / 1.5 \text{ min} = 13.3 \text{ cm/min}$   
 $u = 0.222 \text{ cm/s}$

**3**  $V_m = (0.40 \text{ mL/min}) (1.5 \text{ min}) = 0.60 \text{ cm}^3$

**4**  $k' = (t_R - t_M) / t_M = (8.004 \text{ min} - 1.5 \text{ min}) / (1.5 \text{ min}) = 4.3$

Parametry pewnego rozdzału chromatograficznego zostały przedstawione w poniższej tabeli. Podaj objętość fazy stacjonarnej rezydującej w kolumnie.

- A. 0.016 cm<sup>3</sup>
- B. 0.16 cm<sup>3</sup>
- C. 1.60 cm<sup>3</sup>
- D. 16.0 cm<sup>3</sup>

	$t_R$ (min)	Powierzchnia	$w_b$ (min)
Sacharyna	1.810	6,909,203	0.169
Kofeina	3.926	13,730,875	0.328
Benzoesan sodu	8.004	4,385,838	0.602
Aspartam	9.925	754,735	0.754

Objętość walca:

**Odp. B**

$$V = \pi r^2 L$$

$$r = ID/2 = 2.1 \text{ mm} / 2 = 1.1 \text{ mm}$$

$$L = 20 \text{ cm}$$

$$V_s = 0.76 \text{ cm}^3 - 0.60 \text{ cm}^3 = 0.16 \text{ cm}^3$$

Długość kolumny: 20cm

Średnica kolumny: 2.1 mm

Szybkość przepływu: 0.4 ml/min

Faza mobilna: 20% metoanol + bufor octanowy pH=4.0

Podaj względny czas retencji dla kofeiny

- A. 0.016
- B. 0.16
- C. 1.60
- D. 16.0

**Odp. C**

$$k' = (t_R - t_M) / t_M = (3.926 \text{ min} - 1.5 \text{ min}) / (1.5 \text{ min}) = 1.6$$

$$r_{i,w} = \frac{t'_{R_i}}{t'_{R_w}}$$

Parametry pewnego rozdzału chromatograficznego zostały przedstawione w poniższej tabeli.

Oblicz współczynnik podziału dla kofeiny.

$$K = k' \frac{V_m}{V_s}$$

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

	$t_R$ (min)	Powierzchnia	$w_b$ (min)
Sacharyna	1.810	6,909,203	0.169
Kofeina	3.926	13,730,875	0.328
Benzoesan sodu	8.004	4,385,838	0.602
Aspartam	9.925	754,735	0.754

Długość kolumny: 20cm  
Średnica kolumny: 2.1 mm  
Szybkość przepływu: 0.4 ml/min  
Faza mobilna: 20% metanol + bufor octanowy pH=4.0

$$V_s = 0.76 \text{ cm}^3 - 0.60 \text{ cm}^3 = 0.16 \text{ cm}^3$$

$$k' = (t_R - t_M) / t_M = (3.926 \text{ min} - 1.5 \text{ min}) / (1.5 \text{ min}) = 1.6$$

$$K = k' V_m / V_s = 1.6 (0.60 \text{ cm}^3 / 0.16 \text{ cm}^3) = 6.0$$

Parametry pewnego rozdzału chromatograficznego zostały przedstawione w poniższej tabeli.

Oblicz współczynnik selektywności rozdzału kofeiny względem sacharyny

	$t_R$ (min)	Powierzchnia	$w_b$ (min)
Sacharyna	1.810	6,909,203	0.169
Kofeina	3.926	13,730,875	0.328
Benzoesan sodu	8.004	4,385,838	0.602
Aspartam	9.925	754,735	0.754

$$\alpha_{j,i} = \frac{k'_j}{k'_i} = \frac{t_{Rj} - t_M}{t_{Ri} - t_M}$$

Współczynnik selektywności kofeiny względem sacharyny

$$\alpha = \frac{3,926 - 1,500}{1,810 - 1,500} = 7,8$$

Długość kolumny: 20cm  
Średnica kolumny: 2.1 mm  
Szybkość przepływu: 0.4 ml/min  
Faza mobilna: 20% metanol + bufor octanowy pH=4.0

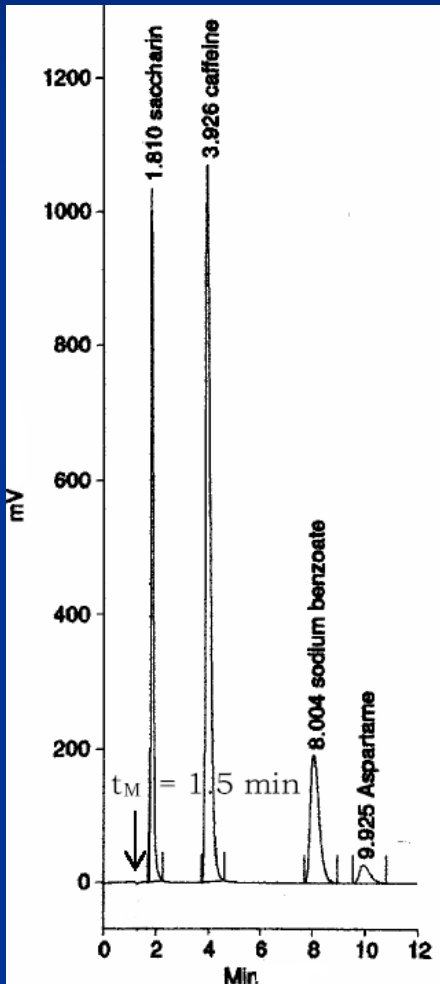
Współczynnik selektywności benzoesanu sodu względem aspartamu

$$\alpha = \frac{9,925 - 1,500}{8,004 - 1,500} = 1,3$$

**Odp. A, C, D, E**

Parametry pewnego rozdzału chromatograficznego zostały przedstawione w poniższej tabeli.  
Oblicz rozdzielczość chromatograficzną rozdzału kofeiny od sacharyny

	$t_R$ (min)	Powierzchnia	$w_b$ (min)
Sacharyna	1.810	6,909,203	0.169
Kofeina	3.926	13,730,875	0.328
Benzoesan sodu	8.004	4,385,838	0.602
Aspartam	9.925	754,735	0.754



$$R_s = \frac{2(t_{R,B} - t_{R,A})}{w_A + w_B}$$

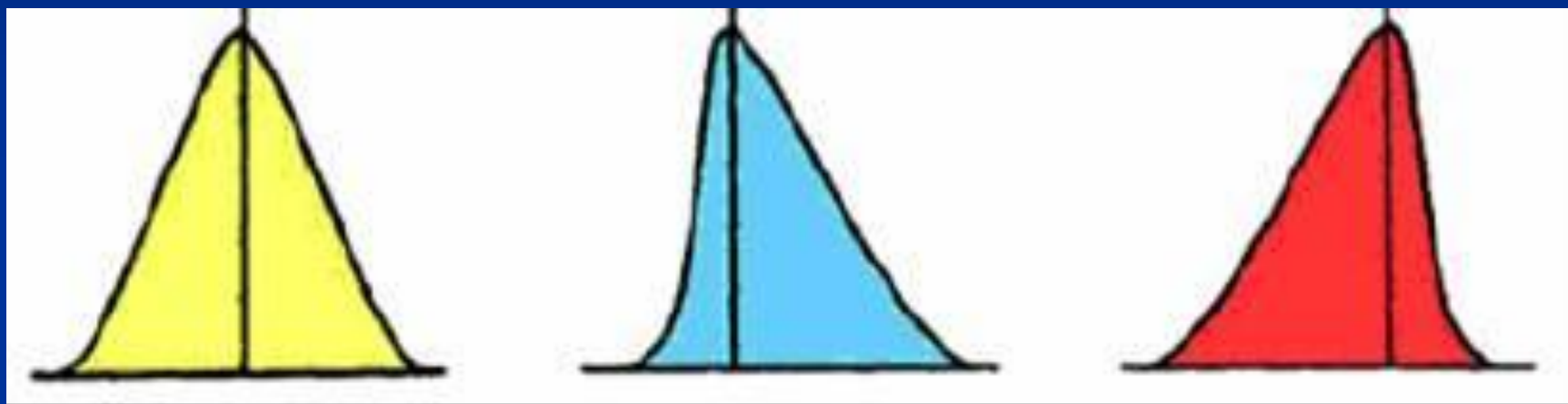
Długość kolumny: 20cm  
Średnica kolumny: 2.1 mm  
Szybkość przepływu: 0.4 ml/min  
Faza mobilna: 20% metanol + bufor octanowy pH=4.0

$$R_s = \frac{2(3,926 - 1,810)}{0,328 + 0,169} = 8,5$$

**Rozdział jest perfekcyjny**



## Rodzaje pików chromatograficznych

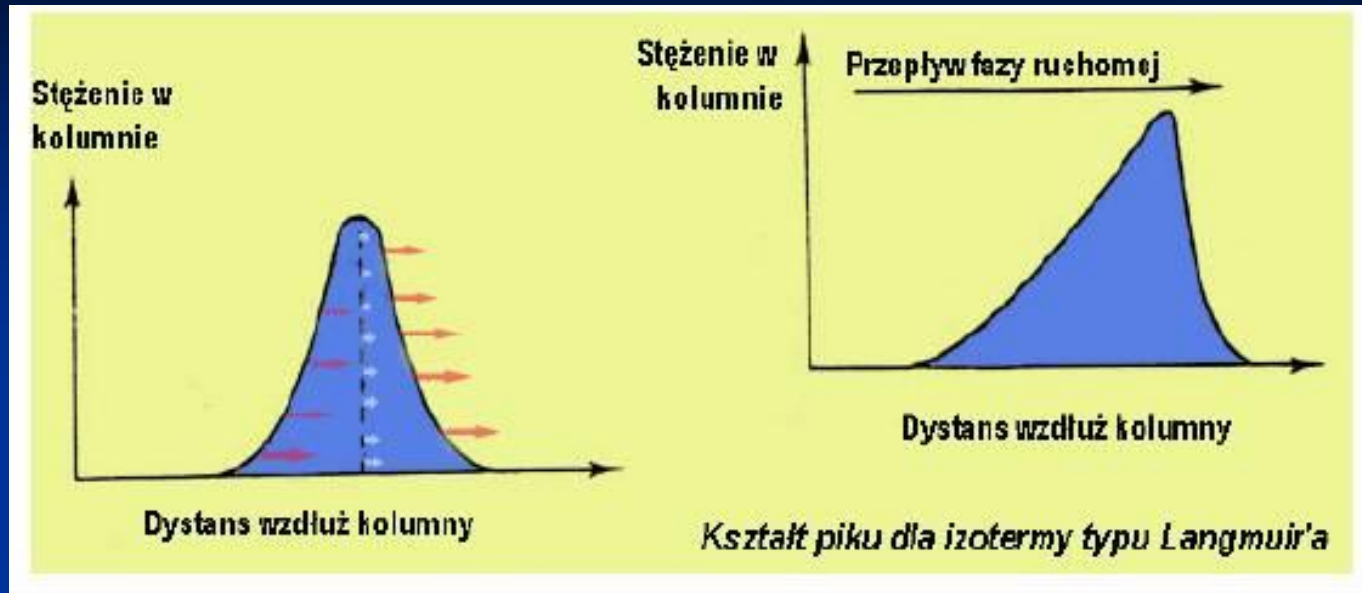


**Gaussowski**

**ogonowanie**

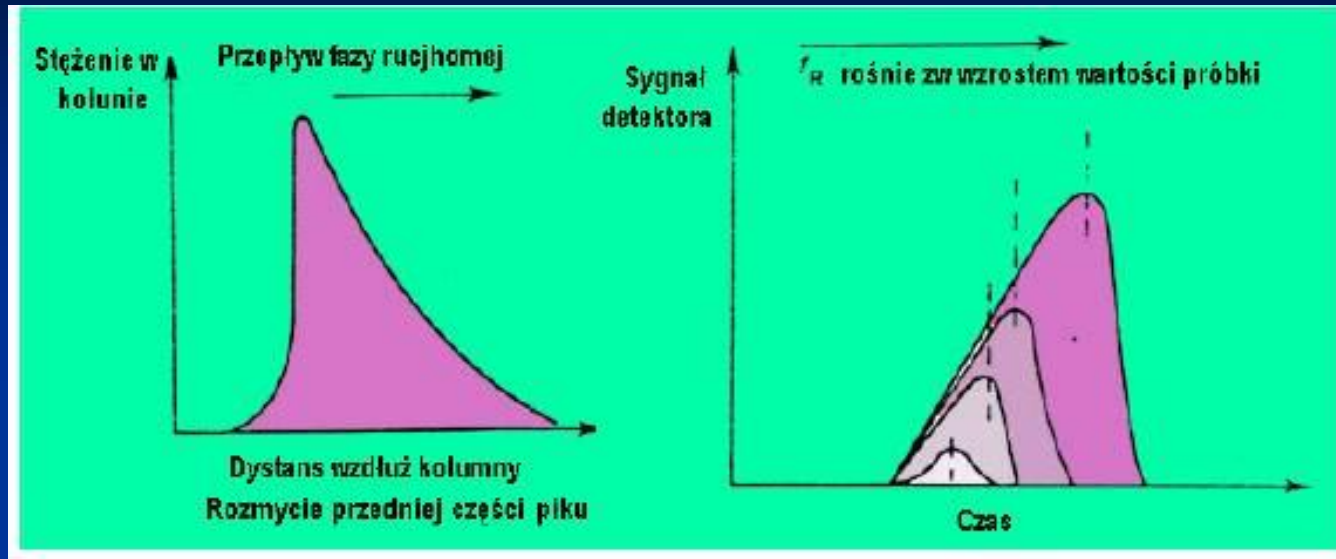
**rozmycie przednie**

## Rodzaje pików chromatograficznych – rozmycie przednie



- W chromatografii adsorpcyjnej, izoterma ma kształt „wypukły” w stosunku do osi  $C_m$  (izoterma typu *Langmuir*).
- Takie zachowanie ma miejsce w wypadku silnych oddziaływań między analizowaną substancją a fazą stacjonarną, ale oddziaływania pomiędzy cząsteczkami fazy mobilnej są stosunkowo słabe.
- Początkowo, ilość substancji zaadsorbowanej przez fazę stacjonarną wzrasta szybko wraz ze wzrostem stężenia w fazie ruchomej, tak długo aż jednocząsteczkowa warstwa substancji uformuje się na adsorbencie.
- Ponieważ oddziaływania pomiędzy cząsteczkami substancji są słabe, przypadki adsorpcji, w których formowane są warstwy jednocząsteczkowe i pewna ilość substancji zostaje zaadsorbowana, pozostają stałe nawet gdy stężenie w fazie ruchomej później wzrasta. Dlatego współczynnik podziału jest wysoki przy niskich wartościach  $C_m$ , ale maleje wraz ze wzrostem  $C_m$ .

## Rodzaje pików chromatograficznych – rozmycie przednie



- W układach podziałowych, izoterma zazwyczaj jest wklęsła do osi  $C_m$  (izoterma typu anty-Langmuira).
- Ten rodzaj izotermy powstaje w wyniku silnych oddziaływań między
- cząsteczkami substancji, a oddziaływania pomiędzy substancją a fazą stacjonarną są słabe. Dlatego, przy niskich stężeniach, rozpuszczalność cząsteczek badanej substancji jest mała i parametr  $K$  ma niską wartość, ale gdy kilka cząsteczek substancji rozpuści się w fazie stacjonarnej, silne oddziaływania substancja / substancja wciągają kolejne cząsteczki do fazy stacjonarnej i  $K$  wzrasta gwałtownie.
- W przypadku izotermy typu anty-Langmuira  $K$  wzrośnie wraz ze wzrostem stężenia w poprzek pasma, więc najniższe będzie na brzegach a najwyższe w centrum pików. Dlatego stosunek przemieszczania się będzie najniższy w centrum a najwyższy na brzegach. Ogon będzie dążył do środka a przód będzie odbiegał od środka przyczyniając się do powstania pików z ostrym ogonem i rozmytym przodem (tj. rozmycie przedniej części pików).

Wpływ wielkości próbki na czas retencji analitów:

A - kolumna nie przeładowana;

B – kolumna lekko przeładowana;

C – kolumna mocno przeładowana;

