

21. ANALIZA INSTRUMENTALNA

Instrumentalna analiza chemiczna powstała dzięki konstruowaniu precyzyjnych aparatów pomiarowych, które pozwalają wykorzystać własności fizykochemiczne związków do ich analizy jakościowo-ilościowej. Spośród różnych technik analizy instrumentalnej omówiono tylko niektóre, podstawowe z zakresu technik optycznych, elektrycznych i chromatograficznych.

ABSORPCJOMETRIA

Iwona Żak, Beata Sarecka

Absorpcjometria jest analityczną techniką optyczną, wykorzystującą zdolność substancji chemicznych będących w roztworze do pochłaniania światła całą swą objętością oraz pomiar natężenia wiązki światła. Cząsteczki związków zdolnych do absorpcji promieniowania świetlnego są układami rezonansowymi, zdolnymi do drgań z częstotliwością zgodną z częstotliwością drgań fal elektromagnetycznych o określonej długości fali. Różne substancje pochłaniają promieniowanie zwykle o odmiennej długości fali, jeśli jednak pochłaniają fale tej samej długości, to z różną intensywnością.

Substancje mogą pochłaniać promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie światła widzialnego (VIS od ang. *visible*), tzn. o długości od 400 do 750 nm (zakres kolorimetrii), lub nadfioletu (UV od ang. *ultra violet*), tzn. o długości od 200 do 400 nm, czy też podczerwieni (IR od ang. *infra red*), obejmującej obszar powyżej 750 nm: podczerwień bliska – zakres długości fal 750–2500 nm; podczerwień – 2,5–25 μm .; podczerwień daleka – powyżej 25 μm do ułamków milimetra. Promieniowanie o długości fal 0,4–200 nm to daleki nadfiolet, który charakteryzuje się tym, że jest pochłaniany przez atomy tlenu, dlatego analizy w spektrofotometrze z tym zakresem wykonuje się po usunięciu z niego powietrza, czyli w próżni.

Źródłem promieniowania mogą być lampy spektralne (np. deuterowe, wodorowe, rtęciowe, sodowe), lasery lub lampy żarowe. Lampy spektralne i lasery dają

widmo liniowe, natomiast lampy żarowe widmo ciągłe. W celu otrzymania określonej długości fali używa się odpowiednich monochromatorów. W monochromatorze znajduje się układ (pryzmat, siatka dyfrakcyjna lub filtry), który przez odpowiednie ustawienie na szczelinę wyjściową pozwala skierować wiązkę promieniowania o żądanej długości fali. Ze szczeliny wyjściowej wiązka monochromatyczna wpada do pomieszczenia pomiarowego, w którym przechodzi przez odpowiednie naczynie (kuwetę) z roztworem zawierającym analizowany związek.

Kuwety powinny być wykonane z materiału przezroczystego dla określonych długości fal. Najpowszechniejszym materiałem przezroczystym jest kwarc, stosowany dla fal o długości: 200–400 nm, 400–750 nm oraz 750–2500 nm. Poza tym, dla fal o długości 400–750 nm stosuje się również wysokojakościowe szkło, a dla dłuższych fal podczerwieni kryształy: NaCl (w zakresie 2,5–15 μm), KBr (do 25 μm), CsBr (w zakresie 25–40 μm) i specjalne gatunki polietylenu przezroczystego dla fal o długości w granicach 15–300 μm .

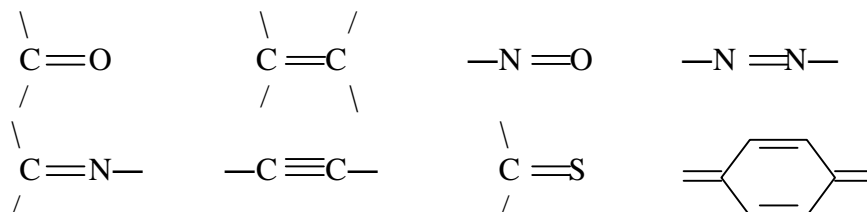
Podstawę kolorymetrycznego oznaczania stężenia substancji w roztworze stanowi zależność między intensywnością zabarwienia roztworu, a stężeniem zawartej w nim substancji. Metoda ta służy do oznaczania stężenia substancji mających własną barwę. Barwa substancji zależy od selektywnej absorpcji określonej długości światła widzialnego i jest barwą dopełniającą do pochłoniętej. Na zabarwienie roztworu składają się fale elektromagnetyczne nie zaabsorbowane przez analizowaną substancję, czyli promieniowanie przepuszczone. Przykładowo, czerwona barwa roztworu substancji może być wynikiem pochłaniania zieleni, która jest barwą dopełniającą do czerwieni lub zdolności analizowanej substancji do przepuszczania wyłącznie promieniowania czerwonego. Podobnie żółta barwa roztworu substancji może być wynikiem pochłaniania fal niebieskich, które są barwą dopełniającą do żółtej lub zdolności analizowanej substancji do przepuszczania wyłącznie promieniowania żółtego.

Roztwory substancji bezbarwnych to takie, w których żaden z rodzajów promieni widzialnych nie ulega pochłonięciu.

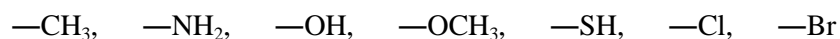
Substancje bezbarwne można oznaczać ilościowo metodą kolorymetryczną, lecz po przeprowadzeniu ich w barwne pochodne na drodze stechiometrycznych reakcji chemicznych, które powinny przebiegać szybko i do końca, powinny być powtarzalne i specyficzne oraz łatwe do przeprowadzenia. Specyficzność reakcji zwykle określa użyty odczynnik barwiący, który powinien reagować tylko z badaną substancją i nie powinien wchodzić w reakcję z żadną inną substancją obecną w roztworze. Powstała barwa powinna być: trwała, niewrażliwa na światło, niepodatna na zmiany pH, niezależna od zmian temperatury i nadmiaru odczynnika barwiącego.

Efekty absorpcji w zakresie światła widzialnego i ultrafioletu obserwuje się w widmach związków zawierających **grupy chromoforowe** oraz ugrupowania

atomów z wielokrotnymi sprzężonymi wiązaniami nienasyconymi. Niektóre z nich przykładowo przedstawiono poniżej.



Na intensywność barwy związku wpływają również podstawniki, zwane **grupami auksochromowymi**, które przykładowo przedstawiono poniżej. Mają one zdolność przesuwania maksimum absorpcji w kierunku fal dłuższych, zjawisko to zwane jest **efektem batochromowym**.



Absorbpcję promieniowania przez roztwory opisuje **prawo Beera**. Natężenie (I_0) wiązki promieniowania, którą przepuści się przez warstwę roztworu substancji pochłaniającej światło, spada do wartości (I), gdy przejdzie przez roztwór. Stosunek I do I_0 nazywa się **transmitancją (T)** lub **przepuszczalnością**, wyrażaną zwykle w procentach promieniowania przechodzącego przez analizowany roztwór:

$$T = \frac{I}{I_0} \qquad T_{\%} = \frac{I}{I_0} \cdot 100$$

Transmitancja może przyjmować wartości od 0 do 100. Wartość T będzie największa (100% przepuszczalności światła), gdy nie będzie absorpcji światła przez roztwór, najmniejsza wartość T (0% przepuszczalności światła) oznacza całkowitą absorpcję promieniowania.

Transmitancja nie jest prostoliniową funkcją stężenia substancji pochłaniającej światło w przeciwieństwie do **absorbancji (A)**, innej wielkości pozwalającej ocenić spadek natężenia wiązki światła po przejściu przez warstwę roztworu substancji pochłaniającej światło. Absorbancja to logarytm odwrotności transmitancji:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot l$$

gdzie:

ϵ – współczynnik absorpcji; c – stężenie roztworu; l – grubość warstwy roztworu absorbującego w cm.

Absorbancja (A), zwana też **ekstynkcją (E)** lub **gęstością optyczną (D)**, równa się logarytmowi stosunku natężenia promieniowania padającego (I_0) do natężenia promieniowania przepuszczonego (I).

Prawo **Bouguera-Lamberta-Beera** stanowi podstawowe prawo absorpcjometrii, zgodnie z którym absorbancja substancji pochłaniającej światło jest wprost proporcjonalna do stężenia i grubości warstwy roztworu, którego matematyczny zapis to: $A = \epsilon \cdot c \cdot l$. Jeśli stężenie roztworu (mol/l) i grubość jego warstwy (w cm) są równe jedności, to wówczas współczynnik absorpcji (ϵ) równa się wartości mierzonej absorbancji, $A = \epsilon$, dlatego nazywa się **molowym współczynnikiem absorpcji**. Dla bardzo wielu substancji bezpośredni pomiar A przy stężeniu 1 mol/l jest niemożliwy, dlatego wartość molowego współczynnika absorpcji oblicza się z pomiaru absorbancji przy stężeniu znacznie niższym, korzystając z zależności:

$$\epsilon = \frac{A}{c \cdot l} [1 / \text{mol} \cdot \text{cm}] \quad \text{to} \quad c = \frac{A}{\epsilon_{[1/\text{mol} \cdot \text{cm}]}}$$

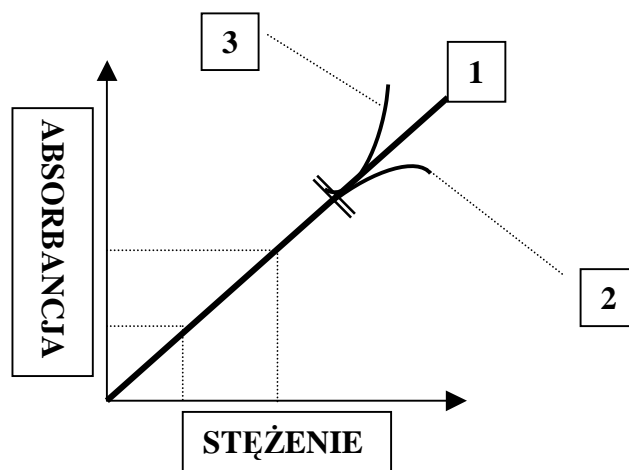
Jeżeli stężenie substancji pochłaniającej promieniowanie jest wyrażone w gramach na litr, wówczas współczynnik nosi nazwę **właściwego współczynnika absorpcji (α)**. Molowy współczynnik absorpcji zależy od długości fali, temperatury i użytego rozpuszczalnika. Im większą wartość ma molowy współczynnik absorpcji danej substancji, tym mniejszą ilość tej substancji można oznaczyć kolorymetrycznie.

Znając wartość molowego współczynnika absorpcji analizowanej substancji i absorbancję roztworu o nieznanym stężeniu tej substancji można obliczyć jej stężenie (wyrażone w mol/l) na podstawie matematycznego zapisu prawa Bouguera-Lamberta-Beera, jednak obliczenia takie stosuje się rzadko, zwykle odczytuje się je ze sporządzonego wykresu kalibracyjnego.

W celu stwierdzenia, czy dana substancja pochłania promieniowanie w danym zakresie długości fal, należy dokonać pomiarów absorbancji dla każdej długości fali z tego zakresu. Z otrzymanych pomiarów sporządza się wykres zależności absorbancji od długości fali, który jest charakterystycznym dla danej substancji **widmem absorpcyjnym**, w danym zakresie długości fal. Na widmie znajduje się maksymalna wartość absorbancji dla określonej długości fali, przy której następnie dokonuje się pomiarów absorbancji roztworów wzorcowych i badanych danej substancji. Jeżeli substancja nie pochłania światła w danym zakresie długości fal, wartości absorbancji są równe lub bliskie zeru.

Największą zaletą absorbancji jest jej wprost proporcjonalna zależność od stężenia. Wykres tej zależności w dostatecznie szerokim zakresie ma kształt krzywej logarytmicznej. W początkowym odcinku każdej pojedynczej wartości absorbancji można przyporządkować tylko jedną wartość stężenia. W miarę, jak wykres

staje się asymptotą krzywej, niemożliwe okazuje się przyporządkowanie pojedynczej wartości absorpcji tylko jednego stężenia, bo w miarę postępu krzywej, jednej wartości absorpcji można przyporządkować nieskończenie wiele stężeń.



Prawo Bouguera-Lamberta-Beera stosuje się tylko do początkowego odcinka wykresu zależności absorpcji do stężenia. Jest on prostoliniowy i nazywa się **wykresem kalibracyjnym (1)**, z którego można odczytać szukane stężenie roztworu po zmierzeniu wartości jego absorpcji. W wykresie kalibracyjnym mogą zdarzać się odchylenia od prostoliniowej zależności, mianowicie: **ujemne (2)** – gdy absorpcja zwiększa się wolniej wraz ze zwiększaniem stężenia, niż wynikałoby to z proporcjonalnej zależności, lub **dodatnie (3)** – gdy absorpcja zwiększa się znacznie wraz ze zwiększaniem stężenia, niż wynikałoby to z proporcjonalnej zależności. Przyczynami odchyłeń od prawa Lamberta-Beera mogą być takie zjawiska, jak: dimeryzacja, dysocjacja lub asocjacja, które mogą wpływać na własności optyczne substancji oraz zależą od stężenia. Wykres kalibracyjny wykorzystuje się w zakresie prostoliniowej zależności.

Ponadto, stężenie substancji, spełniającej prawo Bouguera-Lamberta-Beera w zakresie stężeń, dla których zależność absorpcji od stężenia jest prostoliniowa, można oznaczyć bez sporządzania wykresu kalibracyjnego. W tym celu mierzy się wartość absorpcji roztworu analizowanej substancji o znanym stężeniu (wzorzec) oraz roztworu analizowanego o nieznanym stężeniu. Stężenie oznaczane oblicza się po przekształceniu następującej proporcji:

$$A_w : A_x = c_w : c_x \quad c_x = c_w \cdot A_x / A_w$$

gdzie:

A_w – absorpcja roztworu o znanym stężeniu (wzorca); A_x – absorpcja roztworu analizowanego o nieznanym stężeniu; c_w – stężenie znane, wzorca; c_x – stężenie oznaczane

Aparaty służące do pomiaru absorbancji to absorpcjometry. Stężenie związków barwnych oceniano pierwotnie przez intensywność zabarwienia, czyli koloru, stąd wywodzi się wciąż używana nazwa **kolorymetria**, odnosząca się do absorpcjometrii w świetle widzialnym. Przyrządem służącym do tego typu pomiarów jest **kolorymetr**, który można traktować jako uproszczony spektrofotometr.

Przyrządy stosowane do pomiaru absorpcji promieniowania można najogólniej podzielić na:

1) fotokolorymetry – w których światło monochromatyczne uzyskuje się przez specjalne filtry świetlne;

2) spektrofotometry – zawierające pryzmaty lub siatki dyfrakcyjne do uzyskiwania monochromatyzacji światła.

Na ogólny schemat budowy tych aparatów składa się: a) źródło światła, b) regulator natężenia wiązki promieniowania, c) monochromatory, d) pojemnik na roztwór badany, e) detektor, f) wskaźnik pomiaru.

Przy pomiarze absorbancji pierwszą czynnością, jaką należy wykonać jest nastawienie aparatu na wymaganą długość fali. Następnie trzeba przepuścić wiązkę światła monochromatycznego (przy ustawieniu wskaźnika cyfrowego na 100% przepuszczalności) przez kuwetę zawierającą roztwór porównawczy (np. woda lub używany rozpuszczalnik) bądź tzw. próbę ślepa (jest to roztwór o takim samym składzie i pH, jak roztwór badany, nie zawierający jednak oznaczanego składnika). Jest to podstawowa zasada oznaczeń absorpcjometrycznych, pozwalająca na wyeliminowanie wpływu odczynników i zawartych w nich zanieczyszczeń na ostateczny wynik pomiaru. Kolejny etap to przełączenie wskaźnika cyfrowego na absorbancję, która powinna wynosić 0,00. Dopiero po wyzerowaniu aparatu na próbie ślepej można odczytać absorbancję roztworu badanego, umieszczonego w identycznej kuwecie.

Metody kolorymetryczne należą do najłatwiejszych i najszybszych metod analitycznych, są uniwersalne, dokładne i czułe.

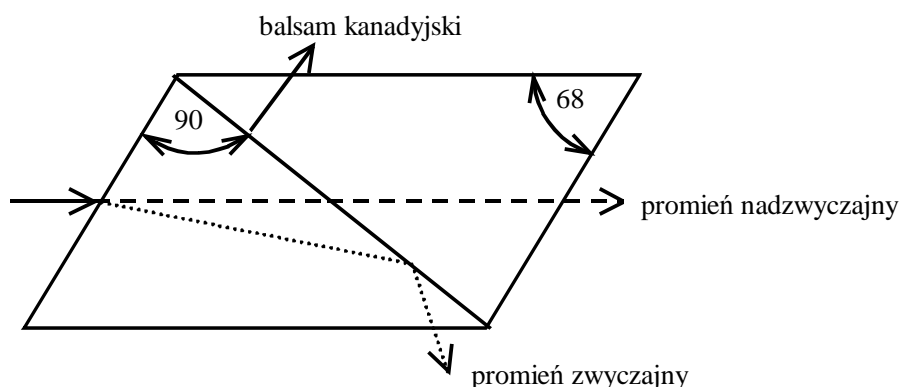
POLARYMETRIA

Iwona Żak, Izabela Szotysek-Bołdys

Polarymetria to technika analityczna, która wykorzystuje zjawisko skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego do wykrywania lub oznaczania stężenia substancji optycznie czynnej, m.in. w analizie środków leczniczych. Przyrządem służącym do oznaczania kąta skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego jest **polarymetr**. Wiązkę światła liniowo spolaryzowanego otrzymuje się po przepuszczeniu

czeniu wiązki światła monochromatycznego (lampy sodowej) przez **pryzmat Ni-
cola (nikol)**.

Pryzmat Nicola to dwułamny kryształ szpatu islandzkiego (krystaliczny CaCO_3), który szlifuje się pod kątem 68° , przecina wzdłuż przekątnej, po czym obie połówki skleja balsamem kanadyjskim o współczynniku załamania równym 1,54; główny przekrój jest płaszczyzną polaryzacji pryzmatu.



Schemat działania pryzmatu Nicola

Wchodzący do pryzmatu Nicola promień światła rozszczepia się na dwa promienie: zwyczajny i nadzwyczajny. **Promień zwyczajny** pada na warstwę balsamu kanadyjskiego pod kątem większym od granicznego, dlatego ulega odbiciu i wygaszeniu, **promień nadzwyczajny** zaś pod kątem mniejszym od granicznego, dlatego przechodzi bez zmian.

Spolaryzowane promienie nadzwyczajne po opuszczeniu pryzmatu Nicola będą dalej w tym samym kierunku, co promienie padające na ten pryzmat. Zatem pryzmat Nicola przepuszcza drgania fali elektromagnetycznej tylko w jednej płaszczyźnie, natomiast wygasa drgania w innych płaszczyznach.

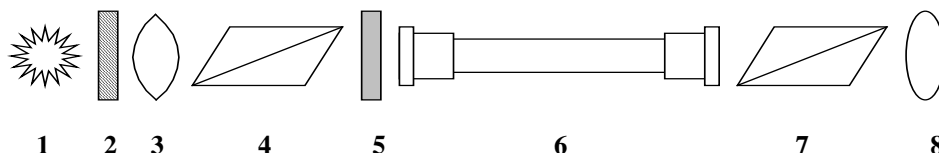
Po przepuszczeniu światła monochromatycznego przez dwa pryzmaty Nicola, ustawione jeden za drugim, natężenie światła spolaryzowanego zależy od ustawienia drugiego.

Światło spolaryzowane wykazuje maksymalne natężenie, gdy płaszczyzny polaryzacji obu pryzmatów Nicola są do siebie ustawione równolegle. W przypadku, gdy jeden zostanie obrócony wokół swej osi można obserwować coraz większe zaciemnienie w polu widzenia, tj. wygaszanie światła wychodzącego z polarymetru.

Maksymalne zaciemnienie, czyli wygaszenie światła ma miejsce, gdy kąt obrotu pryzmatu Nicola osiągnie 90° , wówczas płaszczyzny polaryzacji (główne przekroje) obu pryzmatów są do siebie prostopadłe (skrzyżowane). W takim ułoże-

niu drugi pryzmat Nicola nie przepuszcza wiązki światła spolaryzowanego wychodzącego z pierwszego. Wiązka odbija się od warstwy balsamu w drugim pryzmacie i dalej biegnie jako wiązka promieni zwyczajnych.

Schemat budowy polarymetru



gdzie:

1 – źródło światła; 2 – filtr żółty dający światło monochromatyczne; 3 – soczewka dająca wiązkę promieni równoległych; 4 – polaryzator; 5 – płytka kwarcowa; 6 – rurka polarymetru; 7 – analizator; 8 – okular

W polarymetrach pierwszy pryzmat Nicola jest nieruchomy i nosi nazwę **polaryzatora**, ponieważ służy do wytwarzania wiązki światła spolaryzowanego. Drugi to **analizator**, który jest ruchomy wokół osi optycznej i sprzężony ze skalą kątową, służącą do odczytu wielkości kąta skręcenia.

Zasada działania polarymetru opiera się na tym, że jeśli między pryzmatami Nicola (skrzyżowane) umieści się substancję optycznie czynną, która skręca płaszczyznę światła spolaryzowanego o kąt α , to pole widzenia w okularze rozjaśni się proporcjonalnie do stężenia tego związku.

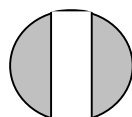
W celu osiągnięcia pierwotnego zaciemnienia należy obrócić analizator dokładnie o kąt α . W przypadku jednych związków optycznie czynnych, analizator należy obrócić w prawo (substancje prawoskrętne), w przypadku drugich w lewo (substancje lewoskrętne). Kąt skręcenia odczytuje się na skali kątowej z dokładnością do $0,05^\circ$ za pomocą noniusza.

Najczęściej używane są polarymetry półcieniowe: dwucieniowe (dwupolowe) lub trójcieniowe (trójpolowe), które umożliwiają porównanie natężenia światła opuszczającego polaryzator z natężeniem światła przechodzącego przez analizator. W polarymetrach tych część wiązki światła przepuszcza się przez dodatkowy pryzmat lub płytkę kwarcową, które rozdzielają pole widzenia w okularze. Dzięki temu w okularze może ukazać się jednocześnie pole maksymalnie jasne obok pola ciemniejszego.

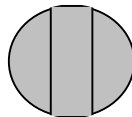
Polarymetr jest tak uregulowany, że jeśli w rurce polarymetru nie ma substancji optycznie czynnej i zerowa kreska podziałki kątowej pokrywa się z zerową kreską podziałki noniusza, wtedy wszystkie części pola widzenia w okularze są jednolicie szaro oświetlone (wygaszone), tak jak w pozycji „b” na rysunku, przedstawiającym rodzaje pól widzenia w polarymetrze.

Jeśli w rurce polarymetrycznej umieści się substancję optycznie czynną lewoskrętną, wówczas pojawi się pasek jasny w środkowej części pola widzenia, któremu towarzyszą po bokach pola ciemne, tak jak w pozycji „a” na rysunku.

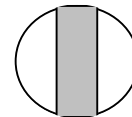
Rodzaje pól widzenia w polarymetrze



a
lewoskrętna
substancja



b
wygaszenie całkowite



c
prawoskrętna
substancja

Jeżeli w rurce polarymetrycznej umieści się substancję prawoskrętną, wówczas pojawia się pasek ciemny w środkowej części pola widzenia, któremu towarzyszą po bokach pola jasne, tak jak w pozycji „c” na rysunku.

Podstawą polarymetrii jest zależność wyrażona wzorem:

$$\alpha = [\alpha]^D \cdot c \cdot l$$

gdzie:

α – zmierzony kąt skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego; $[\alpha]^D$ – skręcalność właściwa; c – stężenie związku optycznie czynnego, w g/ml roztworu; l – grubość warstwy roztworu, przez którą przechodzi wiązka światła spolaryzowanego, w dm

Wartość mierzonego kąta skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego przez związek optycznie czynny zależy od stężenia substancji, od grubości warstwy roztworu tej substancji, przez którą przechodzi światło spolaryzowane oraz od rodzaju substancji, jej budowy, ilości i rozmieszczenia jej centrów chiralności. Daną substancję optycznie czynną charakteryzuje wartość skręcalności właściwej.

Skręcalność właściwa danej substancji to kąt, o jaki skręcałaby płaszczyznę światła spolaryzowanego jednodecymetrowa warstwa roztworu danej substancji o stężeniu 1g/ml. Jej wartość zależy od długości fali promieni spolaryzowanych, temperatury i rodzaju rozpuszczalnika, dlatego przy zapisie wartości skręcalności właściwej podaje się te parametry:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{c(\text{g/ml}) \cdot l(\text{dm})}$$

gdzie:

$[\alpha]_D^{20}$ – skręcalność właściwa rozpuszczonej substancji wyrażona w stopniach; indeks górny ²⁰ oznacza temperaturę pomiaru; indeks dolny „D” – światło monochromatyczne, czyli linia D lampy sodowej (589,3 nm); α – zmierzony kąt skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego wyrażony w stopniach; c – stężenie roztworu wyrażone w g/ml; l – grubość warstwy roztworu, wyrażona w dm, przez którą przechodzi światło spolaryzowane.

Po dokonaniu pomiaru kąta skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego przez substancję o znanej wartości skręcalności właściwej można określić jej stężenie, wyrażone w g/ml, na podstawie matematycznej zależności:

$$c = \frac{\alpha}{[\alpha]_D^{20} \cdot l(\text{dm})}$$

W technice polarymetrii stężenie wyznacza się z pomiaru kąta skręcenia na podstawie prostej matematycznej zależności, której warunki stosowania można łatwo zapewnić. Związek między stężeniem a odpowiadającym mu kątem skręcenia wyznacza wartość skręcalności właściwej, którą odczytać można z odpowiednich zestawień tabelarycznych w poradnikach fizykochemicznych.

Iloczyn skręcalności właściwej i masy molowej (M) podzielony przez 100 określa się jako skręcalność molowa $[\Phi]$:

$$[\Phi] = \frac{[\alpha] \cdot M}{100}$$

Pozwala ona na porównywanie zdolności do skręcania światła spolaryzowanego w skali molowej. Ponieważ wartość iloczynu skręcalności właściwej i masy molowej byłaby liczbą zbyt dużą, niewygodną w użyciu, została podzielona przez 100.

CHROMATOGRAFIA

Iwona Żak

Chromatografia jest metodą służącą do rozdzielania mieszanin substancji, w której wykorzystywane są różne fizykochemiczne oddziaływania rozdzielanych substancji z dwoma fazami: ruchomą i nieruchomą. Fazą nieruchomą może być

ciało stałe (w chromatografii adsorpcyjnej) lub ciecz, unieruchomiona w stałym nośniku (w chromatografii podziałowej), fazą ruchomą bywa ciecz lub gaz.

Chromatografia adsorpcyjna

W chromatografii adsorpcyjnej wykorzystuje się zjawisko adsorpcji, które jest następstwem cząsteczkowych oddziaływań dyspersyjnych, tworzenia się słabych wiązań chemicznych, wodorowych, doprowadzających do nagromadzenia się substancji rozpuszczonej na powierzchni ciała stałego, zwanego adsorbentem. Wielkość adsorpcji określa się stosunkiem ilości masy substancji zaadsorbowanej, zwanej adsorbatem, przypadającej na jednostkę masy adsorbenta. Wielkość ta zależy od temperatury oraz rodzaju adsorbentu i adsorbenta. Adsorbentami mogą być: żel skrobiowy, sacharoza, węgiel wapniowy, fosforan wapniowy, fosforan magnezowy, tlenek magnezowy, żel krzemionkowy, węgiel aktywny i inne. Adsorbenty można podzielić na dwie zasadnicze grupy, tj. polarne, np. żel krzemionkowy, i niepolarne, np. węgiel aktywny. Fazą ruchomą używaną do elucji są zwykle ciekłe związki organiczne o różnych stopniach polarności, od węglowodorów po alkohole i kwasy organiczne. Moc elucyjną poszczególnych rozpuszczalników można określić, wyznaczając wartość współczynnika R_f (*rate of flow* – szybkość przepływu) dla substancji testowanej, zachowując jednakowe warunki doświadczalne (te same: adsorbent, adsorbat i temperatura).

$$R_f = \frac{\text{DROGA PRZEBYTA PRZEZ SUBSTANCJĘ}}{\text{DROGA PRZEBYTA PRZEZ ROZPUSZCZALNIK}}$$

R_f jest to stosunek odległości przebytej przez migrującą substancję do odległości przebytej przez czoło rozpuszczalnika w tym samym czasie.

W chromatografii adsorpcyjnej rozdzielenie mieszaniny substancji odbywa się głównie dzięki różnicom w ich adsorpcji przez adsorbent. Substancje słabiej adsorbowane przez adsorbent są wymywane przez rozpuszczalnik wcześniej. Natomiast silniej adsorbowane przez adsorbent pozostają z nim związane. Czasami dla ich wymycia z adsorbentu należy zastosować wiele rozpuszczalników o rosnącej mocy eluowania (zdolności wymywania) lub elucję gradientową, polegającą na ciągłym zwiększaniu mocy rozpuszczalnika wymywającego.

Chromatografia podziałowa

W chromatografii podziałowej rozdzielenie mieszaniny opiera się na różnej rozpuszczalności jej związków w dwóch nie mieszających się rozpuszczalnikach. Jeden z rozpuszczalników, unieruchomiony na nośniku, stanowi fazę nieruchomą, natomiast drugi przemieszcza się względem pierwszego i stanowi fazę ruchomą. Rozdzielane substancje dzielą się pomiędzy fazę ruchomą i nieruchomą zgodnie

z ich rozpuszczalnością w tych fazach. Substancje, które lepiej rozpuszczają się w fazie nieruchomej, migrują wolniej i to właśnie prowadzi do rozdziału. Na podstawie polarności poszczególnych faz wyróżniamy:

- ⇒ chromatografię podziałową zwykłą, w której fazą nieruchomą jest woda (lub roztwór buforowy albo rozpuszczalnik organiczny nasycony wodą) osadzona na nieaktywnym nośniku (np. bibuła), a fazą ruchomą jest rozpuszczalnik organiczny;
- ⇒ chromatografię podziałową z fazą nieruchomą, mniej polarną od wody, np. hydrofilny rozpuszczalnik organiczny nie mieszający się z fazą ruchomą;
- ⇒ chromatografię podziałową z odwróconymi fazami, w której nośnik jest silnie hydrofobowy i utrzymuje nieruchomą fazę organiczną. Zróżnicowanie szybkości wędrowania składników rozdzielanej mieszaniny wynika z różnych wartości współczynników podziału dla poszczególnych składników.

Współczynnik podziału substancji (k) jest to stosunek stężenia substancji rozpuszczonej w fazie ruchomej do jej stężenia w fazie nieruchomej, który w stanie równowagi i w danej temperaturze ma wielkość stałą.

$$k = \frac{\text{STĘŻENIE W FAZIE RUCHOWEJ}}{\text{STĘŻENIE W FAZIE NIERUCHOMEJ}}$$

Najszybciej wędrują składniki posiadające największą wartość współczynnika podziału. Podczas chromatografii podziałowej, poza podziałem składników między dwie fazy ciekłe, często mają miejsce zjawiska związane w mniejszym lub większym stopniu z adsorpcją składników z nośnikiem. Siły adsorpcji hamują ruch podczas procesu chromatograficznego.

Rozdzielane substancje w danych warunkach chromatograficznych charakteryzuje różna szybkość wędrowania, określona współczynnikiem R_f .

Substancje, które mają identyczne wartości współczynników R_f , nie mogą być rozdzielone w danych warunkach chromatograficznych.

Jeśli substancja ma współczynnik szybkości przepływu $R_f = 1$, to oznacza, że wędruje ona wraz z czołem rozpuszczalnika, czyli jest bardzo dobrze rozpuszczalna w fazie ruchomej, a nierozpuszczalna w fazie nieruchomej.

Jeżeli natomiast substancja ma wartość $R_f = 0$, to oznacza, że substancja ta jest na tyle słabo rozpuszczalna w fazie ruchomej, że pozostała na linii startowej, nie będąc w stanie migrować.

W chromatografii podziałowej najczęściej stosowanymi technikami są chromatografie: bibułowa, kolumnowa i cienkowarstwowa.

W chromatografii bibułowej nośnikiem fazy nieruchomej jest bibuła, w której kierunek włókien celulozowych może czasami mieć niekorzystny wpływ na zdolność rozdzielczą tego nośnika.

W chromatografii kolumnowej lub cienkowarstwowej nośnikami są żele krzemionkowe, celulozowe, ziemia okrzemkowa i inne obojętne, porowate materiały, które albo wypełniają kolumny, albo naniesione są w postaci cienkiej warstwy na płytkach szklanych lub plastikowych. Wymienione nośniki są hydrofilowe, dlatego faza na nich unieruchomiona jest zawsze polarna, najczęściej woda lub wodne roztwory metanolu, kwasu octowego, buforów i inne. Jako faz ruchomych używa się rozpuszczalników organicznych lub ich mieszanin, niekiedy z dodatkiem polarnych substancji, np. kwasu octowego. Nośniki o charakterze hydrofobowym (np. celulozy acetylowane lub kauczuk w obecności benzenu lub chloroformu) wykorzystuje się w chromatografii podziałowej z odwróconymi fazami, gdzie stosuje się niepolarną fazę nieruchomą.

W chromatografii kolumnowej na pionowo ustawioną kolumnę, wypełnioną nośnikiem zrównoważonym fazą nieruchomą, nanosi się roztwór mieszaniny przeznaczonej do rozdzielania, który wnika w kolumnę. Składniki mieszaniny, głównie dzięki różnym współczynnikom podziału, wędrują z różną prędkością wraz z fazą ruchomą. Wymywane z kolumny poszczególne składniki mieszaniny zbierane są do probówek znajdujących się w kolektorze frakcji, automatycznie przesuwającym probówki, zależnie od nastawionego przedziału czasowego lub objętości zbieranej frakcji.

W chromatografii bibułowej i cienkowarstwowej wyróżniamy dwie podstawowe techniki: chromatografię wstępującą i zstępującą. W tej pierwszej faza ruchoma wraz z rozdzielanymi substancjami wędrują wskutek sił kapilarnych warstwy nośnika. W technice zstępującej faza ruchoma wraz z rozdzielanymi substancjami wędrują wskutek sił ciężkości.

Po zakończeniu migracji na chromatogramie należy uwidocznić i zidentyfikować rozdzielone związki, jeśli nie są one barwne. Właściwe użycie wzorców, odpowiednich odczynników identyfikujących i metod fizykochemicznych wraz z pomiarem wartości R_f pozwala na rozpoznanie substancji tworzących plamki na chromatogramie. Sposób wywołania chromatogramu zależy od celu danej analizy.

Chromatografia na sitach molekularnych

W chromatografii na sitach molekularnych, zwanej sączeniem molekularnym lub filtracją żelową, rozdzielanie mieszaniny cząsteczek odbywa się na podstawie ich wielkości i kształtu.

Nośnikami fazy ruchomej, czyli sitami molekularnymi w tej metodzie, są usieciowane poprzecznie, nierozpuszczalne polimery węglowodanowe, typu dekstran (Sephadex) lub agarozą (Sepharose), oraz polimery poliakrylamidowe (Bio-Gel). Są one wysoce uwodnionymi ziarnami o strukturze porowatej, których wielkość porów jest charakterystyczna dla danego rodzaju sita, a poszczególne rodzaje sit różnią się rozmiarami porów. Wielkość porów określa rozmiar kanalików

w ziarnach, np. im będą one większe, tym większe cząsteczki będą do nich wnikały. Przykładowo, zdolności rozdzielcze Sephadexów serii G (G-15 – G-200) są różne, np. na Sephadexie G-75 najlepiej rozdzielane są substancje o masach cząsteczkowych mieszczących się w zakresie 3000–150 000, a np. na Sephadexie G-200 o masach w zakresie 5000–800 000.

Techniki z użyciem sit molekularnych są podobne do stosowanych w przypadku chromatografii podziałowej, mianowicie technika kolumnowa lub cienko-warstwowa. W obu przypadkach, zasada rozdzielania polega na tym, że cząsteczki mniejsze od wielkości porów wchodzą do kanalików w poszczególnych ziarnach sit, natomiast cząsteczki od nich większe lub o wydłużonym kształcie nie mogą wejść do wnętrza kanalików w ziarnach. Cząsteczki większe występują tylko w płynie otaczającym ziarna, mają więc krótszą drogę do przebycia, niż cząsteczki mniejsze, które znajdują się w płynie o większej objętości (jest to płyn otaczający porowate ziarna, jak i wypełniający kanaliki w ziarnach), dlatego mają dłuższą drogę do przebycia od cząsteczek większych. Cząsteczki większe przemieszczają się przez sita molekularne szybciej i ulegają elucji jako frakcje początkowe, natomiast mniejsze poruszają się znacznie wolniej, poddając się elucji jako frakcje późniejsze.

Sączenie molekularne często wykorzystywane jest do odsalania roztworów białek izolowanych z materiału biologicznego metodami wysalania. Podczas rozdziału cząsteczki soli wnikają do kanalików ziaren i eluowane są znacznie później od frakcji białek, które nie mając możliwości wejścia do kanalików ziaren, szczególnie Sephadexu G-25, wcześniej wymywane są z kolumny niemal z objętością swobodną kolumny (V_0), czyli objętością rozpuszczalnika wypełniającego przestrzeń między ziarnami.

Sita molekularne najczęściej stosuje się do rozdziału białek, peptydów, kwasów nukleinowych i innych związków, zarówno w badaniach analitycznych, jak i w celach preparatywnych. Sączenie molekularne można także wykorzystać do wyznaczenia masy cząsteczkowej, np. białek. W tym celu należy wyznaczyć objętość elucyjną (V_e) dla danego białka i objętość swobodną kolumny (V_0). Między określoną względną objętością elucyjną białka (V_e/V_0) a logarytmem jego masy cząsteczkowej występuje zależność liniowa. Dzięki temu, po wystandaryzowaniu sita molekularnego wzorcowymi białkami o znanej masie cząsteczkowej, wykreśla się krzywą wzorcową (zależności V_e/V_0 do \log_{10} masy cząsteczkowej), z której można odczytać masę cząsteczkową badanego białka, znając jego względną objętość elucyjną.

Chromatografia jonowymienna

W metodzie tej nośnikiem są wymiennicze jonowe (jonity), wysokocząsteczkowe, usieciowane związki nierozpuszczalne, które posiadają łatwo dysocju-

jące grupy chemiczne, kwaśne lub zasadowe. W ściśle określonych warunkach (pH i mocy jonowej roztworu) mogą one wiązać jony z roztworu oraz oddawać je w przypadku zmiany tych warunków.

Kationity zawierają dysocjujące grupy kwaśne (obdarzone ładunkiem ujemnym), np. $-\text{COO}^-\text{H}^+$, $-\text{SO}_3^-\text{H}^+$, fenolowe lub fosforanowe, które na zasadzie podwójnej wymiany, przyłączają z roztworu rozdzielanej mieszaniny kationy, np. Ca^{++} , oddając atom wodoru.

Anionity zawierają dysocjujące grupy zasadowe, np. $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$, lub aktywne ugrupowania amin I-, II- lub III-rzędowych (obdarzone ładunkiem dodatnim), które przyłączają z roztworu rozdzielanej mieszaniny aniony, np. Cl^- . W chromatografii jonowymiennej podstawą rozdziału mieszaniny cząsteczek jest ich całkowity ładunek. Dlatego na kolumnie kationitowej z rozdzielanej mieszaniny zostaną zatrzymane tylko kationy, natomiast aniony i cząsteczki obojętne nie mogą być związane, dlatego wypłyną z kolumny wraz z frontem rozpuszczalnika. Związane z jonitem kationy można następnie wyciągnąć z kolumny przez przemycie roztworem jonów dodatnich, np. Na^+ o wzrastającym gradiencie, które konkurują z badanymi kationami o wiązanie z obdarzonymi ładunkami ujemnymi grupami jonitu, lub też uwolnić je poprzez zwiększenie pH buforu elucyjnego. Miarą pojemności wymienniczej jest stężenie aktywnych (obdarzonych ładunkiem) grup wymienniczych na jednostkę masy jonitu.

W chromatografii jonowymiennej nośnikami mogą być też sита molekularne, zawierające dodatkowo obdarzone ładunkiem dodatnim grupy dietyloaminoetylowe (DEAE), np. DEAE-Sephadex, DEAE-celuloza, są one anionitami często wykorzystywanymi do rozdziału i oczyszczania białek o wypadkowym ładunku ujemnym (białek anionowych). Sита molekularne zawierające obdarzone ładunkiem ujemnym grupy karboksymetylowe (CM), np. CM-Sephadex, CM-celuloza, są kationitami, często wykorzystywanymi do rozdziału i oczyszczania białek o wypadkowym ładunku dodatnim (białek kationowych).

Chromatografia powinowactwa

Chromatografia powinowactwa wykorzystuje specyficzne, niekowalencyjne i o wysokim powinowactwie wiązanie się białka z inną cząsteczką zwaną ligandem, dlatego umożliwia wyodrębnienie jednego białka z mieszaniny wielu różnych białek. Przykładowo, częstymi kombinacjami specyficznych par ligandów i oczyszczanych białek są np.: **hormon** jako ligand w celu oczyszczenia rozpoznawanego i wiążącego go specyficznie **receptora**; **lektyna** w celu oczyszczenia **glikoproteiny**; **przeciwciało**, aby wyizolować **antygen**, **inhibitor** do oczyszczenia **enzymu**. Specyficzne ligandy są zwykle unieruchomione na porowatych nośnikach (sita molekularnych) na Sepharose, Sephadexie, jak np. konkanawalina A-Sephadex. Mieszaninę białek nakłada się na immobilizowane ligandem sита molekularne,

uformowane na kształt złoża wypełniającego kolumnę. Na nośniku zostanie zatrzymane jedynie białko specyficznie wiążące się z ligandem, natomiast wszystkie pozostałe białka pozostaną w buforze elucyjnym, który opuści kolumnę. Białko związane z ligandem na kolumnie można uwolnić w dwojaki sposób: albo przez przemycie kolumny roztworem zawierającym wolną formę liganda lub poprzez zmianę pH, czy też stężenia soli w buforze elucyjnym.

ELEKTROFOREZA

Iwona Żak

Elektroforeza jest techniką rozdzielania związków obdarzonych ładunkiem, która wykorzystuje zjawisko ruchu cząstek w polu elektrycznym. Pod wpływem pola elektrycznego cząstki obdarzone ładunkiem dodatnim, czyli kationy, wędrują do katody, tzn. elektrody ujemnej, w procesie zwanym kataforezą. Cząstki obdarzone ładunkiem ujemnym – aniony – wędrują w polu elektrycznym do anody, tj. elektrody dodatniej, w procesie zwanym anaforezą. Podstawą rozdziału elektroforetycznego cząstek jest ich zróżnicowana szybkość wędrówki w polu elektrycznym, manifestująca się tym, że w jednakowym czasie odmienne cząstki przewędrują różne odległości.

Szybkość przemieszczania cząstek obdarzonych ładunkiem w polu elektrycznym zależy od trzech zasadniczych grup czynników, mianowicie: 1) własności cząstek wędrujących; 2) własności środowiska, w którym cząstki wędrują; 3) od parametrów charakteryzujących przepływający prąd.

Własności cząstek wędrujących w polu elektrycznym, które mają największy wpływ na szybkość przemieszczania, to wielkość wypadkowego ładunku elektrycznego, masa i kształt cząstek. Wielkość masy i wypadkowego ładunku cząstek działają przeciwstawnie na szybkość wędrówki. Im większy wypadkowy ładunek cząstek, tym szybciej się poruszają, ale im większa masa, tym wolniejsza wędrówka cząstek. Zatem szybkość migracji cząstek w polu elektrycznym zależy od stosunku ładunek/masa. Kształt cząstek wpływa na szybkość ich przemieszczania, dzięki obniżaniu lub wzmagananiu oporu środowiska, który przeciwdziała ruchowi cząstek. Opór środowiska dla cząstek o kształcie bliskim kuli (globularnym) będzie mniejszy (dzięki czemu ruch tych cząstek jest szybszy) niż tych o rozpostartej konformacji przestrzennej.

Środowisko, w którym cząstki wędrują, rodzaj użytego buforu i jego właściwości, takie jak lepkość, siła jonowa, pH i temperatura, wpływają na rozdział elektroforetyczny. Im większa lepkość, tym większy opór środowiska ma do pokonania przemieszczająca się cząstka. Natomiast od siły jonowej i pH buforu elektroforetycznego może zależeć wielkość ładunku rozdzielanej cząstki.

Zastosowanie buforu o wartości pH odpowiadającej wartości pI rozdzielanych cząstek uniemożliwi ich rozdział, ponieważ w tych warunkach cząstki występują w formie jonu obojnego i nie poruszają się w polu elektrycznym. Dla cząstek rozpuszczalnych w środowisku zasadowym najważniejszy będzie bufor o pH wyższym od pI każdej rozdzielanej cząstki mieszaniny. Przykładowo, bufor elektroforetyczny o wartości pH około 9 stwarza warunki, w których większość białek wykazuje ujemny wypadkowy ładunek i w polu elektrycznym wędruje w kierunku anody.

Nie bez znaczenia jest rodzaj nośnika, którego pory są wypełnione buforem z cząstkami obdarzonymi ładunkiem elektrycznym. Nośnikiem do elektroforezy może być bibuła (różnego rodzaju), inny nośnik celulozowy, w tym octan celulozy oraz obecnie powszechnie stosowane różne żele obojętne (agarozowy, poliakrylamidowy) w przypadku elektroforezy żelowej. Bibuła jest nośnikiem o dużej oporności, natomiast żele cechuje mała oporność oraz niska adsorpcja cząstek. Dodatkowo, żele są sitami molekularnymi, w związku z tym przez kanaliki w żelu małe cząstki przechodzą swobodnie, natomiast większe są zatrzymywane. Usieciowanie żelu, np. poliakrylamidowego, decydujące o wielkości kanalików w żelu, można kontrolować stosownie do potrzeb przez wybór odpowiednich stężeń akrylamidu i odczynnika sieciującego metylenobisakrylamidu, tworzącego wiązania poprzeczne. W żelu będą tym mniejsze kanaliki, im większe zastosuje się stężenie akrylamidu.

Nie bez znaczenia dla rozdziału są wskaźniki charakteryzujące przepływający prąd, czyli wielkość przyłożonego napięcia, a właściwie jego spadek wzdłuż drogi wędrówki cząstek, wielkość natężenia. Przyłożenie niskiego napięcia prądu sprawia, że niskie jest jego natężenie i wydzielanie ciepła, lecz szybkość wędrówki cząstek okazuje się wolna. W takich warunkach wydłuża się czas potrzebny do osiągnięcia rozdziału elektroforetycznego. Zbyt długi czas trwania rozdziału może być niepożądany ze względu na towarzyszące niekorzystne procesy, m.in. dyfuzję, która powoduje rozmycie brzegów rozdzielonych stref. Pod względem wielkości przyłożonego napięcia rozróżnia się elektroforezę niskonapięciową, w której spadek napięcia wynosi do kilkunastu V/cm, oraz elektroforezę wysokonapięciową przy spadku napięcia rzędu 50 V/cm i więcej.

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (PAGE) charakteryzuje się szczególnie dużą rozdzielczością, która w połączeniu z wysoką czułością metod detekcji rozdzielanych substancji pozwala na analizowanie mikrogramowych ilości rozdzielanych mieszanin. Powszechnie stosuje się ją do rozdzielania i oczyszczania białek oraz kwasów nukleinowych. Elektroforezę na żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecylu sodu (SDS) (**PAGE-SDS**) wykorzystuje się do wyznaczania masy cząsteczkowej białek. W metodzie tej stosuje się białka, wcześniej poddane denaturacji termicznej (100°C) w obecności SDS i redukcji poprzez działanie β -merkaptoetanolu w celu zerwania wiązań disiarczkowych. Efektem

tych działań jest całkowite rozwinięcie struktury białka. Cząsteczki anionowego detergentu SDS są silnie ujemne i opłaszczają zdenaturowane białko, tworząc wydłużone micelle, we wnętrzu których znajduje się cząsteczka białka.

W warunkach tych wszystkie białka wykazują wypadkowy ładunek ujemny i identyczny stosunek ładunku do masy. W obecności SDS wszystkie białka posiadają podobny włókienkowy kształt „prętopodobny” i ich długość jest wówczas proporcjonalna do długości łańcucha polipeptydowego, tym samym do masy cząsteczkowej białka. Podczas PAGE-SDS podstawę rozdziału stanowi jedynie różnica wielkości mas cząsteczkowych rozdzielanych białek.

Wariantem elektroforezy na żelu poliakrylamidowym jest **ogniskowanie izoelektryczne**, czyli elektroforeza PAGE w gradiencie pH, utworzonym przez poliamfolity pod wpływem pola elektrycznego. W tych warunkach rozdział elektroforetyczny białek polega na tym, że każde białko wędruje w polu elektrycznym tylko do tych miejsc żelu, w których środowisko pod względem pH odpowiada wartości jego punktu izoelektrycznego i w tych miejscach zatrzymuje się w postaci wąskiego prążka.

Uwidocznienie w żelu rozdzielonych cząstek polega na wykonaniu specyficznych reakcji barwienia, charakterystycznych dla tych związków. Często białka wybarwia się barwnikiem *Coomassie brilliant blue* a kwasy nukleinowe bromkiem etydyny lub azotanem srebra.