



POLITECHNIKA RZESZOWSKA
im. Ignacego Łukasiewicza
WYDZIAŁ CHEMICZNY
Katedra Inżynierii
Chemicznej i Procesowej



PRACA DOKTORSKA

BADANIE MECHANIZMU SORPCJI W WYBRANYCH RODZAJACH CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

mgr inż. Regina Lech-Przywara

Promotor pracy:

dr hab. inż. Wojciech Zapała, prof. PRz

Rzeszów, 2026

Składam serdeczne podziękowania Panu dr hab. inż. Wojciechowi Zapale, prof. PRz za opiekę naukową oraz cenne wskazówki merytoryczne. Dziękuję za życzliwość, cierpliwość oraz poświęcony czas na każdym etapie prowadzonych badań. Dziękuję również za wszystkie konsultacje i uwagi, które były pomocne w trakcie realizacji badań oraz przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej.

Pragnę serdecznie podziękować Pani dr hab. inż. Agnieszce Bukowskiej, prof. PRz za udostępnienie materiałów badawczych wykorzystanych w realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI.....	11
I. WSTĘP.....	17
II. CEL I ZAKRES PRACY	19
III. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	21
III.1. Chromatografia cieczowa.....	21
III.1.1. Wprowadzenie.....	21
III.1.2. Podstawy teoretyczne i zastosowanie	21
III.1.3. Klasyfikacja technik chromatograficznych według mechanizmu rozdzielania.....	22
III.1.4. Wielkości charakteryzujące chromatogram	24
III.1.5. Równowaga adsorpcyjna w chromatografii cieczowej.....	28
III.1.5.1. Izotermy adsorpcji.....	29
III.1.5.2. Wyznaczanie izoterm adsorpcji – metody dynamiczne	32
III.1.5.3. Wyznaczanie izoterm adsorpcji – metoda statyczna.....	37
III.1.5.4. Rozkład energii adsorpcji.....	38
III.1.6. Rozwój chromatografii cieczowej – nowe strategie	40
III.2. Chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych (HILIC)	43
III.2.1. Wprowadzenie.....	43
III.2.2. Klasyfikacja faz stacjonarnych stosowanych w HILIC	44
III.2.2.1. Komercyjne fazy stacjonarne.....	44
III.2.2.2. Niekomercyjne fazy stacjonarne	50
III.2.3. Fazy ruchome stosowane w chromatografii HILIC	55
III.2.4. Mechanizm retencji w HILIC	57
III.2.5. Wpływ składu eluentu na proces separacji – modele retencji.....	60
III.3. Wpływ temperatury na retencję	62
III.4. Sprawność kolumn chromatograficznych	65

III.5. Charakterystyka fizykochemiczna i granulometryczna adsorbentów stosowanych w chromatografii cieczowej.....	69
III.5.1. Morfologia ziaren	70
III.5.2. Skład pierwiastkowy.....	72
III.5.3. Rozkład wielkości ziaren.....	73
III.5.4. Charakterystyka struktury porowatej.....	74
III.5.4.1. Metody wyznaczania wielkości i objętości porów	75
III.5.4.2. Rodzaje i klasyfikacja porów	77
III.5.4.3. Klasyfikacja izoterm dla adsorpcji fizycznej.....	78
III.5.4.4. Powierzchnia właściwa.....	80
III.5.5. Stabilność termiczna adsorbentów	82
III.6. Zastosowanie chromatografii cieczowej w analizie substancji biologicznie czynnych.....	84
III.6.1. Heparyna – charakterystyka i metody oznaczania	85
IV. CZĘŚĆ BADAWCZA.....	89
IV.1. Materiały badawcze i aparatura pomiarowa.....	89
IV.1.1. Wykaz i charakterystyka analitów zastosowanych w badaniach eksperymentalnych.....	89
IV.1.2. Odczynniki	91
IV.1.3. Kolumny chromatograficzne zastosowane w badaniach eksperymentalnych.....	91
IV.1.4. Adsorbenty komercyjne i niekomercyjne zastosowane w badaniach eksperymentalnych.....	92
IV.1.5. Aparatura pomiarowa.....	94
IV.2. Metodyka badań eksperymentalnych	96
IV.2.1. Badania chromatograficzne	96
IV.2.1.1. Wpływ temperatury na retencję substancji testowych	96
IV.2.1.2. Wpływ składu fazy ruchomej na retencję substancji testowych	98
IV.2.1.3. Sprawność kolumn chromatograficznych	98

IV.2.1.4. Równowaga adsorpcyjna	99
IV.2.2. Funkcjonalizacja adsorbentów niekomercyjnych	103
IV.2.3. Charakterystyka fizykochemiczna oraz granulometryczna adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych	103
IV.2.3.1. Morfologia ziaren i skład pierwiastkowy powierzchni adsorbentów – metoda SEM-EDS.....	103
IV.2.3.2. Całkowity skład pierwiastkowy adsorbentów (ilościowy i jakościowy) – metoda ICP-MS	104
IV.2.3.3. Rozkład wielkości ziaren adsorbentów.....	104
IV.2.3.4. Badanie wielkości i objętości porów oraz powierzchni właściwej adsorbentów	105
IV.2.3.5. Badanie stabilności termicznej adsorbentów	105
IV.2.4. Oznaczanie heparyny sodowej.....	105
V. DYSKUSJA WYNIKÓW	107
V.1. Badania chromatograficzne.....	107
V.1.1. Analiza wpływu temperatury na proces retencji.....	107
V.1.1.1. Kolumna Hypersil GOLD HILIC	107
V.1.1.2. Kolumna Shodex SILICA 5NH 4D	112
V.1.1.3. Podsumowanie	117
V.1.2. Analiza wpływu modyfikatora eluentu na proces retencji	118
V.1.2.1. Kolumna Hypersil GOLD HILIC	118
V.1.2.2. Kolumna Shodex SILICA 5NH 4D	121
V.1.2.3. Podsumowanie	124
V.1.3. Analiza sprawności kolumn chromatograficznych	125
V.1.3.1. Kolumna Hypersil GOLD HILIC	125
V.1.3.2. Kolumna Shodex SILICA 5NH 4D	127
V.1.3.3. Podsumowanie	129
V.1.4. Badanie równowagi adsorpcyjnej metodą analizy frontalnej	130
V.1.4.1. Kolumna Hypersil GOLD HILIC	130

V.1.4.2. Porównanie jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji dla kolumny Hypersil GOLD HILIC	134
V.1.4.3. Kolumna Shodex SILICA 5NH 4D	141
V.1.4.4. Porównanie jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji dla kolumny Shodex SILICA 5NH 4D	144
V.1.4.5. Podsumowanie	151
V.1.5. Analiza równowagi adsorpcyjnej wybranych adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych w oparciu o metodę statyczną	151
V.1.5.1. Adsorbenty komercyjne	151
V.1.5.2. Porównanie jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji dla adsorbentów komercyjnych	158
V.1.5.3. Podsumowanie	171
V.1.5.4. Adsorbenty niekomercyjne	171
V.1.5.5. Porównanie jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji dla adsorbentów niekomercyjnych	178
V.1.5.6. Podsumowanie	188
V.2. Analiza fizykochemiczna oraz granulometryczna adsorbentów stosowanych w chromatografii cieczowej	189
V.2.1. Analiza morfologii i składu pierwiastkowego adsorbentów metodą SEM-EDS oraz oznaczenie ich składu całkowitego techniką ICP-MS	189
V.2.1.1. Adsorbenty komercyjne	189
V.2.1.2. Adsorbenty niekomercyjne	202
V.2.1.3. Podsumowanie	206
V.2.2. Rozkład wielkości ziaren adsorbentów	207
V.2.2.1. Adsorbenty komercyjne	207
V.2.2.2. Adsorbenty niekomercyjne	208
V.2.2.3. Podsumowanie	209
V.2.3. Analiza porowatości adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych	210
V.2.3.1. Izoterm adsorpcji/desorpcji azotu	210

V.2.3.2. Analiza wielkości i objętości porów adsorbentów	218
V.2.3.3. Podsumowanie	229
V.2.4. Analiza powierzchni właściwej adsorbentów	230
V.2.4.1. Adsorbenty komercyjne	230
V.2.4.2. Adsorbenty niekomercyjne	235
V.2.4.3. Podsumowanie	237
V.2.5. Analiza termogravimetryczna (TG-DTG) adsorbentów	238
V.2.5.1. Adsorbenty komercyjne	238
V.2.5.2. Adsorbenty niekomercyjne	241
V.2.5.3. Podsumowanie	243
V.3. Analiza chromatograficzna heparyny sodowej	244
V.3.1. Podsumowanie	246
VI. WNIOSKI.....	247
VII. LITERATURA.....	249
VIII. DOROBK NAUKOWY	273
STRESZCZENIE	277
ABSTRACT.....	279

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

Wykaz skrótów

ACN – acetonitryl,
AED (ang. *Adsorption Energy Distribution*) – rozkład energii adsorpcji,
ANOVA (ang. *Analysis of Variance*) – analiza wariancji,
API (ang. *Active Pharmaceutical Ingredient*) – substancja czynna produktu leczniczego,
BET (ang. *Brunauer–Emmett–Teller*) – metoda Brunauera-Emmetta-Tellera,
BJH (ang. *Barrett–Joyner–Halenda*) – metoda Barretta-Joynera-Halenda,
DFT (ang. *Density Functional Theory*) – teoria funkcyjonału gęstości,
DH (ang. *Dollimore–Heal*) – metoda Dollimore'a-Heala,
DLS (ang. *Dynamic Light Scattering*) – dynamiczne rozpraszanie światła,
DTG (ang. *Derivative Thermogravimetry*) – różniczkowa termogravimetria,
ECP (ang. *Elution by Characteristic Point*) – elucja przez punkt charakterystyczny,
EDS (ang. *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*) – spektroskopia rentgenowska z dyspersją energii,
EM (ang. *Expectation–Maximization*) – algorytm oczekiwania-maksymalizacji,
FA (ang. *Frontal Analysis*) – analiza frontalna,
FACP (ang. *Frontal Analysis by Characteristic Point*) – analiza frontalna z punktem charakterystycznym,
HILIC (ang. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) – chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych,
HK (ang. *Horváth–Kawazoe*) – metoda Horvatha-Kawazoe,
HPLC (ang. *High-Performance Liquid Chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa,
HRMS (ang. *High-Resolution Mass Spectrometry*) – wysokorozdzielcza spektrometria mas,
ICP-MS (ang. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) – spektrometria mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie,
IUPAC (ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) – Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej,
LC (ang. *Liquid Chromatography*) – chromatografia cieczowa,
LD (ang. *Laser Diffraction*) – dyfrakcja laserowa,
MCM-41 – mezoporowata krzemionka,
MeOH – metanol,

MIP (ang. *Molecularly Imprinted Polymer*) – molekularnie imprintowany polimer,
 MS (ang. *Mass Spectrometry*) – spektrometria masowa,
 NMR (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) – magnetyczny rezonans jądrowy,
 NPLC (ang. *Normal Phase Liquid Chromatography*) – chromatografia cieczowa w normalnym układzie faz,
 PSD (ang. *Particle Size Distribution*) – rozkład wielkości ziaren,
 RPLC (ang. *Reversed Phase Liquid Chromatography*) – chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz,
 SEM (ang. *Scanning Electron Microscopy*) – skaningowa mikroskopia elektronowa,
 SF (ang. *Saito-Foley*) – metoda Saito-Foley,
 TG (ang. *Thermogravimetry*) – termogravimetria,
 THF – tetrahydrofuran,
 UHPLC (ang. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) – ultra wysokosprawna chromatografia cieczowa.

Wykaz symboli

A – parametr związany z dyfuzją wirową (efekt Eddy'ego),
 α^2 – powierzchnia przekroju poprzecznego pojedynczej cząsteczki N_2 ,
 A_s – liczba miejsc adsorpcyjnych zajmowanych przez cząsteczkę analitu,
 B/u – paramter związany z dyfuzją wzdłużną,
 $C_e(t)$ – profil stężenia analitu na wyjściu z kolumny chromatograficznej,
 C_f – stężenie w roztworze doprowadzającym,
 $C_{f/2}$ – stężenie równe połowie stężeniu roztworu doprowadzającego,
 C_m – stężenie analizowanej substancji w fazie ruchomej,
 $(C_s + C_M)u$ – opory masy w fazie stacjonarnej i ruchomej, odpowiednio,
 C_0 – stężenie początkowe badanego związku,
 D – współczynnik dyfuzji translacyjnej,
 d_f – grubość warstwy fazy stacjonarnej,
 $d(H)$ – średnica hydrodynamiczna,
 D_M – współczynnik dyfuzji analitu w fazie ruchomej,
 d_p – średnica ziarna adsorbentu,
 d_{por} – średnica poru,
 $d_{por,min}$, $d_{por,max}$ – minimalna i maksymalna średnica porów,
 D_s – współczynnik dyfuzji analitu w fazie stacjonarnej,

$d_{90\%}$ – średnica ziarna poniżej której znajduje się 90 % objętości próbki,
 $d_{50\%}$ – średnica ziarna poniżej której znajduje się 50 % objętości próbki,
 $d_{10\%}$ – średnica ziarna poniżej której znajduje się 10 % objętości próbki,
 F – stosunek faz,
 $f(d_{por})$ – funkcja rozkładu wielkości porów,
 $f(\varepsilon)$ – rozkład energii adsorpcji,
 $f(\ln K_i)$ – wartość funkcji rozkładu energii adsorpcji w punkcie odpowiadającym stałej równowagi K_i ,
 F_{M_i, M_j} – wartość stosunku testu Fishera odpowiednio dla modeli izoterm adsorpcji M_i i M_j ,
 f_S, f_M – współczynniki zależne od struktury układu chromatograficznego,
 F_{test} – test Fishera,
 H (WRPT) – wysokość równoważna półce teoretycznej,
 I – pole powierzchni pików, proporcjonalne do ilości analitu,
 K – stała równowagi adsorpcji,
 k – współczynnik retencji,
 k_B – stała Boltzmanna,
 k_{BET} – stała BET, związana z energią oddziaływania adsorbat–powierzchnia adsorbentu,
 K_D – termodynamiczny współczynnik podziału,
 K_F – stała Freundlicha,
 K_H – stała Henry'ego,
 K_p – współczynnik podziału analitu pomiędzy fazę stacjonarną a ciecz wypełniającą pory ziaren adsorbentu,
 k_w – współczynnik retencji w czystej wodzie,
 k_{0B} – współczynnik retencji w czystym składniku B fazy ruchomej,
 L – długość kolumny chromatograficznej,
 l – liczba estymowanych parametrów modelu,
 $m_{A,B}$ – masa kolumny nasyconej rozpuszczalnikiem odpowiednio A oraz B,
 $M_{i,j}$ – modele izoterm adsorpcji (i,j),
 N – liczba pól teoretycznych,
 n – ilość zaadsorbowanego gazu w warunkach równowagi przy danym P,
 n_B – liczba miejsc adsorpcyjnych zajmowanych przez cząsteczkę składnika B fazy ruchomej,
 $N_{DFT}(P/P_0, d_{por})$ – teoretyczna izoterma adsorpcji obliczona metodą DFT dla porów o średnicy d_{por} ,

$N_{exp}(P/P_0)$ – eksperymentalna ilość zaadsorbowanego gazu przy danym względnym ciśnieniu,
 n_F – paramter w izotermie Freundlicha określający intensywność adsorpcji,
 n_m – pojemność monowarstwowa (ilość adsorbatu odpowiadająca pokryciu powierzchni pojedynczą warstwą),
 N_0 – liczba punktów doświadczalnych,
 P – ciśnienie równowagowe adsorbatu,
 p – liczba punktów (przedziałów), na jakie podzielono zakres wartości $\ln K$,
 p_{1-6} – paramtery modeli retencji,
 P_0 – ciśnienie pary nasyconej adsorbatu w danej temperaturze,
 q – stężenie analitu w fazie stacjonarnej,
 $q_{calc}(C_j)$ – obliczona ilość substancji zaadsorbowanej dla j-tego punktu izotermy,
 $q_{dośw}$ – doświadczalnie wyznaczona wartość q ,
 $\bar{q}_{dośw}$ – średnia wartość doświadczalna,
 q_S – pojemność sorpcyjna fazy stacjonarnej,
 q_{teor} – wartość wyestymowanego parametru,
 R – stała gazowa,
 r – promień krzywizny menisku tworzącego się w mezoporze,
 R_S – rozdzielczość chromatograficzna,
 S – nachylenie prostej regresji liniowej, określające wrażliwość retencji na zmianę składu fazy ruchomej,
 S_{BET} – powierzchnia właściwa w metodzie BET,
 SD – odchylenie standardowe,
 $span$ – parametr opisujący szerokość rozkładu wielkości ziaren,
 SUM – suma kwadratów różnic pomiędzy danymi doświadczalnymi i teoretycznymi,
 T – temperatura w Kelwinach,
 t_p – czas rozpoczęcia narastania sygnału na wykresie $C(t)$,
 t_R – czas retencji,
 t'_R – zredukowany czas retencji,
 t_S – czas, w którym stężenie analitu osiąga stan ustalony (plateau),
 t_{sr} – średni czas wyjścia substancji z kolumny chromatograficznej,
 t_0 – czas retencji intertu,
 u – prędkość liniowa fazy ruchomej,
 V_a – objętość adsorbentu,

V_M – molowa objętość adsorbentu,
 V_p – objętość początkowa roztworu,
 V_0 – objętość martwa kolumny,
 $\dot{V}$ – objętościowe natężenie przepływu eluentu,
 u – prędkość liniowa fazy ruchomej,
 w – szerokość pików chromatograficznych u podstawy,
 $w_{1/2}$ – szerokość pików w połowie wysokości,
 α – współczynnik selektywności,
 β – parametr heterogeniczności powierzchni w izotermie Freundlicha-Langmuira,
 γ – współczynnik napięcia powierzchniowego,
 $\delta_{ax,f,d,ads}$ – składowe oporów transportu masy wpływające na szerokość pików,
 ΔG° – standardowa zmiana energii swobodnej Gibbsa,
 ΔH° – standardowa częściowa molowa zmiana entalpii,
 $\Delta \ln K$ – odległość między sąsiednimi punktami siatki energetycznej,
 ΔS° – standardowa częściowa molowa zmiana entropii,
 ε – energia wiązania adsorbentu z określonym centrum aktywnym,
 $\varepsilon_{min}, \varepsilon_{max}$ – odpowiednio minimalna i maksymalna energia adsorpcji charakterystyczna dla rozpatrywanych miejsc aktywnych na powierzchni adsorbentu,
 ε_p – porowatość pojedynczych ziaren adsorbentu,
 ε_t – porowatość złoża,
 η – lepkość dynamiczna,
 $\theta(C_j, K_i)$ – lokalny stopień pokrycia miejsc adsorpcyjnych o energii odpowiadającej K_i przy stężeniu analitu C_j ,
 $\theta(C, \varepsilon)$ – lokalny model adsorpcji dla miejsc o energii ε ,
 λ – współczynnik uwzględniający sposób upakowania i jednorodność kolumny chromatograficznej,
 μ_0 – moment zerowego rzędu,
 μ_1 – pierwszy moment absolutny pików chromatograficznych,
 μ_2 – drugi moment centralny pików chromatograficznych,
 ν – bezwymiarowa stała w izotermie Tótha, charakteryzująca potencjał adsorpcyjny oraz stopień niejednorodności powierzchni adsorbentu,
 $\rho_{A,B}$ – gęstość rozpuszczalników odpowiednio A oraz B,
 σ – odchylenie standardowe pików chromatograficznych,

τ – współczynnik zależny od krętości przepływu, struktury i jednorodności upakowania fazy stacjonarnej,

ϕ – ułamek objętości dostępnej dla fazy ruchomej,

φ_{H_2O} – ułamek objętościowy wody w fazie ruchomej.

I. WSTĘP

Chromatografia cieczowa stanowi jedną z najczęściej stosowanych metod rozdzielania i oznaczania związków chemicznych zarówno w warunkach laboratoryjnych jak i na skalę przemysłową. Metoda ta wykorzystuje różnice w oddziaływaniu składników mieszaniny z fazą stacjonarną i ruchomą, umożliwiając ich rozdzielanie. Efektywność procesu chromatograficznego zależy od wielu czynników takich jak np.: właściwości fizykochemiczne i granulometryczne faz stacjonarnych, skład fazy ruchomej oraz temperatura kolumny chromatograficznej. Wielkości te wpływają nie tylko na sprawność kolumny i selektywność rozdzielania, lecz także na charakter i intensywność oddziaływań zachodzących pomiędzy analitem a fazą stacjonarną, które w konsekwencji determinują proces retencji.

Pomimo ogromnego rozwoju pod względem aparatury i powstawania coraz bardziej zaawansowanych faz stacjonarnych, wciąż istnieją obszary, w których wiedza teoretyczna jest niekompletna, a zjawiska sorpcyjne odpowiedzialne za retencję zwłaszcza w układach o złożonej polarności wymagają pogłębionych badań. Do takich obszarów należy chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych (HILIC). Mechanizm retencji w chromatografii HILIC pozostaje nadal niejednoznaczny i od momentu wprowadzenia tej techniki stanowi przedmiot intensywnych badań oraz dyskusji naukowych. Złożoność tej metody wynika z jednoczesnego udziału adsorpcji powierzchniowej, oddziaływań elektrostatycznych oraz procesów zachodzących w warstwie wodnej powstającej na granicy faz. Współistnienie tych zjawisk prowadzi do trudności w jednoznacznej interpretacji mechanizmu retencji. Dodatkową trudność stanowi fakt, że udział poszczególnych mechanizmów nie jest stały i może zmieniać się w zależności od warunków pracy kolumny. Kluczowym czynnikiem wpływającym na proces retencji w HILIC jest skład fazy ruchomej, zwłaszcza zawartość modyfikatora organicznego, determinująca zarówno grubość warstwy wodnej zaadsorbowanej na powierzchni fazy stacjonarnej, jak i charakter oraz siłę oddziaływań pomiędzy analitem a fazą stacjonarną. W literaturze brak jest jednoznacznych kryteriów pozwalających określić, w jakich warunkach dominują mechanizmy adsorpcyjne, a w jakich znaczącą rolę odgrywają procesy podziałowe. Rozróżnienie udziału tych procesów ma istotne znaczenie dla prawidłowej interpretacji zależności pomiędzy składem fazy ruchomej a retencją. Kolejnym zagadnieniem, które pozostaje niewystarczająco poznane w kontekście HILIC jest wpływ temperatury na proces sorpcji. Temperatura wpływa jednocześnie na właściwości fizykochemiczne fazy ruchomej oraz równowagę pomiędzy warstwą wodną, a fazą organiczną, co może prowadzić do zmian w sposobie oddziaływania

analitów z fazą stacjonarną. Wpływ temperatury na proces retencji w HILIC może wynikać z nakładania się wielu zjawisk, co dodatkowo utrudnia interpretację danych chromatograficznych.

Ważnym elementem charakterystyki adsorbentów stosowanych w HILIC jest analiza rozkładu energii adsorpcji na powierzchni fazy stacjonarnej, dostarczająca informacji o heterogeniczności energetycznej powierzchni. Pozwala ona na określenie, jak zróżnicowana energetycznie jest powierzchnia adsorbentu oraz jakie rodzaje miejsc sorpcyjnych biorą udział w adsorpcji analitów. Wyniki takich analiz umożliwiają lepsze powiązanie właściwości powierzchni adsorbentu z obserwowanym procesem retencji. Istotne znaczenie dla zrozumienia mechanizmu sorpcji ma również charakterystyka fizykochemiczna i granulometryczna samej fazy stacjonarnej. Adsorbenty stosowane w HILIC różnią się składem chemicznym, morfologią, rozkładem wielkości ziaren, wielkością i objętością porów, a także powierzchnią właściwą. Różnice te przekładają się na odmienne właściwości sorpcyjne, wpływając zarówno na intensywność oddziaływań analit–adsorbent, jak i na selektywność oraz efektywność procesu rozdzielania. Z tego względu szczegółowa charakterystyka adsorbentów ma istotne znaczenie zarówno w interpretacji wyników analiz chromatograficznych, jak i w porównywaniu zachowania różnych adsorbentów w zmiennych warunkach eksperymentalnych. Pomimo tego informacje dostępne dotyczące właściwości fizykochemicznych i granulometrycznych adsorbentów są często niepełne, co utrudnia jednoznaczne powiązanie ich cech z obserwowanymi wynikami chromatograficznymi. Kompleksowe podejście obejmujące analizę rozkładu energii adsorpcji na powierzchni fazy stacjonarnej oraz charakterystykę składu chemicznego, morfologii, właściwości strukturalnych i granulometrycznych faz stacjonarnych może dostarczyć wartościowych informacji niezbędnych do lepszego zrozumienia mechanizmów retencji w chromatografii HILIC oraz pozwolić na określenie wpływu właściwości fizykochemicznych adsorbentów na przebieg procesu rozdzielania.

Ze względu na złożoność opisanych zjawisk oraz brak spójnych danych pozwalających jednoznacznie powiązać właściwości powierzchni adsorbentów z ich zachowaniem chromatograficznym, konieczne jest prowadzenie kompleksowych badań. Dotyczy to szczególnie układów, w których ta sama faza stacjonarna może wykazywać mechanizmy retencji charakterystyczne zarówno dla chromatografii HILIC, jak i NP lub RP, w zależności od warunków prowadzenia procesu.

II. CEL I ZAKRES PRACY

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie mechanizmu sorpcji w chromatografii ciekowej ze szczególnym uwzględnieniem chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC) oraz określenie wpływu rodzaju faz stacjonarnych i warunków chromatograficznych na retencję badanych związków. Ważnym elementem pracy było poznanie zależności pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi faz stacjonarnych a zachodzącymi na ich powierzchni procesami adsorpcji. Dodatkowym celem pracy było sprawdzenie możliwości zastosowania różnych układów chromatograficznych do oznaczania heparyny sodowej w materiałach pochodzenia zwierzęcego.

Zakres niniejszej rozprawy doktorskiej obejmował:

- szczegółowy przegląd literatury obejmujący zagadnienia związane z tematyką i zakresem rozprawy doktorskiej,
- analizę wpływu temperatury na retencję substancji testowych w warunkach HILIC,
- analizę wpływu składu fazy ruchomej, w tym rodzaju i udziału modyfikatora organicznego na mechanizm retencji oraz siłę oddziaływań między analitem, a fazą stacjonarną,
- analizę sprawności wybranych kolumn chromatograficznych w warunkach HILIC,
- badanie równowag adsorpcji dla wybranych adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych, obejmujące wyznaczenie rozkładu energii adsorpcji, ocenę heterogeniczności energetycznej powierzchni adsorbentów oraz dobór i weryfikację wybranych modeli izoterm adsorpcji na podstawie wartości estymowanych parametrów oraz jakości dopasowania modeli do danych eksperymentalnych,
- analizę właściwości fizykochemicznych i granulometrycznych wybranych adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych, obejmującej m.in.: określenie składu chemicznego, morfologii, rozkładu wielkości ziaren, wielkości i objętości porów, a także powierzchni właściwej,
- badania chromatograficzne heparyny sodowej w celu oceny możliwości jej oznaczania w materiałach pochodzenia zwierzęcego z wykorzystaniem różnych układów chromatograficznych.

III. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

III.1. Chromatografia cieczowa

III.1.1. Wprowadzenie

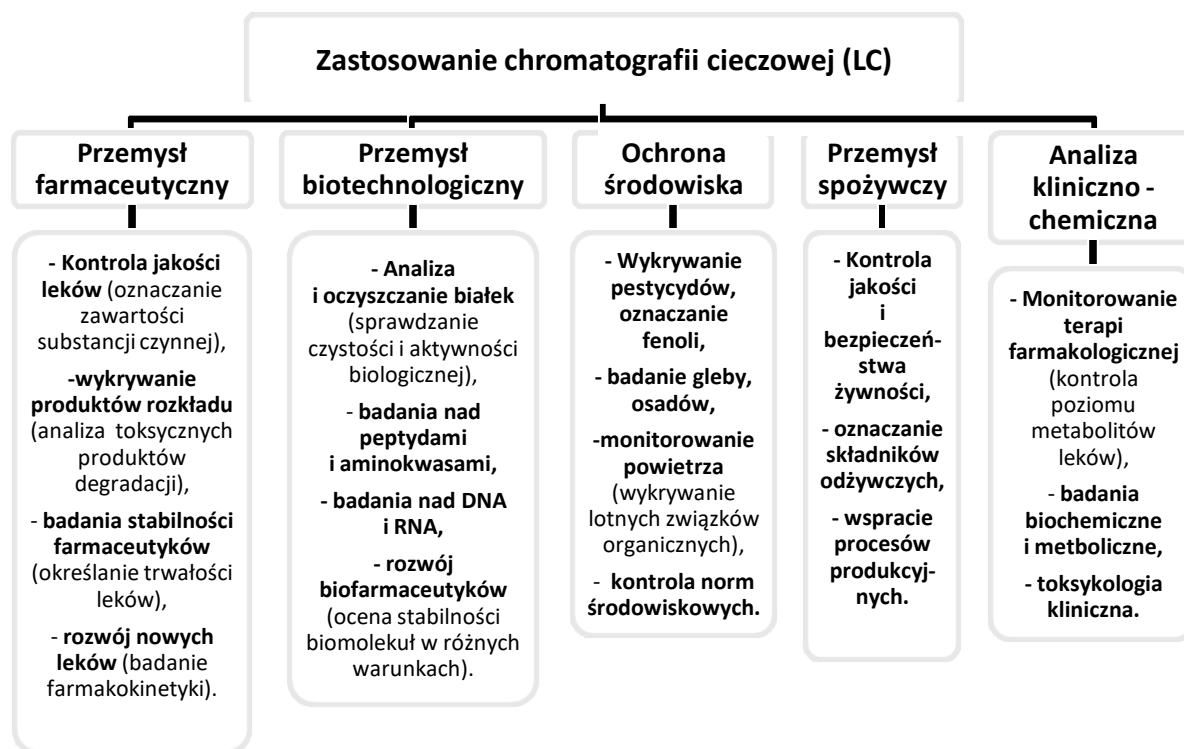
Chromatografia cieczowa (LC, ang. *Liquid Chromatography*) należy do najczęściej stosowanych metod rozdzielania oraz identyfikacji mieszanin związków w chemii, farmacji, biotechnologii oraz dziedzinach pokrewnych. Proces ten może być prowadzony nie tylko w warunkach analitycznych, lecz także coraz częściej w warunkach preparatywnych oraz na skalę przemysłową. Jej rozwój, od początku XX wieku, doprowadził do opracowania technik charakteryzujących się większą dokładnością i stabilnością wyników analiz. W zależności od właściwości analitów stosuje się różne rodzaje technik LC, które oparte są na odmiennych mechanizmach retencji, co pozwala optymalizować warunki analizy/separacji zarówno dla związków prostych, jak i złożonych. Ciągły rozwój chromatografii cieczowej obejmuje m.in. doskonalenie faz stacjonarnych, poprzez opracowywanie nowych adsorbentów o zwiększonej selektywności i stabilności, lepsze poznanie ich właściwości fizykochemicznych, granulometrycznych, które mogą dostarczać cennych informacji na temat mechanizmów oddziaływania analitów z powierzchnią adsorbentu, modyfikację parametrów procesowych np.: skład, pH fazy ruchomej, które bezpośrednio wpływają na mechanizm retencji, a w konsekwencji na wydajność i jakość analiz, co w praktyce przekłada się na lepszą jakość wyników uzyskiwanych w laboratoriach badawczych [1-5].

III.1.2. Podstawy teoretyczne i zastosowanie

Chromatografia cieczowa polega na rozdzielaniu składników mieszaniny na podstawie ich różnego powinowactwa do dwóch faz: fazy ruchomej (eluentu) i fazy stacjonarnej (adsorbentu), która wypełnia kolumnę chromatograficzną. Siła oddziaływania analitu z powierzchnią fazy stacjonarnej decyduje o kolejności elucji substancji z kolumny, a tym samym o jej czasie retencji. Zjawisko to jest ważne dla skuteczności separacji, nawet w przypadku mieszanin złożonych lub zawierających związki o podobnych właściwościach fizykochemicznych. Rodzaj i siła oddziaływań analitów z fazą stacjonarną zależą od mechanizmu retencji, który może opierać się np. na adsorpcji, podziale, wymianie jonowej lub oddziaływaniach powinowactwa. Zrozumienie tych mechanizmów jest ważne dla prawidłowego doboru warunków analizy [1-2,6-7].

Chromatografia cieczowa znajduje szerokie zastosowanie w analizie różnorodnych substancji chemicznych, od małych cząsteczek organicznych, takich jak kwasy, alkohole czy związki aromatyczne, po złożone biomolekuły, w tym białka, peptydy oraz nukleotydy.

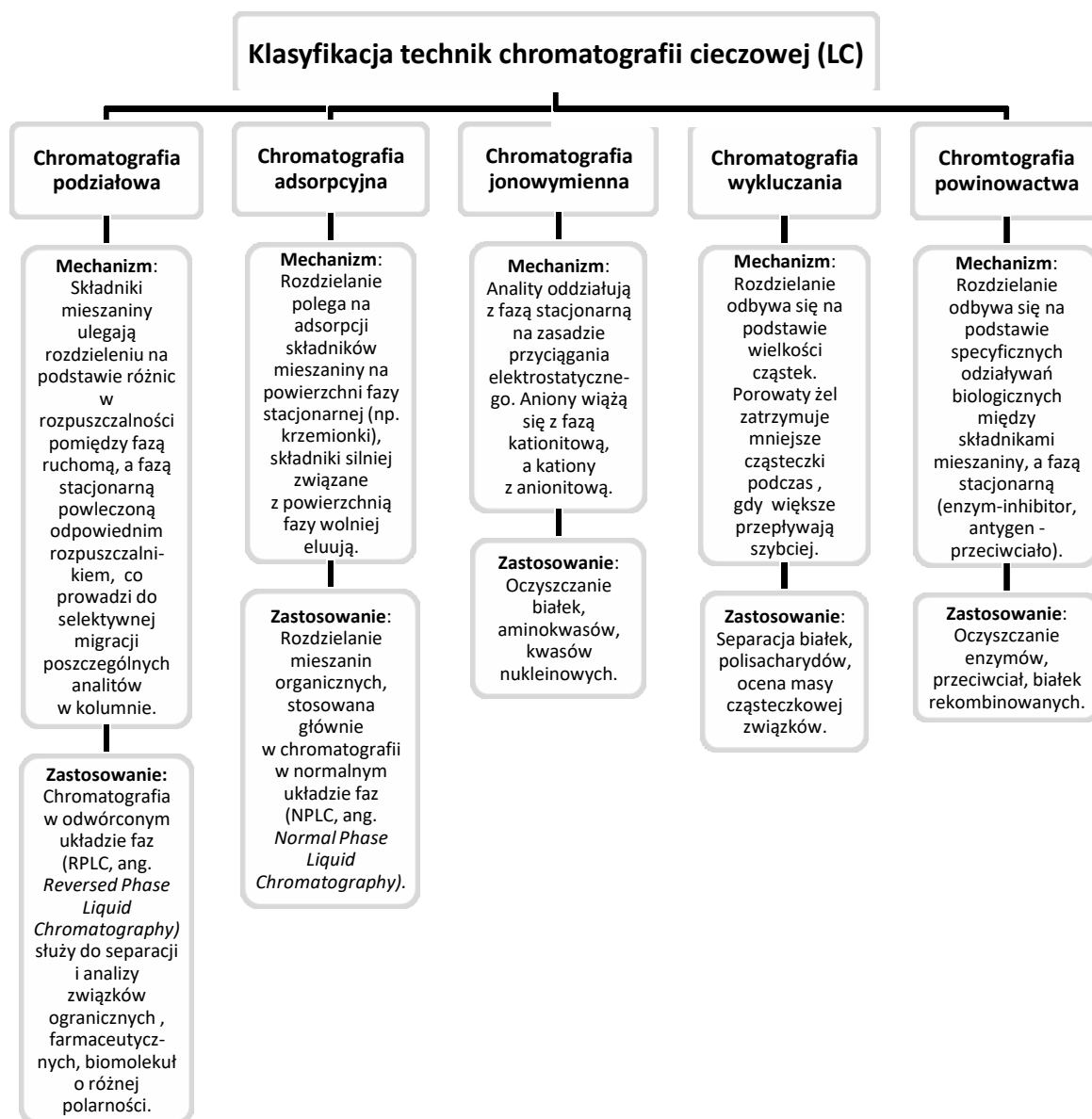
Metoda ta znalazła zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, m.in.: farmaceutycznym, chemicznym, biotechnologicznym, spożywczym czy w ochronie środowiska [1-2,7-10]. Poniższy schemat (rys. 3.1) przedstawia najważniejsze obszary zastosowań chromatografii cieczowej.



Rysunek 3.1. Schemat przedstawiający najważniejsze zastosowania chromatografii cieczowej (LC) [1-2,7-10]

III.1.3. Klasyfikacja technik chromatograficznych według mechanizmu rozdzielania

W chromatografii cieczowej różnorodność technik wynika głównie z rodzaju fazy stacjonarnej, stosowanego eluentu oraz specyficznych warunków pracy kolumny chromatograficznej. Pozwala to na dostosowanie metody do właściwości analizowanych substancji i wymagań analitycznych, zarówno pod względem dokładności, jak i efektywności rozdzielania. Techniki chromatografii cieczowej różnią się przede wszystkim mechanizmem rozdzielania, który określa sposób oddziaływania badanych substancji z fazą stacjonarną. Mechanizmy te opierają się np.: na różnicach w polarności, wielkości cząsteczek, ładunku jonowym lub specyficznych oddziaływaniach biologicznych [11-15]. Na poniższym schemacie zostały opisane najważniejsze techniki chromatografii cieczowej wraz z ich zastosowaniem (rys. 3.2).



Rysunek 3.2. Schemat przedstawiający klasyfikację technik chromatograficznych według mechanizmu rozdzielania [11-15]

W praktyce proces rozdzielania analitów w kolumnie chromatograficznej jest zwykle wynikiem współdziałania wielu czynników i nie zawsze może być jednoznacznie przypisany do jednego rodzaju oddziaływań. W rzeczywistości mechanizmy retencji często nakładają się na siebie, co zwiększa złożoność interpretacji wyników. Przykładem może być chromatografia w odwróconym układzie faz, w której dominującym mechanizmem retencji są oddziaływania hydrofobowe zachodzące pomiędzy niepolarnymi fragmentami analitów a powierzchnią fazy stacjonarnej. W przypadku związków o charakterze polarno-jonowym istotny udział mogą mieć również oddziaływania elektrostatyczne oraz wiązania wodorowe, wpływające na selektywność rozdzielania i kolejność elucji. Zrozumienie współistnienia tych

mechanizmów ma kluczowe znaczenie dla interpretacji zachowania chromatograficznego analizowanych związków [16–17]. Innym przykładem może być chromatografia oddziaływań hydrofilowych (HILIC, ang. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*), która wykorzystuje polarne fazy stacjonarne typowe dla chromatografii w normalnym układzie faz w połączeniu z fazami ruchomymi stosowanymi w RPLC. Mechanizm retencji w tej technice jest złożony i opiera się zarówno na podziale analitów w cienkiej warstwie wodnej obecnej na powierzchni fazy stacjonarnej, jak i na oddziaływaniach adsorpcyjnych [18]. Z kolei w chromatografii w trybie mieszanym (ang. *Mixed-Mode Chromatography*) stosuje się fazy stacjonarne zaprojektowane tak, aby łączyć w sobie cechy różnych mechanizmów retencji. Umożliwia to jednoczesne występowanie oddziaływań hydrofobowych, elektrostatycznych oraz oddziaływań powinowactwa, co zwiększa selektywność i możliwości rozdzielania złożonych mieszanin [19–20].

III.1.4. Wielkości charakteryzujące chromatogram

Efektywność separacji w chromatografii cieczowej jest zależna od wielu czynników, takich jak, np.: właściwości kolumny chromatograficznej, skład fazy ruchomej, temperatura czy prędkość przepływu eluentu. Czynniki te wpływają na charakter oddziaływań analitów z fazą stacjonarną, a tym samym na charakter procesu rozdzielania. Ocena, jakości separacji na podstawie uzyskanego chromatogramu polega na analizie parametrów, które odzwierciedlają efekt tych oddziaływań, takich jak np.: czas retencji, współczynnik selektywności, rozdzielczość czy liczba pól teoretycznych. Ich właściwe zrozumienie i kontrola pozwala optymalizować rozdzielanie, zwiększać precyzję pomiarów oraz poprawiać powtarzalność i jakość analiz. Poniżej omówione zostały najważniejsze wielkości charakteryzujące chromatogram [21]:

- **Czas retencji, t_R** (rys. 3.3) – jest jedną z podstawowych wielkości charakteryzujących chromatogram. Określa czas, jaki upływa od momentu wprowadzenia badanej substancji do kolumny do chwili, gdy osiąga maksymalny sygnał w detektorze. Wartość czasu retencji odzwierciedla stopień równowagi oddziaływań analitu z fazą stacjonarną w porównaniu do fazy ruchomej. Związki silniej adsorbowane przez fazę stacjonarną pozostają w kolumnie dłużej, natomiast te słabiej oddziałujące przemieszczają się szybciej wraz z fazą ruchomą. W praktyce czas retencji można traktować jako wielkość charakterystyczną dla danego analitu, która pozostaje powtarzalna przy zachowaniu tych samych warunków analitycznych (m.in.: rodzaj kolumny, skład fazy ruchomej, temperatura) [22–23].

- **Czas retencji substancji nieadsorbującej się (czas retencji intertu), t_0** , (rys. 3.3) – potocznie nazywany czasem martwym retencji, w chromatografii cieczowej oznacza czas, w którym substancja nieoddziałująca z fazą stacjonarną przemieszcza się przez kolumnę chromatograficzną. Jest to minimalny czas potrzebny na opuszczenie kolumny przez substancję, która nie wchodzi w żadne interakcje z fazą stacjonarną wypełniającą kolumnę. W praktyce wartość t_0 można wyznaczyć przy zastosowaniu związku chemicznie obojętnego (np. uracylu w RPLC). Stosuje się też metodę piknometryczną zwaną metodą wagową. W metodzie tej kolumnę nasyca się dwoma rozpuszczalnikami różniącymi się gęstościami. Najpierw waży się kolumnę nasyconą rozpuszczalnikiem A, a następnie kolumnę nasyconą rozpuszczalnikiem B. W ten sposób wyznacza się tzw. objętość martwą kolumny (V_0), którą przy przyjętym natężeniu przepływu eluentu przelicza się na czas martwy retencji (zależność McCormicka i Kargera – wzór 3.1 i 3.2). Czas retencji intertu odgrywa ważną rolę w optymalizacji warunków chromatograficznych oraz w prawidłowej interpretacji chromatogramu [24–27].

$$V_0 = \frac{m_A - m_B}{\rho_A - \rho_B} \quad (3.1)$$

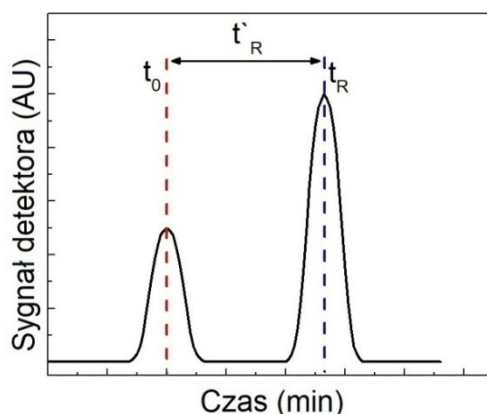
gdzie: m_A i m_B – masa kolumny nasyconej odpowiednio rozpuszczalnikami A i B, ρ_A i ρ_B – gęstości rozpuszczalników A i B.

$$t_0 = \frac{V_0}{\dot{V}} \quad (3.2)$$

gdzie: $\dot{V}$ – objętościowe natężenie przepływu eluentu.

- **Zredukowany czas retencji, t'_R** (rys. 3.3) – określa rzeczywisty czas, jaki analit spędza w kolumnie w wyniku oddziaływań z fazą stacjonarną. Parametr ten jest obliczany, jako różnica między całkowitym czasem retencji, a martwym czasem retencji (wzór 3.3), co pozwala wyeliminować wpływ transportu w fazie ruchomej. Dzięki temu t'_R jest dokładniejszym wskaźnikiem retencji, ponieważ pokazuje, ile czasu analit faktycznie pozostaje w kolumnie z powodu oddziaływań z fazą stacjonarną. Ułatwia to porównywanie zachowania różnych związków i lepsze zrozumienie mechanizmów retencji w kolumnie chromatograficznej [24–27].

$$t'_R = t_R - t_0 \quad (3.3)$$



Rysunek 3.3. Chromatogramy z zaznaczonym czasem retencji (t_R), czasem retencji inerty (t_0) i zredukowanym czasem retencji (t'_R)

- **Współczynnik retencji, k** – jest bezwymiarową wielkością określającą stopień zatrzymywania analitu w kolumnie, czyli jego powinowactwo do fazy stacjonarnej w porównaniu z fazą ruchomą. Oblicza się go na podstawie stosunku zredukowanego czasu retencji do czasu retencji inerty zgodnie ze wzorem 3.4. Większe wartości k wskazują na silniejsze oddziaływania z fazą stacjonarną, natomiast mniejsze wskazują na słabsze powinowactwo. Parametr ten umożliwia porównywanie retencji różnych związków niezależnie od rodzaju kolumny i natężenia przepływu fazy ruchomej [24–27].

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0} \quad (3.4)$$

- **Współczynnik selektywności, α** – jest parametrem określającym skuteczność rozdzielania analitów. Definiuje się go, jako stosunek współczynników retencji dwóch kolejno eluujących związków, zgodnie ze wzorem 3.5. Można dokładnie ocenić, jak dobrze układ chromatograficzny rozdziela mieszaninę związków. Im większa wartość α , tym lepsze rozdzielanie sąsiadujących pików i łatwiejsze uzyskanie wiarygodnych wyników analitycznych [25,28-29].

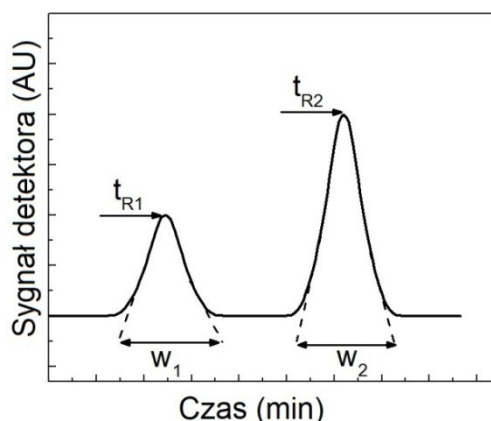
$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (3.5)$$

gdzie: k_2 – współczynnik retencji składnika eluującego później,
 k_1 – współczynnik retencji składnika eluującego wcześniej [25,28-29].

- **Rozdzielczość chromatograficzna, R_S** (rys. 3.4) – określa stopień rozdzielania dwóch sąsiadujących pików chromatograficznych. Większa wartość R_S oznacza wyraźne, dobrze odseparowane piki, natomiast mniejsza wartość wskazuje na ich nakładanie się i niedostateczne rozdzielanie. W praktyce przyjmuje się: $R_S \approx 1$ częściowe nakładanie pików, rozdzielanie niedostateczne, $R_S \approx 1,5$ piki niemal całkowicie rozdzielone, co uznaje się za dobrą separację, $R_S > 2$ pełne rozdzielanie pików. Rozdzielczość można również wyrazić ilościowo za pomocą współczynnika rozdzielczości, opisanego wzorem 3.6 [25,27-30].

$$R_S = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2} \quad (3.6)$$

gdzie: t_{R1}, t_{R2} – czasy retencji dla pierwszego i drugiego składnika,
 w_1, w_2 – szerokości pików u podstawy dla pierwszego i drugiego składnika [25,27-30].



Rysunek 3.4. Schemat wyznaczania rozdzielczości chromatograficznej dla mieszaniny dwuskładnikowej [25]

- **Liczba pól teoretycznych, N** – określa wydajność kolumny chromatograficznej. Większa wartość N oznacza węższe i lepiej odseparowane piki, co pozwala skutecznie oznaczać związki nawet o zbliżonych właściwościach. Parametr

ten zależy m.in.: od długości i średnicy kolumny, wielkości ziaren złoża oraz od warunków analizy, takich jak np. prędkość przepływu fazy ruchomej (wzór 3.7) [30-31].

$$N = \frac{L}{H} \quad (3.7)$$

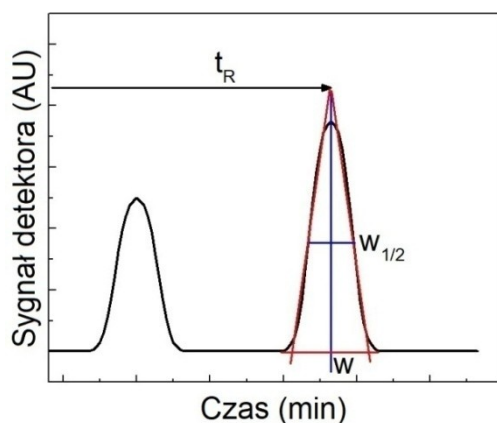
gdzie: L – długość kolumny chromatograficznej, H (WRPT) – wysokość równoważna półce teoretycznej [31].

W praktyce liczba pólk teoretycznych obliczana jest na podstawie kształtu i szerokości uzyskanego piku chromatograficznego (rys. 3.5). Najczęściej stosuje się jeden z dwóch wzorów 3.8 lub 3.9, gdzie $w_{1/2}$ oznacza szerokość piku w połowie wysokości [30-31]:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (3.8)$$

lub

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (3.9)$$



Rysunek 3.5. Schemat wyznaczenia liczby pólk teoretycznych [30-31]

III.1.5. Równowaga adsorpcyjna w chromatografii cieczerwowej

Podstawą procesu chromatografii cieczerwowej jest adsorpcja, czyli przyłączanie cząsteczek analitu do powierzchni fazy stacjonarnej. Równowaga adsorpcyjna określa stan,

w którym szybkość adsorpcji i desorpcji cząsteczek jest zrównoważona, co wpływa na efektywność rozdzielania i kształt pików chromatograficznych. Dokładne poznanie równowagi adsorpcyjnej jest szczególnie ważne w przypadku analiz dużych stężeń badanych substancji lub złożonych mieszanin, gdzie interakcje pomiędzy składnikami mogą prowadzić do zmian w przebiegu procesu rozdzielania, takich jak poszerzenie lub asymetria pików [32-35].

Izotermy adsorpcji, jako modele opracowane przy różnych założeniach stanowią podstawę do zrozumienia mechanizmów adsorpcji i przewidywania zachowania analitów w procesie chromatograficznym. Pozwalają zrozumieć charakter i siłę interakcji między analitem, a fazą stacjonarną, określających przebieg procesu rozdzielania. Opisują zależność pomiędzy ilością substancji zaadsorbowanej na powierzchni adsorbentu, a jej stężeniem w fazie ciekłej w warunkach stałej temperatury [32-36]. W dalszej części zostaną omówione najczęściej stosowane modele izoterm adsorpcji, które pozwalają opisać charakter oddziaływań pomiędzy analitem, a powierzchnią adsorbentu.

III.1.5.1. Izotermy adsorpcji

Różne modele izoterm adsorpcji uwzględniają odmienne mechanizmy interakcji pomiędzy cząsteczkami analitu a powierzchnią adsorbentu, a także różny stopień heterogeniczności tej powierzchni. Dzięki temu możliwe jest bardziej precyzyjne opisanie procesu retencji i przewidywanie zachowania substancji w kolumnie chromatograficznej. Wybór odpowiedniego modelu ma istotne znaczenie dla interpretacji wyników oraz optymalizacji warunków separacji, ponieważ wpływa na ocenę siły i charakteru oddziaływań [32-36]. Poniżej przedstawiono krótkie opisy najczęściej stosowanych w praktyce modeli izoterm adsorpcji.

Izoterma Henry'ego

Izoterma liniowa stanowi najprostszy model opisujący adsorpcję, zakładający, że ilość substancji adsorbowanej jest wprost proporcjonalna do jej stężenia w fazie ciekłej. Model ten znajduje zastosowanie w zakresie niskich stężeń, gdy powierzchnia adsorbentu pozostaje daleka od nasycenia, a oddziaływania między cząsteczkami analitu można uznać za pomijalne. W chromatografii cieczowej model ten dobrze sprawdza się w warunkach idealnych, gdy proces retencji przebiega liniowo. Zależność tę można zapisać równaniem 3.10 [36-38]:

$$q = K_H \cdot C_m \quad (3.10)$$

gdzie: q – stężenie analitu w fazie stacjonarnej (g/dm^3) (odniesione do objętości adsorbentu), C_m – stężenie analizowanej substancji w fazie ruchomej (g/dm^3), K_H – stała Henry'ego, współczynnik określający równowagę między ilością substancji w fazie stałej i ciekłej [36-38].

Izoterma Langmuira

Model Langmuira opiera się na założeniu, że proces zachodzi na jednorodnej powierzchni adsorbentu, a wszystkie miejsca adsorpcyjne mają jednakową energię adsorpcji. W chromatografii cieczowej izoterma Langmuira jest szczególnie istotna przy opisie retencji w warunkach, gdy stężenie analitu jest na tyle wysokie, że powierzchnia adsorbentu zbliża się do nasycenia. Adsorpcja postępuje, aż do utworzenia jednowarstwowej powłoki na powierzchni, a przebieg tego procesu można przedstawić za pomocą równania 3.11 [33-39]:

$$q = q_s \cdot \frac{K \cdot C_m}{1 + K \cdot C_m} \quad (3.11)$$

gdzie: K – stała równowagi adsorpcji (dm^3/g), a q_s – maksymalna pojemność sorpcyjna fazy stacjonarnej (g/dm^3) [33-39].

Izoterma bi-Langmuira

W praktyce często zdarza się, że powierzchnia adsorbentu stosowanego w chromatografii nie jest jednorodna. Na powierzchni adsorbentu uwzględnia się występowanie wielu rodzajów miejsc adsorpcyjnych różniących się energią. Zastosowanie znajduje wtedy izoterma bi-Langmuira, która pozwala uwzględnić obecność różnych rodzajów miejsc adsorpcyjnych (wzór 3.12).

$$q = q_{s1} \cdot \frac{K_1 \cdot C_m}{1 + K_1 \cdot C_m} + q_{s2} \cdot \frac{K_2 \cdot C_m}{1 + K_2 \cdot C_m} \quad (3.12)$$

gdzie: K_1 i K_2 – stałe równowagi adsorpcyjne dla dwóch różnych rodzajów miejsc adsorpcyjnych (dm^3/g), a q_{s1} i q_{s2} – maksymalne pojemności sorpcyjne odpowiadające tym dwóm rodzajom miejsc adsorpcyjnych (g/dm^3) [33-34,37-38].

Izoterma Tótha

Izoterma Tótha jest to model stosowany do opisu adsorpcji na powierzchniach heterogenicznych, gdzie energia adsorpcji cząsteczek analitu nie jest jednakowa dla wszystkich miejsc adsorpcyjnych. W przeciwieństwie do klasycznej izotermy Langmuira, model Tótha uwzględnia zmienność energii adsorpcji, dzięki czemu lepiej opisuje proces w szerokim zakresie stężeń, zarówno przy niskim, jak i wysokim stopniu pokrycia powierzchni (wzór 3.13). Jest to szczególnie istotne w chromatografii cieczowej, gdy faza stacjonarna charakteryzuje się zróżnicowaną strukturą lub gdy analizowane są złożone mieszaniny.

$$q = q_s \cdot \frac{K \cdot C_m}{(1 + (K \cdot C_m)^v)^{\frac{1}{v}}} \quad (3.13)$$

gdzie: v – bezwymiarowa stała, która charakteryzuje potencjał adsorpcyjny oraz stopień niejednorodności powierzchni, gdy $v = 1$ adsorpcję uważa się za jednorodną, a model Tótha sprowadza się do klasycznego modelu Langmuira. Parametr v odgrywa kluczową rolę w interpretacji modelu, im bardziej odbiega od jedności, tym większa jest heterogeniczność powierzchni adsorbentu [26,33,38].

Izoterma Freundlicha

Izoterma Freundlicha jest to model opisujący adsorpcję na powierzchniach heterogenicznych, gdzie energia adsorpcji cząsteczek analitu jest zróżnicowana. W przeciwieństwie do izotermy Langmuira, model ten nie zakłada tworzenia monowarstwy, lecz uwzględnia możliwość adsorpcji wielowarstwowej. Izoterma Freundlicha dobrze opisuje proces w zakresie niskich i średnich stężeń, jednak przy bardzo wysokich stężeniach traci dokładność, ponieważ nie przewiduje nasycenia powierzchni adsorbentu (wzór 3.14) [38,40].

$$q = K_F \cdot C_m^{\frac{1}{n_F}} \quad (3.14)$$

gdzie: K_F – stała Freundlicha, związana z pojemnością adsorpcyjną, n_F – parametr określający intensywność adsorpcji [38,40].

Izoterma Langmuira-Freundlicha

Izoterma Langmuira-Freundlicha nazywana również izotermą Sipsa, łączy cechy modeli Langmuira i Freundlicha, dzięki czemu pozwala opisywać adsorpcję zarówno na jednorodnych, jak i niejednorodnych powierzchniach. Powstała w celu lepszego opisu adsorpcji na powierzchniach heterogenicznych w szerokim zakresie stężeń. Model ten uwzględnia zarówno możliwość tworzenia monowarstwy (jak w izotermie Langmuira), jak i zmienność energii adsorpcji charakterystyczną dla izotermy Freundlicha. Jest szczególnie przydatny, gdy powierzchnia adsorbentu wykazuje częściową heterogeniczność (wzór 3.15) [35-36,38]:

$$q = q_s \cdot \frac{K \cdot C_m^\beta}{1 + (K \cdot C_m)^\beta} \quad (3.15)$$

gdzie: β – oznacza parametr heterogeniczności powierzchni (gdy $\beta = 1$ równanie redukuje się do izoterm Langmuira) [35-36,38].

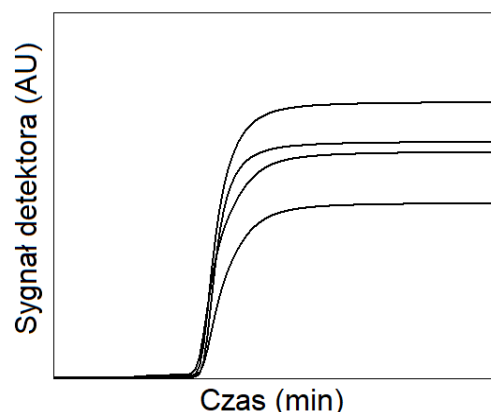
III.1.5.2. Wyznaczanie izoterm adsorpcji – metody dynamiczne

Metody dynamiczne wyznaczania izoterm adsorpcji polegają na monitorowaniu procesu adsorpcji i desorpcji w warunkach przepływu, co umożliwia uzyskanie danych eksperymentalnych w czasie rzeczywistym. Zastosowanie technik dynamicznych jest szczególnie korzystne w układach, w których równowaga adsorpcyjna ustala się powoli lub gdy konieczna jest szczegółowa analiza mechanizmów transportu masy oraz kinetyki oddziaływań adsorpcyjnych. Wśród metod dynamicznych najczęściej wykorzystuje się np.: analizę frontálną (FA, ang. *Frontal Analysis*), analizę frontálną z punktem charakterystycznym (FACP, ang. *Frontal Analysis by Characteristic Point*), elucję przez punkt charakterystyczny (ECP, ang. *Elution by Characteristic Point*) czy metodę impulsową [25,36-37,41-42]. Metody te różnią się sposobem prowadzenia eksperymentu oraz zakresem wymaganych obliczeń, jednak ich wspólną cechą jest możliwość uzyskania danych w warunkach przepływu, co lepiej odzwierciedla rzeczywiste procesy chromatograficzne. Analiza FACP polega na wykorzystaniu określonego punktu na krzywej wyjścia, który odpowiada ustalonej wartości stężenia w fazie ciekłej. W praktyce najczęściej wybiera się punkt, w którym stężenie w eluacie osiąga określony ułamek stężenia początkowego. Na podstawie tego punktu, przy znajomości objętości przepływu i stężenia roztworu, można obliczyć ilość substancji zaadsorbowanej w kolumnie oraz wyznaczyć parametry równowagi adsorpcji [37,42-43]. Dobre wyniki wyznaczania izoterm adsorpcji

dla kolumn o liczbie pól teoretycznych większej od około 3000 daje metoda ECP. Jedną z odmian tej metody jest metoda dyfuzyjnego zbocza piku. Do obliczeń wykorzystuje się fragment piku, w którym dominują procesy dyfuzji. Na podstawie zależności stężenia od czasu w tym obszarze można wyznaczyć parametry izotermy adsorpcji [25,37,41,44]. W metodzie impulsowej kolumna jest najpierw nasycana roztworem badanej substancji o stężeniu C_0 . Następnie na wlot kolumny podawany jest krótki impuls próbki o stężeniu nieznacznie większym niż C_0 . Po jego podaniu stężenie na wlocie ponownie ustala się na poziomie C_0 . Parametry modelu, takie jak q_s i K , wyznacza się na podstawie zależności czasu retencji od wielkości zmiany stężenia względem wartości C_0 [25,42-43]. Wybór odpowiedniej metody zależy od rodzaju badanych układów, wymaganej dokładności oraz dostępnych warunków eksperymentalnych. Szerzej omówiona zostanie metoda analizy frontalnej, ze względu na jej zastosowanie w części badawczej niniejszej rozprawy doktorskiej.

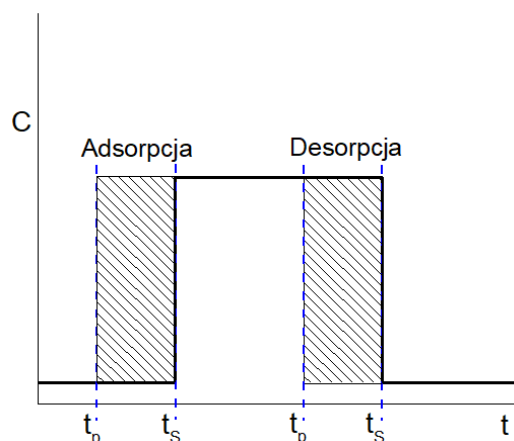
Analiza frontalna

W analizie frontalnej przez kolumnę chromatograficzną nieprzerwanie przepuszcza się roztwór badanego związku o określonym stężeniu, aż do osiągnięcia warunków nasycenia fazy stacjonarnej. Następnie eksperyment powtarza się dla kolejnych stężeń analizowanej substancji. W trakcie przepływu roztworu przez kolumnę powstają charakterystyczne krzywe wyjścia (rys. 3.6), odzwierciedlające proces stopniowego nasycania powierzchni adsorbentu. Istotnym elementem tej metody jest analiza profilu elucji, dostarczająca informacji o właściwościach adsorpcyjnych substancji oraz charakterze oddziaływań między adsorbentem a adsorbentem. W początkowej fazie eksperymentu adsorbat jest niemal całkowicie zatrzymywany na powierzchni adsorbentu, aż do stopniowego zajęcia dostępnych miejsc adsorpcyjnych. Strome krzywe świadczą o silnych oddziaływaniach adsorpcyjnych i szybkim nasycaniu powierzchni, natomiast łagodniejsze przejścia mogą wskazywać na ograniczenia dyfuzyjne w porach adsorbentu lub złożoną kinetykę procesu. Położenie frontu krzywych wyjścia zależy od pojemności adsorpcyjnej adsorbentu oraz stężenia adsorbentu, im dłuższy czas potrzebny do osiągnięcia plateau, tym większa pojemność adsorpcyjna badanego adsorbentu. Analiza pola ograniczonego krzywą umożliwia ilościowe wyznaczenie ilości zaadsorbowanej substancji, a tym samym określenie punktów izotermy adsorpcji [36-37,41-42,45-46].



Rysunek 3.6. Przykładowe krzywe wyjścia badanego analitu o różnych stężeniach wlotowych

Wyznaczanie izoterm adsorpcji metodą analizy frontalnej polega na określeniu ilości substancji zatrzymanej przez fazę stacjonarną na podstawie przebiegu zmian stężenia analitu w funkcji czasu, $C(t)$ (rys. 3.7). Charakterystycznym elementem otrzymanej krzywej jest moment pojawienia się analitu na wyjściu kolumny, oznaczony jako t_p , który wyznacza początek narastania sygnału. Drugim istotnym parametrem jest czas t_s , odpowiadający osiągnięciu stanu ustalonego, w którym stężenie analitu na wyjściu kolumny osiąga wartość równą stężeniu roztworu doprowadzanego do kolumny. Różnica pomiędzy t_s a t_p odpowiada szerokości strefy przejściowej frontu i odzwierciedla wpływ zjawisk transportu masy, takich jak dyfuzja oraz kinetyka adsorpcji. Im bardziej stromy front, tym mniejsze rozmycie sygnału i szybsze ustalanie równowagi adsorpcyjnej. W przypadku desorpcji obserwuje się analogiczny, lecz odwrócony przebieg krzywej, polegający na stopniowym spadku stężenia analitu od wartości plateau do zera [46-47].

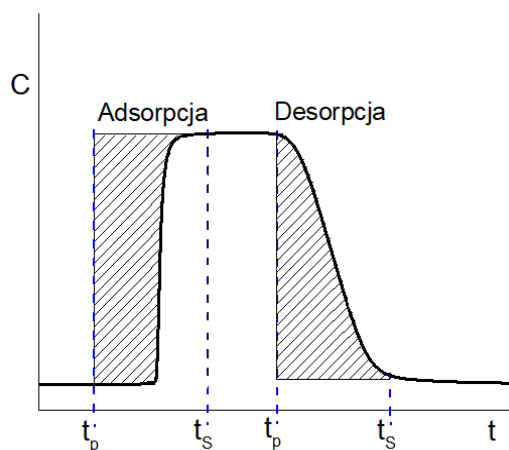


Rysunek 3.7. Schemat teoretycznych granic frontalnych dla procesów adsorpcji i desorpcji w metodzie analizy frontalnej

W praktyce fronty adsorpcyjne i desorpcyjne są zwykle bardziej rozmyte niż przedstawiono na rysunku 3.7. Bardziej realistyczny przebieg procesu przedstawiono na rysunku 3.8. Na wykresie widoczna jest zmiana stężenia analitu w czasie, podczas adsorpcji stężenie wzrasta od momentu t_p do osiągnięcia stanu ustalonego w czasie t_s , natomiast podczas desorpcji obserwuje się przebieg odwrotny, polegający na stopniowym spadku stężenia od wartości plateau do zera [46–47]. Rozmycie frontów wynika z procesów transportu masy oraz ograniczeń kinetycznych zachodzących w złożu chromatograficznym. Do ilościowego opisu adsorpcji stosuje się zależność uwzględniającą parametry strukturalne złoża (wzór 3.16), w której jako wielkość odniesienia wykorzystuje się czas retencji inerty, t_0 [25,45].

$$q = C_0 \cdot \frac{\varepsilon_t}{1 - \varepsilon_t} \cdot \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (3.16)$$

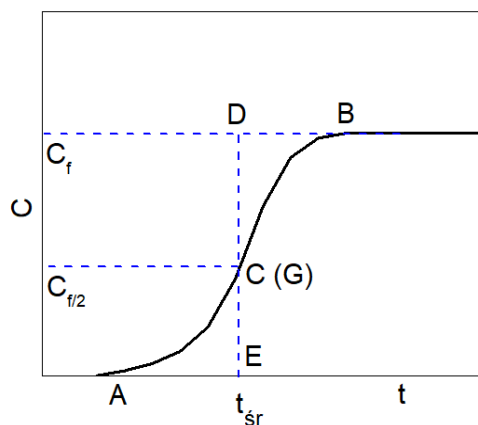
gdzie: ε_t – porowatość całkowita złoża.



Rysunek 3.8. Schemat granic frontalnych dla procesów adsorpcji i desorpcji w metodzie analizy frontalnej

Aby wyznaczyć czas retencji bądź równoważną objętość retencji w analizie frontalnej, korzysta się z metod opartych na interpretacji krzywej wyjścia analizowanej substancji z kolumny. Typowy przebieg takiej krzywej przedstawiono na rysunku 3.9. Krzywa AB przedstawia zmianę stężenia substancji na wylocie kolumny w funkcji czasu. W punkcie A stężenie na wylocie zaczyna wzrastać, co oznacza początek pojawiania się substancji w eluacie. Punkt B odpowiada chwili, gdy stężenie osiąga wartość równą stężeniu w roztworze doprowadzającym, C_f . W celu określenia średniego czasu wyjścia substancji wyznacza się punkt C na krzywej AB, jest to tzw. metoda równych pól: pole powierzchni

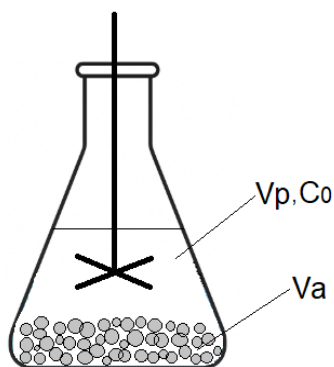
ograniczone przez punkty CDB jest równe polu ograniczonemu przez punkty CEA. W praktyce oznacza to, że punkt C dzieli krzywą wyjścia na dwie części o równych polach. Czas odpowiadający temu punktowi, oznaczony, jako t_{sr} , jest definiowany, jako średni czas wyjścia substancji z kolumny. Analogicznie, na podstawie przepływu fazy ruchomej można obliczyć równoważną objętość retencji. W praktyce jednak trudno jest precyzyjnie wyznaczyć punkt C na krzywej wyjścia substancji z kolumny w analizie frontalnej, ponieważ wymaga to dokładnego obliczenia pól powierzchni po obu stronach tego punktu. Inną metodą jest metoda stężenia średniego, gdzie punkt, w którym stężenie substancji na wylocie kolumny osiąga wartość równą połowie stężenia w roztworze doprowadzającym, $C_{f/2}$. Jeżeli krzywa wyjścia jest symetryczna lub można ją uznać w przybliżeniu za symetryczną względem punktu G, wówczas pole powierzchni ograniczone przez punkty GDB jest zbliżone do pola ograniczonego przez GAE. W takiej sytuacji punkt G można traktować, jako przybliżony średni punkt wyjścia substancji, a odpowiadający mu czas t_{sr} , jako średni czas wyjścia. Na rysunku 3.9 punkt G pokrywa się z punktem C, ponieważ został wyznaczony jako przecięcie krzywej wyjścia z poziomem odpowiadającym połowie stężenia $C_{f/2}$. Przy symetrycznej krzywej obie metody tj. równych pól i średniego stężenia, prowadzą do tego samego t_{sr} . Oprócz metody równych pól (punkt C) i metody średniego stężenia (punkt G), stosuje się także metodę punktu przegięcia krzywej wyjścia. Punkt przegięcia to miejsce na krzywej, gdzie stężenie zmienia się najszybciej, czyli środek najbardziej stromego odcinka krzywej. Choć nie jest on osobno zaznaczony na rysunku, jego położenie można oszacować na podstawie charakterystycznego kształtu krzywej [42,45].



Rysunek 3.9. Typowa krzywa wyjścia analizowanej substancji w analizie frontalnej z zaznaczonymi punktami charakterystycznymi

III.1.5.3. Wyznaczanie izoterm adsorpcji – metoda statyczna

Wyznaczanie izoterm adsorpcji metodą statyczną pozwala określić pojemność sorpcyjną danego adsorbentu. W odróżnieniu od metod dynamicznych, w podejściu statycznym nie analizuje się zmian stężenia w funkcji czasu, lecz wykorzystuje się informacje dotyczące stanów równowagi. Procedura ta polega na porównaniu stężenia analitu w roztworze początkowym ze stężeniem w roztworze po osiągnięciu stanu równowagi z adsorbentem. Podczas przeprowadzania eksperymentów adsorpcyjnych należy zachować stałe warunki prowadzenia procesu. W klasycznej metodzie statycznej określone ilości adsorbentu umieszcza się w zamkniętym naczyniu z roztworem o znanej objętości i określonym stężeniu początkowym (rys. 3.10). Po odpowiednim czasie kontaktu obu faz ustala się równowaga pomiędzy stężeniem związku w roztworze, a jego ilością zaadsorbowaną na powierzchni adsorbentu. Na tej podstawie można obliczyć ilość substancji zaadsorbowanej na jednostkę masy lub objętości adsorbentu, korzystając z odpowiedniego równania (wzór 3.17). Do wyznaczenia izotermy adsorpcji konieczne jest oznaczenie końcowego stężenia równowagowego w roztworze [25,48–50].



Rysunek 3.10. Schemat układu do wyznaczenia izoterm adsorpcji metodą statyczną

$$q = \frac{V_p \cdot (C_0 - C_m)}{V_a} \quad (3.17)$$

gdzie: V_p – początkowa objętość roztworu (cm^3), V_a – objętość adsorbentu (cm^3), C_0 – stężenie początkowe badanego związku (g/cm^3) [25,48-51].

Przeprowadzając eksperymenty dla różnych początkowych stężeń C_0 badanego związku, uzyskuje się eksperymentalną izotermę adsorpcji w postaci zależności $q = f(C_m)$. Parametrami, które można swobodnie modyfikować, są stężenia początkowe badanego

związku oraz objętość adsorbentu. Należy je starannie dobrać, aby umożliwić zbadanie szerokiego zakresu izoterm adsorpcji [24,48-51].

III.1.5.4. Rozkład energii adsorpcji

W chromatografii cieczowej substancje mogą oddziaływać z powierzchnią fazy stacjonarnej na różne sposoby, z których każdy charakteryzuje się odmienną energią adsorpcji. Różnorodność tych oddziaływań sprawia, że proces adsorpcji ma charakter heterogeniczny. Niejednorodność energetyczna powierzchni może prowadzić do ogonowania pików chromatograficznych, obniżenia sprawności procesu separacji, zmniejszenia rozdzielczości oraz wydłużenia czasu retencji analitów. W konsekwencji może to utrudniać interpretację wyników oraz ograniczać czułość i dokładność metod chromatograficznych [33,52-54]. Niejednorodność powierzchni fazy stacjonarnej może być również spowodowana obecnością zanieczyszczeń, takich jak związki żelaza, a także obecnością niezwiązanych grup silanolowych. Istotny wpływ na heterogeniczność powierzchni mają również różnice w grubości i gęstości warstwy ligandów związanych z powierzchnią krzemionki oraz występowanie dużych porów w tej warstwie [52,55].

Analiza rozkładu energii adsorpcji (AED, ang. *Adsorption Energy Distribution*) umożliwia lepsze poznanie procesu adsorpcji poprzez określenie liczby dostępnych centrów aktywnych na powierzchni adsorbentu oraz odpowiadających im wartości energii adsorpcji. Ponadto analiza AED ułatwia dobór modelu izoterm adsorpcji, który najlepiej opisuje badany układ adsorpcyjny [33,52,56]. W przeciwieństwie do klasycznych modeli izoterm adsorpcji, które zazwyczaj przedstawiają jedynie średnią energię lub z góry założony rozkład energii, AED ukazuje ciągły rozkład energii adsorpcji, dostarczając bardziej szczegółowych informacji o heterogeniczności powierzchni [33,52,57]. Całkowitą ilość substancji zaadsorbowanej na powierzchni adsorbentu można obliczyć, całkując wkład wszystkich miejsc adsorpcyjnych o różnych energiach adsorpcji w określonym zakresie oznaczonym jako $(\varepsilon_{min}, \varepsilon_{max})$, odpowiednio minimalna i maksymalna energia adsorpcji charakterystyczna dla rozpatrywanych miejsc aktywnych na powierzchni adsorbentu (wzór 3.18).

$$q(C_m) = \int_{\varepsilon_{min}}^{\varepsilon_{max}} f(\varepsilon) \cdot \theta(C_m, \varepsilon) d\varepsilon \quad (3.18)$$

gdzie: $q(C_m)$ – doświadczalnie wyznaczona izoterma adsorpcji, $f(\varepsilon)$ – rozkład energii adsorpcji, ε – energia adsorpcji (energia adsorpcji adsorbentu z określonym centrum

aktywnym), a $\theta(C_m, \varepsilon)$ – lokalny model adsorpcji opisujący centra aktywne o energii adsorpcji ε [33,52,58].

Do oszacowania rozkładu energii adsorpcji wykorzystuje się różnorodne metody numeryczne. Polegają one na wprowadzeniu dodatkowych informacji lub ograniczeń, co zawęży możliwe rozwiązania, dzięki czemu problem staje się lepiej określony, a uzyskane wyniki są bardziej stabilne, wiarygodne i użyteczne [33,52]. W analizie danych chromatograficznych często wykorzystuje się algorytm oczekiwania–maksymalizacji (EM, ang. *Expectation – Maximization*) (wzór 3.19). Program matematyczny opracowany przez Stanley'a i współpracowników umożliwia wyznaczenie rozkładu stałych równowagi adsorpcji bez konieczności przyjmowania z góry określonego modelu rozkładu energii. Metoda EM jest algorytmem iteracyjnym służącym do estymacji parametrów w modelach statystycznych w sytuacji, gdy część zmiennych ma charakter ukryty. W analizie adsorpcji nieznan rozkład energii traktowany jest właśnie jako parametr ukryty. Działanie tego algorytmu polega na naprzemiennym wykonywaniu dwóch etapów: w pierwszym etapie oczekiwania wyznacza się przybliżony rozkład energii na podstawie aktualnych parametrów, natomiast w drugim etapie maksymalizacji dokonuje się ich korekty w celu zwiększenia zgodności modelu z danymi eksperymentalnymi. Proces ten powtarza się wielokrotnie, aż do momentu, gdy osiągnięta zostanie zadowalająca dokładność lub stabilność wyników [33,52,55,59].

$$q_{calc}(C_j) = \sum_{i=1}^p f(\ln K_i) \cdot \theta(C_j, K_i) \Delta \ln K \quad (3.19)$$

gdzie: $q_{calc}(C_j)$ – obliczona ilość substancji zaadsorbowanej dla j-tego punktu izotermy, $f(\ln K_i)$ – wartość funkcji rozkładu energii adsorpcji w punkcie odpowiadającym stałej równowagi K_i , $\theta(C_j, K_i)$ – lokalny stopień pokrycia miejsc adsorpcyjnych o energii odpowiadającej K_i przy stężeniu analitu C_j . Przestrzeń energii dzieli się na równomierną siatkę z p punktami, a odległość między sąsiednimi punktami siatki wynosi $\Delta \ln K$ [33,52].

W części badawczej niniejszej rozprawy doktorskiej rozkład energii adsorpcji przedstawiono w postaci zależności pojemności adsorpcyjnej q_s od parametru $\ln K$, który jest proporcjonalny do zmiany standardowej energii swobodnej Gibbsa adsorpcji [33,52].

W badaniach dotyczących równowagi adsorpcyjnej dane eksperymentalne często prezentuje się w formie wykresu Scatcharda, który stanowi użyteczne narzędzie do wstępnej,

jakościowej analizy wyników eksperymentu. Wykres ten pozwala nie tylko na ocenę ogólnego przebiegu procesu adsorpcji, lecz także na określenie charakteru miejsc adsorpcyjnych występujących na powierzchni fazy stacjonarnej. Wykres ten sporządza się w układzie q/C_m w funkcji q , gdzie iloraz q/C_m odpowiada stosunkowi ilości substancji zaadsorbowanej w fazie stacjonarnej do jej stężenia w fazie ruchomej. Liniowa zależność świadczy o energetycznej jednorodności powierzchni oraz jednakowej sile oddziaływań pomiędzy adsorbatem, a wszystkimi miejscami adsorpcyjnymi, co jest zgodne z założeniami modelu Langmuira. Natomiast nieliniowy przebieg wykresu Scatcharda wskazuje na energetyczną heterogeniczność powierzchni, co oznacza, że miejsca adsorpcyjne różnią się energią wiązania z adsorbatem [42,59-60].

III.1.6. Rozwój chromatografii ciekowej – nowe strategie

W ostatnich dekadach metoda chromatografii ciekowej, była systematycznie udoskonalana w celu umożliwienia szybkich, precyzyjnych i powtarzalnych analiz złożonych mieszanin, zarówno w analizie laboratoryjnej, jak i w zastosowaniach przemysłowych, przy jednoczesnym ograniczeniu wpływu na środowisko. Wprowadzenie nowych rozwiązań technologicznych, takich jak miniaturyzacja elementów układu, udoskonalenie konstrukcji kolumn oraz zastosowanie nowoczesnych faz stacjonarnych wypełniających kolumny chromatograficzne, pozwoliło znacząco zwiększyć efektywność separacji. Obecnie rozwój tej techniki zmierza w kierunku jeszcze większej wydajności i selektywności, co znajduje odzwierciedlenie w powstaniu ultra wysokosprawnej chromatografii ciekowej (UHPLC, ang. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*), coraz częstszym sprzęganiu chromatografii ciekowej z zaawansowanymi metodami detekcji oraz projektowaniu innowacyjnych faz stacjonarnych [61-67].

Jednym z najważniejszych kierunków rozwoju chromatografii ciekowej jest zwiększenie szybkości i selektywności separacji poprzez zastosowanie faz stacjonarnych o małych rozmiarach ziaren. Warunki takie zapewnia LC prowadzona przy dużych spadkach ciśnień. Metoda UHPLC wykorzystuje kolumny chromatograficzne wypełnione bardzo drobnymi ziarnami adsorbentu ($< 2 \mu\text{m}$), co pozwala na prowadzenie analiz pod znacznie wyższym ciśnieniem niż w klasycznej HPLC. Zmniejszenie rozmiaru ziaren zwiększa powierzchnię kontaktu analitów z fazą stacjonarną i skraca drogę dyfuzji, co prowadzi do poprawy rozdzielczości i selektywności separacji. Wyższe ciśnienie umożliwia utrzymanie większego przepływu fazy ruchomej przez kolumnę, co znacząco skraca czas analizy i zmniejsza zużycie rozpuszczalników [62-63]. Główne zalety UHPLC to krótszy czas analizy oraz większa czułość i rozdzielczość. Efekty te osiągnięto również dzięki modernizacji

konstrukcji chromatografów w stosunku do klasycznych systemów HPLC. Konieczne było opracowanie pomp zdolnych do pracy pod bardzo wysokim ciśnieniem (nawet do 1000–1200 bar), a także wprowadzenie układów dozujących o minimalnej objętości martwej, które redukują efekt rozmycia pasma. Istotnym elementem są również detektory o zwiększonej szybkości akwizycji danych, co umożliwia precyzyjne rejestrowanie bardzo wąskich pików charakterystycznych dla UHPLC [64-65].

Rzeczywisty rozwój chromatografii cieczowej jest ściśle związany z doskonaleniem metod detekcji. Obecnie standardem staje się sprzężanie UHPLC lub HPLC ze spektrometrią mas (np. UHPLC-MS/MS, ang. *Ultra High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*, LC-HRMS, ang. *Liquid Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry*), co umożliwia nie tylko identyfikację, ale także ilościowe oznaczanie związków śladowych w złożonych matrycach. Jak opisali W. Yang i współpracownicy [66], połączenie UHPLC ze spektrometrią mas pozwala na szybkie i dokładne oznaczanie różnych klas lipidów, takich jak oksylipiny, wolne kwasy tłuszczowe czy lizofosfolipidy w próbkach biologicznych, co ma istotne znaczenie w badaniach nad stresem oksydacyjnym. Natomiast Y. Ling i współautorzy [67] opracowali, zwalidowali szybką i czułą metodę UHPLC–MS/MS umożliwiającą jednoczesne oznaczanie metabolitów kwasu foliowego oraz aminokwasów związanych z metabolizmem jednowęglowym (np. homocysteiny, metioniny) w różnych próbkach biologicznych, takich jak osocze czy krew. Metoda ta charakteryzuje się wysoką selektywnością i pozwala na dokładne oznaczenie wielu związków nawet przy bardzo niskich stężeniach, co jest istotne w badaniach klinicznych i epidemiologicznych. Natomiast zastosowanie dwuwymiarowej chromatografii cieczowej (2D-LC), wykorzystującej dwa ortogonalne mechanizmy separacji, pozwala na analizę zmian proporcji atropizomerów w czasie retencji oraz rozdzielenie współeluujących zanieczyszczeń. Jak opisali Y. Shen i in. [68], sprzężenie 2D-LC z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (HRMS) umożliwia wykrycie i identyfikację współeluującego regioizomeru nawet w stężeniu 0,05 % (w/w). Kolejnym przykładem jest połączenie chromatografii cieczowej z magnetycznym rezonansem jądrowym (LC-NMR, ang. *Liquid Chromatography – Nuclear Magnetic Resonance*) oraz spektrometrią mas, która pozwala na jednoczesne określenie budowy chemicznej i ilości składników w złożonych próbkach. Badania wykazały, że LC-NMR/MS pozwala dokładnie śledzić zmiany zachodzące w składnikach aktywnych. H. Fuchino [69] opisał, że w korzeniu *Achyranthes* dochodzi do rozkładu saponin podczas obróbki cieplnej, co może zmniejszać ich działanie biologiczne. Chromatografia LC-NMR/MS ujawniła, że w przypadku ziela

Leonurus stwierdzono obecność diterpenów, które są wrażliwe na wysoką temperaturę suszenia.

W ostatnich latach rozwój chromatografii cieczowej skupia się także na doskonaleniu faz stacjonarnych. Coraz większe znaczenie zyskują tzw. MOF-y (ang. *Metal–Organic Frameworks*) czyli porowate materiały zbudowane z jonów metali połączonych z ligandami organicznymi. Mają bardzo dużą powierzchnię właściwą i można je łatwo modyfikować chemicznie, dzięki czemu świetnie nadają się do rozdzielania związków niskocząsteczkowych oraz enancjomerów. Badania pokazują, że MOF-y mogą dorównywać klasycznym fazom stacjonarnym, a ich wprowadzenie do kolumn w postaci monolitycznych struktur lub hybrydowych adsorbentów (np. MOF osadzony na krzemionce) rozwiązuje problemy typowe dla czystych MOF-ów, takie jak kruchość czy nierównomierna wielkość ziaren. MOF-y stają się obiecującą alternatywą dla nowoczesnych metod separacji, zapewniając bardziej precyzyjne i efektywne analizy [70]. Nowoczesnym rozwiązaniem są fazy stacjonarne typu *Core–Shell* (rdzeń–powłoka). Mają one gęsty, nieporowaty rdzeń otoczony cienką, porowatą warstwą. Dzięki tej budowie kolumna stawia mniejszy opór przepływu, co skraca czas analizy, a jednocześnie zachowuje wysoką rozdzielczość. Badania pokazują, że ziarna krzemionki z rdzeniem o średnicy 2–4 μm i powłoką o grubości 70–300 nm zapewniają bardzo wysoką efektywność rozdzielczą zarówno w analizie związków aromatycznych, jak i w różnych trybach chromatograficznych, w tym HILIC. Dodatkowo możliwość regulacji grubości powłoki sprawia, że separacje w HPLC są stabilne i powtarzalne [71].

Kolejną grupą nowoczesnych materiałów są molekularnie imprintowane polimery (MIP, ang. *Molecularly Imprinted Polymers*). Tworzy się je poprzez polimeryzację monomerów wokół cząsteczki wzorcowej. Po jej usunięciu w polimerze pozostają „kieszenie” idealnie dopasowane do kształtu i właściwości analitu. Dzięki temu MIP-y umożliwiają bardzo selektywne rozdzielanie określonych związków, nawet w złożonych mieszaninach [72]. Kolejnym rozwiązaniem są fazy stacjonarne selektywnie modyfikowane. Do tej grupy należą m.in. mezoporowate adsorbenty krzemionkowe, takie jak MCM-41 czy SBA-15, a także ich odpowiedniki węglowe, które można dodatkowo funkcjonalizować w celu lepszego wiązania wybranych związków. Badania pokazują, że zsyntezowane mezoporowate węgle (RHA-MCM-41, RHA-SBA-15, RHA-CMK-3) charakteryzują się dużą powierzchnią właściwą oraz strukturą łączącą mezopory i mikropory, co umożliwia skuteczną adsorpcję wodoru i innych substancji [73].

Podsumowując, rozwój chromatografii cieczowej zmierza w kierunku większej wydajności, selektywności i integracji z zaawansowanymi technikami detekcji. Wprowadzenie UHPLC, sprzężanie z MS i NMR oraz zastosowanie innowacyjnych faz stacjonarnych, takich jak MOF-y, *Core-Shell*, MIP-y czy modyfikowane adsorbenty krzemionkowe typu MCM-41, znacząco poszerzyły możliwości analityczne tej metody, czyniąc ją szybszą i bardziej precyzyjniejszą w analizie złożonych mieszanin.

III.2. Chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych (HILIC)

III.2.1. Wprowadzenie

Do analizy związków chemicznych można stosować chromatografię cieczową zarówno w trybie faz normalnych (NPLC), jak i odwróconych (RPLC). W NPLC faza stacjonarna jest polarna, co skutkuje np. większą retencją związków polarnych. Retencja wzrasta wraz ze spadkiem polarności fazy ruchomej, ponieważ związki polarne silniej oddziałują z polarną fazą stacjonarną niż niepolarne związki. W RPLC sytuacja jest odwrotna, to związki niepolarne są silniej zatrzymywane. NPLC była i jest stosowana do rozdzielania związków o bardzo różnej polarności. Alternatywą dla tego rodzaju chromatografii stała się chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych (HILIC), która także pozwala efektywnie rozdzielać związki polarne. Choć HILIC bywa określana, jako wariant NPLC, jej mechanizm rozdzielania jest bardziej złożony. W HILIC wykorzystuje się polarne fazy stacjonarne, takie jak krzemionka, faza aminowa czy cyjanowa, natomiast faza ruchoma przypomina tę stosowaną w RPLC. W praktyce HILIC łączy więc cechy NPLC i RPLC. Metoda ta sprawdza się szczególnie przy analizie związków w skomplikowanych układach, które w RPLC eluują blisko objętości martwej kolumny. Dodatkowo polarne związki dobrze rozpuszczają się w wodnej fazie ruchomej HILIC, co eliminuje problemy z ich niską rozpuszczalnością, często występujące w klasycznej NPLC [74-76]. Mechanizm retencji w HILIC jest złożony i nadal nie został w pełni poznany, co sprawia, że prowadzenie dalszych badań w tym zakresie pozostaje istotne. Poznanie oddziaływań zachodzących między fazą stacjonarną, a rozdzielanymi związkami pozwala lepiej przewidywać ich zachowanie oraz optymalizować warunki separacji. Wiedza ta umożliwia również projektowanie nowych, bardziej selektywnych faz stacjonarnych oraz rozwijanie metod analitycznych dostosowanych do analiz złożonych związków [77-79]. Opisane w literaturze mechanizmy retencji w HILIC zostaną omówione w kolejnych podrozdziałach.

III.2.2. Klasyfikacja faz stacjonarnych stosowanych w HILIC

Chromatografia cieczowa w układzie HILIC charakteryzuje się wysoką selektywnością oraz powtarzalnością w rozdzielaniu związków polarnych, co czyni ją szczególnie użyteczną w analizie metabolitów, aminokwasów oraz nukleotydów. Pomimo dynamicznego rozwoju tej techniki oraz rosnącej liczby komercyjnych faz stacjonarnych dedykowanych HILIC, nadal brak uniwersalnej fazy stacjonarnej, która umożliwiałaby efektywne rozdzielanie wszystkich typów analitów. Wynika to z nakładania się wielu mechanizmów retencji oraz zróżnicowanych właściwości fizykochemicznych analizowanych związków [80]. Producenci kolumn dążą do zwiększenia wszechstronności faz poprzez wprowadzanie adsorbentów zwitterjonowych czy faz typu *mixed-mode*, jednak pełna uniwersalność pozostaje mało prawdopodobna. Zamiast tego obserwuje się trend w kierunku projektowania faz o szerokim zakresie zastosowań oraz zapewnienia wysokiej powtarzalności wyników analiz [76-81]. Fazy stacjonarne stosowane w HILIC różnią się właściwościami retencyjnymi oraz selektywnością, co wpływa na ich przydatność do rozdzielania związków o różnych właściwościach fizykochemicznych. Ponadto, uzyskanie optymalnych wyników rozdzielania wymaga często indywidualnego dostosowania składu fazy ruchomej, obejmującego dobór rodzaju buforu, pH, siły jonowej, a także proporcji i rodzaju stosowanych rozpuszczalników. W praktyce oznacza to, że skuteczna analiza w HILIC wymaga zarówno dokładnej znajomości właściwości faz stacjonarnych, jak i doświadczenia w doborze odpowiednich warunków eksperymentalnych [81-85].

III.2.2.1. Komercyjne fazy stacjonarne

Komercyjne fazy stacjonarne stosowane w chromatografii HILIC mogą stanowić czyste krzemionki albo podłoża krzemionkowe lub polimerowe, na których osadzono polarne grupy funkcyjne. Dostępnych jest wiele rodzajów grup funkcyjnych, co pozwala na różnicowanie właściwości kolumn chromatograficznych. Każdy rodzaj fazy stacjonarnej w chromatografii HILIC oddziałuje z analitami w nieco inny sposób, np.: poprzez wiązania wodorowe, oddziaływania elektrostatyczne lub ich kombinację. Te różnice w mechanizmach retencji wpływają na selektywność kolumn [76,86-88].

Fazy stacjonarne z czystej krzemionki wytwarzane są z niezmodyfikowanej krzemionki, której czystość zależy od metody jej przygotowania. Ze względu na jonizację grup silanolowych, faza stacjonarna krzemionkowa może tworzyć wiązania wodorowe z analitami i/lub wykazywać mechanizm wymiany kationowej przy wysokim pH. Jest szczególnie odpowiednia do analizy małych, polarnych cząsteczek. Kolumny tego rodzaju, wykonane z krzemionki niezmodyfikowanej chemicznie żadnymi ligandami, często wybierano do badań

wymagających sprzężenia ze spektrometrią mas. Sprzężenie HILIC z MS/MS było stosowane m.in. do analizy substancji leczniczych [89]. Dostępne stały się również fazy stacjonarne takie jak, np.: amidowe, cyjanowe, diolowe, polietylenoglikolowe, sulfoalkylobetainowe, cyklodekstrynowe i inne. Niektóre z nich wykazują możliwość zastosowania zarówno w chromatografii HILIC, jak i w RPLC. Kolumny HILIC (faza stacjonarna krzemionkowa) oraz ZIC-HILIC (faza stacjonarna sulfobetainowa) były jednymi z pierwszych komercyjnych faz stacjonarnych specjalnie zaprojektowanych do chromatografii HILIC. Od tego czasu pojawiło się wiele innych, a wielu badaczy nadal opracowuje nowe fazy stacjonarne do zastosowań w chromatografii HILIC [76,78,86-92]. Tabela 3.1 przedstawia zestawienie przykładowych polarnych faz stacjonarnych dostępnych komercyjnie, które mają zastosowanie w chromatografii HILIC [91,93].

Tabela 3.1. Przykładowe rodzaje komercyjnych faz stacjonarnych stosowanych w chromatografii HILIC

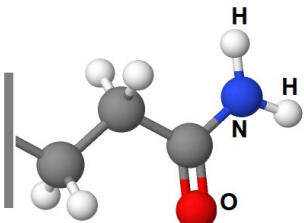
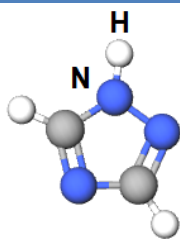
Rodzaj fazy stacjonarnej	Nazwa fazy stacjonarnej	Przykład kolumny chromatograficznej	Grupa funkcyjna	Opis
Neutralna	Amidowa	TSKgel Amide 80		Grupa amidowa związana z powierzchnią krzemionki za pomocą krótkiego łańcucha alkilowego, nie wykazuje właściwości zasadowych. Retencja analizowanych związków chemicznych jest w niewielkim stopniu zależna od pH fazy ruchomej, w odróżnieniu od innych faz HILIC zawierających grupy aminowe zdolne do jonizacji. Ze względu na chemiczną obojętność grup amidowych, takie fazy cechuje wysoka stabilność chemiczna. Szeroko stosowana do separacji cukrów, peptydów, oligosacharydów, glikoprotein czy glikozydów [76,78,86,91,93].
	Diolowa	Acclaim™ Mixed Mode HILIC-1		Grupy diolowe mogą być zakotwiczone na powierzchni krzemionki zarówno za pośrednictwem krótkiego łańcucha alkilowego, jak i dłuższego fragmentu węglowodorowego. W przypadku fazy 2,3-dihydroksypropylowej, diol związany jest z krótkim łańcuchem, co nadaje tej powierzchni wyraźnie polarny charakter. Wykazuje ona dużą zdolność do tworzenia wiązań wodorowych z cząsteczkami analizowanych substancji. Kolumny diolowe są stosowane w rozdzielaniu białek w trybie HILIC, znalazły zastosowanie także w rozdzielaniu niskocząsteczkowych związków fenolowych [76,88,90-91,93].
	Triazolowa	Cosmosil HILIC		Faza triazolowa zaliczana jest do grupy neutralnych, ponieważ pierścień 1,2,4-triazolowy w typowym zakresie pH stosowany w chromatografii HILIC nie ulega znaczącej jonizacji. W praktyce oznacza to, że powierzchnia pozostaje w dużej mierze obojętna. Retencja analizowanych związków wynika, więc głównie z charakteru polarnego oraz zdolności do tworzenia wiązań wodorowych [91,93].

Tabela 3.1. c.d. Przykładowe rodzaje komercyjnych faz stacjonarnych stosowanych w chromatografii HILIC

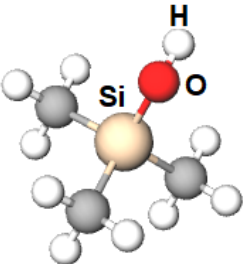
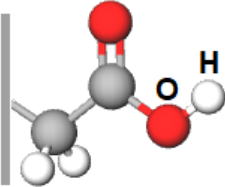
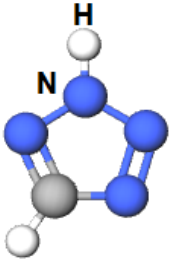
Rodzaj fazy stacjonarnej	Nazwa fazy stacjonarnej	Przykład kolumny chromatograficznej	Grupa funkcyjna	Opis
Anionowa	Silanolowa	Poroshell HILIC; Atlantis HILIC		Niezmodyfikowana krzemionka została włączona do grupy anionowej, ponieważ grupy silanolowe są naładowane ujemnie w zakresie pH fazy ruchomej powyżej 5. Krzemionka taka jak np. w kolumnie Atlantis HILIC przygotowana specjalnie z myślą o fazach ruchomych wodno-organicznych, należy do najczęściej stosowanych faz stacjonarnych w chromatografii HILIC. Dostępne komercyjnie żele krzemionkowe mogą różnić się stopniem czystości w zależności od technologii wytwarzania. W konsekwencji kolumny z czystą krzemionką pochodzące od różnych producentów mogą wykazywać istotne różnice w zakresie retencji, wydajności oraz kształtu pików chromatograficznych [76,78,87-88,90-91,93].
	Karboksylowa	Shodex VC-50		Faza stacjonarna z grupami karboksylowymi jest słabym wymienniczym kationowym. Jej powierzchnia może tworzyć wiązania wodorowe i oddziaływać z jonami dodatnimi, co pozwala na selektywną retencję związków polarnych, takich jak aminokwasy czy kwasy organiczne. Retencja zależy od pH i stężenia soli w fazie ruchomej, a faza ta cechuje się dobrą stabilnością chemiczną w typowych warunkach HILIC [76,87,90-91,93].
	Tetrazolowa	Depak PTZ		W fazie tetrazolowej grupy tetrazolowe są przyłączone do poliakrylamidu, który kowalencyjnie wiąże się z ziarnami krzemionki. Faza tetrazolowa może przenosić ładunek ujemny w pH fazy ruchomej powyżej 5 (pKa 4,9) dlatego zalicza się ją do grupy anionowej [91,93].

Tabela 3.1. c.d. Przykładowe rodzaje komercyjnych faz stacjonarnych stosowanych w chromatografii HILIC

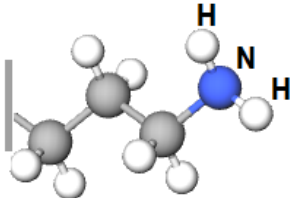
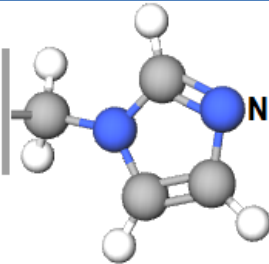
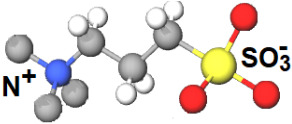
Rodzaj fazy stacjonarnej	Nazwa fazy stacjonarnej	Przykład kolumny chromatograficznej	Grupa funkcyjna	Opis
Kationowa	Aminowa	Shodex SILICA 5NH 4D; Purospher® STAR NH ₂		Grupy aminowe są przyłączone do krzemionki krótkim łańcuchem alkilowym (aminopropyl). W zależności od pH fazy ruchomej, pozwalają na retencję analizowanych związków zarówno poprzez wiązania wodorowe, jak i mechanizm wymiany anionowej. Związane fazy stacjonarne aminowe wykazują zwiększone powinowactwo do związków kwasowych, których retencja wynika z kombinacji mechanizmów podziału i wymiany jonowej. Grupy aminowe pierwszorzędowe są reaktywne i mogą np. tworzyć zasady Schiffa z aldehydami, co może powodować problemy podczas rozdzielania węglowodanów [76,78,86-88,90-91,93].
	Imidazolowa	Excsep® HILIC-Imidazole,		Faza stacjonarna imidazolowa, w której powierzchnia krzemionki jest modyfikowana grupami imidazolowymi, wykazuje dużą polarność, co sprawia, że jest szczególnie efektywna w separacji związków hydrofilowych, takich jak aminokwasy, nukleotydy, kwasy karboksylowe czy cukry. Retencja zależy od składu fazy ruchomej, pH i stężenia soli [91-93].

Tabela 3.1. c.d. Przykładowe rodzaje komercyjnych faz stacjonarnych stosowanych w chromatografii HILIC

Rodzaj fazy stacjonarnej	Nazwa fazy stacjonarnej	Przykład kolumny chromatograficznej	Grupa funkcyjna	Opis
Zwitterjonowa (amfoteryczna)	Fosfocholinowa	PC-HILIC; ZIC-cHILIC		Fazy fosfocholinowe charakteryzują się obecnością jednocześnie grup dodatnio i ujemnie naładowanych, oddzielonych krótkim łańcuchem alkilowym. W porównaniu do faz przeznaczonych do chromatografii wymiany jonowej, interakcje elektrostatyczne między tymi grupami, a przeciwnie naładowanymi analitami są słabsze. Fazy te pozwalają łączyć kilka mechanizmów retencji, takich jak HILIC oraz wymiana anionowa i/lub kationowa. Przykładem są fazy ZIC-HILIC, w których grupy dodatnie (amoniowe czwartorzędowe) znajdują się blisko powierzchni krzemionki, natomiast grupy ujemne (sulfoniany) na zewnętrznej części fazy [76,78,86-88,90-91,93].
	Sulfobetainowa	HILIC-Z; Nucleodur HILIC; Synchronis HILIC		Zawierają anionową grupę kwasu sulfonowego oraz grupę amoniową czwartorzędową, rozdzielone krótkim łącznikiem alkilowym. Związana sulfobetaina umożliwia adsorpcję wody poprzez wiązania wodorowe, a zaadsorbowana warstwa wody w istotny sposób kontroluje mechanizm retencji i oddziaływania wymiany jonowej [76,78,86-88,90-91,93].

III.2.2.2. Niekomercyjne fazy stacjonarne

Niekomercyjne fazy stacjonarne, podobnie jak fazy komercyjne, można sklasyfikować ze względu na charakter powierzchni jako neutralne, anionowe, kationowe lub amfoteryczne. Stosuje się różnego rodzaju modyfikacje powierzchni, polegające m.in. na wprowadzaniu ligandów o charakterze polarnym lub jonowym. Modyfikacje te wpływają na właściwości powierzchni faz stacjonarnych, a tym samym na rodzaj i siłę oddziaływań zachodzących pomiędzy fazą stacjonarną a analitami w warunkach HILIC.

III.2.2.2.1. Fazy stacjonarne polimerowe

W fazach stacjonarnych neutralnych dominującym składnikiem są polimery. Przykładem takiego rozwiązania jest faza stacjonarna oparta na żelu krzemionkowym, która została pokryta syntetycznym polimerem, alkoholem poliwinylowym (PVA). Zbliżoną koncepcję zastosowano w komercyjnej kolumnie TSKgel Amide-80, gdzie zastosowano, poliakrylamid, jako polimer powłokowy [91,93-95]. Poliakrylamid był również immobilizowany na zhydrolizowanych mikrosferach poli(glicydyloetakrylanu-diwinylbenzenu) (GMA-DVB), co pozwoliło uzyskać fazę stacjonarną o wysokiej stabilności hydrolitycznej [96]. Kolejnym przykładem jest faza stacjonarna utworzona z hydrotermicznie sieciowanego poliwinylpirolidonu (PVP) immobilizowanego na powierzchni krzemionki. Faza ta wykazała wysoką skuteczność zarówno w chromatografii HILIC, jak i w RPLC, a jej stabilność była zachowana w szerokim zakresie wartości pH (od 3,5 do 9,5) [93,97].

Fazy stacjonarne o ładunku ujemnym (fazy anionowe) zazwyczaj zawierają grupy karboksylanowe, fosforanowe lub sulfonianowe. Fazę z dikarboksylowej celulozy otrzymano poprzez wstępną oksydację celulozy do dialdehydowej celulozy, którą następnie związano z krzemionką sfunkcjonalizowaną grupami aminowymi. Po etapie wiązania grupy aldehydowe zostały dodatkowo utlenione do grup karboksylowych [91,93,98]. Innym interesującym przykładem było zastosowanie rozpuszczalników eutektycznych (DES, ang. *Deep Eutectic Solvents*), należących do nowej klasy ekologicznych rozpuszczalników. Zostały one wykorzystane do wytworzenia fazy stacjonarnej na bazie poli(kwasu itakonowego) immobilizowanego na krzemionkę tiolową. Faza ta była badana pod kątem różnych parametrów, w tym stężenia buforu, składu fazy ruchomej, pH oraz temperatury kolumny. Uzyskane wyniki potwierdziły efektywne rozdzielanie związków polarnych [91,93,99].

Przykładem kationowej fazy stacjonarnej jest kopolimer PVA–kationowej celulozy zawierający czwartorzędowe grupy amoniowe. Ocena selektywności wykazała, że zmodyfikowana faza PVA kationowa celuloza wykazuje hydrofobowość porównywalną do fazy amidowej, choć sama celuloza jest naturalnie hydrofilowa, jednak jej zdolność wymiany anionów jest niższa niż w przypadku fazy aminowej. Charakterystyczną cechą procesu syntezy tej fazy jest to, że została ona wytworzona bez użycia rozpuszczalników organicznych. Ponadto faza ta wykazała wysoką stabilność, szeroki zakres tolerancji pH oraz bardzo dobrą efektywność separacyjną [91,93,100].

Fazy stacjonarne zwitterjonowe (amfoteryczne) są bardzo wszechstronne. Modulacja pH fazy ruchomej pozwala kontrolować elucję jonów i związków obdarzonych ładunkiem. W HILIC stosowano zarówno małe peptydy, jak i aminokwasy, jako ligandy w fazach zwitterjonowych. Aminokwasy są klasycznymi molekułami zwitterjonowymi dzięki obecności zarówno grupy aminowej, jak i karboksylowej [91,93]. Przykładem jest faza stacjonarna oparta na cysteinie, w której aminokwas został zakotwiczony na krzemionce zmodyfikowanej grupami winylowymi przy użyciu mechanizmu fotoindukowanego. Znaczne pokrycie powierzchni krzemionki fragmentami winylowymi zwiększa hydrofobowość fazy, co wpływa na retencję w trybie RPLC przy wyższej zawartości wody w fazie ruchomej [93,101]. P. Zhang i współpracownicy [102] zaprojektowali niekomercyjną zwitterjonową fazę stacjonarną HILIC opartą na krzemionce modyfikowanej polimerem zwitterjonowym, w której polimer kopolimeru etylenu i maleinianu został osadzony na powierzchni krzemionki i poddany aminolizie przy użyciu etylenodiaminy. Faza ta efektywnie rozdziela anality polarne, w tym nukleozydy, zasady azotowe i sacharydy, przy retencji wynikającej z interakcji hydrofilowych, elektrostatycznych oraz wiązań wodorowych.

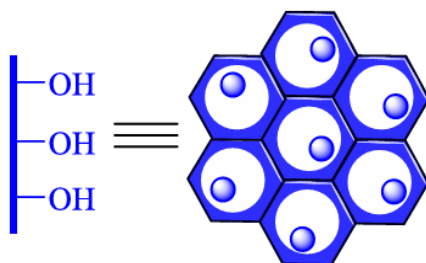
III.2.2.2.2. Mezoporowata krzemionka typu MCM-41 i jej funkcjonalizacja

Fazy stacjonarne w HPLC zwykle wykonuje się z porowatej krzemionki o kulistych, jednorodnych ziarnach, które można otrzymać syntetycznie. Rozmiar ziaren może wpływać na efektywność separacji, jednak porowata struktura krzemionki jest często nieregularna [103]. Jeśli ziarna o jednorodnym rozmiarze posiadają również monodispersyjną strukturę porów, może to znacząco poprawić efektywność rozdzielania. Taką uporządkowaną strukturę reprezentuje mezoporowata krzemionka [104–105]. Adsorbenty mezoporowate stanowią jedną z najbardziej obiecujących klas adsorbentów w skali nanometrycznej. Wyróżniają się wieloma przydatnymi właściwościami, takimi jak, np.: stabilnością termiczną, wysoką wytrzymałością mechaniczną, możliwością precyzyjnego dostosowania średnicy porów

oraz stabilnością w szerokim zakresie pH. Adsorbenty mezoporowate zostały podzielone na trzy główne kategorie:

- lamelarną, o niestabilnej, warstwowej strukturze: MCM-50,
- heksagonalną, z układem jednostronnych, niepołączonych porów: MCM-41,
- oraz trójwymiarową, sześcienną strukturą porów: MCM-48 [106-109].

Spośród adsorbentów mezoporowatych największe zainteresowanie badaczy wzbudza krzemionka MCM-41 (rys. 3.11), która pozostaje intensywnie badanym adsorbentem o wciąż odkrywanych właściwościach i możliwościach funkcjonalizacji. MCM-41 charakteryzuje się strukturą plastra miodu i licznymi pustymi kanałami lub mezoporami, regularnym układem kanałów, uporządkowaną strukturą 2D-heksagonalną. Posiada wąski rozkład rozmiarów porów oraz wysoką powierzchnię właściwą i objętość porów. Dodatkowo wysoka stabilność chemiczna nanocząstek sprawia, że jest użyteczna w katalizie diagnostycznej, nośnikach leków, sensorach oraz w procesach oczyszczania i separacji [106-109].



Rysunek 3.11. Struktura MCM-41 [106]

Typowa synteza adsorbentów MCM-41 polega na prowadzeniu reakcji w fazie wodnej pomiędzy źródłem krzemionki, najczęściej tetrametylortosilikatem (TMOS) lub tetraetylortosilikatem (TEOS), a środkiem szablonowym, takim jak bromek cetyltrimetyloamoniowy (CTAB) lub inny surfaktant. Syntezę zwykle przeprowadza się w środowisku zasadowym (pH około 10–11), w którym zachodzą reakcje hydrolizy i kondensacji prekursorów krzemionki prowadzące do formowania uporządkowanej struktury mezoporowatej. Usunięcie surfaktantu poprzez kalcynację w wysokiej temperaturze lub ekstrakcję rozpuszczalnikiem powoduje odsłonięcie regularnego układu mezoporów. Kontrola morfologii i rozmiaru ziaren MCM-41 zależy między innymi od:

- szybkości hydrolizy prekursorów krzemionki,
- stopnia oddziaływań pomiędzy tworzącą się siecią krzemionkową a agregatami surfaktantu,
- stopnia kondensacji źródła krzemionki.

Poprzez regulację pH środowiska reakcyjnego oraz zastosowanie różnych szablonów i rozpuszczalników możliwe jest kontrolowanie wymienionych parametrów, a tym samym właściwości otrzymywanych adsorbentów MCM-41 [106,110–111].

Niemodyfikowana krzemionka MCM-41, pomimo swojej regularnej mezoporowatej struktury, charakteryzuje się powierzchnią, której właściwości polarne wynikają głównie z obecności grup silanolowych. Grupy te nadają materiałowi hydrofilowy charakter, jednak ich liczba i właściwości nie zawsze są wystarczające do zastosowań wymagających silniejszych lub bardziej specyficznych oddziaływań z analitami, takich jak chromatografia HILIC. Wprowadzenie odpowiednich grup funkcyjnych umożliwia zwiększenie hydrofilowości oraz dostosowanie właściwości powierzchni do konkretnych zastosowań, co znacząco poszerza zakres zastosowania tego adsorbentu. Dlatego funkcjonalizacja powierzchni krzemionki jest kluczowym etapem przygotowania adsorbentów przeznaczonych do specyficznych zastosowań. Powierzchnię krzemionki mezoporowatej można funkcjonalizować na trzy główne sposoby, które zostały krótko opisane na schemacie 3.12 [111-116].

Metoda ko-kondensacji (co-condensation, in-situ)	Metoda graftingu (modyfikacja post-syntetyczna)	Metoda powlekania odcisku (imprint coating)
W metodzie ko-kondensacji prekursor tetraalkoksylosilanów reaguje z odpowiednimi związkami funkcyjnymi, takimi jak organoalkoksylosilany, podczas tworzenia sieci krzemionki MCM-41. Podejście to umożliwia jednocześnie wprowadzenie funkcjonalnych grup na powierzchnię adsorbentu, a reakcja przebiega w kontrolowanych warunkach pH i temperatury [111-112].	Polega na silylacji grup hydroksylowych ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$) obecnych na powierzchni krzemionki. Zmiana rodzaju wprowadzanych grup funkcyjnych lub długości łańcucha węglowego pozwala na modyfikację właściwości adsorbentu. Dodatkowo grupy te mogą poprawiać stabilność materiału oraz wpływać na jego zdolności adsorpcyjne [111-112].	Polega na powlekanii powierzchni porów MCM-41 ligandami uprzednio skompleksowanymi z jonami metalu. Po usunięciu jonów metalu pozostają miejsca rozpoznające, które umożliwiają selektywne wiązanie jonów o podobnych właściwościach. Metoda ta pozwala otrzymywać materiały o wysokiej selektywności adsorpcji i precyzyjnie zaprogramowanej funkcjonalności [111-112].

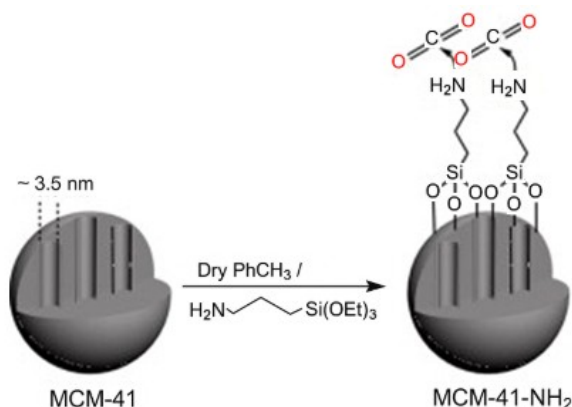
Rysunek 3.12. Metody funkcjonalizacji powierzchni krzemionki mezoporowatej MCM-41

Istnieje możliwość wprowadzania różnych funkcjonalności organicznych i nieorganicznych, takich jak, np.:

- grupy aminowe,
- grupy glicydylowe,
- grupy chloropropylowe,
- kwasy karboksylowe,
- grupy heteropolikwasowe,
- jony metali,
- nanocząstki metali [111].

MCM-41 jest interesującym nośnikiem do przyłączania np. grup aminowych ($-\text{NH}_2$) poprzez modyfikację post-syntetyczną, ze względu na dużą powierzchnię właściwą, dużą objętość porów, regularny rozmiar porów oraz łatwość funkcjonalizacji powierzchni [116-117]. Modyfikacja MCM-41 polega na zakotwiczeniu grup aminowych ($-\text{NH}_2$) na powierzchni krzemionki (rys. 3.13). Grupy aminowe kowalencyjnie związane z mezoporowatą strukturą

krzemionki, mogą zwiększać pojemność sorpcyjną materiału względem CO₂, pozwalając na chemisorpcję przy niskich ciśnieniach i fizysorpcję przy wyższych [118].

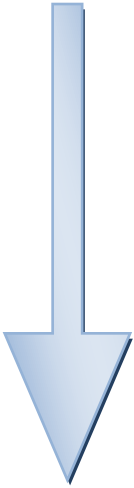


Rysunek 3.13. Przykład modyfikacji krzemionki MCM-41 grupami aminowymi [118]

III.2.3. Fazy ruchome stosowane w chromatografii HILIC

Faza ruchoma odgrywa istotną rolę w procesie chromatograficznym, odpowiada nie tylko za solwatację oraz transport cząsteczek analitu przez pory fazy stacjonarnej w kolumnie, lecz także za solwatację samej fazy stacjonarnej [96]. W chromatografii HILIC jako fazę ruchomą stosuje się polarne rozpuszczalniki organiczne dobrze mieszające się z wodą. Najczęściej wykorzystywanym składnikiem organicznym jest acetonitryl (ACN) z dodatkiem niewielkiej ilości wody. Zastosowanie mogą znaleźć również inne aprotyczne rozpuszczalniki mieszalne z wodą, takie jak tetrahydrofuran (THF) czy dioksan. Choć alkohole również mogą być stosowane jako składniki fazy ruchomej, wykorzystywane są rzadziej, ponieważ ich właściwości są zbliżone do wody, przez co konkurują z nią zarówno w procesie solwatacji powierzchni fazy stacjonarnej, jak i w tworzeniu wiązań wodorowych. Dobór rozpuszczalnika organicznego w znacznym stopniu wpływa na retencję w układzie HILIC. Siła eluująca rozpuszczalników rośnie wraz ze wzrostem ich polarności oraz zdolności do uczestniczenia w oddziaływaniach typu donor–akceptor protonów (tab. 3.2) [76,78,88,119–121].

Tabela 3.2. Wzrost polarności rozpuszczalników w HILIC

Rozpuszczalnik	Wzór chemiczny	Wzrost polarności rozpuszczalników
Aceton	$\text{CH}_3\text{-C(=O)-CH}_3$	
Acetonitryl	$\text{CH}_3\text{-C}\equiv\text{N}$	
Izopropanol	$\text{CH}_3\text{-CH(-OH)-CH}_3$	
Propanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	
Etanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	
Dioksan	$\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2$	
Dimetyloformamid	$\text{CH}_3\text{-NH-C(=O)-CH}_3$	
Metanol	$\text{CH}_3\text{-OH}$	
Woda	H-O-H	

Efekt zmiany rodzaju rozpuszczalnika organicznego w chromatografii jest trudny do przewidzenia, ponieważ dokładny wpływ fazy ruchomej na retencję i selektywność analitów nie jest jeszcze w pełni poznany. Pojęcie siły elucyjnej fazy ruchomej ma charakter wyłącznie empiryczny, określenie, które rozpuszczalniki działają jako „słabe”, a które jako „silne” oraz ustalenie ich hierarchii, wynika z obserwacji elucji analitów w określonym trybie chromatografii HPLC. Przykładowo w RPLC rozpuszczalniki organiczne, takie jak metanol (MeOH) czy acetonitryl, pełnią funkcję silnych rozpuszczalników, co wynika z ich zdolności do konkurencyjnego wypierania analitów z hydrofobowej fazy stacjonarnej. Natomiast w chromatografii HILIC niewielki dodatek wody w fazie ruchomej umożliwia retencję związków polarnych dzięki ich interakcjom z warstwą wody zaadsorbowaną na hydrofilowej fazie stacjonarnej. Zwiększenie udziału silnego składnika fazy ruchomej zwykle prowadzi do skrócenia czasu retencji analitów, ponieważ osłabia ich oddziaływania z fazą stacjonarną [119-121].

Faza ruchoma stosowana w HILIC jest silnie organiczna (>70 % (v/v) rozpuszczalnika, zazwyczaj acetonitrylu) i zawiera niewielki procent rozpuszczalnika wodnego lub buforu [122]. Organiczna część fazy ruchomej działa, jako słaby rozpuszczalnik, podczas gdy część wodna jest uważana za silny rozpuszczalnik [86]. W HILIC acetonitryl jest najczęściej wybieranym rozpuszczalnikiem organicznym, ponieważ inne często prowadzą do niewystarczającej retencji analitów oraz powstawania szerokich lub niesymetrycznych pików, szczególnie dotyczy to metanolu. Słabsza wydajność metanolu w HILIC wynika z jego podobieństwa do wody, rozpuszczalniki te są proticznymi i konkurują ze sobą

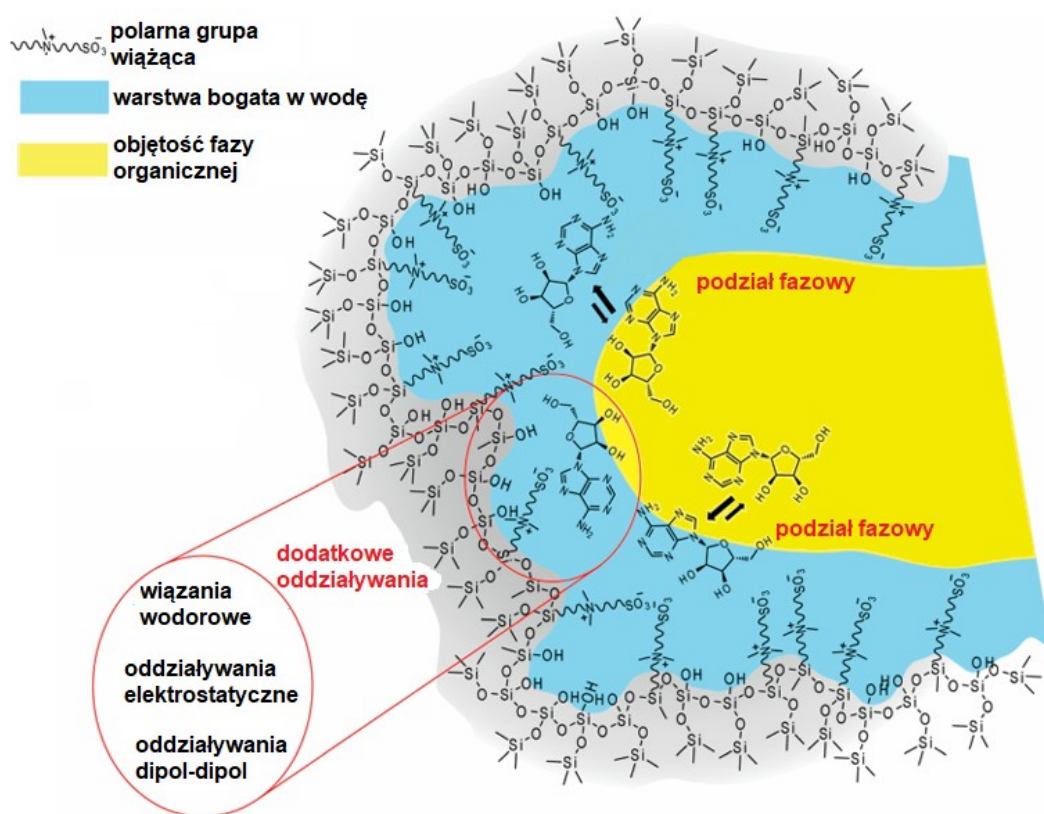
o solwatację powierzchni krzemionki lub innych polarnych faz stacjonarnych, przy czym tworzą silne wiązania wodorowe między sobą. W przypadku innych alkoholi, takich jak etanol czy propan-2-ol, problem ten występuje w mniejszym stopniu. Niemniej jednak, fazy ruchome w HILIC oparte na MeOH mogą być interesujące w analizach chromatograficznych. Badania wykazały, że podczas częściowej separacji diastereomerów w HILIC zastosowanie MeOH zamiast ACN skutecznie tłumi rozdzielczość diastereomerów, co może być korzystne w przypadku analizy oligonukleotydów o licznych diastereomerach [123-124]. Z kolei aceton w warunkach HILIC prowadzi do niższej retencji. Dodatkowo jego absorpcja w zakresie UV i słabsza czułość w detekcji ograniczają możliwość stosowania go, jako bezpośredniego zamiennika acetonitrylu [87,125]. Fazy ruchome w HILIC mogą zawierać także bufor, którego pH i siła jonowa znacząco może wpływać na retencję i selektywność. W przeciwieństwie do RPLC, pH buforu w HILIC można dobierać w celu zwiększenia jonizacji związków ($\text{pH} > 7$ dla kwasów i $\text{pH} < 7$ dla zasad), szczególnie gdy fazy stacjonarne HILIC posiadają funkcjonalności jonowe [87,126].

III.2.4. Mechanizm retencji w HILIC

W chromatografii HILIC mechanizm retencji silnie zależy od rodzaju fazy stacjonarnej i składu fazy ruchomej, ponieważ to one decydują o przewadze określonych oddziaływań np.: polarnych, hydrofobowych czy jonowymiennych, które wspólnie odpowiadają za retencję analitów. W praktyce prowadzi to do występowania mieszanego mechanizmu retencji. Należy przy tym pamiętać, że charakter oddziaływań jest ściśle związany z rodzajem fazy stacjonarnej (np. neutralnej, aminowej lub zwitterjonowej) oraz strukturą analizowanych związków. W obecności eluentu o wysokiej zawartości acetonitrylu retencja kontrolowana jest głównie przez interakcje polarne. Natomiast przy zastosowaniu eluentu bogatego w wodę większe znaczenie zyskują oddziaływania hydrofobowe, co sprawia, że kolumna może zachowywać się podobnie jak w chromatografii faz odwróconych (RPLC) [91,127]. Mechanizm retencji w HILIC jest jednak bardziej złożony niż w RPLC czy w NPLC. Na zatrzymywanie małych, polarnych cząsteczek mogą wpływać jednocześnie takie zjawiska jak, np.: podział, adsorpcja oraz oddziaływania elektrostatyczne. Cząsteczki polarne często zawierają grupy funkcyjne zdolne do jonizacji, co sprawia, że oprócz udziału w mechanizmie podziałowym mogą również uczestniczyć w oddziaływaniach elektrostatycznych, takich jak mechanizmy jonowymienne. W umiarkowanym i wyższym pH fazy ruchomej adsorbenty krzemionkowe wykazują obecność ujemnie naładowanych, zjonizowanych grup silanolowych, które mogą silnie oddziaływać z dodatnio naładowanymi analitami. Natomiast anality o ładunku ujemnym mogą być odpychane. Cząsteczki polarne mogą również

wykazywać zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, które uczestniczą w adsorpcyjnych oddziaływaniach polarnych. Mogą występować również oddziaływania takie jak, np.: oddziaływania jon-dipol, oddziaływania π - π dla związków aromatycznych w kolumnach amidowych czy oddziaływania van der Waalsa [91].

W modelu rozdzielania hydrofilowego (rys. 3.14) warstwa wody zaadsorbowana na powierzchni adsorbentu pełni funkcję fazy stacjonarnej, a obecne na niej polarne ligandy stabilizują jej strukturę. Nie oznacza to jednak, że ligandy te pozostają bierne. Polarne anality mogą oddziaływać bezpośrednio z grupami funkcyjnymi ligandów poprzez adsorpcję powierzchniową, obejmującą interakcje polarne lub wiązania wodorowe, a także poprzez oddziaływania elektrostatyczne, gdy zarówno ligand, jak i analit posiadają ładunek [91,95,128-130].



Rysunek 3.14. Główne oddziaływania wpływające na mechanizm retencji w chromatografii HILIC [131]

Trudno jest jednoznacznie określić główny mechanizm retencji dla danego analitu na konkretnej fazie stacjonarnej, co może utrudniać zrozumienie problemu selektywności i rozdzielczości w HILIC [78,82,84,88,90,129–130]. Podczas przepływu fazy ruchomej przez polarną fazę stacjonarną na powierzchni ziaren adsorbentu tworzy się warstwa wzbogacona w wodę, utrzymywana dzięki wiązaniom wodorowym i obecności wody w fazie

ruchomej. Hydrofilowy analit ulega wtedy podziałowi między tę wodną warstwę, a bardziej organiczną fazę ruchomą, a jego czas elucji zależy od rozpuszczalności w fazie ruchomej [132–133].

Mechanizm retencji w HILIC, nawet w przypadku niemodyfikowanego żelu krzemionkowego, nadal pozostaje słabo poznany. Wciąż konieczne są dalsze badania, aby go lepiej zrozumieć, a tym samym pełniej wykorzystać [122]. Stosując model efektywnej dyfuzji, Gritti i współpracownicy [128] wyznaczyli stałe równowagi opisujące rozmieszczenie związków modelowych pomiędzy objętością eluentu w porowatym wypełnieniu a rozproszoną warstwą wodną oraz pomiędzy rozproszoną i sztywną warstwą wodną na powierzchni adsorbentu. Na tej podstawie określono dominujący mechanizm retencji dla poszczególnych związków. Model efektywnej dyfuzji nie umożliwia jednak ilościowego wyznaczenia udziału mechanizmów podziału i adsorpcji w całkowitej retencji analizowanych substancji [128,134]. Melnikov i współpracownicy [136] wykonali symulacje dynamiki molekularnej dla porów krzemionki, kontaktujących się z mieszaninami wody i acetonitrylu, aby zbadać układ warstw wodnych przy powierzchni tego adsorbentu. Wyniki wykazały, że najbliższej powierzchni tworzy się pierwsza, zwarta warstwa wody związana z grupami silanolowymi za pomocą wiązań wodorowych (region I). Za nią znajdują się kolejne, pośrednie warstwy wody, w których cząsteczki wody są bardziej ruchome, ale wciąż oddziałują z warstwą przy samej powierzchni (region II). Najdalej od powierzchni występuje region, w którym mieszanina wody i rozpuszczalnika organicznego przepływa swobodnie przez kolumnę (region III) [135-136]. Wyniki symulacji dynamiki molekularnej wskazują, że cząsteczki analitu nie gromadzą się wyłącznie na powierzchni fazy stałej poprzez adsorpcję. Mogą one również występować w obszarach porów oddalonych od ścian mezoporów w wyniku procesu podziału. Taka nierównomierność rozmieszczenia masy próbki w porach sprawia, że interpretacja danych chromatograficznych pod kątem mechanizmu retencji staje się trudna, niejednoznaczna, a czasem wręcz niemożliwa. Cząsteczki analitu mogą przemieszczać się między fazą objętościową, a rozproszoną warstwą wodną, a jednocześnie ulegać adsorpcji z tej warstwy do sztywnej, przyściennej warstwy wody [137].

Ocena poszczególnych mechanizmów retencji oraz określenie ich względnego udziału w procesie rozdzielania stanowi duże wyzwanie. Mechanizm retencji w chromatografii HILIC wydaje się być złożoną kombinacją procesów podziału i adsorpcji. Zrozumienie tych zjawisk jest kluczowe dla interpretacji selektywności separacji, optymalizacji warunków chromatograficznych oraz projektowania nowych faz stacjonarnych. Pomimo licznych badań

eksperymentalnych i opracowanych modeli teoretycznych, ilościowe określenie udziału poszczególnych mechanizmów w całkowitej retencji nadal pozostaje trudne. Z tego względu chromatografia w układzie HILIC nadal stanowi obszar intensywnych badań naukowych [138-139].

III.2.5. Wpływ składu eluentu na proces separacji – modele retencji

W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie modelowaniem retencji w kolumnach HILIC w zależności od składu fazy ruchomej, przy wykorzystaniu różnych podejść teoretycznych. Nie opracowano jednak jednoznacznie najlepszego modelu, co wynika m.in. z dużej różnorodności kolumn dostępnych na rynku, dedykowanych chromatografii w trybie HILIC [140-143]. Modele retencji stanowią istotną grupę modeli matematycznych znajdujących zastosowanie w doborze i optymalizacji warunków rozdzielania składników mieszanin [140]. W celu lepszego poznania mechanizmów retencji w chromatografii ciekłowej, w tym w układach HILIC, stosuje się różnorodne modele umożliwiające wstępne oszacowanie udziału procesów podziału oraz adsorpcji powierzchniowej w mechanizmie retencji. Snyder zaproponował model LSS (ang. *Linear Solvent Strength*), opisujący wpływ składu fazy ruchomej na retencję, w szczególności zależności od ułamka objętościowego silniejszego składnika eluentu (wzór 3.20).

$$\log k = \log k_w - S \cdot \varphi \quad (3.20)$$

gdzie: k_w – współczynnik retencji w czystej wodzie, φ – ułamek objętościowy składnika fazy ruchomej (np. wody lub rozpuszczalnika organicznego, w zależności od układu), S – nachylenie prostej regresji liniowej, określające wrażliwość retencji na zmianę składu fazy ruchomej [121,131,133,141].

W przypadku gdy retencja wynika z mechanizmu adsorpcyjnego, jej zależność od składu fazy ruchomej może być opisana równaniem Snydera–Soczewińskiego (wzór 3.21) [137]:

$$\log k = \log k_{0B} - \frac{A_S}{n_B} \log \varphi \quad (3.21)$$

gdzie: k_{0B} – współczynnik retencji w czystym składniku B fazy ruchomej, A_S – liczba miejsc adsorpcyjnych zajmowanych przez cząsteczkę analitu, n_B – liczba miejsc adsorpcyjnych zajmowanych przez cząsteczkę składnika B fazy ruchomej.

Zależność między $\log k$ a liniową lub logarytmiczną funkcją zawartości wody w fazie ruchomej może być wykorzystywana do oceny dominującego mechanizmu retencji w układach HILIC. W przypadku mechanizmu adsorpcyjnego zależność $\log k$ od $\log \varphi$ ma charakter liniowy, co wskazuje na istotną rolę procesów adsorpcji na powierzchni fazy stacjonarnej pokrytej warstwą wody. Natomiast dla mechanizmu podziałowego obserwuje się zwykle nieliniową zależność retencji od składu fazy ruchomej, co jest związane ze zmianami składu oraz objętości uwodnionej warstwy na powierzchni fazy stacjonarnej wraz ze zmianą udziału wody w fazie ruchomej [131,133,141]. Powyższe modele zostały opracowane dla RPLC oraz NPLC, natomiast w chromatografii HILIC są stosowane do interpretacji mieszanego mechanizmu retencji.

Model zaproponowany przez Lianga i współpracowników dla chromatografii HILIC został opracowany w celu opisu oddziaływań zachodzących między analitem, fazą ruchomą i fazą stacjonarną (wzór 3.22).

$$\ln k = p_1 + p_2 \cdot \ln \varphi + p_3 \cdot \varphi \quad (3.22)$$

gdzie: p_1 – stała związana z objętością cząsteczkową analitów oraz energią oddziaływań między analitami, a fazą stacjonarną i ruchomą, p_2 – współczynnik uwzględniający bezpośrednie oddziaływanie analit-faza stacjonarna, p_3 – odnosi się do energii oddziaływań analit-rozpuszczalnik [131,133,141,144-145].

Model zaproponowany przez Janderę i Hájka należy do grupy modeli mieszanych i stanowi rozwinięcie wcześniejszych podejść do opisu retencji w chromatografii HILIC. Uwzględnia on jednocześnie występowanie mechanizmów podziału oraz adsorpcji powierzchniowej w procesie retencji analitów (wzór 3.23) [144-145].

$$\ln k = p_1 + p_2 \cdot \varphi + p_3 \cdot \ln(1 + p_4 \cdot \varphi) \quad (3.23)$$

gdzie: p_1 – p_4 – parametry modelu. Parametr p_1 zależy zarówno od charakterystyki chromatografowanego związku, jak i od zastosowanego układu chromatograficznego. Parametry p_2 i p_3 odnoszą się odpowiednio do efektów podziału i adsorpcji związanych z wpływem stężenia wody na retencję, natomiast p_4 pełni funkcję współczynnika korygującego retencję w przypadku fazy ruchomej zawierającej bardzo niewielkie ilości wody [145].

Do opisu wpływu stężenia modyfikatora organicznego na retencję wybranych substancji stosuje się sześć-parametrowy model (wzór 3.24), stanowiący modyfikację wcześniej opisanych zależności (wzory 3.22 i 3.23). Zakłada się, że istotną rolę w kształtowaniu mechanizmu retencji odgrywa również heterogeniczność energetyczna fazy stacjonarnej. Pierwszy człon równania uwzględnia wpływ tej heterogeniczności, natomiast drugi opisuje retencję przebiegającą głównie zgodnie z mechanizmem podziałowym.

$$k = \frac{1 + p_1 \cdot \varphi}{p_2 + p_3 \cdot \varphi + p_4 \cdot \varphi^2} + \exp(p_5 - p_6 \cdot \varphi) \quad (3.24)$$

gdzie: p_1 – p_4 – wielkości empiryczne zależne od rozpatrywanego układu chromatograficznego, parametr p_5 – opisuje retencję chromatografowanej substancji w eluencie składającym się z czystej wody, p_6 – współczynnik zależny od rodzaju chromatografowanej substancji i modyfikatora eluentu charakteryzujący siłę elucji rozpuszczalnika [145].

III.3. Wpływ temperatury na retencję

Temperatura kolumny chromatograficznej stanowi jeden z najważniejszych parametrów wpływających na przebieg procesu chromatograficznego. Oddziałuje ona na współczynniki dyfuzji analitów, lepkość fazy ruchomej oraz szybkość transportu masy pomiędzy fazą ruchomą i stacjonarną, a tym samym może wpływać na retencję, selektywność i sprawność rozdzielania. Z punktu widzenia kinetyki rozdzielania kontrola temperatury pozwala również na zwiększenie wydajności procesu chromatograficznego. Podwyższenie temperatury prowadzi do wzrostu współczynników dyfuzji analitów oraz poprawy transportu masy, co ogranicza poszerzanie pasm chromatograficznych i skutkuje uzyskaniem węższych pików chromatograficznych [126]. W chromatografii cieczowej praktycznie wszystkie istotne wielkości opisujące retencję są w pewnym stopniu zależne od temperatury. W ostatnich latach rośnie znaczenie regulacji temperatury jako narzędzia do kontrolowania zarówno selektywności, jak i szybkości rozdzielania, co czyni ten parametr istotnym elementem optymalizacji procesów chromatograficznych [142].

W chromatografii HILIC retencja analizowanych substancji zazwyczaj zmniejsza się wraz ze wzrostem temperatury, co jest związane ze spadkiem energii kohezji oraz osłabieniem wiązań wodorowych i innych oddziaływań polarnych między fazą ruchomą a stacjonarną. Temperatura kolumny wpływa również na grubość warstwy wodnej, która jest zwykle większa w niższych temperaturach. Wynika to z silniejszych oddziaływań

wodorowych oraz bardziej uporządkowanej struktury wody, sprzyjających jej adsorpcji na powierzchni fazy stacjonarnej. Wraz ze wzrostem temperatury oddziaływania te ulegają osłabieniu, co prowadzi do zmniejszenia grubości uwodnionej warstwy [143]. Wpływ temperatury na selektywność rozdzielania jest szczególnie istotny dla związków różniących się właściwościami fizykochemicznymi, takimi jak rozmiar i kształt cząsteczek, zdolności do tworzenia wiązań wodorowych czy stopnia jonizacji. Zmiana temperatury może prowadzić do różnic w sile oddziaływań analitów z fazą stacjonarną, co jest szczególnie zauważalne w przypadku związków częściowo zjonizowanych [78]. Termodynamiczny współczynnik podziału, K_D , zależy od zmiany energii swobodnej Gibbsa, ΔG^0 , związanej z retencją analitu i jest powiązany ze zmianami standardowej molowej entropii ΔS^0 oraz entalpii ΔH^0 , opisującymi proces transportu analitu z fazy ruchomej do stacjonarnej (wzór 3.25) [78,144]:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT \ln K_D \quad (3.25)$$

gdzie: ΔS^0 i ΔH^0 – standardowa częściowa molowa zmiana entropii i entalpii, T – temperatura, R – stała gazowa, $8,314 \frac{J}{K \cdot mol}$, K_D – równowaga podziału analitu pomiędzy fazą ruchomą a fazą stacjonarną [78,144].

Badanie retencji analitów wymaga analizy nie tylko zmian wartości entalpii, ΔH^0 , i entropii, ΔS^0 , lecz także uwzględnienia szerszego kontekstu zjawisk termodynamicznych. W celu pełniejszego zrozumienia mechanizmów retencji konieczne jest prowadzenie badań w zmiennych warunkach eksperymentalnych, na przykład przy różnych składach fazy ruchomej. Korelacje między wyznaczonymi wielkościami termodynamicznymi a właściwościami badanych związków lub parametrami chromatograficznymi dostarczają istotnych informacji o procesach adsorpcji zachodzących w kolumnie chromatograficznej, pozwalając lepiej zrozumieć mechanizmy retencji [78,90]. W celu zrozumienia aspektów termodynamicznych retencji stosuje się model van 't Hoffa, który umożliwia ocenę wpływu temperatury na retencję. Metoda ta pozwala na wyznaczenie zmian entalpii i entropii procesu retencji, dostarczając istotnych informacji o charakterze oraz intensywności oddziaływań między analizowanym związkiem a fazą stacjonarną. Metoda ta polega na wyznaczeniu współczynnika retencji, k , badanego analitu w różnych temperaturach, a następnie określeniu standardowych zmian entalpii, ΔH^0 , i entropii, ΔS^0 , procesu retencji na podstawie równania van't Hoffa (wzór 3.26). W tym celu sporządza się wykres zależności $\ln k$ od odwrotności temperatury bezwzględnej $\frac{1}{T}$ [146-149].

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{R \cdot T} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln F \quad (3.26)$$

gdzie: F – stosunek faz (wzór 3.27), w praktyce, gdy $F < 1$, wpływ na wartość $\ln k$ jest znikomy, dlatego w większości analiz można go pominąć upraszczając równanie 3.26 [146-149].

$$F = \frac{1 - \varepsilon_t}{\varepsilon_t} \quad (3.27)$$

gdzie: ε_t – porowatość złoża [146-149].

Zależność logarytmu naturalnego współczynnika retencji $\ln k$ od odwrotności temperatury bezwzględnej $\frac{1}{T}$ powinien mieć charakter liniowy. Nachylenie otrzymanej prostej umożliwia wyznaczenie standardowej zmiany entalpii natomiast punkt przecięcia z osią rzędnych pozwala na określenie standardowej zmiany entropii [147-148]. Liniowa zależność wskazuje na dominację tego samego mechanizmu retencji w analizowanym zakresie temperatur, co sugeruje, że charakter oddziaływań w układzie pozostaje niezmienny. Nieliniowość wykresu van 't Hoffa dostarcza cennych informacji na temat zmian mechanizmu retencji zachodzących ze zmianą temperatury. Może ona wskazywać na złożone zjawiska, takie jak zmiany stopnia jonizacji analitu, jego rozpuszczalności w fazie ruchomej czy modyfikacje konformacyjne cząsteczek, wpływające na charakter oddziaływań z fazą stacjonarną. W konsekwencji prowadzi to do zmian retencji i selektywności. Analiza odchyleń od liniowości stanowi zatem istotne narzędzie w badaniu mechanizmów separacyjnych w chromatografii cieczowej [78,146-150]. Dodatnia wartość standardowej zmiany entalpii, ΔH , wskazuje, że proces przeniesienia analitu z fazy ruchomej do stacjonarnej ma charakter endotermiczny i wymaga dostarczenia energii. Z kolei ujemna wartość, ΔH , świadczy o egzotermicznym charakterze procesu, co sugeruje występowanie korzystnych oddziaływań pomiędzy analitem a fazą stacjonarną, sprzyjających retencji. Standardowa zmiana entropii, ΔS , dostarcza informacji na temat stopnia uporządkowania układu podczas procesu retencji. Dodatnia wartość, ΔS , może wskazywać na wzrost nieuporządkowania układu, wynikający na przykład z desolvatacji analitu lub reorganizacji cząsteczek rozpuszczalnika. Natomiast ujemna wartość, ΔS , sugeruje wzrost uporządkowania układu, związany z ograniczeniem swobody ruchu analitu po przejściu do fazy stacjonarnej [78,89,146-153].

III.4. Sprawność kolumn chromatograficznych

Kolumny chromatograficzne wypełnione fazą stacjonarną stanowią podstawowy element układu chromatograficznego i mają kluczowy wpływ na skuteczność rozdzielania mieszanin wieloskładnikowych. Ich wydajność, oceniana za pomocą parametrów, takich jak liczba pól teoretycznych, N , (wzory 3.7–3.9) oraz wysokość równoważna półce teoretycznej, $WRPT$, (wzór 3.28), stanowi podstawowy wskaźnik efektywności rozdzielania [149].

$$WRPT = \frac{L}{N} \quad (3.28)$$

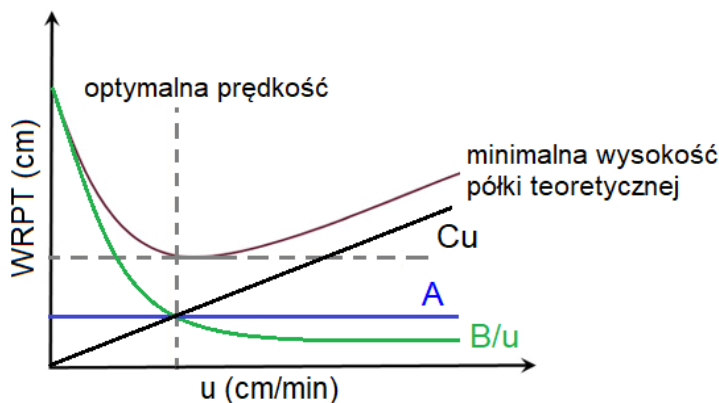
Duża liczba pól teoretycznych, N , oraz mała wartość, $WRPT$, wskazują na wysoką sprawność kolumny chromatograficznej, determinując zdolność rozdzielania substancji o zbliżonych właściwościach fizykochemicznych. Wysoka sprawność kolumny umożliwia uzyskanie wąskich, symetrycznych pików chromatograficznych, co jest istotne dla dokładności i powtarzalności wyników analizy [149,151–152]. Liczba pól teoretycznych nie uwzględnia jednak zjawisk transportu masy zachodzących w kolumnie chromatograficznej [151–152]. W celu bardziej szczegółowego opisu wpływu kolumny na efektywność rozdzielania stosuje się równanie van Deemtera (wzór 3.29), które przedstawia zależność wysokości półki teoretycznej od prędkości przepływu fazy ruchomej oraz właściwości wypełnienia kolumny chromatograficznej [149,154-156].

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u = A + \frac{B}{u} + (C_S + C_M) \cdot u \quad (3.29)$$

gdzie: A – parametr związany z dyfuzją wirową (efekt Eddy`ego), u – prędkość liniowa fazy ruchomej (cm/min), $\frac{B}{u}$ – dyfuzja wzdłużna, $C_S \cdot u$ i $C_M \cdot u$ – opory masy w fazie stacjonarnej i ruchomej [149,154-156].

Równanie van Deemtera wskazuje, że mniejsze rozmiary ziaren fazy stacjonarnej umożliwiają stosowanie szerszego zakresu optymalnych prędkości liniowych fazy ruchomej w porównaniu z większymi ziarnami, co prowadzi do poprawy efektywności chromatograficznej. Krótsza droga dyfuzji w przypadku mniejszych ziaren sprzyja szybszej wymianie masy pomiędzy fazą ruchomą a stacjonarną. W konsekwencji analit spędza mniej czasu w porach ziaren fazy stacjonarnej, gdzie opory transportu masy są największe, co ogranicza poszerzanie pików chromatograficznych [150-152]. Mniejsza wartość wysokości

równowaznej półce teoretycznej, H , oznacza większą sprawność kolumny, ponieważ na danej długości kolumny może występować większa liczba półek teoretycznych. Równanie van Deemtera opisuje zależność o charakterze krzywej posiadającej minimum, co oznacza, że dla określonej prędkości liniowej fazy ruchomej, u , występuje minimalna wartość wysokości równowaznej półki teoretycznej, $WRPT$. Maksymalną wydajność kolumny uzyskuje się przy optymalnej prędkości liniowej fazy ruchomej, odpowiadającej minimum funkcji $WRPT = f(u)$ (rys. 3.15) [152].



Rysunek 3.15. Graficzne przedstawienie równania van Deemtera

Parametr A (wzór 3.30), związany z dyfuzją wirową (efekt Eddy'ego), wynika z obecności ziaren fazy stacjonarnej w kolumnie i zależy od właściwości fazy stacjonarnej, geometrii układu przepływu oraz sposobu upakowania złoża. Uwzględnia wpływ wielkości, kształtu i porowatości ziaren fazy stacjonarnej, a także jednorodności ich rozmieszczenia w złożu. Parametr ten opisuje zatem wpływ niejednorodności struktury złoża na przepływ fazy ruchomej przez kolumnę chromatograficzną.

$$A = 2\lambda d_p \quad (3.30)$$

gdzie: λ – współczynnik uwzględniający sposób upakowania kolumny chromatograficznej, a d_p – średnica ziaren adsorbentu wypełniającego kolumnę chromatograficzną [154,156-162].

Parametr B (wzór 3.31) opisuje dyfuzję wzdłużną cząsteczek analitu zachodzącą wzdłuż osi kolumny podczas procesu separacji, wynikającą z gradientu stężenia w fazie ruchomej. Zjawisko to można ograniczyć poprzez zwiększenie lepkości rozpuszczalnika lub obniżenie temperatury, co prowadzi do zmniejszenia współczynnika dyfuzji analitu. Wpływ dyfuzji wzdłużnej maleje również wraz ze wzrostem prędkości przepływu fazy ruchomej. Ponieważ udział członu B jest odwrotnie proporcjonalny do prędkości liniowej

fazy ruchomej, jego wpływ jest największy przy małych prędkościach przepływu, a najmniejszy przy dużych prędkościach.

$$\frac{B}{u} = \frac{2\tau D_M}{u} \quad (3.31)$$

gdzie: τ – współczynnik zależny od krętości przepływu w złożu kolumny, uwzględniającym strukturę, morfologię i jednorodność upakowania fazy stacjonarnej, D_M – współczynnik dyfuzji analitu w fazie ruchomej [154,156-162].

Parametr C (wzór 3.32) opisuje opory przenoszenia masy analitu pomiędzy fazą ruchomą a stacjonarną, wynikające z szybkości transportu cząsteczek między obiema fazami. W trakcie procesu chromatograficznego analit nie osiąga natychmiast stanu równowagi pomiędzy fazą ruchomą i stacjonarną, co prowadzi do opóźnień związanych z procesami dyfuzji oraz wymiany masy. Wartość parametru C zależy od właściwości fazy stacjonarnej, takich jak struktura, kształt i porowatość ziaren. Istotne znaczenie mają również grubość warstwy fazy stacjonarnej oraz współczynnik dyfuzji analitu w obu fazach. Wpływ parametru C wzrasta wraz ze zwiększaniem prędkości przepływu fazy ruchomej, ponieważ czas dostępny na osiągnięcie równowagi pomiędzy fazami ulega skróceniu.

$$C \cdot u = C_S \cdot u + C_M \cdot u = f_S \cdot \frac{k \cdot d_f^2 \cdot u}{D_S} + f_M \cdot \frac{k \cdot d_p^2 \cdot u}{D_M} \quad (3.32)$$

gdzie: f_S, f_M – współczynniki zależne od struktury układu chromatograficznego, d_f – grubość warstwy fazy stacjonarnej, d_p – średnica ziaren adsorbentu, D_S – współczynnik dyfuzji analitu w fazie stacjonarnej [154,156-162].

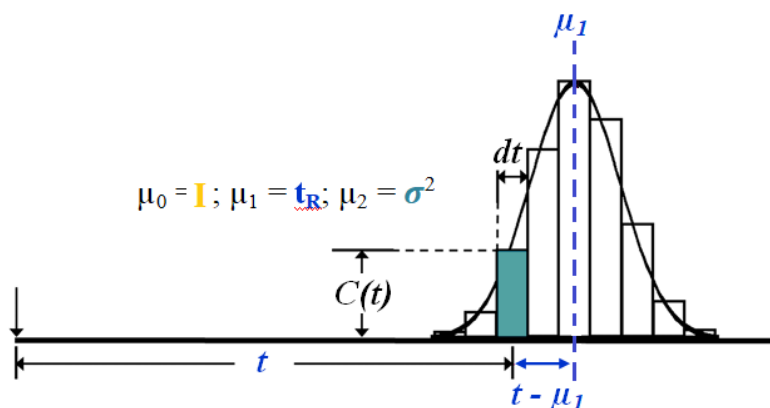
Zmniejszenie wartości parametrów A i C prowadzi do obniżenia wysokości równowaznej półce teoretycznej, co w konsekwencji zwiększa sprawność kolumny chromatograficznej. Jednorodna wielkość ziaren, ich regularna morfologia oraz uporządkowane upakowanie adsorbentu wypełniającego kolumnę ograniczają dyfuzję wirową i opory przenoszenia masy, sprzyjając wzrostowi efektywności separacji. Z tego względu idealny materiał wypełniający stosowany w chromatografii HPLC powinien składać się z małych, jednorodnych ziaren o dobrze zdefiniowanej morfologii i strukturze [154].

W celu uzyskania informacji o retencji oraz kinetyce przenoszenia masy w kolumnach stosuje się teorię momentów, w której analizuje się pierwszy moment absolutny, μ_1 , i drugi moment centralny, μ_2 , pików chromatograficznych [157-158]. W metodzie analizy

momentów wartości μ_1 i μ_2 wykorzystuje się do wyznaczania parametrów równowagowych i kinetycznych związanych z procesami separacji w HPLC. Moment zerowego rzędu, μ_0 , odpowiada polu powierzchni pików chromatograficznych i nie jest zwykle przedmiotem analizy, gdyż celem metody momentów nie jest ilościowe oznaczanie stężenia analitu. Momentów wyższych rzędów niż trzeci zazwyczaj się nie uwzględnia, ponieważ ich dokładne wyznaczenie eksperymentalne jest utrudnione przez obecność szumu sygnału w obszarach oddalonych od maksimum pików. Nie jest również konieczne ściśle kontrolowanie ilości wprowadzanego analitu, gdyż wartości μ_1 i μ_2 pozostają praktycznie niezmienione przy niewielkich zmianach wartości μ_0 [157–158,160]. W przypadku pików o kształcie zbliżonym do rozkładu Gaussa (wzór 3.33, rys. 3.16) momenty te mają jednoznaczną interpretację fizyczną: μ_1 odpowiada położeniu środka ciężkości pików, natomiast μ_2 stanowi miarę jego szerokości i stopnia rozmycia pików chromatograficznych.

$$C(t) = \frac{I}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot \exp \cdot \left(\frac{-(t - t_R)^2}{2 \cdot \sigma^2} \right) \quad (3.33)$$

gdzie: I – pole powierzchni pików, proporcjonalne do ilości analitu, σ – odchylenie standardowe pików chromatograficznych [157].



Rysunek 3.16. Schematyczna ilustracja pierwszego momentu absolutnego i drugiego momentu centralnego pików chromatograficznych [157]

Pierwszy moment absolutny, μ_1 , (wzór 3.34) wykorzystuje się do oceny retencji oraz parametrów równowagowych w kolumnie chromatograficznej. Moment ten jest związany ze średnim czasem retencji analitu, co umożliwia analizę zmian retencji pod wpływem temperatury, składu fazy ruchomej i innych parametrów chromatograficznych.

$$\mu_1 = \frac{\int_0^\infty Ce(t) \cdot t \, dt}{\int_0^\infty Ce(t) dt} = \frac{L}{u} [\phi + (1 - \phi) \{ \varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p) \cdot K_p \}] \quad (3.34)$$

gdzie: $Ce(t)$ – profil stężenia analitu na wyjściu z kolumny, L – długość kolumny chromatograficznej, ϕ – ułamek objętości dostępnej dla fazy ruchomej, ε_p – porowatość ziaren adsorbentu, K_p – współczynnik podziału analitu pomiędzy fazę stacjonarną a ciecz wypełniającą pory ziaren adsorbentu [157-158,160].

Czas retencji inerty (t_0) (wzór 3.35) jest definiowany jako czas, w którym substancja przepływa przez kolumnę chromatograficzną bez oddziaływań z fazą stacjonarną [156-157,159].

$$t_0 = \left(\frac{L}{u} \right) \cdot [\phi + (1 - \phi) \cdot \varepsilon_p] \quad (3.35)$$

Drugi moment centralny, μ_2 , (wzór 3.36) opisuje stopień rozprzestrzeniania się pasma analitu w kolumnie chromatograficznej i jest związany z szerokością piku chromatograficznego. Parametr ten umożliwia ocenę dyspersji oraz efektywności procesu separacji.

$$\mu_2 = \frac{\int_0^\infty Ce(t) \cdot (t - \mu_1)^2 dt}{\int_0^\infty Ce(t) dt} = \frac{2 \cdot L}{u} (\delta_{ax} + \delta_f + \delta_d + \delta_{ads}) \quad (3.36)$$

gdzie: δ – składowe oporów transportu masy wpływające na szerokość piku, a indeksy dolne ax, f, d, ads odnoszą się odpowiednio do dyspersji osiowej, zewnętrznego transportu masy, dyfuzji wewnątrzcząsteczkowej oraz kinetyki adsorpcji/desorpcji [157-158,160].

III.5. Charakterystyka fizykochemiczna i granulometryczna adsorbentów stosowanych w chromatografii ciekowej

Właściwości fizykochemiczne i granulometryczne adsorbentów stosowanych w chromatografii ciekowej, takie jak morfologia, skład chemiczny, rozkład wielkości ziaren, wielkość i objętość porów, powierzchnia właściwa oraz stabilność termiczna i chemiczna, mogą bezpośrednio wpływać na procesy wymiany masy, a tym samym na charakter oddziaływań, pomiędzy analitem, a fazą stacjonarną. Parametry te mogą wpływać zarówno na mechanizm retencji, jak i na odpowiedź kolumny na sygnał wlotowy i kształt piku chromatograficznego, jego szerokość i symetrię, a w konsekwencji na rozdzielczość

oraz wydajność separacji. Morfologia ziaren adsorbentu w istotny sposób warunkuje dostęp do miejsc aktywnych na powierzchni materiału, a także wpływa na profil przepływu fazy ruchomej w złożu chromatograficznym. Z kolei struktura chemiczna powierzchni fazy stacjonarnej determinuje charakter oraz siłę oddziaływań zachodzących pomiędzy analitem a powierzchnią fazy stacjonarnej, co bezpośrednio wpływa na mechanizm retencji [163-166]. Rozkład wielkości ziaren adsorbentu stanowi istotny czynnik wpływający na jednorodność upakowania kolumny, porowatość złoża oraz opory przepływu fazy ruchomej, determinując tym samym efektywność procesu separacji oraz powtarzalność wyników analitycznych [48,167–169]. Struktura porów oraz ich dostępność odgrywają kluczową rolę w procesie transportu masy, determinując wielkość oporów dyfuzji wewnętrznej. Opory te mogą istotnie wpływać na szybkość przemieszczania się cząsteczek analitów do wnętrza porów ziaren adsorbentu, a tym samym na kinetykę procesu chromatograficznego [163,170–172]. Powierzchnia właściwa adsorbentu, wynikająca z jego struktury porowatej, wpływa na liczbę dostępnych miejsc oddziaływań z analitem, determinując pojemność sorpcyjną oraz właściwości retencyjne materiału [163,173]. Stabilność termiczna i chemiczna adsorbentu determinuje jego trwałość oraz odporność na zmiany warunków pracy w szerokim zakresie temperatur [174–176]. Dokładne poznanie właściwości fizykochemicznych oraz granulometrycznych adsorbentów umożliwia nie tylko głębsze zrozumienie mechanizmów retencji w HPLC, lecz także właściwy dobór fazy stacjonarnej do rozdzielania określonych klas związków, z uwzględnieniem ich polarności, wielkości cząsteczek oraz charakteru jonowego. Wiedza ta pozwala również na świadome projektowanie i optymalizację warunków analizy, takich jak skład i polarność fazy ruchomej, temperatura kolumny czy prędkość przepływu fazy ruchomej. W rezultacie charakterystyka adsorbentów stanowi podstawę zarówno prawidłowej interpretacji wyników chromatograficznych, jak i rozwoju nowych materiałów o ulepszonych właściwościach separacyjnych, zwiększonej trwałości oraz szerszym zakresie zastosowań analitycznych.

Charakterystyka wybranych adsorbentów stanowi jeden z głównych celów badawczych niniejszej dysertacji.

III.5.1. Morfologia ziaren

Jak wspomniano, morfologia ziaren adsorbentów stanowi jeden z kluczowych czynników wpływających na ich właściwości adsorpcyjne oraz efektywność procesów chromatograficznych. Kształt, wielkość oraz struktura ziaren determinują profil przepływu fazy ruchomej, efektywność rozdzielania oraz kinetykę adsorpcji i dyfuzji analitów do wnętrza porów. Różnice w morfologii adsorbentu wpływają na opory przepływu fazy

ruchomej w złożu kolumny oraz na rozdzielczość chromatograficzną. Badania wykazały, że zastosowanie sferycznych ziaren o wąskim rozkładzie wielkości sprzyja bardziej jednolitemu upakowaniu złoża chromatograficznego, co skutkuje ograniczeniem dyspersji oraz niejednorodności przepływu fazy ruchomej. W konsekwencji obserwuje się poprawę powtarzalności retencji, zmniejszenie poszerzenia pików chromatograficznych oraz wzrost efektywności separacji chromatograficznej [163-166,177-178]. Ziarna nieregularne charakteryzują się mniejszą jednorodnością kształtu i rozmiaru, co prowadzi do powstawania różnic w stopniu upakowania złoża chromatograficznego oraz lokalnych zmian prędkości przepływu fazy ruchomej. W praktyce kolumny wypełnione takimi ziarnami wykazują większe opory przepływu i wyższy spadek ciśnienia, a także mogą generować piki chromatograficzne o gorszej jakości, charakteryzujące się większym poszerzeniem oraz mniejszą symetrią [163,169,178-179]. Nowoczesne fazy stacjonarne często wykorzystują ziarna typu *Core-shell*, zbudowane z nieporowatego rdzenia pokrytego cienką, porowatą warstwą. Struktura ta zapewnia wysoką powierzchnię właściwą przy jednoczesnym ograniczeniu długości drogi dyfuzji analitów, co prowadzi do zmniejszenia oporów transportu masy. W rezultacie obserwuje się zwiększenie sprawności separacji, skrócenie czasu analizy oraz obniżenie ciśnienia roboczego w kolumnie. Dalsze zmniejszanie grubości warstwy porowatej sprzyja intensyfikacji transportu masy, co przekłada się na dodatkową poprawę efektywności chromatograficznej [180-181].

Jedną z podstawowych i najczęściej stosowanych metod analizy morfologii ziaren adsorbentów jest skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM, ang. *Scanning Electron Microscopy*). Technika ta umożliwia wizualizację powierzchni ziaren w wysokiej rozdzielczości, co pozwala na ocenę ich wielkości, kształtu, struktury oraz sposobu rozmieszczenia. Metoda ta umożliwia również identyfikację defektów powierzchniowych, takich jak pęknięcia czy agregacja ziaren, które mogą wpływać na przepływ fazy ruchomej w kolumnie oraz efektywność separacji. Obraz w mikroskopii SEM powstaje w wyniku rejestracji sygnałów generowanych podczas oddziaływania wiązki elektronów z materiałem próbki. Elektrony pierwotne padają na powierzchnię próbki i częściowo wnikają w jej objętość, tworząc tzw. objętość oddziaływania, w której zachodzą procesy wzbudzenia elektronów oraz emisji charakterystycznych sygnałów. Wielkość tego obszaru zależy przede wszystkim od energii wiązki elektronów, jak również od właściwości materiału próbki, takich jak liczba atomowa i gęstość, które wpływają na sposób rozpraszania i hamowania elektronów w jej wnętrzu [182-183].

III.5.2. Skład pierwiastkowy

Skład chemiczny powierzchni ziaren adsorbentu stanowi jeden z ważniejszych czynników determinujących charakter oddziaływań pomiędzy analitem a fazą stacjonarną. Analiza pierwiastkowa umożliwia identyfikację oraz określenie zawartości pierwiastków obecnych w badanym materiale, a także wykrywanie zanieczyszczeń oraz składników wprowadzanych podczas modyfikacji powierzchni. Uzyskane informacje pozwalają na ocenę właściwości chemicznych adsorbentu oraz przewidywanie jego selektywności i wydajności chromatograficznej. Skład pierwiastkowy powierzchni fazy stacjonarnej wpływa na jej właściwości fizykochemiczne, które determinują rodzaj i siłę oddziaływań. Do najważniejszych z nich należą oddziaływania jonowe, wiązania wodorowe oraz oddziaływania dipol–dipol. Skład chemiczny powierzchni adsorbentu oraz obecność zanieczyszczeń mogą prowadzić do powstawania centrów adsorpcyjnych o zróżnicowanej energii. W rezultacie powierzchnia adsorbentu staje się energetycznie heterogeniczna, co wpływa na mechanizm retencji oraz przebieg procesów adsorpcyjnych w chromatografii ciekłowej. W konsekwencji może przyczyniać się do występowania zjawisk niepożądanych, takich jak poszerzenie czy asymetria pików chromatograficznych [163-166].

Metody analizy składu pierwiastkowego faz stacjonarnych obejmują m.in.: spektroskopię EDS (ang. *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*) oraz technikę ICP-MS (ang. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Spektroskopia EDS służy do analizy składu pierwiastkowego warstwy powierzchniowej adsorbentu i najczęściej jest sprzężona z mikroskopią skaningową (SEM). Umożliwia identyfikację obecnych pierwiastków oraz ich ilościową ocenę na powierzchni adsorbentu [182,184]. Technika ICP-MS stosowana jest natomiast do precyzyjnego oznaczania zawartości pierwiastków w całej objętości próbki, po jej uprzednim rozтворzeniu, i może stanowić uzupełnienie danych uzyskiwanych metodami analizy powierzchniowej, takimi jak EDS. Metoda ta charakteryzuje się bardzo wysoką czułością, wymaga niewielkich ilości próbki, zapewnia niski poziom interferencji spektralnych oraz umożliwia szybkie i zautomatyzowane analizy. W technice ICP-MS jako źródło jonizacji wykorzystywana jest plazma indukcyjnie sprzężona, generowana w obojętnej gazie (argonie), która umożliwia efektywną jonizację badanych pierwiastków. Powstałe jony są następnie rozdzielane w zależności od stosunku masy do ładunku, najczęściej z wykorzystaniem analizatora kwadrupolowego i rejestrowane przez detektor. Dzięki temu możliwe jest oznaczanie stężeń większości pierwiastków układu okresowego na bardzo niskich poziomach stężeń, sięgających zakresu ppb oraz ppt [185-186].

III.5.3. Rozkład wielkości ziaren

Rozkład wielkości ziaren (PSD, ang. *Particle Size Distribution*) adsorbentów może w znaczący sposób wpływać na efektywność procesu adsorpcji [169,187]. W wielu badaniach nad adsorpcją w złożu stałym przyjmuje się uproszczenie polegające na uśrednieniu wielkości ziaren lub przymuje się pewien zakres ich wielkości, aby ułatwić modelowanie procesu. Jednak takie podejście nie eliminuje różnic między wynikami eksperymentalnymi, a wynikami symulacji, które w praktyce wynikają z rzeczywistego rozkładu wielkości ziaren adsorbentu. Ziarna o różnych rozmiarach mogą zachowywać się w złożu odmiennie, a te różnice trudno w pełni uchwycić przy założeniu jednorodnej wielkości ziaren, zarówno analizując pojedyncze ziarna, jak i całość złoża. Choć w niektórych przypadkach przyjęcie średniej wielkości ziaren daje wystarczająco dobre przybliżenie, wciąż pozostaje niepewność, co do stopnia odchylenia, jakie mogą wystąpić [188]. Ziarna adsorbentu o różnych rozmiarach różnią się nie tylko powierzchnią, ale także strukturą porów. W przypadku większych ziaren migracja analitu do wnętrza porów może zajmować znacznie więcej czasu. Dlatego rozkład wielkości ziaren może istotnie wpływać na przebieg procesu adsorpcji. Dodatkowo, szerokość lub rozpiętość tego rozkładu również może determinować efektywność adsorpcji, modyfikując sposób, w jaki cząstki analitu oddziałują w złożu [168,189]. Pożądane jest stosowanie adsorbentów wypełniających kolumny chromatograficzne o wąskich rozkładach wielkości ziaren, co może zwiększać ich wydajność [190]. Kaczmarski i współpracownicy [191] uwzględnili zarówno rozkład wielkości i objętości porów, jak i rozkład wielkości ziaren adsorbentu w badaniach nad adsorpcją ciecz–ciało stałe na węglu aktywnym. Z ich obserwacji wynika, że choć uproszczenie modelu polegające na zastosowaniu średniego rozmiaru porów zamiast pełnego rozkładu wciąż pozwalało na uzyskanie satysfakcjonujących wyników symulacji procesu, pominięcie rzeczywistego rozkładu wielkości ziaren adsorbentu może skutkować błędną oceną parametrów w modelach izoterm adsorpcji lub desorpcji.

Jedną z powszechnie stosowanych metod oznaczania rozkładu wielkości ziaren adsorbentów jest dyfrakcja laserowa (LD, ang. *Laser Diffraction*). Inną metodą, wykorzystywaną głównie do analizy nanocząstek, jest dynamiczne rozpraszanie światła (DLS, ang. *Dynamic Light Scattering*). W metodzie dyfrakcji laserowej wiązka światła laserowego przechodzi przez zawiesinę ziaren, a następnie analizowany jest rozkład natężenia światła rozproszonego pod różnymi kątami. Duże ziarna rozpraszają światło głównie pod małymi kątami, natomiast mniejsze pod większymi. Na podstawie zarejestrowanego rozkładu intensywności światła w funkcji kąta rozpraszania, określanego jako obraz dyfrakcyjny, wyznacza się rozkład wielkości ziaren w próbce z wykorzystaniem odpowiednich modeli

optycznych (Fraunhofera lub Miego). Metoda ta umożliwia szybkie i nieniszczące wyznaczenie rozkładu wielkości ziaren w szerokim zakresie rozmiarów [192-193]. Metoda DLS z kolei umożliwia nieinwazyjne pomiary i opiera się na analizie ruchów Browna oraz czasowych fluktuacji intensywności światła rozproszonego [194]. W cieczy ziarna poruszają się losowo w wyniku zderzeń z cząsteczkami rozpuszczalnika, co określane jest jako ruchy Browna [195]. Światło laserowe padające na ziarna ulega rozproszeniu we wszystkich kierunkach, a fale rozproszone przez poszczególne ziarna nakładają się, prowadząc do interferencji konstruktywnej i destruktywnej. W wyniku ruchu ziaren intensywność światła rozproszonego w określonym punkcie ulega zmianom w czasie. Mniejsze ziarna przemieszczają się szybciej, powodując szybsze fluktuacje sygnału, natomiast większe ziarna poruszają się wolniej, generując wolniejsze zmiany intensywności. Zarejestrowane zmiany są analizowane przy użyciu funkcji autokorelacji, a szybkość fluktuacji jest bezpośrednio powiązana ze współczynnikiem dyfuzji ziaren. Na podstawie równania Stokesa–Einsteina współczynnik dyfuzji przeliczany jest na hydrodynamiczną średnicę ziaren. W ten sposób, poprzez analizę fluktuacji światła, DLS pozwala określić rozkład wielkości ziaren w badanej próbce, zwykle w zakresie submikronowym [195-197]. Równanie Stokesa–Einsteina wyrażone jest następująco (wzór 3.37):

$$d(H) = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (3.37)$$

gdzie: $d(H)$ – średnica hydrodynamiczna, k_B – stała Boltzmanna, T – temperatura bezwzględna, η – lepkość dynamiczna, D – współczynnik dyfuzji translacyjnej [195-197].

III.5.4. Charakterystyka struktury porowatej

Dokładna charakterystyka porowatości adsorbentów jest niezbędna nie tylko do świadomego doboru fazy stacjonarnej, lecz także do projektowania nowych adsorbentów o zoptymalizowanych właściwościach separacyjnych oraz wysokiej wydajności analitycznej. Porowatość adsorbentów chromatograficznych w istotny sposób wpływa na ich właściwości sorpcyjne, powierzchnię właściwą, kinetykę transportu masy oraz mechanizm retencji analitów. Struktura porowata decyduje o dostępności miejsc adsorpcyjnych, szybkości dyfuzji cząsteczek do wnętrza porów ziaren oraz efektywności wymiany masy pomiędzy fazą ruchomą a fazą stacjonarną. Wielkość porów determinuje możliwość rozdzielania cząsteczek o różnej masie cząsteczkowej natomiast ich całkowita objętość wpływa na pojemność sorpcyjną adsorbentu. Wielkość porów może również wpływać na parametry chromatograficzne, takie jak kształt pików, rozdzielczość. Ponadto niejednorodność struktury

porowatej prowadzi do zróżnicowania warunków dyfuzji oraz oddziaływań pomiędzy analitami a powierzchnią adsorbentu, co może wpływać na efektywność separacji oraz przyczyniać się do poszerzenia pików chromatograficznych [170-172,198-200].

III.5.4.1. Metody wyznaczania wielkości i objętości porów

Do analizy wielkości i objętości porów adsorbentów powszechnie stosuje się metody oparte na analizie izoterm adsorpcji gazów, najczęściej azotu. Jedną z klasycznych technik wykorzystywanych do charakterystyki materiałów mezoporowatych jest metoda BJH (*Barrett–Joyner–Halenda*), umożliwiająca wyznaczenie rozkładu wielkości porów oraz ich objętości na podstawie gałęzi desorpcyjnej izoterm adsorpcji. W pierwszym etapie próbka zostaje nasycona gazem adsorpcyjnym, a następnie stopniowo obniża się ciśnienie, rejestrując ilość desorbowanego gazu. Podczas desorpcji następuje najpierw opróżnianie porów wypełnionych kondensatem kapilarnym, a następnie stopniowe zmniejszanie grubości warstwy adsorbentu zaadsorbowanego na powierzchni porów. Metoda BJH wykorzystuje równanie Kelvina do wyznaczania promienia krzywizny menisku cieczy w porach, co umożliwia określenie wielkości porów na podstawie ilości desorbowanego gazu. Wyniki analizy przedstawiane są najczęściej w postaci zależności objętości porów od ich promienia lub średnicy, co pozwala na wyznaczenie całkowitej objętości porów oraz ocenę struktury porowatej badanego adsorbentu. W metodzie BJH promień poru definiowany jest jako suma promienia krzywizny menisku wyznaczonego z równania Kelvina oraz grubości warstwy adsorpcyjnej (wzór 3.38) [201-202].

$$\ln \left(\frac{P}{P_0} \right) = \frac{2\gamma V_M}{rRT} \quad (3.38)$$

gdzie: $\frac{P}{P_0}$ – ciśnienie względne (stosunek ciśnienia równowagowego adsorbentu do ciśnienia pary nasyconej), γ – współczynnik napięcia powierzchniowego, V_M – molowa objętość adsorbentu, R – uniwersalna stała gazowa, r – promień krzywizny menisku tworzącego się w mezoporze, T – temperatura bezwzględna [201-202].

Uzupełnieniem klasycznej metody BJH jest metoda teorii funkcyjności gęstości (DFT, ang. *Density Functional Theory*). Umożliwia ona dokładniejszą analizę mikro- i mezoporów w zakresie, w którym metoda BJH wykazuje ograniczoną dokładność. Seaton i współpracownicy jako pierwsi zaproponowali zastosowanie modelu DFT do wyznaczania rozkładu wielkości porów na podstawie izoterm adsorpcji. Metoda ta polega na dopasowaniu

eksperymentalnej izotermy adsorpcji $N_{exp}\left(\frac{P}{P_0}\right)$ do kombinacji teoretycznych izoterm $N_{DFT}\left(\frac{P}{P_0}, d_{por}\right)$, wyznaczonych dla porów o różnych średnicach d_{por} . W wyniku tego dopasowania otrzymuje się funkcję rozkładu wielkości porów $f(d_{por})$. Proces ten opisuje równanie całkowe przedstawione we wzorze 3.39.

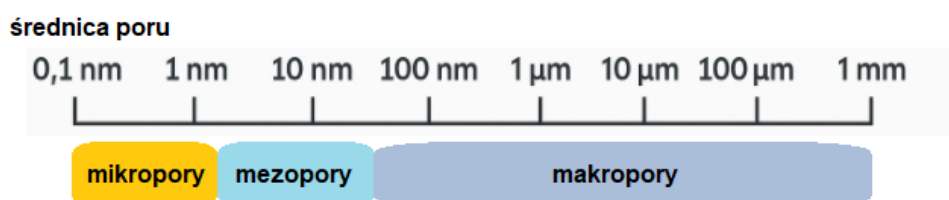
$$N_{exp}\left(\frac{P}{P_0}\right) = \int_{d_{por,min}}^{d_{por,max}} N_{DFT}\left(\frac{P}{P_0}, d_{por}\right) \cdot f(d_{por}) d d_{por} \quad (3.39)$$

gdzie: $d_{por,min}$ i $d_{por,max}$ – oznaczają odpowiednio minimalną i maksymalną średnicę porów [201-203].

Kolejną metodą wykorzystywaną do wyznaczania wielkości porów jest metoda Dollimore’a–Heala (DH), stanowiąca rozwinięcie klasycznej metody BJH. Podobnie jak metoda BJH, opiera się ona na analizie gałęzi desorpcyjnej izotermy adsorpcji azotu. W metodzie DH wykorzystuje się zmodyfikowaną postać równania Kelvina oraz odmienny sposób uwzględniania grubości warstwy adsorpcyjnej, co pozwala na dokładniejszy opis zjawiska kondensacji kapilarnej. W rezultacie metoda ta umożliwia wyznaczanie wielkości porów, szczególnie w zakresie większych mezoporów, dla których metoda BJH może wykazywać ograniczoną dokładność. Znajduje ona zastosowanie przede wszystkim w charakterystyce adsorbentów o dobrze rozwiniętej strukturze mezoporowatej [202,204]. Innym podejściem teoretycznym do wyznaczania rozkładu wielkości porów na podstawie izoterm adsorpcji jest metoda Horvátha–Kawazoe (HK). Metoda ta jest stosowana głównie do charakterystyki materiałów mikroporowatych i opiera się na analizie zależności pomiędzy ciśnieniem względnym adsorbentu a energią oddziaływań występujących pomiędzy cząsteczkami adsorbentu a powierzchnią porów. Na podstawie modelu oddziaływań molekularnych możliwe jest wyznaczenie wielkości mikroporów. Metoda HK znajduje zastosowanie przede wszystkim w analizie adsorbentów zawierających mikropory o dobrze zdefiniowanej strukturze [205-206]. Do metod wykorzystywanych w analizie mikroporów należy również metoda Saito–Foley (SF), oparta na teorii pola potencjału. Dzięki uwzględnieniu oddziaływań pomiędzy cząsteczkami adsorbentu a powierzchnią porów umożliwia ona precyzyjne wyznaczanie rozmiarów porów o średnicy mniejszej niż 2 nm. Metoda ta została opracowana z myślą o materiałach zawierających pory cylindryczne i sferyczne, dzięki czemu znajduje zastosowanie w charakterystyce mikroporowatych adsorbentów [206].

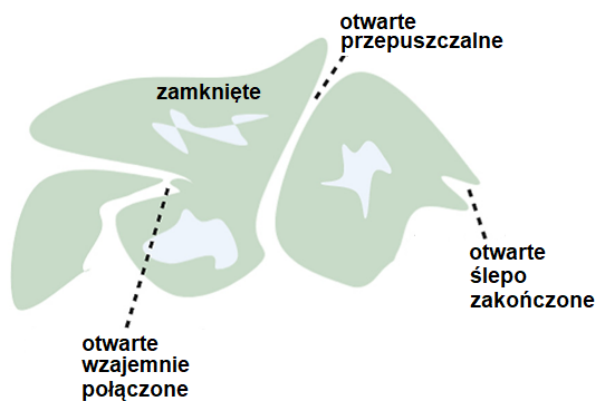
III.5.4.2. Rodzaje i klasyfikacja porów

Adsorbenty o dużej powierzchni właściwej zazwyczaj posiadają dobrze rozwiniętą strukturę porowatą. W materiałach adsorpcyjnych występują różnorodne typy porów, zarówno o charakterze sztywnym, jak i elastycznym, a pojedynczy adsorbent może zawierać układ porów o zróżnicowanych rozmiarach i geometrii. Kluczowe znaczenie dla właściwości adsorpcyjnych mają wymiary porów, takie jak szerokość porów szczelinowych lub średnica porów cylindrycznych, oraz ich całkowita objętość. Zgodnie z klasyfikacją Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC, ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) nanopory dzielą się na trzy kategorie (rys. 3.17): mikropory o średnicy poniżej 2 nm, mezopory o średnicy od 2 do 50 nm oraz makropory o średnicy większej niż 50 nm. Materiały porowate klasyfikuje się do jednej z tych grup na podstawie dominującego rozmiaru porów. Należy jednak pamiętać, że granice te mają charakter umowny, ponieważ sposób wypełniania porów zależy nie tylko od ich wielkości i kształtu, lecz także od rozmiaru cząsteczek adsorbentu oraz rodzaju oddziaływań występujących pomiędzy adsorbentem a adsorbentem [207-208].



Rysunek 3.17. Klasyfikacja rozmiarów porów według IUPAC

Materiały porowate mogą zawierać różne typy porów: zamknięte, otwarte przepuszczalne, otwarte ślepo zakończone oraz otwarte wzajemnie połączone (rys. 3.18). Pory zamknięte są całkowicie odizolowane od otoczenia, a ich wnętrze nie jest dostępne dla cząsteczek adsorbentu. Pory ślepo zakończone, otwarte tylko z jednej strony, są dostępne z powierzchni materiału, jednak nie zapewniają przepływu przez całą strukturę materiału, w przeciwieństwie do porów otwartych przepuszczalnych. Natomiast pory otwarte wzajemnie połączone tworzą sieć kanałów transportowych rozciągających się w różnych kierunkach, umożliwiających przepływ przez materiał. Dostępność porów oraz ich geometria odgrywają istotną rolę w procesach adsorpcji i transportu masy, wpływając na efektywność wykorzystania powierzchni adsorbentu oraz szybkość dyfuzji cząsteczek wewnątrz struktury porowatej [207].

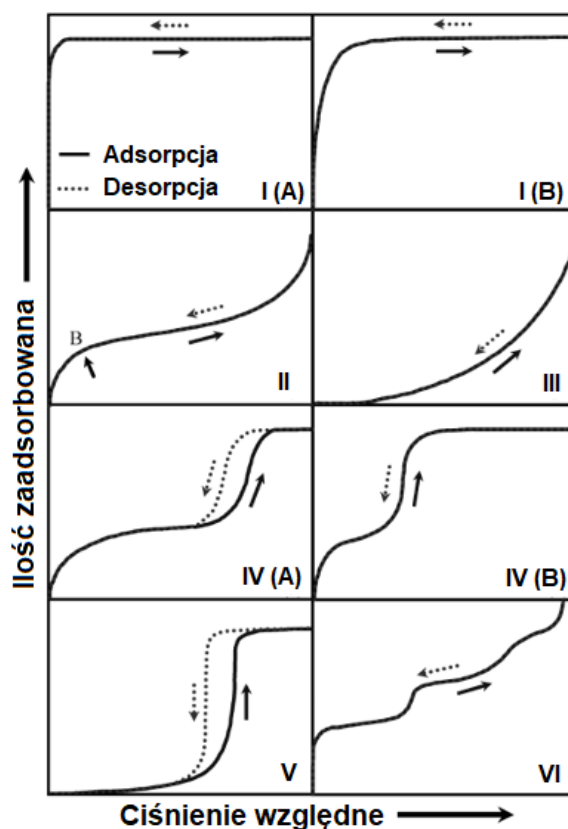


Rysunek 3.18. Rodzaje porów [207]

III.5.4.3. Klasyfikacja izoterm dla adsorpcji fizycznej

IUPAC w 1985 roku opracowała klasyfikację izoterm adsorpcji obejmującą sześć podstawowych typów, która została zaktualizowana w 2015 roku poprzez doprecyzowanie interpretacji niektórych kształtów izoterm oraz wprowadzenie dodatkowych podtypów związanych z charakterem porowatości materiałów (rys. 3.19). Izotermmy typu I obserwuje się w materiałach mikroporowatych, w których adsorpcja zachodzi głównie w mikroporach, przy stosunkowo niewielkim udziale powierzchni zewnętrznej. Typ I (A) dotyczy adsorbentów zawierających bardzo wąskie mikropory o szerokości poniżej około 1 nm, natomiast typ I (B) występuje w materiałach charakteryzujących się szerszym rozkładem porów, obejmującym zarówno szersze mikropory, jak i wąskie mezopory (do około 2,5 nm). Izotermmy typu II są charakterystyczne dla materiałów nieporowatych lub makroporowatych, w których zachodzi adsorpcja wielowarstwowa. W przebiegu tych izoterm obserwuje się wyraźny punkt B, odpowiadający zakończeniu tworzenia monowarstwy adsorbentu. Po osiągnięciu punktu B następuje dalsza adsorpcja prowadząca do powstawania kolejnych warstw adsorbentu, czego efektem jest stopniowy wzrost adsorbowanej ilości substancji bez wyraźnego ograniczenia w zakresie wysokich wartości ciśnienia względnego. Izotermmy typu III występują w układach, w których oddziaływania adsorbat–adsorbent są słabe, co prowadzi do braku adsorpcji monowarstwowej; w konsekwencji ilość zaadsorbowanego gazu rośnie w sposób ciągły, a krzywa izotermmy ma charakter wypukły względem osi ciśnienia. Izotermmy typu IV są typowe dla materiałów mezoporowatych i wiążą się z występowaniem zjawiska kapilarnej kondensacji w porach. W zależności od charakteru porów oraz przebiegu pętli histerezy wyróżnia się podtyp IV (A) oraz IV (B), przy czym IV (A) odpowiada materiałom wykazującym wyraźną histerezę sorpcji, natomiast IV (B) obejmuje układy, w których pętla histerezy jest słabo zaznaczona. Obecność i kształt pętli histerezy zależą od struktury oraz geometrii porów. Izotermmy typu V mają charakter

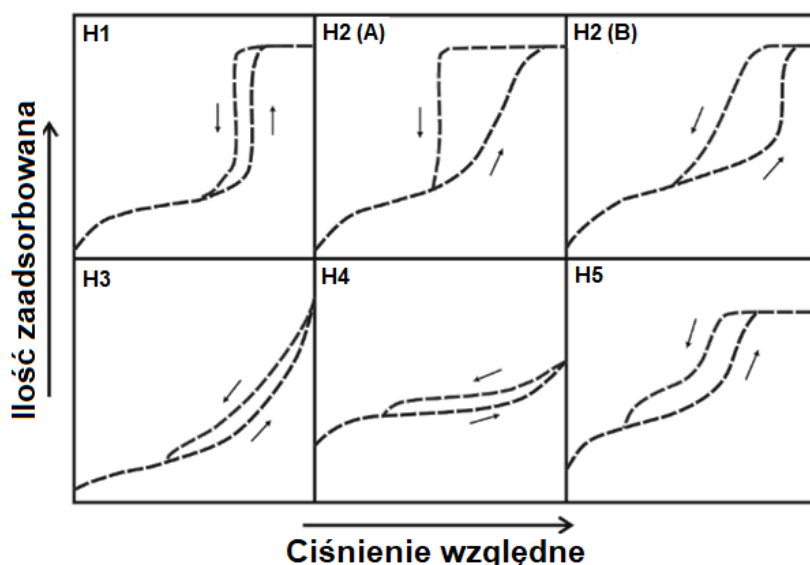
S-kształtne i występują w układach, w których oddziaływania adsorbat–adsorbent są słabe, co prowadzi do niekorzystnej adsorpcji przy niskich wartościach ciśnienia, a następnie do jej gwałtownego wzrostu w wyniku kondensacji kapilarnej. Typ VI występuje stosunkowo rzadko i jest obserwowany w przypadku jednorodnych powierzchni adsorpcyjnych, na których zachodzi wielowarstwowa adsorpcja o charakterze schodkowym. Poszczególne stopnie izoterm odpowiadają tworzeniu się kolejnych warstw adsorbentu [207,209–210].



Rysunek 3.19. Klasyfikacja izoterm adsorpcji azotu dla równowag gaz–ciało stałe według IUPAC [206,208-209]

Histeresa (rys. 3.20) jest zjawiskiem polegającym na różnicy przebiegu izoterm adsorpcji i desorpcji przy tych samych wartościach ciśnienia względnego, wynikającej z występowania metastabilnych stanów fazy skondensowanej w porach. Zjawisko to jest najczęściej związane z kondensacją kapilarną zachodzącą w mezoporach, a następnie z ich opróżnianiem podczas desorpcji. Obecność pętli histerezy wskazuje na występowanie mezoporowatości oraz złożonej struktury porów, natomiast jej kształt i położenie zależą od geometrii, topologii oraz rozkładu porów w analizowanym adsorbencie [207,209–211]. Rodzaj pętli histerezy H1 jest charakterystyczny dla materiałów porowatych o wąskim rozkładzie jednorodnych mezoporów oraz względnie uporządkowanej strukturze porów, w których obserwuje się regularny przebieg kondensacji kapilarnej. Pętla H2 występuje

w materiałach o złożonej strukturze porów, w których histereza wynika z efektów blokowania porów oraz ograniczeń transportu adsorbentu w sieci porów. Może ona przyjmować zróżnicowane kształty w zależności od stopnia przewężenia porów oraz sposobu ich połączenia. Pętla H3 jest typowa dla materiałów zawierających pory szczelinowe i często nie wykazuje wyraźnego plateau przy wysokich wartościach ciśnienia względnego, co wskazuje na brak ograniczenia adsorpcji w zakresie wysokiego nasycenia. Pętla H4 związana jest z materiałami zawierającymi zarówno mikropory, jak i wąskie mezopory, w których nakładają się efekty adsorpcji mikroporowej oraz kondensacji kapilarnej. Pętla H5 występuje stosunkowo rzadko i jest obserwowana w materiałach o złożonej strukturze porów, obejmującej częściowo zablokowane mezopory oraz pory otwarte, co prowadzi do nietypowego przebiegu histerezy [207,209–211].



Rysunek 3.20. Klasyfikacja pętli histerezy według IUPAC [207,209-211]

III.5.4.4. Powierzchnia właściwa

Powierzchnia właściwa adsorbentów ma istotny wpływ na zdolność sorpcyjną oraz efektywność procesów chromatograficznych. Im większa powierzchnia dostępna dla cząsteczek analitu, tym większa liczba centrów adsorpcyjnych może uczestniczyć w procesie adsorpcji, co wpływa na pojemność sorpcyjną, retencję oraz ogólną wydajność separacji. Powierzchnia właściwa zależy nie tylko od rodzaju adsorbentu i jego składu chemicznego, lecz także od struktury porów, rozkładu wielkości ziaren oraz morfologii. Dokładne poznanie powierzchni właściwej jest istotne przy projektowaniu faz stacjonarnych, optymalizacji warunków chromatograficznych oraz interpretacji procesów adsorpcji i retencji zachodzących w kolumnie chromatograficznej [212].

W literaturze opisano wiele metod wyznaczania powierzchni właściwej adsorbentów, wśród których szczególne miejsce zajmują techniki oparte na adsorpcji gazów, najczęściej azotu. Do najczęściej stosowanych należy metoda BET (*Brunauera–Emmetta–Teller*), umożliwiająca ilościowe określenie powierzchni dostępnej dla cząsteczek adsorbentu [163,173]. Metoda BET została uznana przez IUPAC za standardową metodę wyznaczania powierzchni właściwej materiałów na podstawie pomiarów adsorpcji gazów [211]. Metoda BET opiera się na modelu adsorpcji wielowarstwowej zgodnie z którym cząsteczki gazu gromadzą się na powierzchni materiału, tworząc początkowo monowarstwę, a następnie kolejne warstwy o charakterze zbliżonym do fazy skondensowanej. W analizach najczęściej wykorzystuje się azot w temperaturze 77 K ze względu na jego obojętność chemiczną oraz dobrze poznane właściwości adsorpcyjne. Pierwsza warstwa adsorbentu powstaje w wyniku oddziaływań adsorbat–adsorbent, natomiast kolejne warstwy tworzą się na powierzchni wcześniej zaadsorbowanych cząsteczek. Wraz ze wzrostem ciśnienia gazu następuje stopniowe tworzenie kolejnych warstw adsorbentu, prowadzące do adsorpcji wielowarstwowej. Proces rozpoczyna się z chwilą kontaktu badanego materiału z gazem adsorpcyjnym w kontrolowanej temperaturze. Następnie ciśnienie gazu jest stopniowo zwiększane, a dla kolejnych wartości rejestrowana jest ilość zaadsorbowanego gazu, co pozwala na wyznaczenie izotermy adsorpcji. Na podstawie uzyskanych danych stosuje się model BET, który umożliwia analizę fragmentu izotermy w zakresie średnich wartości ciśnienia względnego, a następnie określenie pojemności monowarstwy adsorpcyjnej oraz obliczenie powierzchni właściwej badanego materiału [209–210]. Do analizy wykorzystuje się liniowy obszar izotermy występujący w zakresie średnich wartości ciśnienia względnego [213]. Równanie BET przedstawiono we wzorze 3.40.

$$\frac{\frac{P}{P_0}}{n \cdot \left(1 - \frac{P}{P_0}\right)} = \frac{1}{n_m \cdot k_{BET}} + \frac{k_{BET} - 1}{n_m \cdot k_{BET}} \cdot \left(\frac{P}{P_0}\right) \quad (3.40)$$

gdzie: P i P_0 – odpowiednio ciśnienie cząstkowe i ciśnienie nasycenia adsorbentu, n – ilość zaadsorbowanego gazu w warunkach równowagi przy danym P , n_m – pojemność monowarstwowa (ilość adsorbentu odpowiadająca pokryciu powierzchni pojedynczą warstwą), a k_{BET} – stała BET, związana z energią oddziaływania adsorbat–powierzchnia adsorbentu. Zarówno n_m jak i k_{BET} można wyznaczyć na podstawie regresji liniowej izoterm adsorpcji N_2 w wykresach BET [214-216].

Powierzchnię właściwą w metodzie BET oblicza się na podstawie pojemności monowarstwy adsorpcyjnej zgodnie ze wzorem 3.41.

$$S_{BET} = n_m \cdot a^2 \quad (3.41)$$

gdzie: a^2 – powierzchnia przekroju poprzecznego pojedynczej cząsteczki azotu w monowarstwie. W obliczeniach przyjmuje się wartość $a^2 = 0,162 \text{ nm}^2$, wynikającą z modelu geometrycznego cząsteczki azotu oraz założenia ścisłego upakowania monowarstwy adsorbentu na powierzchni materiału [214-216].

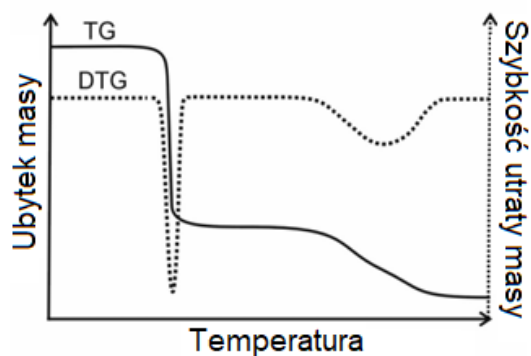
Metodę BET można stosować w dwóch wariantach: wielopunktowym (*Multi-point BET*) oraz jednopunktowym (*Single-point BET*). W wariantcie wielopunktowym konieczne jest wyznaczenie co najmniej trzech punktów pomiarowych w zakresie ciśnienia względnego, zwykle od 0,05 do 0,35, przy czym dokładny zakres powinien być dobrany w taki sposób, aby zapewnić liniowość równania BET. W przypadku, gdy dopuszczalna jest mniejsza dokładność pomiaru lub konieczne jest skrócenie czasu analizy, stosuje się wariant jednopunktowy, w którym powierzchnię właściwą wyznacza się na podstawie pojedynczego punktu pomiarowego z wybranego zakresu ciśnienia względnego. Metoda wielopunktowa BET charakteryzuje się większą dokładnością oraz większą odpornością na błędy wynikające z niedostatecznego dopasowania modelu do danych eksperymentalnych. Wykorzystanie wielu punktów pomiarowych pozwala na dokładniejsze odwzorowanie przebiegu izotermy adsorpcji, a tym samym zwiększa wiarygodność wyznaczanych parametrów [163,217–218].

III.5.5. Stabilność termiczna adsorbentów

Stabilność termiczna adsorbentów stosowanych w chromatografii cieczowej jest istotnym czynnikiem determinującym trwałość oraz przydatność faz stacjonarnych. Adsorbenty powinny zachowywać swoje właściwości fizykochemiczne w warunkach podwyższonej temperatury, zarówno podczas syntezy i modyfikacji, jak i w trakcie eksploatacji kolumn chromatograficznych. Pod wpływem ogrzewania mogą zachodzić procesy prowadzące do zmian struktury porowatej oraz ubytku grup funkcyjnych, co może skutkować zmianą parametrów retencji i pogorszeniem efektywności rozdzielania. Stabilność termiczna jest zatem bezpośrednio związana z trwałością fazy stacjonarnej, żywotnością kolumny chromatograficznej oraz powtarzalnością wyników chromatograficznych [219–221].

Do teoretycznego opisu stabilności termicznej adsorbentów niezbędne jest uwzględnienie procesów zachodzących w materiale wraz ze wzrostem temperatury. W niższych temperaturach dochodzi zwykle do usuwania fizycznie zaadsorbowanej wody

oraz rozpuszczalników pozostałych po procesie syntezy. W wyższych temperaturach obserwuje się zmiany chemiczne, takie jak rozpad grup organicznych związanych z powierzchnią adsorbentu, dehydroksylację grup silanolowych, a w skrajnych przypadkach również degradację struktury nośnika. Temperatura, przy której rozpoczynają się nieodwracalne zmiany strukturalne, określana jest jako temperatura początku rozkładu i stanowi jeden z podstawowych wskaźników stabilności termicznej materiału [222]. Ocena stabilności termicznej adsorbentów jest możliwa dzięki zastosowaniu metod analizy termicznej, spośród których wyróżnia się termograwimetrię (TG) oraz jej pochodną różnicową termograwimetrię (DTG). Metoda TG polega na ciągłym rejestrowaniu zmian masy próbki w funkcji temperatury podczas kontrolowanego ogrzewania. Ubytek masy związany jest z procesami zachodzącymi w materiale, takimi jak desorpcja składników lotnych czy rozkład termiczny warstw organicznych. Krzywa TG odzwierciedla więc całkowity przebieg zmian masy i pozwala określić ich intensywność oraz zakres temperaturowy występowania. Metoda DTG stanowi rozwinięcie analizy TG i polega na wyznaczeniu pierwszej pochodnej zmiany masy względem temperatury. Krzywa DTG przedstawia szybkość ubytku masy i umożliwia identyfikację poszczególnych etapów rozkładu, nawet jeśli na krzywej TG ulegają one częściowemu nałożeniu. Maksima na krzywej DTG odpowiadają temperaturom, w których procesy degradacji przebiegają z największą intensywnością. Dzięki połączeniu informacji uzyskanych z TG i DTG możliwe jest określenie mechanizmu przemian termicznych, ich etapowości oraz temperatur charakterystycznych dla poszczególnych procesów zachodzących w adsorbencie. Na rysunku 3.21 przedstawiono typowe krzywe: termograwimetryczne (TG) oraz różnicowej termograwimetrii (DTG) [222–225].



Rysunek 3.21. Typowe krzywe termograwimetryczne (TG) i różnicowej termograwimetrii (DTG)

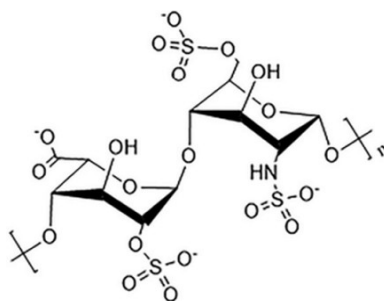
III.6. Zastosowanie chromatografii cieczowej w analizie substancji biologicznie czynnych

Metody analityczne są niezbędne na każdym etapie opracowywania i wytwarzania leków, zapewniając ich skuteczność oraz zgodność z wymaganiami regulacyjnymi. Już w fazie odkrywania nowych substancji leczniczych wykorzystuje się je do identyfikacji oraz charakterystyki potencjalnych produktów, w tym oceny ich czystości chemicznej i właściwości fizykochemicznych [226]. Chromatografia cieczowa jest jedną z najczęściej stosowanych technik w laboratoriach analitycznych i znajduje szerokie zastosowanie opisane w farmakopeach. W badaniach i rozwoju leków chromatografia cieczowa służy do rozdzielania, oznaczania ilościowego oraz oceny czystości substancji czynnych (API, ang. *Active Pharmaceutical Ingredient*), produktów pośrednich oraz zanieczyszczeń. W kontroli jakości w farmacji technika ta jest wykorzystywana do weryfikacji, czy surowce, produkt końcowy spełniają wymagania specyfikacyjne oraz czy nie zawierają zanieczyszczeń [227–228]. Przemysł farmaceutyczny szeroko stosuje wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) w celu spełnienia wymagań regulacyjnych, takich jak FDA (ang. *Food and Drug Administration*) oraz EMA (ang. *European Medicines Agency*). Technika ta odgrywa również kluczową rolę w walidacji metod analitycznych oraz opracowywaniu dokumentacji wymaganej w procesie rejestracji produktów leczniczych [227]. Najczęściej stosowaną techniką chromatografii cieczowej jest chromatografia w odwróconym układzie faz (RPLC), znajdująca zastosowanie w analizie substancji czynnych o zróżnicowanej lipofilowości. Związki jonizowalne, powszechnie występujące w farmacji, mogą być skutecznie analizowane w warunkach HILIC, często z wykorzystaniem odpowiedniej modyfikacji pH fazy ruchomej lub zastosowaniem reagentów tworzących pary jonowe. Wprowadzenie chromatografii UHPLC, wykorzystującej kolumny wypełnione ziarnami adsorbentu o średnicy poniżej 2 μm i pracującej przy wysokim ciśnieniu, umożliwiło znaczące skrócenie czasu analizy przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej sprawności i rozdzielczości chromatograficznej. [226]. Z powodzeniem badano i wdrażano różne techniki chromatograficzne wykraczające poza RPLC, np.: chromatografię wymiany jonowej, chromatografię wykluczenia, chromatografię oddziaływań hydrofobowych, chromatografię oddziaływań hydrofilowych, chromatografię cieczową w fazie odwróconej z wiązaniem jonowym, czy chromatografię powinowactwa [226–230].

W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono wyniki wstępnych badań dotyczących analizy heparyny pochodzenia zwierzęcego. Wyniki te zaprezentowano w kolejnych rozdziałach rozprawy.

III.6.1. Heparyna – charakterystyka i metody oznaczania

Heparyna (rys. 3.22) jest liniowym, heterogennym, anionowym oraz silnie usiarczanionym polisacharydem należącym do grupy glikozaminoglikanów. Składa się z powtarzających się jednostek disacharydowych, zbudowanych z reszt heksozaminy oraz kwasu uronowego. Jednostki te mogą być modyfikowane przez grupy N-acetylowe, N-sulfonowe oraz O-sulfonowe w różnych pozycjach, co prowadzi do wysokiej zmienności sekwencyjnej cząsteczki [230–233]. Heparyna, podobnie jak inne naturalne polisacharydy, charakteryzuje się znaczną heterogenicznością strukturalną obejmującą zróżnicowaną masę cząsteczkową, stopień usiarczanowania, skład jednostek cukrowych oraz ich sekwencję. Zakres tej zmienności determinowany jest zarówno przez źródło tkankowe, jak i zastosowaną metodę ekstrakcji [234]. Heparyna jest jednym z najczęściej stosowanych środków przeciwzakrzepowych w praktyce klinicznej. Wykorzystuje się ją m.in.: podczas zabiegów wewnątrznaczyniowych, hemodializy oraz w profilaktyce i leczeniu zakrzepicy. Dodatkowo heparyna wykazuje szereg efektów biologicznych, w tym działanie przeciwzapalne oraz potencjalne właściwości przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe, wynikające z jej zdolności do interakcji z cytokinami, cząsteczkami adhezyjnymi oraz komórkami układu odpornościowego [235]. W skali przemysłowej heparyna niefrakcjonowana pozyskiwana jest z błony śluzowej jelita cienkiego świń. Proces izolacji tego polisacharydu wiąże się z jednoczesnym otrzymywaniem znacznych ilości glikozaminoglikanów strukturalnie podobnych do heparyny, a także frakcji o niższej aktywności przeciwzakrzepowej [236]. Analizy strukturalne i funkcjonalne wykazały istotne różnice pomiędzy heparyną bydlęcą a świńską. Heparyna bydlęca charakteryzuje się odmienną budową, większą heterogenicznością cząsteczkową oraz niższym udziałem sekwencji pentasacharydowych odpowiedzialnych za wiązanie antytrombiny w porównaniu z heparyną świńską, która wykazuje bardziej jednorodny profil strukturalny. W konsekwencji obserwuje się różnice w aktywności biologicznej, w tym w sile działania przeciwzakrzepowego oraz powinowactwie do białek wiążących, takich jak antytrombina i protamina. Różnice te mogą wpływać na konieczność dostosowania dawek terapeutycznych w zależności od źródła heparyny, co ogranicza możliwość ich bezpośredniej zamienności w praktyce klinicznej [237-238].



Rysunek 3.22. Struktura heparyny

Chromatografia cieczowa jest obecnie jedną z najczęściej stosowanych metod oczyszczania polisacharydów ze względu na jej wysoką skuteczność. Wraz z rozwojem adsorbentów chromatograficznych oraz metod separacji technika ta znajduje zastosowanie nie tylko w rozdzielaniu polisacharydów o zróżnicowanych właściwościach, lecz także w analizie ich profili strukturalnych, często w połączeniu z detekcją spektrometrii mas. W analizie heparyny stosuje się różne techniki HPLC, przy czym szczególne znaczenie mają separacje oparte na mechanizmie wymiany jonowej oraz chromatografii w odwróconym układzie faz z zastosowaniem odczynników par jonowych. Chromatografia na silnych anionitach (SAX, ang. *Strong Anion Exchange*) wykorzystywana jest do izolacji, oczyszczania oraz mapowania oligosacharydów powstających w wyniku depolimeryzacji heparyny [239–240]. W literaturze opisano również zastosowanie techniki HILIC w połączeniu z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (Q-TOF MS, ang. *Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry*) do analizy disacharydów oraz fragmentów pochodzących z heparyny i heparyny drobnocząsteczkowej (LMWH, ang. *Low Molecular Weight Heparin*). W metodzie tej faza HILIC umożliwia skuteczne rozdzielanie silnie polarnych składników, co zwiększa jej kompatybilność z detekcją masową i pozwala na identyfikację licznych fragmentów strukturalnych heparyny. Dzięki temu możliwe jest porównanie profilu disacharydowego oraz wykrycie niewielkich różnic pomiędzy poszczególnymi próbkami heparyny [234]. Coraz częściej do analizy heparyny stosuje się techniki UHPLC, które stanowią rozwinięcie klasycznej chromatografii HPLC i umożliwiają prowadzenie analiz przy użyciu kolumn wypełnionych ziarnami adsorbentu o bardzo małej średnicy oraz przy wysokich ciśnieniach. Yang i współpracownicy [241] opracowali metodę RPIP-UPLC-MS (ang. *Reversed-Phase Ion-Pairing Ultra-Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry*), w której po enzymatycznej depolimeryzacji heparyny do fragmentów disacharydowych zastosowano chromatografię odwróconych faz z parowaniem jonowym sprzężoną ze spektrometrią mas. Metoda ta umożliwiła rozdzielanie

i identyfikację ośmiu głównych disacharydów przy zachowaniu krótkiego czasu analizy oraz wysokiej czułości detekcji. Technika okazała się szczególnie użyteczna w badaniach biologicznych, w których dostępna ilość materiału analitycznego jest ograniczona. W najnowszej literaturze Ouyang i współpracownicy [242] opisują osiągnięcia w wykorzystaniu chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS) w badaniach strukturalnych heparyny. Autorzy podkreślają, że ze względu na złożoność struktury heparyny, obejmującą różnorodne jednostki disacharydowe, zmienny stopień sulfatacji oraz obecność regionów łącznikowych, konieczne jest stosowanie technik o wysokiej rozdzielczości i czułości detekcji. Zastosowanie UHPLC w połączeniu z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (HRMS, ang. *High-Resolution Mass Spectrometry*) umożliwia dokładną identyfikację poszczególnych fragmentów heparyny oraz ocenę różnic pomiędzy partiami produkcyjnymi.

Podsumowując, chromatografia cieczowa, w tym nowoczesne techniki takie jak UHPLC i LC-MS, stanowi obecnie jedną z kluczowych metod analizy i charakterystyki heparyny, umożliwiając oznaczanie jej składników, szczegółowe badanie fragmentów oraz ocenę różnic pomiędzy partiami produkcyjnymi.

IV. CZĘŚĆ BADAWCZA

IV.1. Materiały badawcze i aparatura pomiarowa

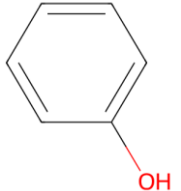
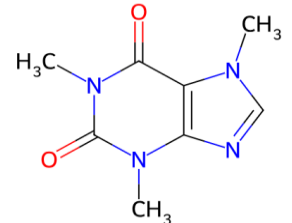
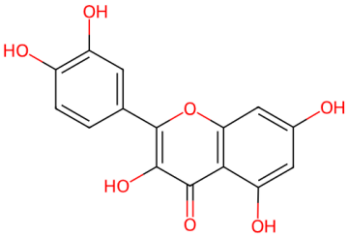
IV.1.1. Wykaz i charakterystyka analitów zastosowanych w badaniach eksperymentalnych

W badaniach eksperymentalnych zastosowano zestaw związków o zróżnicowanej budowie chemicznej, polarności i masie cząsteczkowej. Dobór analitów miał na celu próbę zrozumienia mechanizmów sorpcji w chromatografii cieczowej, a także ocenę wpływu struktury cząsteczek na charakter oddziaływań między analitem a fazą stacjonarną.

W celu analizy mechanizmu sorpcji w chromatografii cieczowej, jako związki testowe zastosowano fenol, kofeinę oraz kwercetynę. Związki te wybrano ze względu na ich zróżnicowaną strukturę oraz obecność różnych grup funkcyjnych, co czyni je użytecznymi w badaniach mechanizmów retencji. Fenol, jako prosty związek aromatyczny, zawierający pojedynczą grupę hydroksylową umożliwia analizę podstawowych oddziaływań np. oddziaływań wodorowych oraz oddziaływań typu π - π . Kofeina, charakteryzująca się bardziej złożoną strukturą i zawierająca liczne heteroatomy (azotu i tlenu), umożliwia analizę roli grup donorowych i akceptorowych w oddziaływaniach międzycząsteczkowych. Natomiast kwercetyna, jako związek polifenolowy zawierający liczne grupy hydroksylowe oraz rozbudowany układ aromatyczny, pozwala na analizę złożonych oddziaływań wynikających z obecności wielu grup funkcyjnych zdolnych do jednoczesnych interakcji, takich jak wiązania wodorowe, oddziaływania π - π oraz oddziaływania dipol-dipol.

Heparynę sodową oraz ekstrakty biologiczne pochodzenia zwierzęcego zawierające heparynę w postaci soli sodowych zastosowano jako analit modelowy w badaniach nad wykorzystaniem chromatografii cieczowej do analizy związków biologicznie czynnych. Ze względu na polianionowy charakter i dużą masę cząsteczkową heparyna umożliwia ocenę wpływu oddziaływań elektrostatycznych na mechanizm retencji. Przeprowadzone badania pozwoliły ocenić wpływ składu fazy ruchomej oraz pH na retencję, rozdzielczość i czułość oznaczenia w układach HPLC z zastosowaniem różnych kolumn chromatograficznych. Uzyskane wyniki umożliwiły optymalizację warunków separacji heparyny sodowej i mogą stanowić punkt odniesienia w analizie związków o podobnych właściwościach fizykochemicznych. W tabeli 4.1 przedstawiono charakterystykę analitów zastosowanych w badaniach eksperymentalnych.

Tabela 4.1. Charakterystyka analitów zastosowanych w badaniach eksperymentalnych [243-246]

Analit	Wzór chemiczny	Masa molowa (g/mol)	Log P	pK _a (25°C)	Polarność powierzchni (Å ²)	Donor wodoru	Akceptor wodoru	Zastosowanie w badaniach eksperymentalnych
FENOL		94,11	1,46	~9,99	20,20	1	1	Badanie wpływu różnych warunków chromatograficznych na proces sorpcji, wyznaczenie rozkładu energii adsorpcji.
KOFEINA		194,19	-0,07	14	58,40	0	6	Badanie wpływu różnych warunków chromatograficznych na proces sorpcji, wyznaczenie rozkładu energii adsorpcji.
KWERCETYNA		302,23	2,08	~6,38	127	5	7	Badanie wpływu różnych warunków chromatograficznych na proces sorpcji.
HEPARYNA SODOWA	(C ₁₂ H ₁₉ NO ₂₀ S ₃ Na) _n (jednostka powtarzalna)	17000 – 19000	< 2	-	-	liczne	liczne	Analiza rozdzielczości, wykrywalności substancji biologicznie czynnych.

IV.1.2. Odczynniki

W badaniach eksperymentalnych zastosowano następujące substancje chemiczne:

- Acetonitryl, czystość chromatograficzna ($\geq 99,9\%$), Honeywell,
- Metanol, czystość chromatograficzna ($\geq 99,9\%$), Honeywell,
- Propan-2-ol, cz.d.a., Merck,
- Octan sodu, cz.d.a., Chempur
- Kwas octowy, cz.d.a., Chempur
- Woda dejonizowana, ELKAR typ SolPure-78Z,
- Fenol, cz.d.a., Sigma - Aldrich,
- Kofeina, cz.d.a., Alfa Aesar,
- Kwercetyna, cz.d.a., Chemapol,
- Heparyna sodowa – wzorzec 1 - Toronto Research Chemicals Inc., TRC, Canada,
- Heparyna sodowa – wzorzec 2 - European Pharmacopoeia Reference Standard (heparin for physico-chemical analysis), EDQM, Council of Europe, Strasburg,
- Dwa ekstrakty pochodzenia zwierzęcego zawierające heparynę w postaci soli sodowych, otrzymane z firmy Animex Foods Polska.

IV.1.3. Kolumny chromatograficzne zastosowane w badaniach eksperymentalnych

Do oceny właściwości chromatograficznych w różnych warunkach separacji zastosowano dwie kolumny: Thermo Scientific Hypersil GOLD HILIC oraz Shodex SILICA 5NH 4D. Należy zauważyć, że obie kolumny mogą być zastosowane zarówno w chromatografii RPLC, NPLC oraz w HILIC. Do analizy wzorców heparyny sodowej oraz heparyny sodowej z ekstraktów biologicznych pochodzenia zwierzęcego zastosowano kolumnę Merck LiChroCART Purospher STAR NH₂ pracującą w układzie HPLC oraz dwie kolumny stosowane w pomiarach prowadzonych z użyciem systemu UHPLC: Thermo Scientific Hypercarb Porous Graphitic Carbon oraz Macherey-Nagel NUCLEOSIL 120-3 C18. Parametry wszystkich kolumn zestawiono w tabeli 4.2. W przypadku kolumny Hypersil GOLD HILIC producent nie podaje szczegółowej modyfikacji chemicznej wypełnienia, faza stacjonarna oparta jest na krzemionce z polarną modyfikacją przeznaczoną do chromatografii HILIC. Dodatkowo producenci nie udostępniają informacji dotyczącej powierzchni właściwej dla kolumn: Hypersil GOLD HILIC i Shodex SILICA 5NH 4D.

Tabela 4.2. Parametry kolumn chromatograficznych zastosowanych w badaniach eksperymentalnych

Nazwa kolumny chromatograficznej, producent	Faza stacjonarna	Wymiary kolumny (mm)	Średnica ziarna (μm)	Rozmiar porów ($\text{\AA}$)	Powierzchnia właściwa (m^2/g)
Hypersil GOLD HILIC, Thermo Scientific	polarna krzemionka	4,6 x 150	5	175	dane niedostępne
SILICA 5NH 4D, Shodex	krzemionka aminopropylowa	4,6 x 150	5	100	dane niedostępne
LiChroCART Purospher STAR NH_2 , Merck	krzemionka aminopropylowa	4,0 x 125	5	120	330
Hypercarb Porous Graphitic Carbon HPLC, Thermo Scientific	porowaty węgiel grafitowy	2,1 x 100	3	250	120
NUCLEOSIL 120-3 C18, Macherey-Nagel	krzemionka C18	4,0 x 100	3	120	200

IV.1.4. Adsorbenty komercyjne i niekomercyjne zastosowane w badaniach eksperymentalnych

W tabeli 4.3 przedstawiono zestawienie adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych zastosowanych w badaniach równowagi adsorpcyjnej oraz w analizie ich właściwości fizykochemicznych i granulometrycznych. Adsorbenty niekomercyjne wykorzystane w badaniach zostały opracowane i zsyntetyzowane w Katedrze Technologii i Materiałoznawstwa Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej. Adsorbenty MCM-41-Cl oraz MCM-41-Gly otrzymano w wyniku modyfikacji powierzchni mezoporowatej krzemionki typu MCM-41 odpowiednio (3-chloropropylo)trimetoksylanem oraz (3-glicydyloksypropylo)trimetoksylanem (GLYMO). Natomiast w tabeli 4.4 zestawiono fazy stacjonarne pozyskane z kolumn chromatograficznych. Wszystkie badane adsorbenty bazowały na materiałach krzemionkowych, obejmujących zarówno konwencjonalną krzemionkę chromatograficzną stosowaną jako faza stacjonarna w kolumnach HILIC i RP, jak również mezoporowate materiały krzemionkowe typu MCM-41 oraz ich modyfikacje. W przypadku adsorbentów komercyjnych podano dane techniczne udostępnione przez producentów np.: nazwę handlową, rodzaj materiału, wielkość ziaren, rozmiar porów oraz powierzchnię właściwą.

Tabela 4.3. Wykaz komercyjnych i niekomercyjnych adsorbentów zastosowanych w badaniach eksperymentalnych

Adsorbenty komercyjne			
Nazwa adsorbentu	Producent	Rodzaj adsorbentu	Wielkości ziaren (dane od producenta)
LiChrospher 4000 Si	Merck	krzemionka (SiO ₂)	10 µm
LiChrospher 60 Si	Merck	krzemionka (SiO ₂)	12 µm
Silica gel 60	Merck	krzemionka (SiO ₂)	0,015-0,040 mm
Silica gel 60 (Art. 7733)	Merck	krzemionka (SiO ₂)	0,2-0,5 mm
Adsorbenty niekomercyjne			
MCM-41	Synteza (PRz)	mezoporowata krzemionka (SiO ₂)	----
MCM-41-Cl	Synteza (PRz)	mezoporowata krzemionka (SiO ₂) modyfikowana grupami chloropropylowymi	----
MCM-41-Gly	Synteza (PRz)	mezoporowata krzemionka (SiO ₂) modyfikowana grupami glicydyłowymi	----

Tabela 4.4. Wykaz adsorbentów komercyjnych pozyskanych z kolumn chromatograficznych

Nazwa kolumny chromatograficznej, producent	Rodzaj adsorbentu	Wielkość ziarna (µm)	Rozmiar porów (Å)	Powierzchnia właściwa (m²/g)
TSK-Gel Amide-80, Tosoh Bioscience	krzemionka (SiO ₂) modyfikowana grupami amidowymi	5	80	450
Eurospher II 100-5 HILIC, Knauer	krzemionka (SiO ₂) modyfikowana grupami zwitterjonowymi	5	100	320
Nucleodur C18 Gravity, Macherey-Nagel	krzemionka (SiO ₂) modyfikowana grupami C18	5	110	338
Purospher STAR NH₂, SUPELCO™	krzemionka (SiO ₂) modyfikowana grupami aminopropylowymi	5	120	330

IV.1.5. Aparatura pomiarowa

W badaniach zastosowano zestawy aparatury umożliwiającej prowadzenie badań chromatograficznych, analiz właściwości fizykochemicznych oraz badań granulometrycznych adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych. Zastosowaną aparaturę pomiarową zestawiono w tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Aparatura pomiarowa zastosowana w badaniach eksperymentalnych

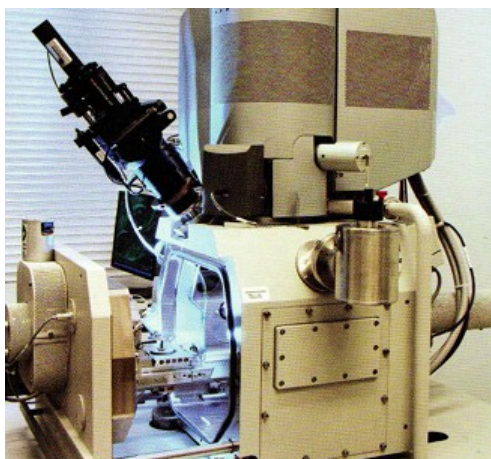
Rodzaj analizy	Nazwa aparatury	Producent	Opis
Analiza chromatograficzna	Chromatograf cieczowy Primaide	Merck – Hitachi	Chromatograf cieczowy składał się z pompy eluentu (model 1110), termostatu kolumnowego (model 1310) oraz detektora UV (model 1410). Sterowanie układem oraz rejestrację danych prowadzono z wykorzystaniem oprogramowania D-7000 HSM firmy Merck.
	Chromatograf cieczowy LaChrom	Merck – Hitachi	Chromatograf cieczowy składał się z interfejsu (D-7000), pompy (L-7100), termostatu kolumnowego (L-7360), detektora UV-DAD (L-7455) oraz degazera (L-7612).
	Chromatograf cieczowy UHPLC Ultimate 3000	Dionex	System UHPLC składał się z pompy (UltiMate 3000 RS Pump), autosamplera (UltiMate 3000 RS Autosampler), termostатовanej komory kolumny (UltiMate 3000 RS Column Compartment), detektora UV-DAD (UltiMate 3000 RS Diode Array Detector) oraz degazera.
Analiza morfologii powierzchni adsorbentów oraz lokalnego składu pierwiastkowego	Stołowy elektronowy mikroskop skaningowy Phenom-World (rys. 4.1)	Thermo Fisher Scientific	Badania prowadzono przy użyciu mikroskopu elektronowego wyposażonego w termiczne źródło elektronów (5 kV). Zakres powiększeń wynosił 525–24 000×. Obrazowanie realizowano w trybie elektronów wtórnych (SE) oraz wstecznie rozproszonych (BSE). Uzyskane obrazy zapisywano w pamięci flash.

Tabela 4.5. c.d. Aparatura pomiarowa zastosowana w badaniach eksperymentalnych

Rodzaj analizy	Nazwa aparatury	Producent	Opis
Analiza morfologii powierzchni adsorbentów oraz lokalnego składu pierwiastkowego	Mikroskop skaningowy MIRA3 SEM, wyposażony w spektrometr EDS, model X-MaxN	TESCAN (Czechy)/Oxford Instruments	Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM) wyposażony w spektrometr EDS, umożliwiający wysokorozdzielcze obrazowanie topografii powierzchni oraz analizę składu chemicznego badanych adsorbentów. Uzyskiwana rozdzielczość obrazu wynosiła $\leq 1,2$ nm przy napięciu przyspieszającym 30 kV, natomiast zakres napięcia przyspieszającego elektronów wynosił 0,1–30 kV.
Analiza ilościowa i jakościowa całkowitego składu pierwiastkowego adsorbentów	Spektrometr ICP-MS, iCAP RQ,	Thermo Scientific	Urządzenie charakteryzowało się wysoką czułością (LOD w zakresie ppb–ppt), zakresem mas (m/z) od 7 do 250 oraz dokładnością wynoszącą zazwyczaj ± 1 –5 %. Praca w trybach: standardowym, kinetically controlled (KED) oraz reaction cell, a jego działanie było sterowane oprogramowaniem Qtegra ISDS.
Analiza rozkładu wielkości ziaren adsorbentów	Analizator Mastersizer	Malvern Instruments (Wielka Brytania)	Aparatura działała w oparciu o zasadę dyfrakcji laserowej i umożliwiała analizę wielkości ziaren adsorbentów w zakresie od kilkuset nanometrów do kilku milimetrów. Była wyposażona w system optyczny o wysokiej rozdzielczości oraz oprogramowanie umożliwiające analizę i interpretację danych pomiarowych.
Analiza wielkości i objętości porów oraz powierzchni właściwej adsorbentów	NOVA 1200e Surface Area & Pore Size Analyzer	Quantachrome Instruments	Analizator umożliwiał wyznaczanie powierzchni właściwej metodą BET oraz rozkładu rozmiarów i objętości porów metodą adsorpcji/desorpcji gazów (N_2). Zakres oznaczanej powierzchni właściwej wynosił od około $0,01 \text{ m}^2/\text{g}$, natomiast zakres rozmiaru porów sięgał do około 500 nm. Urządzenie charakteryzowało się wysoką precyzją i powtarzalnością wyników (poniżej 2 %). Aparatura pracowała w warunkach próżni oraz kontrolowanego przepływu gazu.

Tabela 4.5. c.d. Aparatura pomiarowa zastosowana w badaniach eksperymentalnych

Rodzaj analizy	Nazwa aparatury	Producent	Opis
Analiza stabilności termicznej adsorbentów	Termograwimetr TG	TA Instruments	Analiza termograwimetryczna oparta na detekcji zmiany masy próbki i zmiany temperatury w funkcji zadanego przebiegu temperaturowego. Zakres pracy aparatu 25 – 900 °C.



Rysunek 4.1. Stołowy elektronowy mikroskop skaningowy Phenom-World

IV.2. Metodyka badań eksperymentalnych

IV.2.1. Badania chromatograficzne

IV.2.1.1. Wpływ temperatury na retencję substancji testowych

Badania wpływu temperatury na retencję substancji testowych (fenolu, kofeiny i kwercetyny) prowadzono w warunkach izokratycznych, przy stałym przepływie eluentu wynoszącym 1 cm³/min. Każde doświadczenie wykonywano trzykrotnie. Otrzymane wyniki charakteryzowały się dobrą powtarzalnością, dlatego do dalszej analizy przyjmowano średnie wartości współczynnika retencji. Badania prowadzono z wykorzystaniem dwóch kolumn chromatograficznych: Hypersil GOLD HILIC oraz Shodex SILICA 5NH 4D. Jako fazy ruchome stosowano mieszaniny: acetonitryl:woda (ACN:H₂O) oraz metanol:woda (MeOH:H₂O), zawierające 70, 90, 95 i 99 % (v/v) składnika organicznego. Do odgazowania faz ruchomych bezpośrednio po ich przygotowaniu stosowano łąźnię ultradźwiękową, w której proces prowadzono przez 5 minut. Wodę destylowaną, dejonizowaną i demineralizowaną przygotowywano przy użyciu dejonizatora wody SolPure-78Z (ELKAR). Stężenie badanych substancji testowych wynosiło 20 µg/cm³, a roztwory przygotowywano bezpośrednio w eluentach stosowanych w analizie, co zapewniało optymalne warunki

chromatograficzne. Temperaturę zmieniano, co 5 °C w zakresie od 20 °C do 50 °C. Objętość wprowadzanej próbki wynosiła 0,02 cm³. Przed rozpoczęciem serii eksperymentów każdą kolumnę stabilizowano poprzez jej przepłukanie fazą ruchomą w objętości odpowiadającej dwudziestokrotnej objętości kolumny, zgodnie z zaleceniami producenta. Detekcję pików chromatograficznych prowadzono przy długości fali: 250 nm dla kofeiny oraz 270 nm dla fenolu i kwercetyny, co zapewniało uzyskanie wyraźnych sygnałów detektora UV lub DAD. Na podstawie uzyskanych pików chromatograficznych analizowanych substancji testowych wyznaczano czasy retencji, definiowane jako czas odpowiadający maksimum pików. Otrzymane piki były symetryczne i zbliżone kształtem do krzywej Gaussa. Czasy retencji korygowano poprzez odjęcie tzw. czasu martwego przewodów, definiowanego jako czas przepływu fazy ruchomej przez kapilary łączące dozownik z kolumną chromatograficzną oraz kolumnę z detektorem. Czas martwy przewodów wyznaczano doświadczalnie dla stosowanej aparatury i warunków pomiarowych. Parametry chromatograficzne zastosowanych kolumn w tym eksperymencie przedstawiono w tabeli 4.6. Stosunek faz, F , został obliczony za pomocą równania opisanego w podrozdziale III.3. wzór 3.27.

Tabela 4.6. Parametry chromatograficzne zastosowanych kolumn w badaniach eksperymentalnych

Nazwa kolumny chromatograficznej	Czas retencji substancji inertej, t_0 (min)	Porowatość całkowita złoza, ϵ_t	Stosunek faz, F
Hypersil GOLD HILIC	1,729	0,694	0,441
Shodex SILICA 5NH 4D	1,795	0,720	0,388

Analiza danych termodynamicznych polegała na wyznaczeniu zmian wartości entalpii, ΔH oraz wartości entropii, ΔS , na podstawie równania van't Hoffa (podrozdział III.3. – wzór 3.26). Zastosowano metodę regresji liniowej, wykorzystując zależności $\ln k = f(1/T)$, gdzie k oznacza współczynnik retencji, a T oznacza temperaturę bezwzględną. Analiza ta umożliwiła ocenę wpływu temperatury na proces sorpcji. Dopasowanie danych eksperymentalnych do modelu van't Hoffa oceniano na podstawie wartości współczynnika determinacji R^2 , obliczanego z wykorzystaniem programu OriginPro 8.5.1. Wartość R^2 stanowiła miarę zgodności danych eksperymentalnych z modelem teoretycznym. Istotność statystyczną modelu oceniano na podstawie analizy wariancji regresji (ANOVA, ang. *Analysis of Variance*) z zastosowaniem testu Fishera (F_{test}) oraz wartości p , przyjmując

kryterium $p < 0,05$. Zastosowanie regresji liniowej oraz analizy wariancji umożliwiło ocenę stopnia dopasowania modelu teoretycznego oraz jego istotności statystycznej [247–248].

IV.2.1.2. Wpływ składu fazy ruchomej na retencję substancji testowych

Analizę wpływu modyfikatora fazy ruchomej na retencję badanych substancji testowych prowadzono w warunkach izokratycznych, przy stałym przepływie fazy ruchomej wynoszącym 1 cm³/min oraz stałej temperaturze 20 °C. Wszystkie eksperymenty wykonywano trzykrotnie. Uzyskane wyniki charakteryzowały się dobrą powtarzalnością, dlatego do dalszej analizy przyjmowano średnie wartości współczynnika retencji. Badania prowadzono z wykorzystaniem dwóch kolumn chromatograficznych: Hypersil GOLD HILIC oraz Shodex SILICA 5NH 4D. Do badań zastosowano fazy ruchome składające się z mieszanin: ACN:H₂O oraz MeOH:H₂O, w których udział składnika organicznego wynosił 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 oraz 99 % (v/v). Do odgazowania faz ruchomych bezpośrednio po ich przygotowaniu stosowano łaźnię ultradźwiękową, w której proces prowadzono przez 5 minut. Stężenie badanych substancji testowych wynosiło 20 µg/cm³, a roztwory przygotowywano bezpośrednio w eluentach stosowanych w analizie, co zapewniało optymalne warunki chromatograficzne. Objętość nastrzyku wynosiła 0,02 cm³. Przed rozpoczęciem każdej serii eksperymentów kolumny stabilizowano w sposób opisany w podrozdziale IV.2.1.1. Piki chromatograficzne rejestrowano przy długości fali: 250 nm dla kofeiny oraz 270 nm dla fenolu i kwercetyny. Na podstawie uzyskanych wyników eksperymentalnych analizowano zależność współczynnika retencji od składu fazy ruchomej, wyrażonego, jako udział objętościowy wody w fazie ruchomej, φ_{H_2O} . Wartość φ_{H_2O} odpowiadała procentowemu udziałowi objętościowemu wody w mieszaninie ACN:H₂O lub MeOH:H₂O. Uzyskane zależności umożliwiały analizę wpływu zmian składu fazy ruchomej na retencję badanych związków. Dodatkowo, w celu określenia dominującego mechanizmu retencji w analizowanych układach chromatograficznych, zastosowano teorię Snydera–Soczewińskiego, analizowano zależności $\ln k = f(\varphi_{H_2O})$ oraz $\ln k = f(\ln \varphi_{H_2O})$ (podrozdział III.2.5., [137,141]).

IV.2.1.3. Sprawność kolumn chromatograficznych

Analizę sprawności badanych kolumn chromatograficznych (Hypersil GOLD HILIC i Shodex SILICA 5NH 4D) prowadzono w oparciu o równanie van Deemtera (podrozdział III.4. – wzór 3.29) w stałej temperaturze 20 °C, przy przepływach eluentu wynoszących:

0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,40; 0,50; 0,65; 0,80; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00 oraz 3,00 cm³/min. Do badań stosowano fazy ruchome składające się z mieszanin: ACN:H₂O oraz MeOH:H₂O, w których udział składnika organicznego wynosił 70 i 95 % (v/v). Stężenie fenolu, kofeiny i kwercetyny wynosiło 20 µg/cm³, a roztwory przygotowywano bezpośrednio w eluentach stosowanych w analizie, co zapewniało optymalne warunki chromatograficzne. Objętość każdej wprowadzanej próbki wynosiła 0,02 cm³. Do odgazowania faz ruchomych bezpośrednio po ich przygotowaniu stosowano łącznie ultradźwiękową, w której proces prowadzono przez 5 minut. Wszystkie eksperymenty wykonywano trzykrotnie. Otrzymane wyniki charakteryzowały się dobrą powtarzalnością. Przed rozpoczęciem każdej serii eksperymentów kolumnę stabilizowano w sposób opisany w podrozdziale IV.2.1.1. Aby uwzględnić w pomiarach wpływ dodatkowego rozmycia pików wynikającego z przepływu fazy ruchomej przez przewody od dozownika do kolumny oraz od kolumny do detektora, wyniki korygowano poprzez uwzględnienie poszerzenia pików chromatograficznych uzyskanego bez kolumny, przy użyciu tzw. złączki. Obliczenia wykonywano z zastosowaniem metody analizy momentów, szerzej opisanej w podrozdziale III.4., przy użyciu programu ChromatographicColumn opracowanego przez prof. Krzysztofa Kaczmarek z Politechniki Rzeszowskiej. Program ten implementuje metodę analizy momentów, umożliwiając szczegółową analizę danych chromatograficznych. Metoda ta pozwala na niezależną ocenę różnych parametrów profilu pików chromatograficznych, zwłaszcza gdy nie jest on idealnie symetryczny lub gdy występują zakłócenia spowodowane nakładaniem się sygnałów.

IV.2.1.4. Równowaga adsorpcyjna

Metoda dynamiczna - analiza frontalna

Wyznaczanie izoterm adsorpcji prowadzono metodą analizy frontalnej (podrozdział III.1.5.2.) w warunkach przeciążenia kolumny próbka, w szerokim zakresie stężeń badanych substancji testowych, ograniczonym rozpuszczalnością poszczególnych związków w stosowanym eluencie. Stężenia wynosiły odpowiednio: dla fenolu – 1; 6; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 i 120 g/dm³, a dla kofeiny – 0,1; 0,5; 0,8; 1; 2; 3,5; 5; 6,75; 8,25; 10,5; 12; 13,5 i 15 g/dm³. Roztwory przygotowywano bezpośrednio w eluentach stosowanych w analizie, co zapewniało optymalne warunki chromatograficzne. Pomiarów wykonywano z wykorzystaniem kolumn chromatograficznych: Hypersil GOLD HILIC oraz Shodex SILICA 5NH 4D w stałej temperaturze 20 °C i przy przepływie fazy ruchomej wynoszącym 1 cm³/min. Jako fazy ruchome stosowano mieszaniny: ACN:H₂O i MeOH:H₂O zawierające 70 i 95 % (v/v) składnika organicznego. Do odgazowania faz ruchomych bezpośrednio po ich

przygotowaniu stosowano łąźnię ultradźwiękową, w której proces prowadzono przez 5 minut. Przed rozpoczęciem każdej serii eksperymentów kolumnę chromatograficzną stabilizowano w sposób opisany w podrozdziale IV.2.1.1. Detekcję prowadzono przy długości fali: 250 nm dla kofeiny oraz 270 nm dla fenolu. Objętość wprowadzanej do kolumny chromatograficznej próbki wynosiła 5 cm³. Wszystkie eksperymenty wykonywano trzykrotnie. Otrzymane wyniki charakteryzowały się dobrą powtarzalnością. Do badań wykorzystano wartości uśrednione (średnia arytmetyczna). Na podstawie uzyskanych krzywych wyjścia dla różnych stężeń, po przeliczeniu sygnału detektora na stężenie z wykorzystaniem krzywych kalibracyjnych (zależność sygnału detektora od stężenia), wyznaczano eksperymentalne izotermę adsorpcji dla badanych układów. Na podstawie izoterm adsorpcji sporządzano również wykresy Scatcharda, wykorzystywane do wstępnej oceny energetycznej heterogeniczności powierzchni adsorbentów. Następnie, w celu określenia rozkładu energii adsorpcji (AED), stosowano program obliczeniowy opracowany przez Stanleya i współpracowników, oparty na algorytmie EM (podrozdział III.1.5.4.). Danymi wejściowymi do obliczeń były: eksperymentalna izoterma adsorpcji, minimalna i maksymalna wartość stałej równowagi adsorpcji, określone na podstawie skrajnych stężeń analitu w analizie frontalnej oraz liczba punktów siatki energetycznej, p . Rozkłady energii adsorpcji przedstawiano jako zależność udziału pojemności adsorpcyjnej q_s od $\ln K$. Na podstawie otrzymanych izoterm, zależności Scatcharda oraz rozkładów energii adsorpcji dokonano wstępnej selekcji najbardziej adekwatnego modelu izoterm adsorpcji. Za pomocą programu OriginPro 8.5.1 przeprowadzono estymację parametrów modeli metodą minimalizacji sumy kwadratów różnic pomiędzy wartościami doświadczalnymi, a teoretycznymi, z wykorzystaniem algorytmu Levenberga–Marquardta. Porównywano dopasowanie modeli izoterm adsorpcji: liniowej, Langmuira, Tótha oraz bi-Langmuira. Jakość dopasowania oceniano przy użyciu testu Fishera (wzór 4.1), stanowiącego kryterium statystyczne umożliwiające ocenę zgodności modeli z danymi eksperymentalnymi. Dodatkowo stosowano sumę kwadratów różnic (SUM) (wzór 4.2) oraz odchylenie standardowe (SD) (wzór 4.3).

- Test Fishera (F_{test}):

$$F_{test} = \frac{[(N_0 - l) \cdot \sum (\bar{q}_{dośw} - q_{teor}(i))^2]}{[(l - 1) \cdot \sum (q_{dośw}(i) - q_{teor}(i))^2]} \quad (4.1)$$

- Suma kwadratów różnic pomiędzy danymi doświadczalnymi i teoretycznymi (SUM):

$$SUM = \sum_{i=1}^{N_0} (q_{do\acute{s}w}(i) - q_{teor}(i))^2 \quad (4.2)$$

- Odchylenie standardowe (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{SUM}{N_0 - l}} \quad (4.3)$$

gdzie: N_0 – liczba punktów doświadczalnych, $i = 1 \dots, N_0$, l – liczba estymowanych parametrów modelu, $\bar{q}_{do\acute{s}w}$ – średnia wartość doświadczalna, $q_{teor}(i)$ – wartość obliczona na podstawie modelu, $q_{do\acute{s}w}(i)$ – wartość doświadczalna [25,249].

Analizowane w niniejszej pracy modele izoterm adsorpcji porównano również w oparciu o wartości stosunku testów Fishera dla dwóch modeli. Zastosowanie wartości stosunku testu Fishera umożliwiło bezpośrednie porównanie jakości dopasowania różnych modeli, przy jednoczesnym uwzględnieniu liczby estymowanych parametrów, co było szczególnie istotne w analizie modeli o różnym stopniu złożoności. Pomiedzy dwoma modelami izoterm adsorpcji M_i i M_j , wartość stosunku testów Fishera, F_{M_i, M_j} , obliczano z zależności (wzór 4.4):

$$F_{M_i, M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}} \quad (4.4)$$

gdzie: F_{M_i} i F_{M_j} są wartościami testu Fishera odpowiednio dla modeli M_i i M_j .

Biorąc pod uwagę ryzyko α , model M_i będzie lepiej opisywał dane doświadczalne niż model M_j (będzie statystycznie lepszy), jeśli zależność 4.5 będzie spełniona [25,145].

$$F_{M_i, M_j} \geq F_{N_0-l_i, N_0-l_j, \alpha} \quad (4.5)$$

gdzie: N_0 – liczba punktów doświadczalnych, l_i i l_j – liczba estymowanych parametrów modeli M_i i M_j , $F_{N_0-l_i, N_0-l_j, \alpha}$ – wartość dostępna w tablicach statystycznych [25,145].

W niniejszej rozprawie doktorskiej założony poziom istotności (ryzyka) przyjęto $\alpha = 0,05$.

Metoda statyczna

Izotermy adsorpcji dla wybranych adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych wyznaczano metodą statyczną, szerzej opisaną w podrozdziale III.1.5.3. Przygotowywano roztwory o różnych stężeniach dla fenolu i kofeiny w układach ACN:H₂O oraz MeOH:H₂O, 95:5 (v/v). Zakres stężeń wynosił odpowiednio: dla fenolu – 1; 6; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 i 120 g/dm³, a dla kofeiny – 0,1; 0,5; 0,8; 1; 2; 3,5; 5; 6,75; 8,25; 10,5; 12; 13,5 i 15 g/dm³. Roztwory przygotowywano bezpośrednio w eluentach stosowanych w analizie, co zapewniało optymalne warunki chromatograficzne. Do kolb odważano po 0,3 g poszczególnych adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych, a następnie kontaktowano je z przygotowanymi roztworami fenolu i kofeiny (po 3 cm³) w odpowiednim zakresie stężeń. W celu zapewnienia odpowiedniej dynamiki procesu adsorpcji oraz utrzymania stałych warunków temperaturowych stosowano wytrząsarkę Orbital Shaker–Incubator ES-20/60 (Biosan). Urządzenie to, wyposażone w bezpośredni napęd platformy, umożliwił równomierny ruch w stałej temperaturze wynoszącej 25 °C. Prędkość obrotowa została ustawiona na 100 obr./min. Próbkę pobierano po dwóch godzinach wytrząsania za pomocą strzykawki z filtrem, aby oddzielić roztwór po adsorpcji od adsorbentu, następnie umieszczano go w probówkach. Stężenia badanych substancji przed i po adsorpcji oznaczano z zastosowaniem systemu HPLC pracującego w trybie *bypass*, umożliwiającym pomiar próbek z pominięciem kolumny chromatograficznej za pomocą złączki, co pozwoliło na rejestrację sygnału odpowiadającego bezpośrednio stężeniu analitu w roztworze. Wszystkie pomiary prowadzono w warunkach izokratycznych, przy natężeniu przepływu eluentu 0,5 cm³/min i w stałej temperaturze. Objętość każdej wprowadzanej próbki wynosiła 0,02 cm³. Pomiary dla fenolu wykonywano przy długości fali 270 nm, a dla kofeiny przy 250 nm. Stężenia analitów wyznaczano na podstawie pól powierzchni pików chromatograficznych z wykorzystaniem wcześniej sporządzonych krzywych wzorcowych. Następnie na podstawie otrzymanych wyników opracowywano doświadczalne izotermy adsorpcji dla badanych układów. W celu określenia rozkładu energii adsorpcji, zastosowano program obliczeniowy opracowany przez Stanleya i współpracowników, oparty na algorytmie EM (podrozdział III.1.5.4.). Stosowana procedura była analogiczna do tej w analizach prowadzonych metodą dynamiczną. Na podstawie otrzymanych izoterm, zależności Scatcharda oraz rozkładów energii adsorpcji dokonano wstępnej selekcji najbardziej adekwatnego modelu izotermy adsorpcji. Następnie, przy pomocy programu OriginPro 8.5.1, prowadzono estymację parametrów modeli metodą minimalizacji sumy kwadratów różnic między wartościami doświadczalnymi i teoretycznymi, wykorzystując algorytm

Levenberga–Marquardta. Porównywano dopasowanie modeli izoterm adsorpcji: liniowej, Langmuira, Tótha oraz bi-Langmuira. Analizę statystyczną prowadzono analogicznie jak w przypadku badań wykonywanych metodą analizy frontalnej.

IV.2.2. Funkcjonalizacja adsorbentów niekomercyjnych

Adsorbenty niekomercyjne MCM-41, MCM-41-Cl oraz MCM-41-Gly zostały opracowane i zsyntetyzowane w Katedrze Technologii i Materiałoznawstwa Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej. Adsorbent MCM-41 stanowił materiał wyjściowy do otrzymania adsorbentów MCM-41-Cl oraz MCM-41-Gly. Adsorbent MCM-41-Cl został otrzymany poprzez funkcjonalizację powierzchni mezoporowatej krzemionki MCM-41 z zastosowaniem (3-chloropropyl)trimetoksylanu. Proces modyfikacji prowadzono w środowisku bezwodnego toluenu, w atmosferze argonu, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 24 h, przy ciągłym mieszaniu. Po zakończeniu reakcji adsorbent oczyszczano z nadmiaru modyfikatora i produktów ubocznych przez wielokrotne przemywanie odpowiednimi rozpuszczalnikami (toluenem, dichlorometanem, heksanem), a następnie suszono do stałej masy. W wyniku procesu na powierzchni krzemionki wprowadzone zostały grupy chloropropylowe. Adsorbent MCM-41-Gly otrzymano analogicznie poprzez funkcjonalizację powierzchni krzemionki MCM-41 (3-glicydyloksypropyl)trimetoksylanem (GLYMO), prowadzącą do wprowadzenia grup glicydydowych na powierzchni adsorbentu.

IV.2.3. Charakterystyka fizykochemiczna oraz granulometryczna adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych

IV.2.3.1. Morfologia ziaren i skład pierwiastkowy powierzchni adsorbentów – metoda SEM-EDS

Badania mikroanalizy powierzchni adsorbentów prowadzono w laboratoriach Politechniki Rzeszowskiej w Stalowej Woli (Wydział Mechaniczno-Technologiczny) stosując mikroskop elektronowy TESCAN MIRA3, wyposażony w spektrometr EDS firmy Oxford Instruments, model X-MaxN. Analizy mikroskopowe prowadzono przy zastosowaniu napięcia przyspieszającego 20 keV, odległości roboczej 15 mm oraz montażu próbek na aluminiowych pinach z taśmą węglową, jako materiałem przewodzącym. Do obrazowania powierzchni adsorbentu stosowano detektor elektronów wstecznie rozproszonych (BSE), natomiast do określenia składu pierwiastkowego wykonano mapowanie EDS z czasem akwizycji 30 minut, po dziesięć indywidualnych widm dla każdej próbki (czas zbierania sygnału 180 s). Dodatkowo analizę morfologii powierzchni adsorbentów metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) prowadzono w Laboratorium Analitycznym Uniwersytetu

Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie z wykorzystaniem stołowego elektronowego mikroskopu skaningowego Phenom-World.

Zastosowanie skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) wraz z analizą EDS umożliwiło szczegółową ocenę morfologii badanych adsorbentów, kształtu ziaren, obecności pęknięć oraz innych mikrodefektów, a także identyfikację pierwiastków chemicznych obecnych na powierzchni adsorbentów.

IV.2.3.2. Całkowity skład pierwiastkowy adsorbentów (ilościowy i jakościowy) – metoda ICP-MS

Analizę ilościową i jakościową składu pierwiastkowego badanych adsorbentów prowadzono w Instytucie Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Do pomiarów stosowano spektrometr ICP-MS iCAP RQ (Thermo Scientific). Badania umożliwiły określenie obecności oraz zawartości poszczególnych pierwiastków w badanych adsorbentach, wyrażonej w ppm. Szczegółowa procedura pomiarowa wykonana została zgodnie z wewnętrznymi protokołami laboratorium, a wyniki zostały udostępnione na potrzeby niniejszej rozprawy doktorskiej.

IV.2.3.3. Rozkład wielkości ziaren adsorbentów

Analizę rozkładu wielkości ziaren adsorbentów wykonano za pomocą metody dyfrakcji laserowej, umożliwiającej pomiar ziaren w zakresie mikrometrycznym i nanometrycznym. Do określenia rozkładu wielkości ziaren badanych adsorbentów stosowano analizator Mastersizer firmy Malvern Instruments (Malvern, Wielka Brytania), który wykorzystuje dyfrakcję laserową. Pomiary prowadzono w trybie dyspersji ciekłej („na mokro”): proszek zawieszano w odgazowanej wodzie dejonizowanej, pełniącej funkcję ośrodka dyspergującego. Przebieg analizy obejmował kilka etapów. Najpierw przepłukiwano i przygotowywano celę pomiarową, po czym uruchamiano moduł optyczny wraz z jednostką dyspersyjną. Następnie włączano pompę perystaltyczną, która kierowała dyspergant do układu pomiarowego. Po dokładnym wyosiiowaniu elementów optycznych rejestrowano sygnał tła, czyli rozproszenie wiązki laserowej przez czystą ciecz. Następnie do zawiesiny wprowadzano odważoną porcję adsorbentu tak, by poziom przysłonięcia wiązki lasera mieścił się w zakresie 10–20 %. Gdy wartość ta była ustabilizowana, rozpoczynano właściwy pomiar. W trakcie pomiaru zawiesinę intensywnie mieszano i poddawano działaniu ultradźwięków, co ograniczało powstawanie aglomeratów. Wyznaczano parametr *span* opisujący szerokość rozkładu wielkości ziaren, zdefiniowany równaniem 4.6 [48].

$$span = \frac{d_{90 \%} - d_{10 \%}}{d_{50 \%}}$$

gdzie: $d_{90 \%}$ – średnica ziarna poniżej której znajduje się 90 % objętości próbki, $d_{50 \%}$ – średnica ziarna poniżej której znajduje się 50 % objętości próbki, $d_{10 \%}$ – średnica ziarna poniżej której znajduje się 10 % objętości próbki [48].

IV.2.3.4. Badanie wielkości i objętości porów oraz powierzchni właściwej adsorbentów

Analizę wielkości i objętości porów oraz powierzchni właściwej adsorbentów prowadzono w laboratoriach Politechniki Rzeszowskiej w Stalowej Woli (Wydział Mechaniczno-Technologiczny) z wykorzystaniem analizatora NOVA 1200e Surface Area & Pore Size Analyzer (Quantachrome Instruments). Próbki w postaci proszku przed analizą odgazowywano w warunkach próżniowych przez 2 h w temperaturze 250 °C. Powierzchnię właściwą adsorbentów wyznaczano wielopunktową metodą BET na podstawie izoterm adsorpcji–desorpcji azotu. Analizę wielkości i objętości porów prowadzono z wykorzystaniem metod BJH, DH, HK, SF oraz DFT, umożliwiających charakterystykę struktury porowatej adsorbentów w zakresie mikro- i mezoporowatości.

IV.2.3.5. Badanie stabilności termicznej adsorbentów

Analizę stabilności termicznej adsorbentów prowadzono w Instytucie Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach z zastosowaniem analizy termogravimetrycznej (TG-DTG) przy użyciu termogravimetru TA Instruments. Badania umożliwiły ocenę zmian masy badanych adsorbentów w funkcji temperatury oraz określenie temperatur, w których zachodziły procesy związane z utratą masy. Na podstawie uzyskanych krzywych TG i DTG oceniono stabilność termiczną analizowanych materiałów.

IV.2.4. Oznaczanie heparyny sodowej

W celu opracowania i wstępnej oceny metody oznaczania heparyny w ekstraktach pochodzenia zwierzęcego porównano właściwości separacyjne różnych kolumn chromatograficznych. Analizie poddano kolumny wykorzystujące odmienne mechanizmy retencji: z fazą polarną aminopropylową (Merck LiChroCART Purospher STAR NH₂), z porowatym grafitowym węglem (Thermo Scientific Hypercarb Porous Graphitic Carbon HPLC) oraz z fazą niepolarną C18 (Macherey-Nagel NUCLEOSIL 120-3 C18). Do badań zastosowano dwa wzorce heparyny sodowej oraz dwa oddzielnie wyprodukowane ekstrakty

pochodzenia zwierzęcego w postaci soli sodowych zawierające heparynę sodową (pozyskane ze śluzu jelita cienkiego świń), dostarczone przez firmę Animex Foods Polska. Jako fazy ruchome zastosowano mieszaniny: ACN:H₂O 90:10 (v/v) oraz ACN:bufor octanowy 90:10 (v/v) o pH = 5. Do odgazowania faz ruchomych bezpośrednio po ich przygotowaniu stosowano łaźnię ultradźwiękową, w której proces prowadzono przez 5 minut. Wszystkie pomiary prowadzono w warunkach izokratycznych przy przepływie eluentu 1 cm³/min oraz w stałej temperaturze wynoszącej 20 °C. Objętość wprowadzanych próbek wynosiła 0,02 cm³, a ich stężenie 20 µg/cm³. Roztwory przygotowywano bezpośrednio w eluentach stosowanych w analizie, co zapewniało optymalne warunki chromatograficzne. Przed rozpoczęciem każdej serii eksperymentów kolumnę stabilizowano w sposób opisany w podrozdziale IV.2.1.1. Piki chromatograficzne rejestrowano przy długości fali 202 nm (zalecanej przez Farmakopeę Europejską [250]). Każdy eksperyment wykonywano trzykrotnie dla danego składu fazy ruchomej oraz zastosowanej kolumny chromatograficznej, uzyskując powtarzalne wyniki pomiarów. Założeniem badań było potwierdzenie możliwości uzyskania dobrej jakości rozdzielania, przy jednoczesnym uproszczeniu procedury analitycznej oraz skróceniu czasu trwania analizy. Istotnym aspektem było również określenie, czy zastosowane techniki takie jak np. UHPLC umożliwiają dalsze skrócenie czasu oznaczenia w stosunku do metod opisanych w literaturze oraz w Farmakopei Europejskiej, z zachowaniem odpowiednich parametrów selektywności i czułości. Badania miały na celu również ocenę przydatności opracowanej metody do rutynowej, szybkiej kontroli zawartości heparyny w przedsiębiorstwach zajmujących się jej produkcją.

V. DYSKUSJA WYNIKÓW

V.1. Badania chromatograficzne

V.1.1. Analiza wpływu temperatury na proces retencji

V.1.1.1. Kolumna *Hypersil GOLD HILIC*

W niniejszej pracy zbadano wpływ temperatury na retencję fenolu, kofeiny i kwercetyny, analizując termodynamiczne aspekty procesu retencji za pomocą równania van't Hoffa. Badania przeprowadzono z zastosowaniem kolumny *Hypersil GOLD HILIC*, zgodnie z metodyką opisaną w podrozdziale IV.2.1.1.

W tabeli 5.1 przedstawiono wyznaczone wartości zmian entalpii i entropii dla substancji testowych w badanych układach. Dla fenolu (rys. 5.1) w układach zawierających acetonitryl wraz ze wzrostem udziału rozpuszczalnika organicznego zaobserwowano zmianę charakteru procesu retencji. Dla eluentu zawierającego 70:30 (v/v) ACN:H₂O zmiana entalpii, ΔH , przyjmuje wartość dodatnią, co wskazuje na endotermiczny charakter procesu retencji. Oznacza to, że wraz ze wzrostem temperatury zwiększa się retencja analitu, co może świadczyć o wzroście jego powinowactwa do fazy stacjonarnej. Wartość ΔS przyjmuje również wartość dodatnią co świadczy o wzroście nieuporządkowania układu podczas procesu retencji. Przy wyższych udziałach acetonitrylu w eluencie (90:10, 95:5, 99:1 v/v), ΔH przyjmuje natomiast wartości ujemne, charakterystyczne dla procesów egzotermicznych. W takich warunkach wzrost temperatury prowadzi do osłabienia oddziaływań analit-adsorbent, a w konsekwencji do skrócenia czasu retencji. Najsilniejszy efekt egzotermiczny zaobserwowano dla fazy ruchomej o składzie 99:1 (v/v) ACN:H₂O, gdzie ΔH przyjmuje najbardziej ujemną wartość (-11,28 kJ/mol). Wartość ΔS w tym układzie jest również najbardziej ujemna (-42,74 J/mol·K), co wskazuje na znaczny spadek stopnia swobody i wzrost uporządkowania układu podczas procesu retencji fenolu. Zależności van't Hoffa dla fenolu w układach zawierających ACN wykazują charakter liniowy, co potwierdza stabilność mechanizmu retencji w badanym zakresie temperatur. Świadczą o tym wysokie wartości współczynnika determinacji ($R^2 > 0,9$, tab. 5.2). Różnice między badanymi układami dotyczą jedynie nachylenia prostych, dla najmniejszego i największego udziału ACN obserwuje się większe nachylenie linii, co wskazuje na silniejszy wpływ temperatury na retencję fenolu. W fazach ruchomych zawierających MeOH retencja fenolu wykazuje wyraźnie egzotermiczny charakter dla wszystkich badanych układów ($\Delta H < 0$), a zmiana entropii przyjmuje wartości ujemne. Największą wartość bezwzględną zmiany entalpii zaobserwowano dla układu 95:5 (v/v) MeOH:H₂O, co wskazuje na najsilniejsze

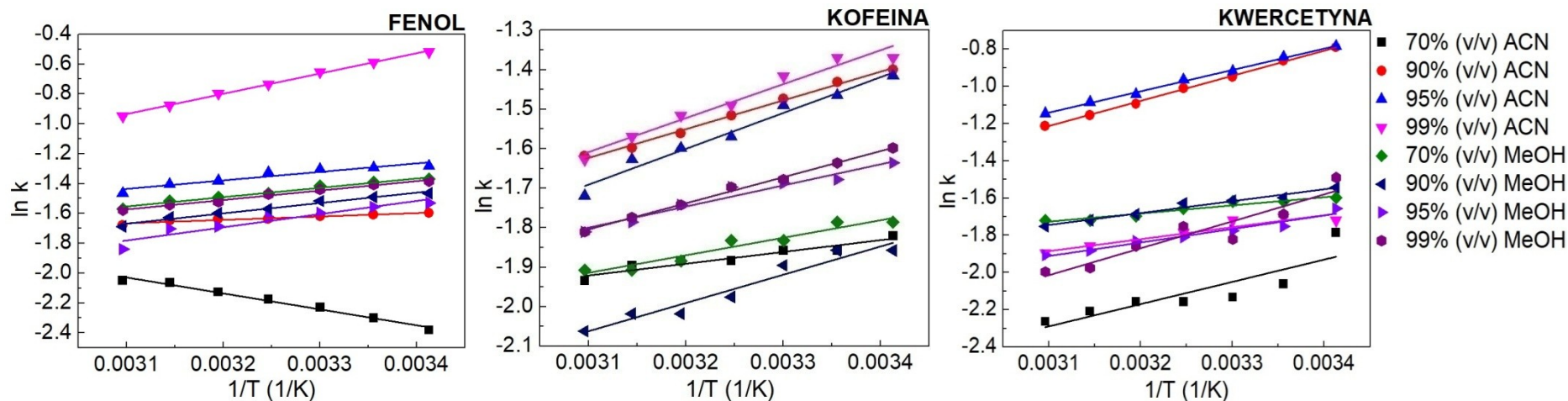
oddziaływania fenolu z fazą stacjonarną, które ulegają osłabieniu wraz ze wzrostem temperatury. Ujemne wartości ΔS wskazują na zmniejszenie stopnia swobody cząsteczek fenolu podczas procesu retencji, co wiąże się ze wzrostem uporządkowania układu. Wszystkie zależności $\ln k$ w funkcji $1/T$ dla układów zawierających metanol mają charakter liniowy, co sugeruje niezmienny mechanizm retencji w badanym zakresie temperatur. Potwierdzają to wysokie wartości współczynnika determinacji ($R^2 \geq 0,9$) (tab. 5.2).

Dla kofeiny (rys. 5.1) wszystkie zmiany wartości ΔH (tab. 5.1), niezależnie od zastosowanego układu, przyjmują wartości ujemne, co świadczy o egzotermicznym charakterze procesu retencji. W układach zawierających acetonitryl wraz ze wzrostem udziału rozpuszczalnika organicznego obserwuje się zwiększenie bezwzględnej wartości ΔH : dla układu 70:30 (v/v) ACN:H₂O wynosi ona $-2,48$ kJ/mol, natomiast dla 95:5 (v/v) ACN:H₂O $-7,54$ kJ/mol, co wskazuje na bardziej egzotermiczny charakter procesu retencji przy wyższej zawartości acetonitrylu. Wszystkie zmiany wartości ΔS są ujemne, co oznacza zmniejszenie stopnia swobody układu. W fazach ruchomych zawierających metanol zaobserwowano podobny trend, jednak w nieco mniejszym zakresie, wartości ΔH zmieniają się od $-3,69$ kJ/mol (dla 70:30 (v/v) ACN:H₂O) do $-5,49$ kJ/mol (dla 99:1 (v/v) ACN:H₂O). Zależności van't Hoffa dla kofeiny nie wykazały odchyleń od liniowości, które mogłyby sugerować zmianę mechanizmu retencji lub występowanie dodatkowych procesów wpływających na retencję. Potwierdzają to wysokie wartości współczynnika determinacji ($R^2 \geq 0,9$) (tab. 5.2).

Dla kwercetyny (rys. 5.1) we wszystkich badanych układach zawierających acetonitryl lub metanol wartości ΔH i ΔS (tab. 5.1) są ujemne, co wskazuje na egzotermiczny charakter retencji oraz wzrost uporządkowania układu podczas procesu retencji. Wartości ΔH sugerują, że najsilniejsze oddziaływania kwercetyny z fazą stacjonarną występują w układach 90:10 (v/v) ACN:H₂O oraz 99:1 (v/v) MeOH:H₂O. Szczególnie dla układu 99:1 (v/v) MeOH:H₂O odnotowano wartości $\Delta H = -12,03$ kJ/mol oraz $\Delta S = -54,05$ J/mol·K, co wskazuje na silnie egzotermiczny charakter procesu retencji oraz znaczny wzrost uporządkowania układu podczas retencji kwercetyny. Uzyskane wartości parametrów termodynamicznych świadczą również o istotnym wpływie temperatury na przebieg procesu retencji. Wyraźną nieliniowość zależności van't Hoffa zaobserwowano w układzie 70:30 (v/v) ACN:H₂O (rys. 5.1, tab. 5.2), dla którego wartość współczynnika determinacji (R^2) wynosi 0,72. Nieliniowość ta może wynikać z wysokiej zawartości wody w eluencie, wpływającej na proces solwatacji kwercetyny oraz sposób oddziaływania jej grup polarnych z powierzchnią fazy stacjonarnej. Sugeruje to współwystępowanie różnych rodzajów

oddziaływań w analizowanym zakresie temperatur, w tym oddziaływań dipol-dipol, wiązań wodorowych. Niewielkie odchylenia od liniowości zaobserwowano również w układach 99:1 (v/v) ACN:H₂O ($R^2 = 0,89$) oraz 99:1 (v/v) MeOH:H₂O ($R^2 = 0,87$), co może być związane ze zmianą stopnia solwatacji kwercetyny w warunkach bardzo niskiej zawartości wody oraz modyfikacją oddziaływań między analitem a fazą stacjonarną.

Wartości p -value $< 0,05$ (tab. 5.2) dla wszystkich badanych układów wskazują, że wpływ temperatury na retencję jest istotny statystycznie. Wysokie wartości statystyki testu Fishera potwierdzają istotność modelu regresji zastosowanego do opisu zależności van't Hoffa.



Rysunek 5.1. Zależności van't Hoffa dla substancji testowych w kolumnie Hypersil GOLD HILIC w różnych składach eluentów

Tabela 5.1. Wartości zmian entalpii i entropii badanych substancji testowych w kolumnie Hypersil GOLD HILIC w różnych składach eluentów

Rodzaj i skład eluentu	FENOL		KOFEINA		KWERCETYNA	
ACN:H ₂ O (v/v)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol·K)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol·K)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol·K)
70:30	8,87	10,64	-2,48	-23,66	-9,94	-49,86
90:10	-1,88	-19,69	-6,05	-32,25	-11,21	-44,85
95:5	-4,72	-26,58	-7,54	-37,44	-9,52	-39,00
99:1	-11,28	-42,74	-7,14	-35,51	-5,35	-32,25
MeOH:H ₂ O (v/v)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol·K)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol·K)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol·K)
70:30	-5,18	-28,96	-3,69	-27,34	-3,62	-25,59
90:10	-5,75	-31,70	-5,95	-35,58	-5,32	-30,98
95:5	-7,34	-37,58	-4,45	-28,75	-6,04	-34,62
99:1	-5,25	-29,34	-5,49	-32,03	-12,03	-54,05

Tabela 5.2. Wyniki analizy regresji (ANOVA) oraz wartości współczynnika determinacji (R^2) dla zależności van't Hoffa wyznaczonych dla kolumny Hypersil GOLD HILIC

Rodzaj i skład eluentu	FENOL				KOFEINA				KWERCETYNA			
ACN:H ₂ O (v/v)	R ²	F_{test}	p -value	Istotność	R ²	F_{test}	p -value	Istotność	R ²	F_{test}	p -value	Istotność
70:30	0,98	304,00	1,14E-05	TAK	0,90	53,70	7,41E-04	TAK	0,72	16,60	9,62E-03	TAK
90:10	0,92	67,80	4,31E-04	TAK	0,99	840,50	9,15E-07	TAK	0,99	3598,50	2,44E-08	TAK
95:5	0,91	51,50	8,19E-04	TAK	0,97	175,00	4,41E-05	TAK	0,99	1647,50	1,71E-07	TAK
99:1	1,00	2187,80	8,44E-08	TAK	0,96	137,70	7,91E-05	TAK	0,89	50,00	8,75E-04	TAK
MeOH:H ₂ O (v/v)	R ²	F_{test}	p -value	Istotność	R ²	F_{test}	p -value	Istotność	R ²	F_{test}	p -value	Istotność
70:30	0,98	251,60	1,81E-05	TAK	0,92	73,50	3,56E-04	TAK	0,93	80,90	2,84E-04	TAK
90:10	0,98	242,80	1,98E-05	TAK	0,93	81,80	2,76E-04	TAK	0,97	173,30	4,51E-05	TAK
95:5	0,90	52,90	7,68E-04	TAK	0,94	103,40	1,58E-04	TAK	0,95	119,10	1,12E-4	TAK
99:1	0,99	480,70	3,66E-06	TAK	0,99	1064,90	5,08E-07	TAK	0,87	40,00	1,45E-03	TAK

V.1.1.2. Kolumna Shodex SILICA 5NH 4D

Wyniki analizy wpływu temperatury na retencję fenolu, kofeiny i kwercetyny przedstawiono na rysunku 5.2 i w tabelach 5.3 i 5.4. Badania przeprowadzono według metodologii opisanej w podrozdziale IV.2.1.1.

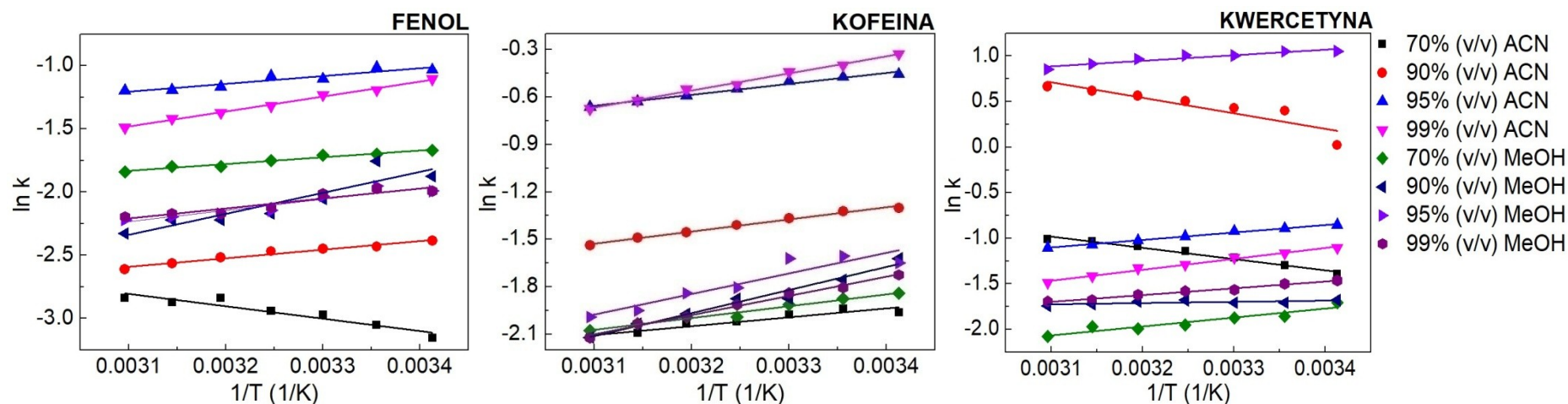
Dla fenolu w układzie 70:30 (v/v) ACN:H₂O zaobserwowano dodatnią wartość ΔH wynoszącą 8,15 kJ/mol, a także dodatnią wartość ΔS wynoszącą 1,93 J/mol·K co wskazuje na endotermiczny charakter procesu oraz wzrost stopnia nieuporządkowania układu podczas retencji. Wraz ze wzrostem udziału acetonitrylu w eluencie wartości ΔH stają się ujemne, co świadczy o zmianie charakteru termodynamicznego procesu retencji na egzotermiczny. Najbardziej wyraźny efekt obserwuje się dla układu 99:1 (v/v) ACN:H₂O ($\Delta H = -9,83$ kJ/mol; $\Delta S = -42,79$ J/mol·K). Zależności van't Hoffa dla układów 70:30 i 95:5 (v/v) ACN:H₂O wykazują niewielkie odchylenia od liniowości (odpowiednio $R^2 = 0,88$ i $R^2 = 0,86$; tab. 5.4), co może wynikać z niewielkich zmian w oddziaływaniach solwacyjnych fenolu oraz jego oddziaływaniach z fazą stacjonarną zachodzących wraz ze zmianą temperatury. Może to prowadzić do niewielkich zmian charakteru procesu retencji. Natomiast dla układów 90:10 i 99:1 (v/v) ACN:H₂O zależności mają charakter liniowy ($R^2 > 0,9$), co sugeruje niezmienny mechanizm retencji w badanym zakresie temperatur. W układach zawierających metanol dla fenolu wszystkie wartości ΔH oraz ΔS są ujemne, co świadczy o egzotermicznym charakterze procesu retencji i wzroście uporządkowania układu podczas przechodzenia analitu do fazy stacjonarnej. Najbardziej wyraźny efekt termodynamiczny zaobserwowano dla eluentu o składzie 90:10 (v/v) MeOH:H₂O, gdzie ΔH wynosiło $-13,80$ kJ/mol, a ΔS wynosi $-62,22$ J/mol·K. Zależność van't Hoffa dla układu 70:30 (v/v) MeOH:H₂O jest wyraźnie liniowa ($R^2 = 0,96$), natomiast dla układów 90:10, 95:5 i 99:1 (v/v) MeOH:H₂O obserwuje się niewielkie odchylenia od liniowości (odpowiednio $R^2 = 0,81$, $R^2 = 0,87$ i $R^2 = 0,87$; tab. 5.4), co może wskazywać na większy udział różnych rodzajów oddziaływań w procesie retencji. Obserwowane zmiany charakteru retencji mogą być również związane z właściwościami powierzchni fazy stacjonarnej. W przypadku kolumny aminopropylowej obecność polarnych grup funkcyjnych umożliwia udział różnych rodzajów oddziaływań, takich jak wiązania wodorowe, oddziaływania dipolowe oraz elektrostatyczne. W konsekwencji wpływ temperatury na retencję może być bardziej złożony niż w przypadku faz niepolarnych, a zmiany wartości ΔH i ΔS mogą odzwierciedlać konkurencję pomiędzy różnymi mechanizmami oddziaływań.

Dla kofeiny zmiany wartości ΔH w układach zawierających acetonitryl i metanol są ujemne, co wskazuje na egzotermiczny charakter procesu retencji. Odpowiadające im

wartości ΔS także są ujemne, co świadczy o ograniczeniu stopnia swobody cząsteczek kofeiny. Najbardziej wyraźny efekt egzotermiczny zaobserwowano dla eluentu zawierającego 99:1 (v/v) ACN:H₂O, zarówno ΔH (-8,97 kJ/mol), jak i ΔS (-33,36 J/mol·K), osiągają największe wartości. Dla układów MeOH:H₂O największy efekt termodynamiczny obserwuje się dla mieszaniny 90:10 (v/v), gdzie ΔH wynosi -12,13 kJ/mol, a ΔS wynosi -55,18 J/mol·K. Tak duże ujemne wartości wskazują na silne oddziaływania kofeiny z fazą stacjonarną oraz istotną zależność retencji od temperatury. Analiza zależności van't Hoffa wskazuje ponadto, że w układach 70:30 (v/v) ACN:H₂O oraz 95:5 (v/v) MeOH:H₂O widoczne są niewielkie odchylenia od liniowości (odpowiednio $R^2 = 0,89$ i $R^2 = 0,85$; tab. 5.4). W pozostałych układach obserwowana jest liniowość zależności van't Hoffa ($R^2 > 0,9$).

Dla kwercetyny w układach zawierających acetonitryl wartości parametrów termodynamicznych wyraźnie zmieniają się wraz ze składem fazy ruchomej. W układach 70:30 oraz 90:10 (v/v) ACN:H₂O wartości ΔH i ΔS są dodatnie. Natomiast w układach 95:5 i 99:1 (v/v) ACN:H₂O proces przyjmuje charakter egzotermiczny ($\Delta H < 0$), a ujemne wartości ΔS wskazują na ograniczenie swobody ruchu cząsteczek kwercetyny. Zależność van't Hoffa dla układu 90:10 (v/v) ACN:H₂O wykazuje wyraźną nieliniowość ($R^2 = 0,79$, tab. 5.4). Może to wskazywać na bardziej złożony charakter procesu retencji w tym układzie. W pozostałych badanych układach zawierających acetonitryl zależności mają charakter liniowy ($R^2 \geq 0,9$), co sugeruje stabilny mechanizm retencji w analizowanym zakresie temperatur. W układach MeOH:H₂O wartości ΔH i ΔS są we wszystkich przypadkach ujemne. Najsilniejszy efekt termodynamiczny zaobserwowano dla mieszaniny 70:30 (v/v) MeOH:H₂O, dla której ΔH wynosi -8,17 kJ/mol, a ΔS wynosi -42,50 J/mol·K. Analiza zależności van't Hoffa wskazuje, że jedynie układ 99:1 (v/v) MeOH:H₂O wykazuje liniowy charakter ($R^2 = 0,98$), natomiast dla eluentów 70:30 oraz 95:5 (v/v) MeOH:H₂O obserwuje się niewielkie odchylenia od liniowości. Najsilniejszą nieliniowość zaobserwowano dla układu 90:10 (v/v) MeOH:H₂O ($R^2 = 0,33$), co wskazuje na zmianę równowagi pomiędzy różnymi rodzajami oddziaływań zachodzących wraz ze zmianą temperatury. Zjawisko to może wynikać ze struktury cząsteczki kwercetyny, która jako związek wielofunkcyjny zawierający liczne grupy hydroksylowe wykazuje wysoką zdolność do tworzenia wiązań wodorowych. Sprzyja to powstawaniu złożonego układu oddziaływań z fazą aminopropylową, obejmującego m.in.: wiązania wodorowe, oddziaływania dipolowe oraz mechanizmy charakterystyczne dla chromatografii HILIC.

Analiza statystyczna (tab. 5.4) wykazała, że niskie wartości p -value ($p < 0,05$) wskazują na istotny statystycznie wpływ temperatury na współczynnik retencji, co potwierdza, że obserwowane zmiany nie wynikają z losowej zmienności danych. Wysokie wartości statystyki testu Fishera świadczą o istotności modelu regresji van't Hoffa i jego adekwatności w opisie danych eksperymentalnych większości badanych układów, co pozwala uznać wyznaczone parametry termodynamiczne za wiarygodne. Wyjątek stanowi kwercetyna w układzie 90:10 (v/v) MeOH:H₂O, dla której uzyskano niski współczynnik determinacji ($R^2 = 0,33$), wskazujący na brak liniowej zależności. W tym przypadku istotność modelu regresji była ograniczona ($p = 0,11$), co potwierdza, że równanie van't Hoffa nie opisuje w sposób zadowalający zmian retencji w funkcji temperatury. Może to wskazywać na bardziej złożony charakter oddziaływań zachodzących w tym układzie chromatograficznym.



Rysunek 5.2. Zależności van't Hoffa dla substancji testowych w kolumnie Shodex SILICA 5NH 4D w różnych składach eluentów

Tabela 5.3. Wartości zmian entalpii i entropii badanych substancji testowych w kolumnie Shodex SILICA 5NH 4D w różnych składach eluentów

Rodzaj i skład eluentu	FENOL		KOFEINA		KWERCETYNA	
ACN:H ₂ O (v/v)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol·K)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol·K)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol·K)
70:30	8,15	1,93	-4,68	-32,00	10,26	23,64
90:10	-5,64	-39,02	-6,38	-32,48	14,16	49,83
95:5	-5,13	-25,93	-5,75	-23,28	-6,81	-30,27
99:1	-9,83	-42,79	-8,97	-33,36	-9,97	-43,11
MeOH:H ₂ O (v/v)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol·K)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol·K)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol·K)
70:30	-4,45	-29,03	-6,20	-36,45	-8,17	-42,50
90:10	-13,80	-62,22	-12,13	-55,18	-1,11	-17,78
95:5	-7,36	-41,37	-10,82	-49,98	-5,07	-8,35
99:1	-6,54	-38,65	-10,10	-48,78	-6,17	-33,25

Tabela 5.4. Wyniki analizy regresji (ANOVA) oraz wartości współczynnika determinacji (R^2) dla zależności van't Hoffa wyznaczonych dla kolumny Shodex SILICA 5NH 4D

Rodzaj i skład eluentu	FENOL				KOFEINA				KWERCETYNA			
ACN:H ₂ O (v/v)	R^2	F_{test}	p -value	Istotność	R^2	F_{test}	p -value	Istotność	R^2	F_{test}	p -value	Istotność
70:30	0,88	44,30	1,16E-03	TAK	0,89	47,90	9,66E-04	TAK	0,97	212,80	2,73E-05	TAK
90:10	0,96	154,10	6,01E-05	TAK	0,99	510,40	3,16E-06	TAK	0,79	23,50	4,67E-03	TAK
95:5	0,86	37,10	1,72E-03	TAK	0,98	286,30	1,32E-05	TAK	0,99	670,80	1,60E-06	TAK
99:1	0,99	766,80	1,15E-06	TAK	0,99	832,90	9,36E-07	TAK	0,99	426,90	4,92E-06	TAK
MeOH:H ₂ O (v/v)	R^2	F_{test}	p -value	Istotność	R^2	F_{test}	p -value	Istotność	R^2	F_{test}	p -value	Istotność
70:30	0,96	159,90	5,49E-05	TAK	0,97	199,80	3,19E-05	TAK	0,88	45,80	1,07E-03	TAK
90:10	0,81	26,90	3,49E-03	TAK	0,96	155,30	5,90E-05	TAK	0,33	3,90	0,11	NIE
95:5	0,87	41,70	1,32E-03	TAK	0,85	35,60	1,89E-03	TAK	0,89	47,70	9,78E-04	TAK
99:1	0,87	39,70	1,48E-03	TAK	0,99	511,40	3,14E-06	TAK	0,98	303,40	1,14E-05	TAK

V.1.1.3. Podsumowanie

Przeprowadzona analiza termodynamiczna wykazała, że dla badanych układów retencja fenolu, kofeiny i kwercetyny w kolumnie Hypersil GOLD HILIC może być opisana w oparciu o równanie van't Hoffa. W przypadku fenolu i kofeiny obserwuje się dominację jednego mechanizmu oddziaływań z fazą stacjonarną, co potwierdzają liniowe zależności $\ln k = f(1/T)$ oraz wysokie wartości współczynnika determinacji ($R^2 > 0,9$). Retencja tych związków ma w większości przypadków charakter egzotermiczny, z wyjątkiem fenolu w układzie o wysokiej zawartości wody (70:30 v/v ACN:H₂O), w którym obserwuje się proces endotermiczny. Dla kwercetyny stwierdzono większą wrażliwość retencji na skład fazy ruchomej oraz częstsze odchylenia od liniowości zależności van't Hoffa, co sugeruje udział różnych rodzajów oddziaływań w procesie retencji. Analiza statystyczna potwierdza istotność modeli dla badanych układów, natomiast obserwowane przypadki nieliniowości mogą wskazywać na bardziej złożony charakter oddziaływań.

Analiza termodynamiczna fenolu, kofeiny i kwercetyny w kolumnie Shodex SILICA 5NH 4D wykazała istotny wpływ składu fazy ruchomej na charakter procesu retencji. Dla fenolu i kofeiny dominował mechanizm egzotermiczny, co oznacza, że wzrost temperatury prowadzi do osłabienia oddziaływań z fazą stacjonarną i zmniejszenia retencji, przy czym wyjątek stanowił fenol w układzie o wysokiej zawartości wody, gdzie obserwowano charakter endotermiczny (70:30 v/v ACN:H₂O). W przypadku kwercetyny zaobserwowano znacznie większą wrażliwość na skład fazy ruchomej, co przejawiało się zmianą charakteru procesu z endotermicznego do egzotermicznego. Wskazuje to na istotną rolę konkurencyjnych oddziaływań między analitem, fazą ruchomą i stacjonarną. W większości badanych układów zależności van't Hoffa miały charakter liniowy, co potwierdza możliwość opisu retencji za pomocą modelu termodynamicznego. Jednakże w wybranych przypadkach, szczególnie dla kwercetyny, obserwowano odchylenia od liniowości, sugerujące bardziej złożony charakter oddziaływań odpowiedzialnych za retencję. Analiza statystyczna wykazała, że dla kwercetyny w układzie 90:10 (v/v) MeOH:H₂O model van't Hoffa nie opisuje w sposób właściwy zależności eksperymentalnych. Potwierdza to niska wartość współczynnika determinacji ($R^2 = 0,33$) oraz brak istotności statystycznej modelu ($p > 0,05$).

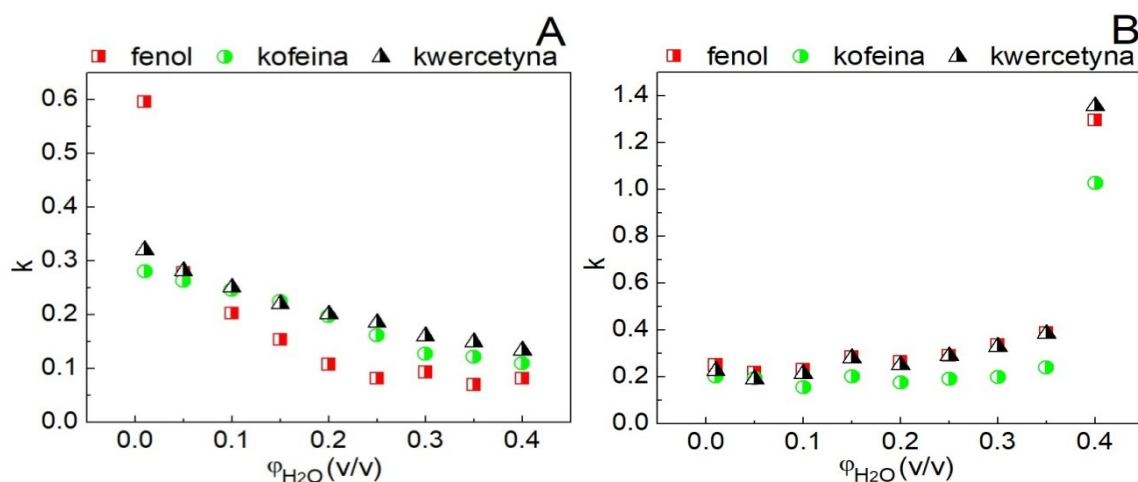
V.1.2. Analiza wpływu modyfikatora eluentu na proces retencji

V.1.2.1. Kolumna Hypersil GOLD HILIC

Na rysunkach 5.3 A i 5.3 B, przedstawiono zależności wpływu modyfikatora fazy ruchomej na retencję badanych substancji testowych, w postaci zależności $k = f(\varphi_{H_2O})$, odpowiednio dla układu ACN:H₂O i MeOH:H₂O. Zakres zawartości wody w eluencie od 1 do 40 % (v/v). W mechanizmie HILIC teoretycznie możliwa jest zależność o kształcie zbliżonym do litery „U”, wynikająca z nakładania się dwóch konkurencyjnych mechanizmów: adsorpcji analitu na powierzchni fazy stacjonarnej oraz podziału analitu pomiędzy fazę ruchomą a cienką warstwę wodną otaczającą powierzchnię adsorbentu. Przy bardzo niskiej zawartości wody retencja jest wysoka, ponieważ anality preferują warstwę wodną na powierzchni fazy stacjonarnej i mogą dodatkowo oddziaływać z odsłoniętymi grupami silanolowymi, co prowadzi do wysokich wartości współczynnika retencji. W miarę wzrostu udziału wody w fazie ruchomej warstwa wodna ulega stabilizacji, co ogranicza znaczenie adsorpcji i powoduje spadek retencji. Przy bardzo wysokiej zawartości wody, gdy układ zbliża się do granicy pomiędzy HILIC i RP, zmieniają się właściwości warstwy wodnej związanej z powierzchnią fazy stacjonarnej. Coraz większego znaczenia mogą nabierać mechanizmy o charakterze hydrofobowym. Zmienia się także dostępność miejsc oddziaływań co prowadzi do ponownego wzrostu retencji niektórych analitów, skutkując zależnością o kształcie litery „U”.

Na rysunku 5.3 A w układzie ACN:H₂O zaobserwowano jednoznacznie malejący współczynnik retencji dla wszystkich analitów wraz ze wzrostem udziału wody w eluencie, φ_{H_2O} , od 1 do 40 % (v/v), bez wyraźnego wzrostu przy wysokiej zawartości wody. Oznacza to, że w analizowanym zakresie składu fazy ruchomej nie zaobserwowano pełnej zależności o kształcie litery „U”, opisywanej dla niektórych układów HILIC. Uzyskane wyniki wskazują, że w badanym zakresie warunków retencja jest zdominowana przez mechanizm charakterystyczny dla chromatografii HILIC. Stopniowe zmniejszanie retencji wraz ze wzrostem zawartości wody jest zgodne z koncepcją przechodzenia od większego udziału oddziaływań adsorpcyjnych do dominacji mechanizmu podziałowego. Początkowy spadek wartości współczynnika retencji jest stromy, szczególnie dla fenolu, natomiast przy wyższych zawartościach wody obserwuje się jego wyraźne wypłaszczenie. Przy bardzo niskiej zawartości wody najwyższe wartości współczynnika retencji, k , obserwuje się dla fenolu. Jednak po przekroczeniu około $\varphi_{H_2O} \approx 0,2$ (v/v) trend ulega odwróceniu, najwyższe wartości k osiąga kwercetyna, kofeina przyjmuje wartości pośrednie, natomiast fenol staje się

najslabiej zatrzymywanym analitem. W przypadku rozszerzenia zakresu wartości φ_{H_2O} powyżej 40 % (v/v) można oczekiwać pojawienia się prawego ramienia krzywej typu „U”, szczególnie dla związków zdolnych do silnych oddziaływań wodorowych, takich jak kwercetyna. W układzie MeOH:H₂O (rys. 5.3 B) retencja wszystkich analitów pozostaje niska i niemal niezmienna w szerokim zakresie zawartości wody, od 1 do około 35 % (v/v). Różnice pomiędzy badanymi związkami są w tym zakresie niewielkie. Dopiero przy wysokim udziale wody, około 40 % (v/v), obserwuje się wyraźny wzrost retencji wszystkich analitów, szczególnie kwercetyny i fenolu. Taka zależność wskazuje, że w tym układzie mechanizm retencji różni się od obserwowanego w układzie ACN:H₂O. Wzrost zawartości wody może prowadzić do zmian właściwości warstwy wodnej związanej z powierzchnią fazy stacjonarnej oraz zwiększenia udziału oddziaływań polarnych i wiązań wodorowych, co skutkuje wzrostem retencji. W konsekwencji układ MeOH:H₂O wykazuje bardziej złożony przebieg zależności retencji od składu fazy ruchomej niż układ ACN:H₂O. W badanym zakresie zawartości wody nie zaobserwowano jednak pełnej zależności typu „U”.



Rysunek 5.3. Zależności $k = f(\varphi_{H_2O})$ dla substancji testowych w składzie eluentu:

A - ACN:H₂O, B - MeOH:H₂O dla kolumny Hypersil GOLD HILIC

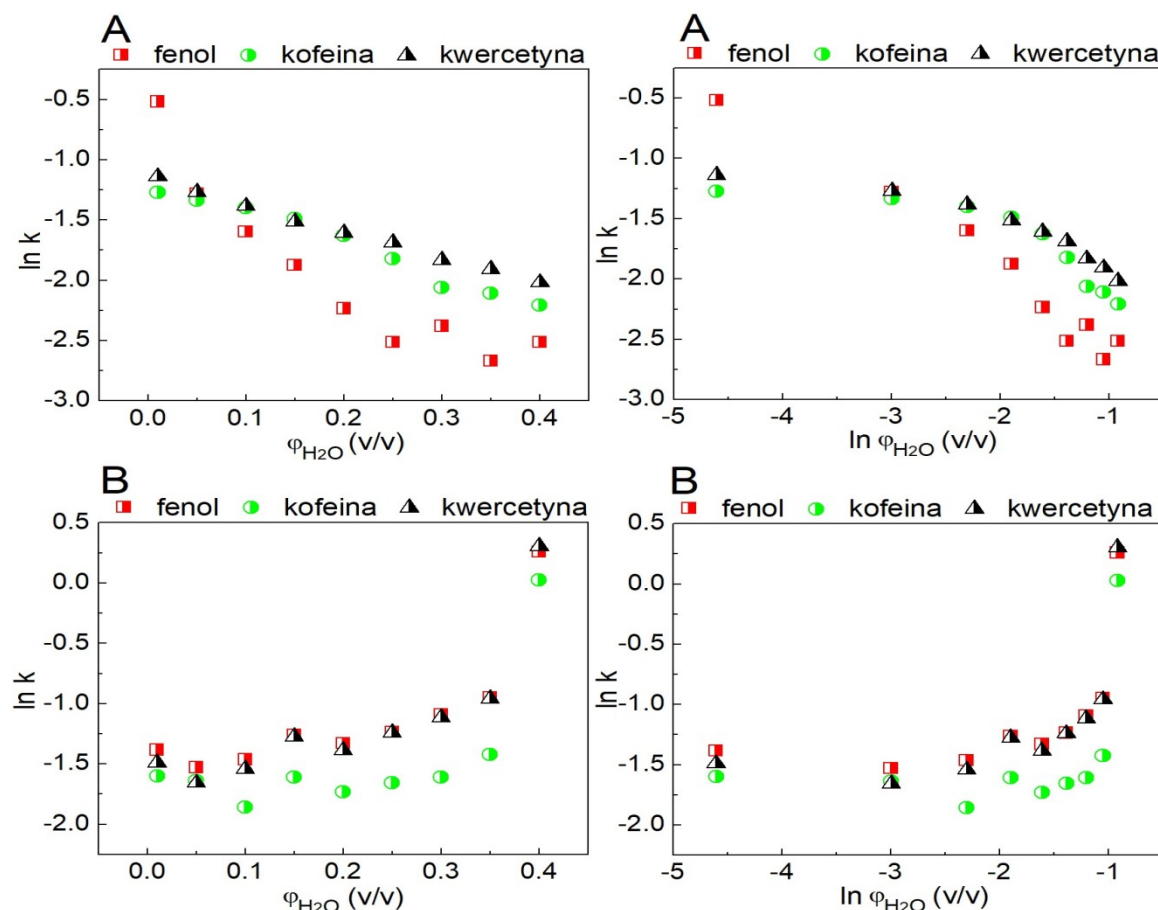
Zgodnie z teorią Soczewińskiego–Snydera liniowa zależność $\ln k = f(\varphi_{H_2O})$, wskazuje na dominację mechanizmu podziałowego. Natomiast liniowość zależności $\ln k = f(\ln \varphi_{H_2O})$, może wskazywać na dominację mechanizmu adsorpcyjnego. W praktyce retencja w technice HILIC rzadko jest wynikiem działania jednego, jednoznacznie zdefiniowanego procesu. Najczęściej ma ona charakter złożony, obejmując zarówno podział analitu pomiędzy fazę ruchomą a powierzchniową warstwę wodną, jak i jego adsorpcję na polarnych centrach fazy stacjonarnej. Interpretacja ta jest zgodna z założeniami modelu

Soczewińskiego–Snydera, w którym retencję opisuje się jako wynik współwystępowania mechanizmów podziału i adsorpcji. Oznacza to, że w warunkach HILIC adsorpcja wynikająca z oddziaływań polarnych zachodzi równolegle z procesem podziału analitu w warstwie wodnej zaadsorbowanej na powierzchni fazy stacjonarnej [150]. Wniosek ten znajduje również potwierdzenie w literaturze. Hemström i Irgum [121] podkreślają, że mechanizm HILIC polega na współwystępowaniu procesów podziału i adsorpcji, a ich względny udział może istotnie zmieniać się w zależności od rodzaju układu chromatograficznego.

Dla kofeiny i kwercetyny w układzie ACN:H₂O (rys. 5.4 A) zależność $\ln k = f(\varphi_{H_2O})$, ma charakter zbliżony do liniowego, co może wskazywać na dominację mechanizmu podziałowego. Oznacza to, że retencja tych związków jest przede wszystkim wynikiem ich podziału pomiędzy fazę ruchomą a warstwę wodną związaną z powierzchnią fazy stacjonarnej. Odmienny charakter zależności zaobserwowano dla fenolu, dla którego zależność $\ln k = f(\varphi_{H_2O})$, ma charakter nieliniowy. Może to wskazywać na udział dodatkowych oddziaływań, takich jak adsorpcja, wiązania wodorowe lub oddziaływania polarne, szczególnie przy niższych zawartościach wody. Uzyskana zależność sugeruje, że udział mechanizmu podziałowego i adsorpcyjnego w retencji fenolu zmienia się wraz ze składem fazy ruchomej. Dodatkowych informacji dostarcza analiza zależności $\ln k = f(\ln \varphi_{H_2O})$, która dla kofeiny, kwercetyny i fenolu wykazuje charakter nieliniowy. Brak liniowości wskazuje, że adsorpcja nie jest jedynym dominującym mechanizmem retencji. Wyniki sugerują zatem współistnienie mechanizmów adsorpcji i podziału, przy czym ich udział zależy od właściwości analitu oraz składu fazy ruchomej.

W układzie zawierającym metanol (rys. 5.4 B) wszystkie analizowane zależności, zarówno $\ln k = f(\varphi_{H_2O})$, jak i $\ln k = f(\ln \varphi_{H_2O})$, wykazują charakter nieliniowy dla wszystkich trzech badanych analitów. Oznacza to, że w obecności metanolu retencja nie jest opisywana wyłącznie przez mechanizm podziałowy ani wyłącznie przez mechanizm adsorpcyjny. Nieliniowość obu zależności wskazuje na złożony i zmienny charakter oddziaływań, wynikający najprawdopodobniej ze specyficznych właściwości metanolu, który silniej niż acetonitryl wpływa na strukturę warstwy wodnej oraz oddziaływania analit–faza stacjonarna. Metanol, jako rozpuszczalnik o wyraźnych właściwościach protonodonorowych, może modyfikować zarówno uporządkowanie warstwy solwatacyjnej, jak i dostępność polarnych miejsc adsorpcyjnych na powierzchni fazy stacjonarnej, co prowadzi do zmiennego udziału mechanizmów adsorpcji i podziału w całym badanym zakresie składu eluentu. Takie współistnienie mechanizmów jest zgodne z aktualnym opisem

retencji w HILIC i potwierdza jej złożony charakter, w którym udział poszczególnych procesów zależy od właściwości fazy stacjonarnej, struktury analitu oraz składu fazy ruchomej.

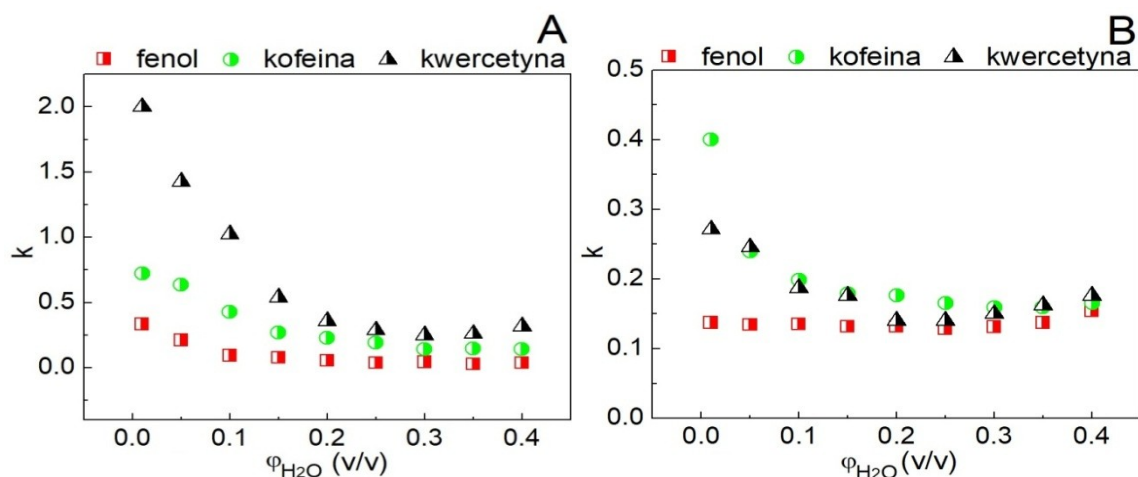


Rysunek 5.4. Zależności $\ln k = f(\phi_{H_2O})$ i $\ln k = f(\ln \phi_{H_2O})$ dla substancji testowych dla kolumny Hypersil GOLD HILIC w składzie eluentu: A - ACN:H₂O; B - MeOH:H₂O

V.1.2.2. Kolumna Shodex SILICA 5NH 4D

Na rysunkach 5.5 A i 5.5 B przedstawiono wpływ modyfikatora fazy ruchomej na retencję badanych substancji w postaci zależności $k = f(\phi_{H_2O})$, odpowiednio dla układów ACN:H₂O i MeOH:H₂O. W układzie ACN:H₂O w analizowanej kolumnie retencja wszystkich trzech związków maleje wraz ze wzrostem udziału wody, co jest zgodne z mechanizmem HILIC, w którym woda pełni rolę „silnego” składnika eluentu. W całym badanym zakresie utrzymuje się stała kolejność retencji: kwercetyna wykazuje najsilniejsze zatrzymywanie, kofeina pośrednie, natomiast fenol najsłabsze. Spadek retencji jest najbardziej wyraźny dla kwercetyny. W miarę dalszego zwiększania zawartości wody charakter krzywych ulega wypłaszczeniu, co może wskazywać na wzrost udziału mechanizmu podziałowego w procesie retencji, związanego ze wzrostem warstwy wodnej

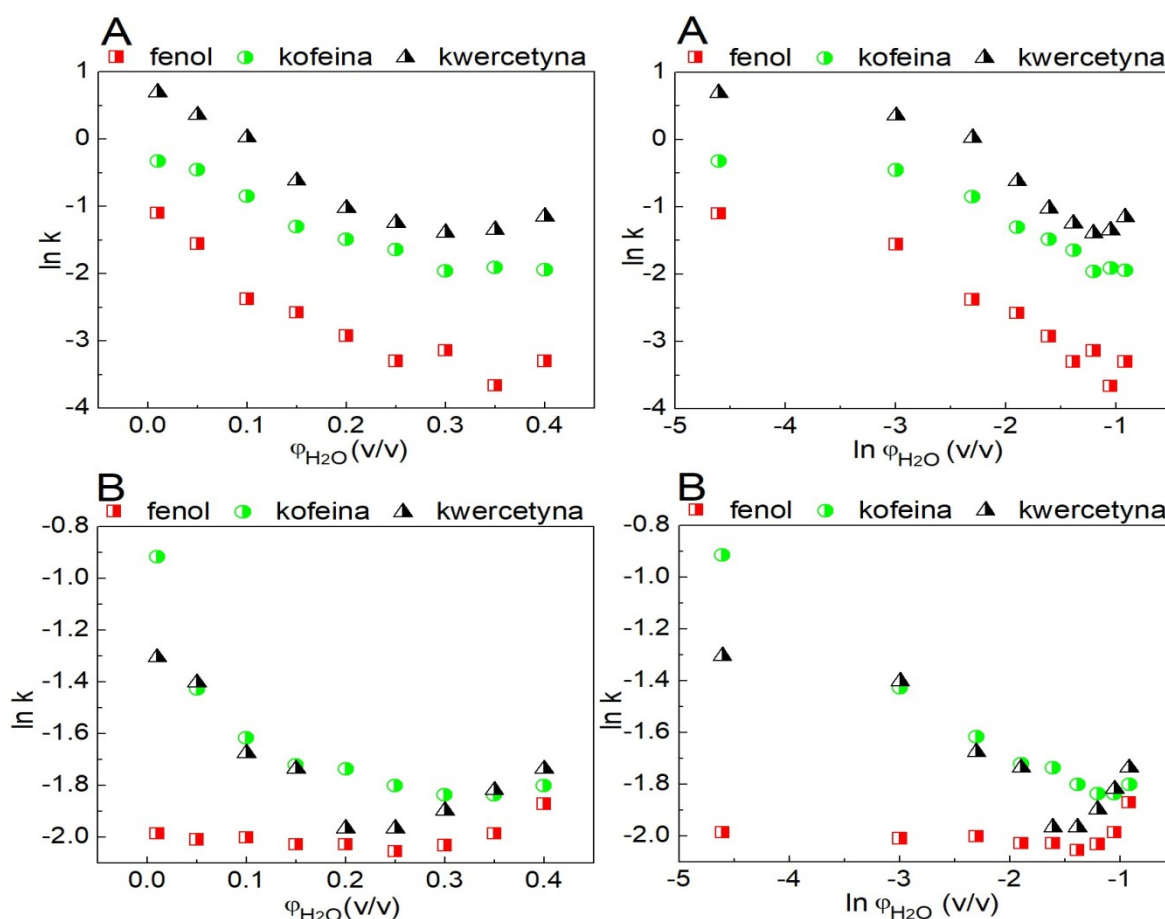
na powierzchni fazy stacjonarnej. W układzie ACN:H₂O (rys. 5.5 A) można zaobserwować przebieg odpowiadający lewej części krzywej typu „U”, szczególnie w przypadku kwercetyny. Wskazuje to, że uzyskane wyniki są zgodne z teorią HILIC, z którą wraz ze wzrostem zawartości wody maleje udział mechanizmu adsorpcyjnego, a rośnie znaczenie mechanizmu podziałowego zachodzącego w warstwie wodnej związanej z powierzchnią fazy stacjonarnej. Pełny kształt krzywej typu „U” mógłby ujawnić się dopiero po rozszerzeniu zakresu zawartości wody w eluencie powyżej 40 % (v/v) lub w wyniku modyfikacji warunków chromatograficznych, takich jak zmiana pH czy zastosowanie buforu. W układzie MeOH:H₂O (rys. 5.5 B) wartości współczynnika retencji dla fenolu, kofeiny i kwercetyny pozostają stosunkowo niskie i wykazują niewielką zmienność w szerokim zakresie udziału wody w fazie ruchomej. Przy bardzo niskiej zawartości wody najwyższą retencję wykazuje kofeina, następnie kwercetyna, natomiast fenol jest zatrzymywany najslabiej. Wraz ze wzrostem udziału wody retencja kofeiny wyraźnie maleje, natomiast zmiany dla kwercetyny i fenolu są mniej intensywne. W zakresie około 0,2–0,3 (v/v) H₂O w eluencie wartości współczynnika retencji dla wszystkich analitów stają się zbliżone, co wskazuje na zmniejszenie różnic wynikających z ich właściwości fizykochemicznych. Przy najwyższych badanych zawartościach wody obserwuje się niewielki wzrost retencji, szczególnie dla kwercetyny i kofeiny. Taki przebieg zależności sugeruje współwystępowanie mechanizmów adsorpcji i podziału, przy czym ich wzajemny udział zmienia się wraz ze składem fazy ruchomej. Ze względu na obecność grup hydroksylowych kwercetyna wykazuje dużą zdolność do tworzenia wiązań wodorowych z warstwą wodną oraz grupami polarnymi fazy stacjonarnej, co sprzyja jej retencji przy wyższych zawartościach wody. Kofeina, dzięki obecności polarnych grup karbonylowych i atomów azotu, wykazuje zdolność do tworzenia oddziaływań dipolowych oraz wiązań wodorowych, co może sprzyjać jej retencji w warunkach mniejszej zawartości wody. Fenol, mimo obecności grupy hydroksylowej, wykazuje najmniejszą liczbę centrów zdolnych do oddziaływań polarnych, dlatego jest zatrzymywany najslabiej w całym badanym zakresie składu eluentu. W przypadku kofeiny i kwercetyny obserwuje się zarys zależności typu „U”. Potwierdzenie pełnego przebiegu tej zależności wymagałoby jednak badań przy wyższej zawartości wody w fazie ruchomej.



Rysunek 5.5. Zależności $k = f(\phi_{H_2O})$ dla substancji testowych w składzie eluentu:

A - ACN:H₂O, B - MeOH:H₂O dla kolumny Shodex SILICA 5NH 4D

Zależność $\ln k = f(\phi_{H_2O})$, w układzie ACN:H₂O (rys. 5.6 A) ma charakter nieliniowy dla kwercetyny i fenolu, co wskazuje na złożony mechanizm retencji, w którym udział procesów podziału i adsorpcji zmienia się wraz ze składem eluentu. Dla kofeiny zależność ta jest zbliżona do liniowej, co sugeruje przewagę mechanizmu podziałowego, jednak nie wyklucza udziału dodatkowych oddziaływań. Dodatkowo zależności $\ln k = f(\ln \phi_{H_2O})$, dla kwercetyny, kofeiny i fenolu mają charakter nieliniowy, co wskazuje, że mechanizm adsorpcyjny nie jest jedynym dominującym mechanizmem retencji. Wyniki sugerują współistnienie adsorpcji i podziału, a udział tych mechanizmów zmienia się wraz ze składem fazy ruchomej. W układzie zawierającym metanol (rys. 5.6 B) wszystkie badane anality wykazują nieliniowy charakter zależności $\ln k = f(\phi_{H_2O})$, co wskazuje, że retencja nie może być opisana wyłącznie za pomocą klasycznego mechanizmu podziałowego. Nieliniowość ta sugeruje, że metanol, jako rozpuszczalnik silnie oddziałujący z fazą stacjonarną oraz wpływający na właściwości warstwy wodnej, modyfikuje równowagę pomiędzy różnymi mechanizmami odpowiedzialnymi za retencję. W efekcie względny udział procesów podziału i adsorpcji zmienia się wraz ze składem eluentu, prowadząc do odstępstw od liniowych zależności charakterystycznych dla dominacji jednego mechanizmu. Analiza zależności $\ln k = f(\ln \phi_{H_2O})$ wykazała natomiast, że jedynie kofeina charakteryzuje się przebiegiem zbliżonym do liniowego, co może wskazywać na większy udział oddziaływań adsorpcyjnych w jej retencji w obecności metanolu. W przypadku fenolu i kwercetyny obserwowane nieliniowe zależności wskazują na bardziej złożony charakter procesu retencji, w którym udział oddziaływań powierzchniowych i podziałowych zależy od składu fazy ruchomej.



Rysunek 5.6. Zależności $\ln k = f(\phi_{H_2O})$ i $\ln k = f(\ln \phi_{H_2O})$ dla substancji testowych dla kolumny Shodex SILICA 5NH 4D w składzie eluentu: A - ACN:H₂O; B - MeOH:H₂O

V.1.2.3. Podsumowanie

Analiza wpływu modyfikatora fazy ruchomej na retencję fenolu, kofeiny i kwercetyny w kolumnach Hypersil GOLD HILIC oraz Shodex SILICA 5NH 4D potwierdza, że mechanizm retencji w chromatografii HILIC ma charakter mieszany i zależy zarówno od właściwości analitu oraz fazy stacjonarnej, jak i od rodzaju zastosowanego modyfikatora organicznego. W obu badanych kolumnach retencja jest wynikiem współistnienia mechanizmów podziału i adsorpcji, przy czym ich wzajemny udział zmienia się wraz ze składem fazy ruchomej. Dla układów ACN:H₂O częściej obserwowano zależności wskazujące na większy udział mechanizmu podziałowego oraz zachowanie zbliżone do klasycznego modelu HILIC. Natomiast w układach MeOH:H₂O częściej występowały nieliniowości zależności retencyjnych, sugerujące bardziej złożony charakter oddziaływań i zmienny udział procesów adsorpcji oraz podziału. Uzyskane wyniki wskazują, że rodzaj modyfikatora organicznego istotnie wpływa na przebieg procesu retencji oraz udział mechanizmów odpowiedzialnych za zatrzymywanie analitów w warunkach HILIC.

V.1.3. Analiza sprawności kolumn chromatograficznych

V.1.3.1. Kolumna *Hypersil GOLD HILIC*

Na rysunku 5.7 przedstawiono zależności van Deemtera dla dwóch analitów testowych: fenolu i kofeiny. Analizę przeprowadzono dla eluentów o składzie: 70:30 i 95:5 (v/v) ACN:H₂O oraz 70:30 i 95:5 (v/v) MeOH:H₂O.

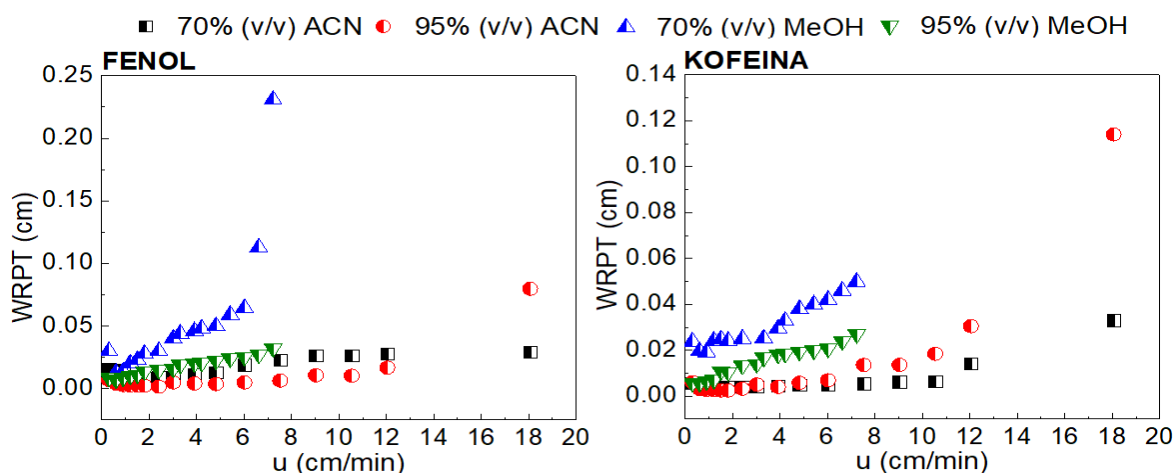
Wyniki eksperymentalne dla fenolu (rys. 5.7) wskazują, że układy zawierające acetonitryl zapewniają wyższą sprawność kolumny niż układy zawierające metanol. Wyższa zawartość składnika organicznego (95 % (v/v) ACN) sprzyja dalszej poprawie sprawności, jednak efekt ten ulega osłabieniu wraz ze wzrostem prędkości przepływu eluentu. Dla fazy ruchomej zawierającej 95 % (v/v) ACN obserwuje się optimum sprawności kolumny w zakresie umiarkowanych prędkości przepływu. Analiza danych wskazuje, że najwyższa sprawność kolumny występuje przy prędkościach przepływu od około 0,9 do 4 cm/min ($\approx 0,15\text{--}0,8\text{ cm}^3/\text{min}$), przy czym minimum wartości WRPT, odpowiadające najlepszym parametrom rozdzielania, obserwuje się w pobliżu 2,4 cm/min ($\approx 0,4\text{ cm}^3/\text{min}$). W tym zakresie krzywa zależności WRPT od prędkości przepływu jest stosunkowo płaska, co oznacza, że niewielkie odchylenia od wartości optymalnej nie powodują istotnego pogorszenia sprawności kolumny. Przy niskich prędkościach przepływu cząsteczki analitu mają więcej czasu na dyfuzję wzdłuż kolumny w fazie ruchomej, co prowadzi do poszerzenia piku chromatograficznego. Natomiast po przekroczeniu górnej granicy zakresu optymalnego obserwuje się systematyczny wzrost wartości WRPT, wynikający z narastającego udziału oporów przenoszenia masy. W takich warunkach analit nie osiąga równowagi pomiędzy fazą ruchomą a stacjonarną w wystarczająco krótkim czasie, co prowadzi do poszerzenia piku chromatograficznego i pogorszenia sprawności rozdzielania. W eluencie o składzie 70:30 (v/v) ACN:H₂O obserwuje się płytsze optimum sprawności, przesunięte w kierunku niższych prędkości przepływu. Najwyższa sprawność kolumny w tym układzie występuje w zakresie od około 1,2 do 3 cm/min ($\approx 0,2\text{--}0,5\text{ cm}^3/\text{min}$). W porównaniu z układem 95:5 (v/v) ACN:H₂O wartości WRPT są wyższe, co wskazuje na mniej efektywny proces przenoszenia masy w bardziej uwodnionym środowisku. Dla faz ruchomych zawierających metanol (70:30 i 95:5 (v/v) MeOH:H₂O) uzyskane zależności WRPT w funkcji prędkości przepływu wykazują istotne różnice w porównaniu z układami zawierającymi acetonitryl. Maksymalne osiągalne prędkości przepływu w tych układach są niższe niż dla układów ACN:H₂O, co wynika z wyższego ciśnienia generowanego w kolumnie przy zwiększaniu przepływu. Stanowi to istotne ograniczenie zarówno wynikające z właściwości kolumny, jak i parametrów pracy aparatury chromatograficznej. Zjawisko to można powiązać z większą

lepkością mieszanin metanolu z wodą w porównaniu z analogicznymi układami zawierającymi acetonitryl, co prowadzi do wzrostu oporów przepływu i w konsekwencji do zwiększenia ciśnienia w kolumnie. Dla układu 95:5 (v/v) MeOH:H₂O najwyższa sprawność kolumny występuje w zakresie prędkości przepływu od około 0,6 do 1,8 cm/min ($\approx 0,1\text{--}0,3 \text{ cm}^3/\text{min}$). Po przekroczeniu tego zakresu obserwuje się systematyczny wzrost wartości WRPT, wskazujący na pogorszenie sprawności w wyniku narastającego wpływu oporów przenoszenia masy. W przypadku układu 70:30 (v/v) MeOH:H₂O krzywa WRPT wykazuje stromy wzrost już przy niewielkich prędkościach przepływu, a minimum przypada w przybliżeniu na zakres od 0,6 do 1,5 cm/min ($\approx 0,1\text{--}0,25 \text{ cm}^3/\text{min}$). Taki przebieg sugeruje istotny udział oporów przenoszenia masy już przy stosunkowo małych prędkościach liniowych. Może to wynikać z większej zawartości wody w fazie ruchomej, która sprzyja silniejszym oddziaływaniom analitów z uwodnioną powierzchnią fazy stacjonarnej oraz wydłuża czas potrzebny do osiągnięcia równowagi pomiędzy fazą ruchomą a stacjonarną.

Dla kofeiny najbardziej korzystne warunki uzyskano dla fazy ruchomej zawierającej 95:5 (v/v) ACN:H₂O. Krzywa WRPT w tym układzie wykazuje wyraźne minimum w zakresie prędkości przepływu 0,9–3,9 cm/min ($\approx 0,15\text{--}0,65 \text{ cm}^3/\text{min}$), co wskazuje na obecność stabilnego obszaru optymalnej sprawności kolumny. W tym zakresie przebieg krzywej jest stosunkowo płaski, co oznacza, że niewielkie odchylenia od wartości optymalnej nie powodują istotnego pogorszenia sprawności. Powyżej górnej granicy tego zakresu obserwuje się systematyczny wzrost wartości WRPT, wynikający z narastających oporów przenoszenia masy. Przy najwyższych prędkościach przepływu następuje natomiast gwałtowne pogorszenie sprawności kolumny. W przypadku układu zawierającego 70:30 (v/v) ACN:H₂O minimum krzywej występuje przy wyższych wartościach WRPT w porównaniu z układem 95:5 (v/v) ACN:H₂O, co wskazuje na niższą sprawność kolumny w zakresie małych i umiarkowanych prędkości przepływu. Najlepsze parametry rozdzielania uzyskuje się w tym przypadku w zakresie około 1,2–5 cm/min ($\approx 0,2\text{--}0,8 \text{ cm}^3/\text{min}$). Wraz ze wzrostem prędkości przepływu różnice pomiędzy układami maleją, a przy najwyższych badanych wartościach przepływu układ 70:30 (v/v) ACN:H₂O wykazuje niższe wartości WRPT, a tym samym wyższą sprawność niż układ zawierający 95 % (v/v) ACN. W układach zawierających 95:5 oraz 70:30 (v/v) MeOH:H₂O maksymalne osiągalne prędkości przepływu były niższe niż w przypadku mieszanin z acetonitrylem, co wynika z wyższego ciśnienia generowanego w kolumnie przy większych przepływach. W układzie zawierającym 95:5 (v/v) MeOH:H₂O najwyższą sprawność kolumny obserwuje się w zakresie prędkości przepływu

około 0,6–4,2 cm/min ($\approx 0,1\text{--}0,7\text{ cm}^3/\text{min}$). Po przekroczeniu tego zakresu następuje systematyczny wzrost wartości WRPT, co świadczy o pogorszeniu sprawności w wyniku narastających oporów przenoszenia masy. Jeszcze mniej korzystne warunki obserwuje się dla układu 70:30 (v/v) MeOH:H₂O, gdzie krzywa WRPT wskazuje na niższą sprawność kolumny w porównaniu z pozostałymi badanymi układami. Minimum odpowiadające optymalnej prędkości przepływu mieści się w zakresie 0,6–3 cm/min ($\approx 0,1\text{--}0,5\text{ cm}^3/\text{min}$), jednak wartości WRPT rosną stosunkowo stromo wraz ze wzrostem prędkości przepływu, co wskazuje na zwiększony wpływ oporów przenoszenia masy.

W przypadku kwercetyny w kolumnie Hypersil GOLD HILIC badania ograniczono do oceny wpływu składu fazy ruchomej oraz temperatury kolumny przy stałej prędkości przepływu wynoszącej 1 cm³/min. W tych warunkach uzyskane chromatogramy umożliwiały wiarygodne wyznaczenie parametrów retencyjnych. Nie przeprowadzono natomiast analizy sprawności kolumny w funkcji prędkości przepływu, ponieważ kształt pików nie pozwalał na rzetelne wyznaczenie sprawności w całym badanym zakresie prędkości przepływów.



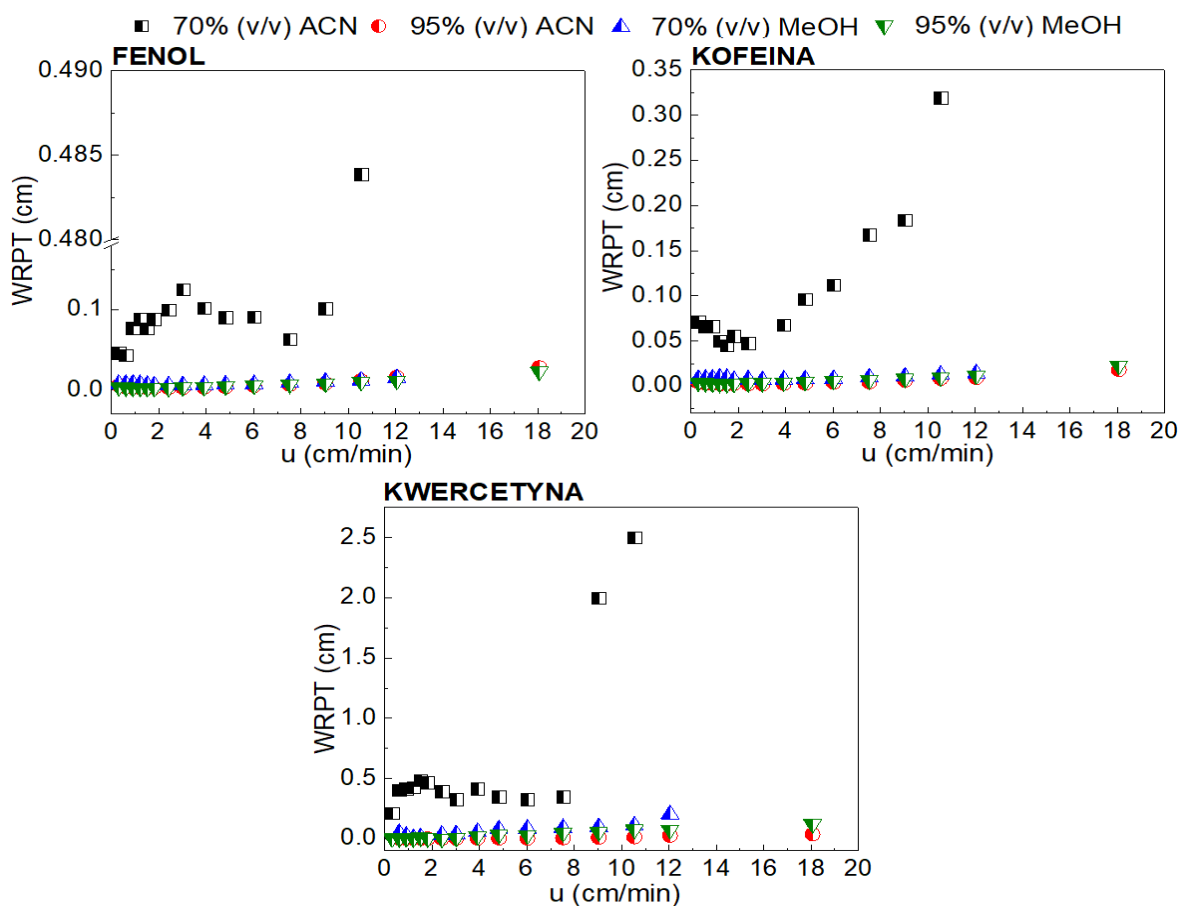
Rysunek 5.7. Zależności van Deemtera dla fenolu i kofeiny w kolumnie Hypersil GOLD HILIC w różnych składach eluentów

V.1.3.2. Kolumna Shodex SILICA 5NH 4D

Na rysunkach 5.8 przedstawiono zależności wartości WRPT od liniowej prędkości przepływu fazy ruchomej dla fenolu, kofeiny i kwercetyny w warunkach chromatografii HILIC z zastosowaniem kolumny Shodex SILICA 5NH 4D. Badania przeprowadzono przy użyciu faz ruchomych o składzie: 70:30 i 95:5 (v/v) ACN:H₂O oraz 70:30 i 95:5 (v/v) MeOH:H₂O.

Najkorzystniejsze warunki chromatograficzne uzyskano dla fazy ruchomej zawierającej 95:5 (v/v) ACN:H₂O, zwłaszcza dla kofeiny i kwercetyny. W tym układzie krzywe WRPT

przebiegają najniżej spośród wszystkich analizowanych faz ruchomych, a jednocześnie charakteryzują się szerokim zakresem prędkości liniowych, dla których sprawność kolumny pozostaje najwyższa (0,9–5,0 cm/min; $\approx$ 0,15–0,8 cm³/min). Oznacza to, że niewielkie odchylenia od wartości optymalnej nie prowadzą do istotnego pogorszenia sprawności układu. Po przekroczeniu górnej granicy tego zakresu obserwuje się stopniowy wzrost wartości WRPT, związany z narastającym udziałem oporów przenoszenia masy. Wysoką sprawność kolumny uzyskano również dla fazy ruchomej o składzie 95:5 (v/v) MeOH:H₂O. W tym układzie krzywa WRPT utrzymuje niskie wartości w zakresie prędkości liniowych 0,9–3,9 cm/min ($\approx$ 0,15–0,65 cm³/min), co umożliwia prowadzenie analiz przy zachowaniu wysokiej sprawności separacyjnej. W porównaniu z układem 95:5 (v/v) ACN:H₂O minimalne wartości WRPT są zbliżone, jednak przy wyższych prędkościach przepływu sprawność kolumny pogarsza się szybciej, szczególnie dla kofeiny i kwercetyny. W przypadku układu zawierającego 70:30 (v/v) MeOH:H₂O obserwuje się niewielkie pogorszenie sprawności. Najniższe wartości WRPT występują w zakresie prędkości przepływu około 1,5–3,9 cm/min ($\approx$ 0,25–0,65 cm³/min). Zakres badanych prędkości był jednak ograniczony przez wysokie ciśnienie pracy kolumny, wynikające z większej lepkości eluentu MeOH:H₂O. Najmniej korzystne warunki uzyskano dla fazy ruchomej o składzie 70:30 (v/v) ACN:H₂O. W tym układzie, szczególnie dla kwercetyny, obserwowano najniższą sprawność kolumny, a krzywa WRPT przebiegała wyraźnie powyżej pozostałych zależności. Ponadto wartości WRPT wzrastały przy małych prędkościach przepływu, co wskazuje na zwiększony wpływ procesów dyfuzyjnych oraz ograniczeń związanych z wymianą masy. Zaobserwowane różnice mogą wynikać ze zmiany udziału oddziaływań odpowiedzialnych za retencję wraz ze wzrostem zawartości wody w fazie ruchomej. Szczególnie w przypadku kwercetyny, zawierającej liczne grupy hydroksylowe zdolne do tworzenia wiązań wodorowych z fazą aminopropylową, obserwuje się bardziej złożone zachowanie chromatograficzne, co może przyczyniać się do obniżenia sprawności.



Rysunek 5.8. Zależności van Deemtera dla fenolu, kofeiny i kwercetyny w kolumnie Shodex SILICA 5NH 4D w różnych składach eluentów

V.1.3.3. Podsumowanie

Analiza sprawności kolumn Hypersil GOLD HILIC oraz Shodex SILICA 5NH 4D wykazała istotny wpływ składu fazy ruchomej na efektywność procesu chromatograficznego. W przypadku obu kolumn najwyższą sprawność uzyskano dla układu 95:5 (v/v) ACN:H₂O, dla którego wartości WRPT były najniższe oraz obserwowano szeroki zakres optymalnych prędkości przepływu. Świadczy to o korzystnych warunkach przenoszenia masy oraz stabilnym przebiegu procesu retencji. Zastosowanie metanolu jako modyfikatora fazy ruchomej wpływało na sprawność chromatograficzną oraz zakres dostępnych prędkości przepływu dla kolumny Hypersil GOLD HILIC. Efekt ten można powiązać z większą lepkością eluentu MeOH:H₂O oraz odmiennym charakterem oddziaływań odpowiedzialnych za retencję. W porównaniu z acetonitrylem metanol silniej wpływa na równowagę pomiędzy procesami podziału i adsorpcji, co może prowadzić do pogorszenia sprawności. Najmniej korzystne warunki dla kolumny Shodex SILICA 5NH 4D zaobserwowano dla układu 70:30 (v/v) ACN:H₂O, zwłaszcza w przypadku kwercetyny. W tych warunkach obserwowano najwyższe wartości WRPT, wskazujące na ograniczenia procesu przenoszenia masy

i pogorszenie sprawności separacji. Może to wynikać z bardziej złożonego mechanizmu retencji kwercetyny, obejmującego udział licznych oddziaływań wodorowych i polarnych z fazą aminopropylową.

Uzyskane wyniki wskazują, że wysoki udział acetonitrylu w fazie ruchomej sprzyja uzyskaniu wysokiej sprawności badanych kolumn HILIC. Jednocześnie wykazano, że wpływ składu fazy ruchomej na sprawność zależy od rodzaju fazy stacjonarnej oraz właściwości analizowanego związku. Szczególnie wyraźnie zaobserwowano to dla kolumny Shodex SILICA 5NH 4D, dla której układ zawierający 70:30 (v/v) ACN:H₂O ujawnił najmniej korzystne warunki.

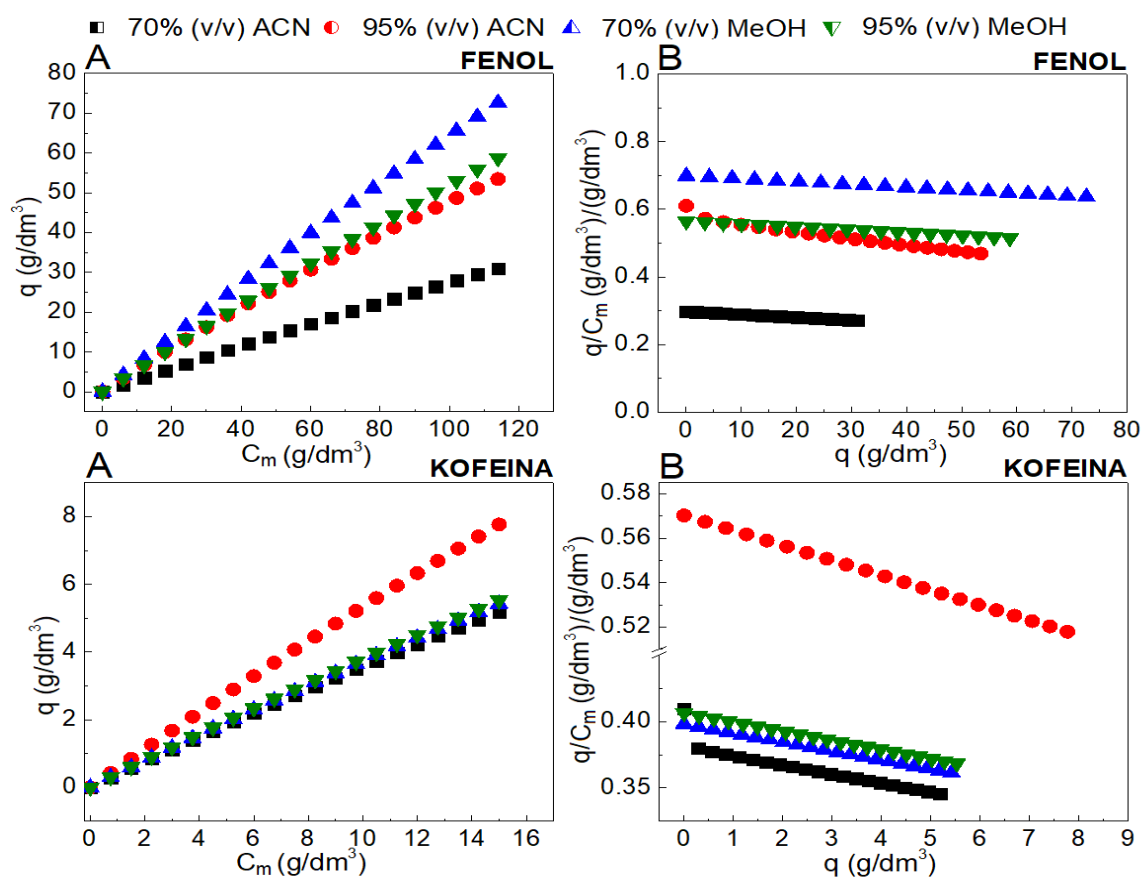
V.1.4. Badanie równowagi adsorpcyjnej metodą analizy frontalnej

V.1.4.1. Kolumna Hypersil GOLD HILIC

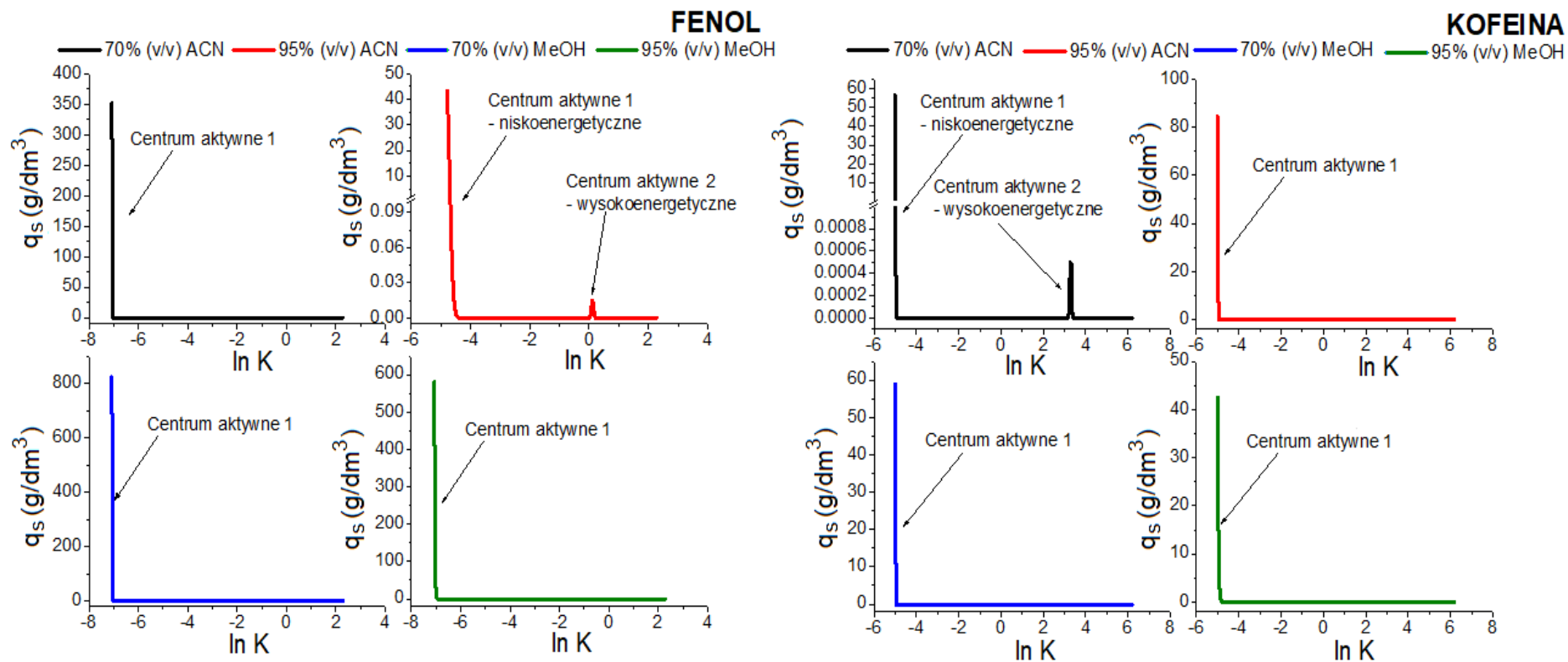
Analizę izoterm adsorpcji oraz odpowiadające im wykresy Scatcharda dla fenolu i kofeiny w różnych składach fazy ruchomej przedstawiono na rysunku 5.9 A i B. Zależności Scatcharda, wyznaczone na podstawie danych eksperymentalnych uzyskanych metodą analizy frontalnej, wykazują liniową zależność dla większości badanych układów. Sugeruje to względną jednorodność energetyczną miejsc adsorpcyjnych uczestniczących w procesie sorpcji. Potwierdza to również analiza rozkładu energii adsorpcji (rys. 5.10), która dla większości badanych układów wskazuje na dominujący udział miejsc adsorpcyjnych o zbliżonej energii oddziaływań. Wyjątek stanowią fenol w układzie 95:5 (v/v) ACN:H₂O oraz kofeina w układzie 70:30 (v/v) ACN:H₂O, dla których obserwuje się nieliniowy przebieg zależności Scatcharda. Odchylenie od liniowości wskazuje na obecność miejsc adsorpcyjnych o zróżnicowanej energii oddziaływań. Sugeruje to energetyczną heterogeniczność powierzchni fazy stacjonarnej w kolumnie Hypersil GOLD HILIC w tych układach. Analiza rozkładu energii adsorpcji (rys. 5.10) wykazała obecność co najmniej dwóch wyraźnie wyodrębnionych rodzajów centrów aktywnych: niskoenergetycznych, odpowiadających za dominującą część pojemności sorpcyjnej, oraz mniej licznych, lecz wyraźnie zaznaczonych centrów o wyższej energii adsorpcji. Zjawisko to zaobserwowano zarówno dla fenolu, jak i kofeiny, przy czym względne udziały poszczególnych stanów energetycznych zależą od składu fazy ruchomej oraz rodzaju analitu, co sugeruje istotny wpływ warunków elucji na dostępność i charakter centrów adsorpcyjnych. Wąski pik odpowiadający wysokim energiom adsorpcji może być związany z obecnością specyficznych miejsc adsorpcyjnych o zwiększonej aktywności energetycznej, zdolnych do tworzenia silnych oddziaływań donorowo-akceptorowych, wiązań wodorowych oraz oddziaływań elektrostatycznych,

zależnie od właściwości analitu. Różnice pomiędzy fenolem a kofeiną wynikają z ich odmiennych właściwości fizykochemicznych. Kofeina, jako związek bardziej polarny i zawierający większą liczbę centrów zdolnych do akceptowania wiązań wodorowych, wykazuje silniejsze oddziaływania z wybranymi miejscami adsorpcyjnymi, co znajduje potwierdzenie w obecności piku wysokoenergetycznego przy większych wartościach $\ln K$. W przypadku fenolu obecność tylko jednej grupy hydroksylowej ogranicza możliwość tworzenia silnych oddziaływań z fazą stacjonarną. W rezultacie rozkład energii adsorpcji jest przesunięty w kierunku niższych wartości $\ln K$, a udział wysokoenergetycznych centrów adsorpcyjnych pozostaje mniejszy niż dla kofeiny. Dla kofeiny największą pojemność sorpcyjną obserwuje się w układzie o wysokim udziale acetonitrylu w eluencie, 95 % (v/v). Układy zawierające 70 % (v/v) ACN oraz 70 % (v/v) MeOH wykazują wartości pośrednie, natomiast zastosowanie 95 % (v/v) MeOH prowadzi do najniższej pojemności sorpcyjnej. Niską pojemność sorpcyjną w układzie 95 % (v/v) MeOH można tłumaczyć silną solwatacją kofeiny przez metanol, który dzięki zdolności do tworzenia wiązań wodorowych ogranicza jej oddziaływania z fazą stacjonarną. Fenol wykazuje wyraźną zależność pojemności sorpcyjnej od składu fazy ruchomej. Największą pojemność sorpcyjną obserwuje się dla układu zawierającego 70 % (v/v) MeOH, natomiast najmniejszą dla układu zawierającego 95 % (v/v) ACN.

Warto podkreślić, że uzyskane doświadczalnie izoterm adsorpcji wraz z zależnościami Scatcharda oraz wyznaczonymi rozkładami energii adsorpcji dostarczają bezpośrednich informacji niezbędnych do wyboru odpowiedniego modelu izoterm adsorpcji. Właściwy dobór modelu izoterm adsorpcji jest kluczowy w procesie optymalizacji separacji, która zazwyczaj realizowana jest numerycznie poprzez rozwiązywanie równań opisujących dynamikę sorpcji w kolumnie. Obserwowana nieliniowość wykresu Scatcharda oraz obecność co najmniej dwóch wyraźnych centrów aktywnych w rozkładzie energii adsorpcji wskazują, że proste, jednoskładnikowe modele (np. izoterma Langmuira) mogą nie opisywać danych w sposób wystarczająco dokładny. W praktyce oznacza to konieczność rozważenia modeli heterogenicznych, takich jak izoterma bi-Langmuira, lub uogólnionych modeli, np. izoterm typu Tótha, które umożliwiają uwzględnienie heterogeniczności energetycznej fazy stacjonarnej. Wybór najbardziej adekwatnego modelu powinien być potwierdzony analizą statystyczną. Porównanie jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji wraz z analizą statystyczną przedstawiono w kolejnym podrozdziale.



Rysunek 5.9. Izotermy adsorpcji wyznaczone doświadczalnie (A) oraz zależności Scatcharda (B) dla fenolu i kofeiny dla kolumny chromatograficznej Hypersil GOLD HILIC w różnych składach eluentów



Rysunek 5.10. Rozkład energii adsorpcji w kolumnie Hypersil GOLD HILIC dla fenolu i kofeiny w różnych składach eluentów

V.1.4.2. Porównanie jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji dla kolumny Hypersil GOLD HILIC

Wyniki badań dla fenolu i kofeiny w składach fazy ruchomej: 70:30 i 95:5 (v/v) ACN:H₂O oraz 70:30 i 95:5 (v/v) MeOH:H₂O przedstawiono na rysunku 5.11. Zaprezentowano na nim uzyskane izotermy adsorpcji wraz z ich dopasowaniem do modeli najlepiej opisujących dane eksperymentalne. Uzyskane izotermy charakteryzują się niemal liniowym przebiegiem, co wynika z faktu, że analizowany zakres stężeń odpowiada początkowemu etapowi procesu adsorpcji. W tym obszarze nawet modele nieliniowe, takie jak model Langmuira, model Tótha oraz model bi-Langmuira, wykazują przebieg zbliżony do liniowego. Dobór modelu izoterm oparto zarówno na analizie rozkładu energii adsorpcji, jak i ocenie jakości dopasowania do danych eksperymentalnych (SUM, SD, F_{test}). Wartości wyestymowanych parametrów przedstawiono w tabeli 5.5, natomiast wyniki analizy statystycznej w tabeli 5.6. Model liniowy został uwzględniony w analizie porównawczej, jednak ze względu na gorszą jakość dopasowania do danych eksperymentalnych w porównaniu z modelami Langmuira, bi-Langmuira i Tótha nie był przedmiotem szczegółowej dyskusji.

Wyniki analizy rozkładu energii adsorpcji oraz zależności Scatcharda (rys. 5.9 i 5.10) dla fenolu w układach 70:30 (v/v) ACN:H₂O oraz 70:30 i 95:5 (v/v) MeOH:H₂O wskazują na jednorodność energetyczną powierzchni fazy stacjonarnej, co sugeruje, że model Langmuira będzie najlepiej opisywać uzyskane dane eksperymentalne. Analiza statystyczna (tab. 5.6) wykazała, że wartości SUM i SD dla modelu Langmuira w tych układach są niższe niż dla pozostałych modeli, natomiast wartości testu Fishera są wyższe. Wyestymowane parametry q_s i K (tab. 5.5) mieszczą się w przewidywanym zakresie, odpowiadając liczbie miejsc adsorpcyjnych oraz sile oddziaływań w fazie stacjonarnej, co uzasadnia przyjęcie modelu Langmuira jako najlepiej dopasowanego do danych doświadczalnych. Dodatkowo wartości parametru ν w modelu Tótha w rozpatrywanych układach są równe jedności, co wskazuje na jednorodność energetyczną powierzchni adsorbentu (tab. 5.5). Dla fenolu w układzie 95:5 (v/v) ACN:H₂O analiza równowagi adsorpcyjnej wykazała heterogeniczny charakter powierzchni fazy stacjonarnej, dlatego układ ten lepiej opisują modele Tótha lub bi-Langmuira. Potwierdzają to następujące obserwacje: (i) wartość parametru ν w modelu Tótha wynosi około 0,86; (ii) wartości SUM i SD dla modelu Langmuira są wyraźnie wyższe niż w pozostałych układach, dla których przyjęto jednorodność energetyczną powierzchni, natomiast wartość testu Fishera jest niższa, co wskazuje na gorsze dopasowanie tego modelu do danych doświadczalnych. Oznacza to, że model Langmuira nie opisuje poprawnie

równowagi adsorpcyjnej fenolu w tym układzie, a jej opis wymaga zastosowania modeli heterogenicznych, takich jak izoterma bi-Langmuira lub model Tótha. W niniejszej rozprawie doktorskiej porównanie jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji przeprowadzono również w oparciu o wartości stosunku testów Fishera dla dwóch modeli, zgodnie z równaniami (4.4) i (4.5). Analiza ta pozwala ocenić, czy różnice w dopasowaniu modeli są statystycznie istotne przy uwzględnieniu liczby ich parametrów. Porównano model heterogeniczny Tótha z modelem homogenicznym Langmuira, a także model bi-Langmuira z modelem Langmuira. Dodatkowo, dla układów wykazujących heterogeniczność energetyczną powierzchni adsorbentu zestawiono model bi-Langmuira z modelem Tótha. Oceny dokonano na podstawie wartości stosunku testów Fishera, który pozwala określić, czy różnice w dopasowaniu modeli są statystycznie istotne przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Wyniki wskazują (tab. 5.7 i 5.8), że w przypadku układu 95:5 (v/v) ACN:H₂O, dla którego stwierdzono heterogeniczność powierzchni fazy stacjonarnej, model Tótha opisuje badany układ lepiej niż model bi-Langmuira. Natomiast w pozostałych układach, w których charakter energetyczny powierzchni fazy stacjonarnej oceniono jako jednorodny, model Langmuira wykazuje lepsze dopasowanie niż modele heterogeniczne.

Dla kofeiny w kolumnie Hypersil GOLD HILIC heterogeniczność powierzchni została wykazana w układzie 70:30 (v/v) ACN:H₂O. Potwierdza to wartość parametru ν w modelu Tótha (tab. 5.5), wynoszący 0,90, który odbiega od jedności. Niższe wartości SUM oraz SD (tab. 5.6) uzyskane dla modeli heterogenicznych wskazują na ich lepsze dopasowanie do danych doświadczalnych w porównaniu z modelem Langmuira. Wyższe wartości testu Fishera dodatkowo potwierdzają przewagę tych modeli, wskazując na istotnie lepszą jakość dopasowania. Wyniki te zostały dodatkowo potwierdzone analizą wartości stosunku testów Fishera (tab. 5.7 i 5.8), która jednoznacznie wykazała, że model Tótha zapewnia najlepszy opis badanego układu. Dla układów zawierających 95:5 (v/v) ACN:H₂O oraz 70:30 i 95:5 (v/v) MeOH:H₂O parametr modelu Tótha przyjmuje wartości równe jedności, co wskazuje na brak wyraźnej heterogeniczności energetycznej powierzchni. W tych warunkach dopasowanie modelu Langmuira jest statystycznie akceptowalne. Stabilność parametrów potwierdzają wąskie przedziały ufności przedstawione w tabeli 5.5.

Tabela 5.5. Wartości wyestymowanych parametrów modeli izoterm adsorpcji wraz z przedziałami ufności w kolumnie Hypersil GOLD HILIC

Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma liniowa	Izoterma Langmuira		Izoterma Tótha		
			K (dm ³ /g)	K (dm ³ /g)	q _s (g/dm ³)	K (dm ³ /g)	q _s (g/dm ³)	ν
FENOL	ACN	70	0,28 ± 2,43×10 ⁻³	8,49×10 ⁻⁴ ± 2,88×10 ⁻⁹	351,28 ± 1,11×10 ⁻³	8,51×10 ⁻⁴ ±1,40×10 ⁻⁶	350,18 ± 0,59	1,00 ± 5,96×10 ⁻⁴
		95	0,49 ± 8,97×10 ⁻³	1,91×10 ⁻³ ±3,03×10 ⁻⁵	298,72 ± 4,09	1,36×10 ⁻³ ±1,42×10 ⁻⁵	55,17 ± 4,72	0,86 ± 3,80×10 ⁻³
	MeOH	70	0,65 ± 5,67×10 ⁻³	8,49×10 ⁻⁴ ± 2,88×10 ⁻⁹	822,81 ± 2,60×10 ⁻³	8,51×10 ⁻⁴ ±1,50×10 ⁻⁶	819,99 ± 1,49	1,00 ± 6,47×10 ⁻⁴
		95	0,53 ± 4,60×10 ⁻³	8,53×10 ⁻⁴ ± 4,79×10 ⁻⁹	662,10 ± 3,46×10 ⁻³	8,55×10 ⁻⁴ ±1,14×10 ⁻⁶	660,46 ± 0,90	1,00 ± 4,83×10 ⁻⁴
KOFEINA	ACN	70	0,35 ± 3,14×10 ⁻³	7,69×10 ⁻³ ± 4,30×10 ⁻⁴	50,00 ± 2,55	6,40×10 ⁻³ ±1,33×10 ⁻⁴	59,64 ± 1,27	0,90 ± 7,30×10 ⁻³
		95	0,53 ± 4,67×10 ⁻³	6,75×10 ⁻³ ± 3,31×10 ⁻⁷	84,46 ± 3,84×10 ⁻⁴	1,86×10 ⁻² ±6,40×10 ⁻³	30,00 ± 10,56	1,00 ± 3,30×10 ⁻¹
	MeOH	70	0,37 ± 3,25×10 ⁻³	6,75×10 ⁻³ ± 3,32×10 ⁻⁸	58,96 ± 2,68×10 ⁻⁴	1,31×10 ⁻² ±3,40×10 ⁻³	30,00 ± 8,05	1,00 ± 1,70×10 ⁻¹
		95	0,38 ± 3,37×10 ⁻³	6,87×10 ⁻³ ± 1,08×10 ⁻⁷	45,13 ± 8,54×10 ⁻⁴	1,33×10 ⁻² ±3,50×10 ⁻³	29,98 ± 8,06	1,00 ± 1,70×10 ⁻¹
Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma bi-Langmuira					
			K ₁ (dm ³ /g)	q _{s1} (g/dm ³)	K ₂ (dm ³ /g)	q _{s2} (g/dm ³)		
FENOL	ACN	70	8,49×10 ⁻⁴ ± 3,55×10 ⁻⁹	351,28 ± 1,34×10 ⁻³	7,19 ± 1,26×10 ⁻³	3,59×10 ⁻⁶ ± 2,64×10 ⁻⁶		
		95	4,46×10 ⁻³ ± 3,22×10 ⁻³	55,24 ± 108,35	7,15×10 ⁻⁴ ± 1,26×10 ⁻³	462,00 ± 389,76		
	MeOH	70	5,46×10 ⁻⁴ ± 1,72×10 ⁻¹	760,00 ± 5,01×10 ⁴	2,15×10 ⁻³ ± 3,20×10 ⁻¹	140,01 ± 6,90×10 ⁴		
		95	6,70×10 ⁻⁴ ± 0,10×10 ⁻¹	300,00 ± 1,40×10 ⁵	1,80×10 ⁻³ ± 0,66	214,00 ± 3,00×10 ⁵		
KOFEINA	ACN	70	8,80×10 ⁻³ ± 6,33×10 ⁻²	28,08 ± 795,23	3,27×10 ⁻³ ± 0,10	40,32 ± 326,78		
		95	9,69×10 ⁻³ ± 6,50×10 ⁻¹	30,00 ± 2,11×10 ⁻¹	9,83×10 ⁻³ ± 8,45×10 ⁻¹	30,00 ± 1,11×10 ⁻¹		
	MeOH	70	2,24×10 ⁻³ ± 8,96	30,00 ± 5,40×10 ⁴	1,14×10 ⁻² ± 2,21	30,00 ± 1,80×10 ⁴		
		95	4,68×10 ⁻³ ± 1,02	55,00 ± 1,43×10 ³	1,70×10 ⁻² ± 2,24	9,27 ± 4,10×10 ³		

Tabela 5.6. Analiza statystyczna: wartości SUM, SD, testu Fishera dla modeli izoterm adsorpcji w kolumnie Hypersil GOLD HILIC

Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma liniowa		
			SUM	SD	F _{test}
FENOL	ACN	70	2,26	0,34	$5,80 \times 10^4$
		95	31,18	1,28	$1,30 \times 10^4$
	MeOH	70	12,40	0,81	$5,80 \times 10^4$
		95	8,19	0,66	$5,70 \times 10^4$
KOFEINA	ACN	70	0,07	0,06	$5,50 \times 10^4$
		95	0,16	0,09	$5,60 \times 10^4$
	MeOH	70	0,08	0,06	$5,60 \times 10^4$
		95	0,08	0,06	$5,40 \times 10^4$
Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma Langmuira		
			SUM	SD	F _{test}
FENOL	ACN	70	$9,62 \times 10^{-11}$	$2,31 \times 10^{-6}$	$6,42 \times 10^{14}$
		95	0,03	$3,80 \times 10^{-2}$	$7,43 \times 10^6$
	MeOH	70	$5,28 \times 10^{-10}$	$5,41 \times 10^{-6}$	$6,41 \times 10^{14}$
		95	$9,55 \times 10^{-10}$	$7,28 \times 10^{-6}$	$2,33 \times 10^{14}$
KOFEINA	ACN	70	$1,10 \times 10^{-3}$	$7,59 \times 10^{-3}$	$1,75 \times 10^6$
		95	$1,52 \times 10^{-11}$	$8,95 \times 10^{-7}$	$2,82 \times 10^{14}$
	MeOH	70	$7,42 \times 10^{-12}$	$6,25 \times 10^{-7}$	$2,82 \times 10^{14}$
		95	$8,02 \times 10^{-11}$	$2,05 \times 10^{-6}$	$2,71 \times 10^{13}$

Tabela 5.6. c.d. Analiza statystyczna: wartości SUM, SD, testu Fishera dla modeli izoterm adsorpcji w kolumnie Hypersil GOLD HILIC

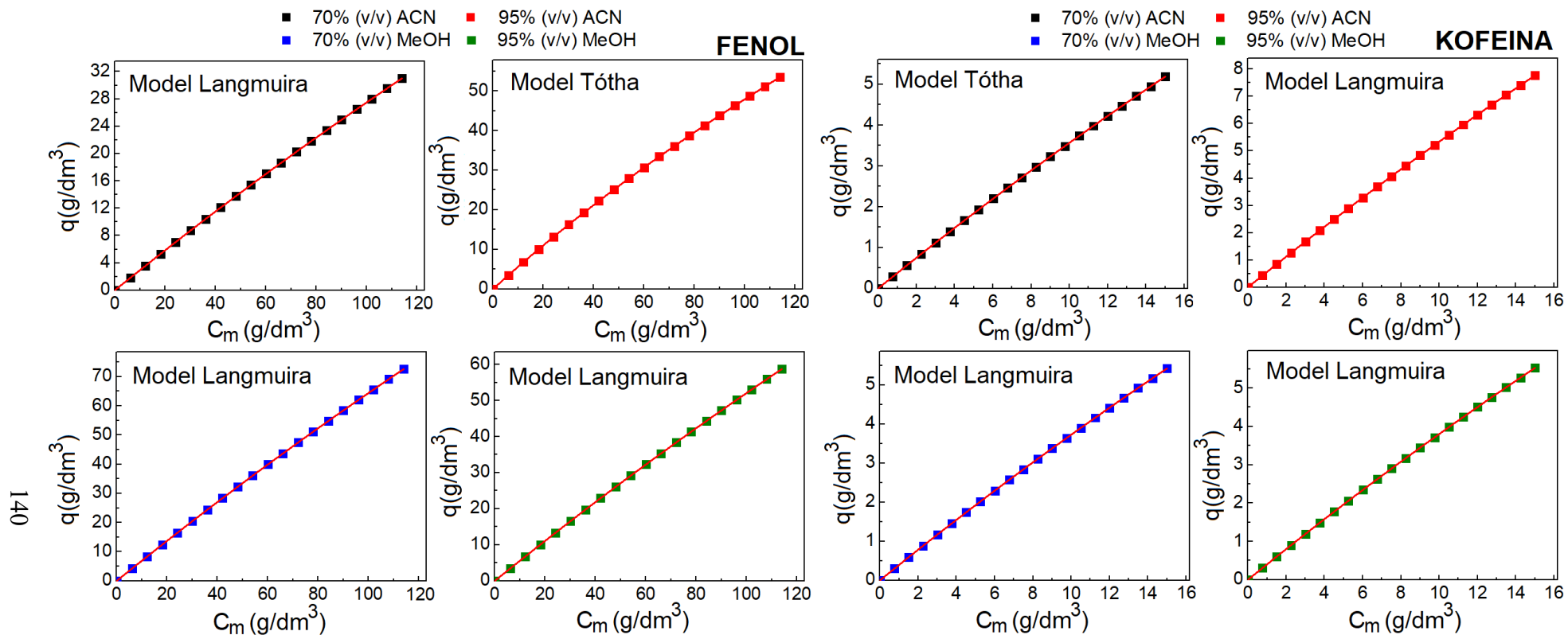
Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma Tótha		
			SUM	SD	F _{test}
FENOL	ACN	70	$1,14 \times 10^{-7}$	$8,20 \times 10^{-5}$	$3,40 \times 10^{11}$
		95	$7,10 \times 10^{-5}$	$2,04 \times 10^{-3}$	$1,70 \times 10^9$
	MeOH	70	$7,39 \times 10^{-7}$	$2,08 \times 10^{-4}$	$2,88 \times 10^{11}$
		95	$2,73 \times 10^{-7}$	$1,26 \times 10^{-4}$	$5,11 \times 10^{11}$
KOFEINA	ACN	70	$6,09 \times 10^{-7}$	$1,84 \times 10^{-4}$	$1,98 \times 10^9$
		95	$1,80 \times 10^{-3}$	$9,90 \times 10^{-3}$	$1,52 \times 10^6$
	MeOH	70	$2,77 \times 10^{-4}$	$3,92 \times 10^{-3}$	$4,77 \times 10^6$
		95	$3,05 \times 10^{-4}$	$4,12 \times 10^{-3}$	$4,50 \times 10^6$
Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma bi-Langmuira		
			SUM	SD	F _{test}
FENOL	ACN	70	$6,33 \times 10^{-11}$	$1,99 \times 10^{-6}$	$4,33 \times 10^{14}$
		95	$7,32 \times 10^{-4}$	$6,77 \times 10^{-3}$	$1,16 \times 10^8$
	MeOH	70	1,24	$2,79 \times 10^{-1}$	$1,20 \times 10^5$
		95	2,64	$4,06 \times 10^{-1}$	$3,70 \times 10^4$
KOFEINA	ACN	70	$9,13 \times 10^{-7}$	$2,32 \times 10^{-4}$	$9,38 \times 10^8$
		95	$3,65 \times 10^{-2}$	$4,60 \times 10^{-2}$	$5,30 \times 10^4$
	MeOH	70	$1,30 \times 10^{-2}$	$2,70 \times 10^{-2}$	$7,20 \times 10^4$
		95	$5,50 \times 10^{-3}$	$1,80 \times 10^{-2}$	$1,70 \times 10^5$

Tabela 5.7. Porównanie analizowanych modeli izoterm adsorpcji w oparciu o wartości stosunku testów Fishera w kolumnie Hypersil GOLD HILIC

Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		bi-Langmuir vs Langmuir			Tóth vs Langmuir		
			$F_{N-16,N-18,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-l_i,N-l_j}$	$F_{N-17,N-18,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-l_i,N-l_j}$
FENOL	ACN	70	2,25	0,67	fałsz	2,23	$5,30 \times 10^{-4}$	fałsz
		95	2,25	15,61	prawda	2,23	228,80	prawda
	MeOH	70	2,25	$1,87 \times 10^{-10}$	fałsz	2,23	$4,49 \times 10^{-4}$	fałsz
		95	2,25	$1,59 \times 10^{-10}$	fałsz	2,23	$2,19 \times 10^{-3}$	fałsz
Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		bi-Langmuir vs Langmuir			Tóth vs Langmuir		
			$F_{N-17,N-19,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-l_i,N-l_j}$	$F_{N-18,N-19,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-l_i,N-l_j}$
KOFEINA	ACN	70	2,20	535,43	prawda	2,18	$1,10 \times 10^3$	prawda
		95	2,20	$1,88 \times 10^{-10}$	fałsz	2,18	$5,39 \times 10^{-9}$	fałsz
	MeOH	70	2,20	$2,55 \times 10^{-10}$	fałsz	2,18	$1,69 \times 10^{-8}$	fałsz
		95	2,20	$6,27 \times 10^{-9}$	fałsz	2,18	$1,66 \times 10^{-7}$	fałsz

Tabela 5.8. Porównanie analizowanych modeli izoterm adsorpcji (heterogenicznych) w oparciu o wartości stosunku testów Fishera w kolumnie Hypersil GOLD HILIC

Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie% (v/v)		bi-Langmuir vs Tóth		
			$F_{N-16,N-17,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-l_i,N-l_j}$
FENOL	ACN	95	2,29	0,07	fałsz
Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie% (v/v)		$F_{N-17,N-18,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-l_i,N-l_j}$
KOFEINA	ACN	70	2,23	0,47	fałsz



Rysunek 5.11. Dopasowanie najbardziej adekwatnych modeli izoterm adsorpcji do danych doświadczalnych dla fenolu i kofeiny w różnych składach eluentów w kolumnie Hypersil GOLD HILIC

V.1.4.3. Kolumna Shodex SILICA 5NH 4D

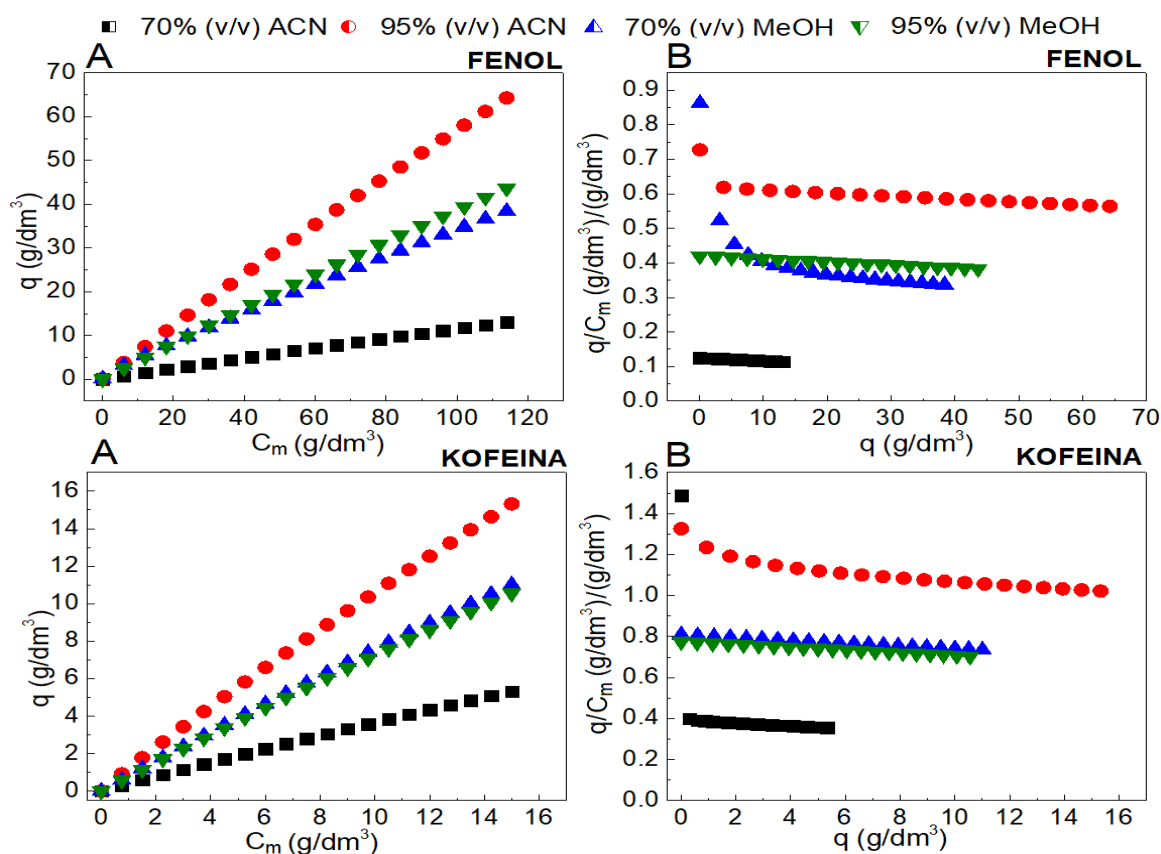
Wyniki badań analizy równowagi adsorpcji dla kolumny chromatograficznej Shodex SILICA 5NH 4D dla substancji testowych: fenolu i kofeiny w różnych składach eluentów przedstawiono na rysunkach 5.12 A i B oraz 5.13.

Analiza równowagi adsorpcji fenolu prowadzonych w składach eluentów 95:5 (v/v) ACN:H₂O oraz 70:30 (v/v) MeOH:H₂O wykazała wyraźną nieliniowość zależności Scatcharda (rys. 5.12). Taki przebieg jest charakterystyczny dla układów, w których powierzchnia fazy stacjonarnej wykazuje heterogeniczność energetyczną. Dodatkowe potwierdzenie tego zjawiska uzyskano na podstawie analizy rozkładu energii adsorpcji (rys. 5.13), która wykazała obecność więcej niż jednego rodzaju centrów aktywnych odpowiedzialnych za proces adsorpcji fenolu. W pozostałych układach chromatograficznych, przy zastosowaniu 70:30 (v/v) ACN:H₂O oraz 95:5 (v/v) MeOH:H₂O jako faz ruchomych, zależności Scatcharda (rys. 5.12) mają charakter liniowy. Liniowość ta wskazuje na jednorodność energetyczną powierzchni fazy stacjonarnej. W tych układach cząsteczki analitu oddziałują z powierzchnią adsorbentu o zbliżonej energii. Interpretację tę potwierdza analiza rozkładu energii adsorpcji, która wykazała obecność jednego dominującego centrum aktywnego (rys. 5.13). Największą pojemność sorpcyjną fenolu zaobserwowano w układzie zawierającym 95 % (v/v) ACN, natomiast najniższą w układzie zawierającym 70 % (v/v) ACN.

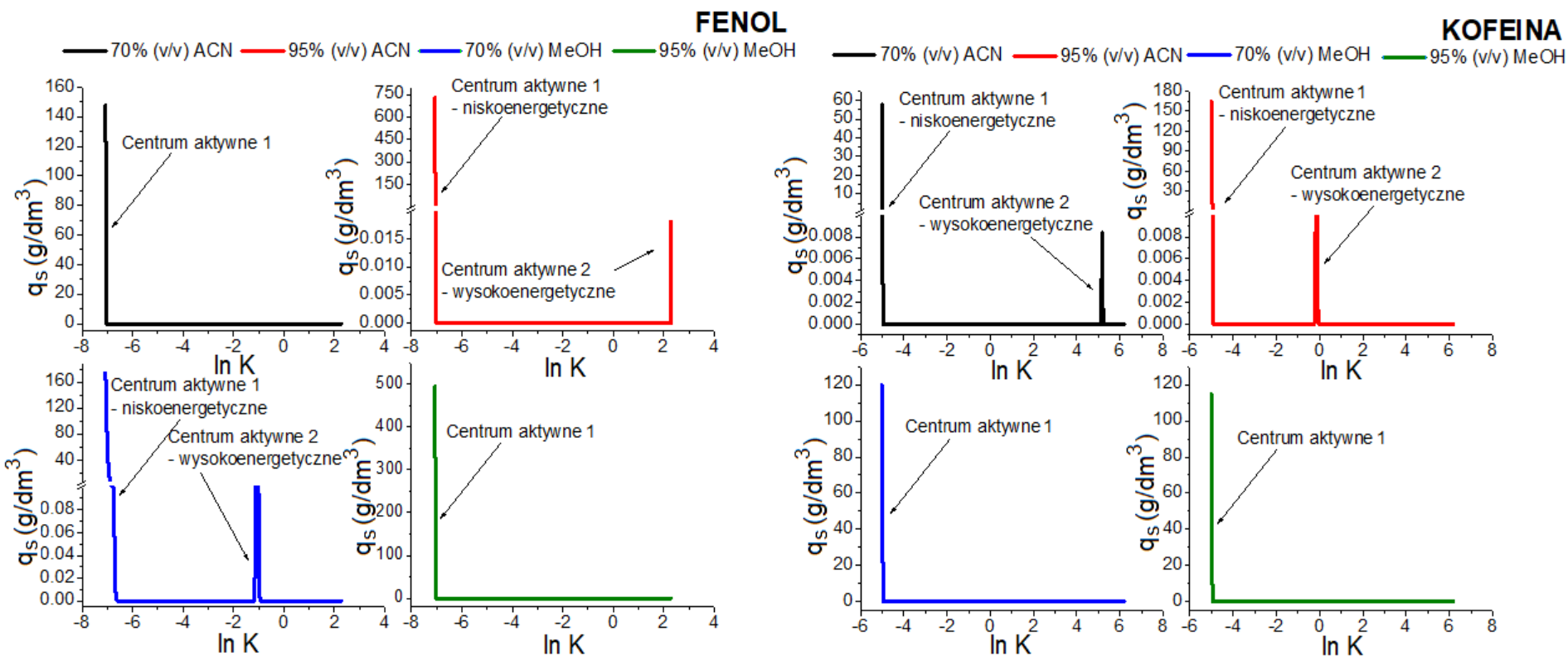
Dla kofeiny zarówno w układzie zawierającym 70:30 (v/v) ACN:H₂O, jak i w układzie 95:5 (v/v) ACN:H₂O zaobserwowano wyraźnie nieliniowy przebieg zależności Scatcharda (rys. 5.12). Interpretację tę potwierdza analiza rozkładu energii adsorpcji (rys. 5.13), która wykazała obecność więcej niż jednego rodzaju centrów aktywnych. Natomiast w układach zawierających 70:30 oraz 95:5 (v/v) MeOH:H₂O zależności Scatcharda wykazują przebieg liniowy, co wskazuje na bardziej jednorodny energetycznie charakter powierzchni adsorbentu. Potwierdza to analiza rozkładu energii adsorpcji, w której zaobserwowano występowanie pojedynczego centrum aktywnego o niskiej energii (rys. 5.13). Dodatkowo analiza rozkładu energii adsorpcji wskazuje, że dla kofeiny w układzie 70:30 (v/v) ACN:H₂O maksimum odpowiadające centrom o wyższej energii adsorpcji występuje przy wyższych wartościach $\ln K$ (około 5) niż w układzie 95:5 (v/v) ACN:H₂O. Oznacza to, że w warunkach mniejszego udziału acetonitrylu kofeina może silniej oddziaływać z wybranymi miejscami adsorpcyjnymi. Zjawisko to można wiązać z wpływem składu fazy ruchomej na równowagę pomiędzy solwatacją kofeiny a jej oddziaływaniami z grupami aminopropylowymi fazy stacjonarnej. Większa zawartość wody w fazie ruchomej może sprzyjać powstawaniu bardziej

specyficznych oddziaływań kofeiny z powierzchnią adsorbentu, w tym wiązań wodorowych. Natomiast przy wysokim udziale acetonitrylu (95:5 (v/v) ACN:H₂O) większe znaczenie może mieć mechanizm podziałowy charakterystyczny dla chromatografii HILIC, związany z podziałem analitu pomiędzy fazę ruchomą a warstwę wodną obecną na powierzchni adsorbentu. Może to prowadzić do zmniejszenia udziału najsilniejszych oddziaływań specyficznych i przesunięcia maksimum rozkładu energii adsorpcji w kierunku niższych wartości $\ln K$. W układzie 70:30 (v/v) ACN:H₂O odnotowano najniższą pojemność sorpcyjną, natomiast najwyższe wartości uzyskano dla fazy ruchomej o składzie 95:5 (v/v) ACN:H₂O. W przypadku układów zawierających metanol pojemność sorpcyjna przyjmowała wartości pośrednie.

Uzyskane doświadczalnie izoterm adsorpcji wraz z zależnościami Scatcharda oraz wyznaczonymi rozkładami energii adsorpcji dostarczają bezpośrednich informacji niezbędnych do wyboru odpowiedniego modelu izoterm adsorpcji. Porównanie jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji omówiono w kolejnym podrozdziale.



Rysunek 5.12. Izoterm adsorpcji wyznaczone doświadczalnie (A) oraz zależności Scatcharda (B) dla fenolu i kofeiny dla kolumny Shodex SILICA 5NH 4D w różnych składach eluentów



Rysunek 5.13. Rozkład energii adsorpcji w kolumnie Shodex SILICA 5NH 4D dla fenolu i kofeiny w różnych składach eluentów

V.1.4.4. Porównanie jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji dla kolumny Shodex SILICA 5NH 4D

Wyniki badań fenolu i kofeiny dla faz ruchomych w składzie: 70:30 i 95:5 (v/v) ACN:H₂O oraz 70:30 i 95:5 (v/v) MeOH:H₂O przedstawiono na rysunku 5.14. Zaprezentowano na nim uzyskane izotermy adsorpcji wraz z ich dopasowaniem do modeli najlepiej opisujących dane eksperymentalne. Dobór modelu izoterm adsorpcji oparto zarówno na analizie rozkładu energii adsorpcji, jak i ocenie jakości dopasowania (SUM, SD, test F_{test}). Wartości wyestymowanych parametrów przedstawiono w tabeli 5.9, natomiast wyniki analizy statystycznej w tabeli 5.10.

Dla fenolu, zgodnie z analizami obejmującymi zależności Scatcharda oraz rozkładu energii adsorpcji (rys. 5.12 i 5.13), w układach z 95:5 (v/v) ACN:H₂O oraz 70:30 (v/v) MeOH:H₂O zaobserwowano energetycznie heterogeniczny charakter powierzchni fazy stacjonarnej. Analiza statystyczna wykazała, że najlepszą zgodność z danymi eksperymentalnymi zapewniają modele heterogeniczne, takie jak izoterma bi-Langmuira oraz model Tótha. Zarówno wartości SUM i SD, jak i wyniki testu Fishera wskazują na wyraźnie lepsze dopasowanie tych modeli w porównaniu z modelem Langmuira (tab. 5.10). Parametrem wskazującym stopień heterogeniczności energetycznej powierzchni jest wartość parametru ν w modelu Tótha (tab. 5.9). Dla układu 95:5 (v/v) ACN:H₂O parametr ten wynosi $\nu \approx 0,90$, natomiast dla układu 70:30 (v/v) MeOH:H₂O $\nu \approx 0,76$. Porównanie jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji przeprowadzono również w oparciu o wartości stosunku testów Fishera dla dwóch modeli, zgodnie z równaniami (4.4) i (4.5). Uzyskane wyniki statystyczne, przedstawione w tabelach 5.11 i 5.12, wskazują, że w warunkach 95:5 (v/v) ACN:H₂O model Tótha zapewnia lepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych niż modele Langmuira i bi-Langmuira. Natomiast w układzie zawierającym 70:30 (v/v) MeOH:H₂O lepsze dopasowanie uzyskano dla modelu bi-Langmuira. Dla fenolu, w układach zawierających 70:30 (v/v) ACN:H₂O oraz 95:5 (v/v) MeOH:H₂O, wcześniejsze analizy wykazały jednorodny energetycznie charakter powierzchni fazy stacjonarnej. W rezultacie dane eksperymentalne dla tych układów są najlepiej opisywane przez model Langmuira. Analiza statystyczna, obejmująca porównanie wartości SUM, SD oraz testów Fishera, potwierdza lepsze dopasowanie modelu Langmuira w porównaniu z modelami heterogenicznymi. Dodatkowym potwierdzeniem jest wartość parametru ν w modelu Tótha, który w tych układach przyjmuje wartości bliskie jedności.

Dla kofeiny w układach zawierających acetonitryl, zgodnie z wynikami wcześniejszych badań, zaobserwowano wyraźne cechy heterogeniczności energetycznej powierzchni

adsorbentu oraz obecność co najmniej dwóch rodzajów centrów aktywnych. Natomiast dla układów zawierających metanol zaobserwowano jednorodną energetycznie powierzchnię adsorbentu. W układach zawierających acetonitryl parametr ν w modelu Tótha odbiega istotnie od jedności (tab. 5.9): dla 70:30 (v/v) ACN:H₂O wynosi $\nu \approx 0,87$, natomiast dla 95:5 (v/v) ACN:H₂O $\nu \approx 0,62$. Świadczy to o znacznym zróżnicowaniu energetycznym miejsc adsorpcyjnych na powierzchni adsorbentu. Analiza statystyczna (tab. 5.10), obejmująca porównanie wartości SUM, SD oraz testów Fishera, potwierdza powyższe obserwacje. W układach zawierających acetonitryl modele heterogeniczne (Tótha oraz bi-Langmuira) charakteryzują się niższymi wartościami SUM i SD oraz wyższymi wartościami F_{test} w porównaniu z modelem Langmuira, co świadczy o ich istotnie lepszym dopasowaniu do danych eksperymentalnych. W układach zawierających metanol obserwuje się odmienną zależność, analiza statystyczna wskazuje na lepsze dopasowanie modelu Langmuira do danych doświadczalnych. Wyestymowane parametry q_s i K (tab. 5.9) mieszczą się w przewidywanym zakresie, odpowiadając liczbie miejsc adsorpcyjnych oraz sile oddziaływań w fazie stacjonarnej, co uzasadnia przyjęcie modelu Langmuira jako najlepiej dopasowanego do danych doświadczalnych. Parametr ν w modelu Tótha jest bliski jedności. Dodatkowa analiza, oparta na wartościach stosunku testów Fishera dla dwóch modeli (tab. 5.11 i 5.12), wykazała, że w warunkach 70:30 (v/v) ACN:H₂O model Tótha zapewnia lepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych niż modele Langmuira i bi-Langmuira. Natomiast w układzie zawierającym 95:5 (v/v) ACN:H₂O lepsze dopasowanie uzyskano dla modelu bi-Langmuira.

Tabela 5.9. Wartości wyestymowanych parametrów modeli izoterm adsorpcji wraz z przedziałami ufności w kolumnie Shodex SILICA 5NH 4D

Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma liniowa	Izoterma Langmuira		Izoterma Tótha		
			K (dm ³ /g)	K (dm ³ /g)	q _s (g/dm ³)	K (dm ³ /g)	q _s (g/dm ³)	ν
FENOL	ACN	70	0,12 ± 1,02×10 ⁻³	8,49×10 ⁻⁴ ± 4,67×10 ⁻⁴	147,57 ± 2,80×10 ⁻⁹	4,31×10 ⁻³ ± 3,65×10 ⁻³	28,93 ± 25,48	1,00 ± 1,58×10 ⁻²
		95	0,57 ± 5,06×10 ⁻³	1,64×10 ⁻³ ± 4,05×10 ⁻⁴	400,00 ± 86,60	7,89×10 ⁻⁴ ± 3,62×10 ⁻⁵	786,61 ± 36,80	0,90 ± 1,56×10 ⁻²
	MeOH	70	0,35 ± 6,95×10 ⁻³	2,00×10 ⁻³ ± 3,52×10 ⁻⁴	205,28 ± 30,99	1,29×10 ⁻⁴ ± 5,82×10 ⁻⁴	170,00 ± 8,71×10 ²	0,76 ± 0,64
		95	0,39 ± 3,41×10 ⁻³	8,49×10 ⁻⁴ ± 2,88×10 ⁻⁹	494,48 ± 1,56×10 ⁻³	9,60×10 ⁻⁴ ± 5,92×10 ⁻⁵	436,00 ± 27,42	1,01 ± 2,43×10 ⁻²
KOFEINA	ACN	70	0,36 ± 3,35×10 ⁻³	1,40×10 ⁻² ± 3,50×10 ⁻³	30,00 ± 6,47	4,91×10 ⁻³ ± 9,43×10 ⁻⁴	80,63 ± 15,82	0,87 ± 5,50×10 ⁻²
		95	1,05 ± 1,27×10 ⁻²	9,43×10 ⁻³ ± 6,43×10 ⁻⁴	123,30 ± 7,60	2,14×10 ⁻³ ± 1,70×10 ⁻³	570,60 ± 467,40	0,62 ± 0,12
	MeOH	70	0,75 ± 6,63×10 ⁻³	6,75×10 ⁻³ ± 3,31×10 ⁻⁸	119,70 ± 5,45×10 ⁻⁴	1,60×10 ⁻² ± 4,90×10 ⁻³	50,00 ± 15,90	1,02 ± 2,50×10 ⁻¹
		95	0,72 ± 6,34×10 ⁻³	6,75×10 ⁻³ ± 3,31×10 ⁻⁸	114,72 ± 5,23×10 ⁻⁴	1,89×10 ⁻² ± 6,50×10 ⁻³	40,00 ± 14,21	1,01 ± 3,44×10 ⁻¹
Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma bi-Langmuira					
			K ₁ (dm ³ /g)	q _{s1} (g/dm ³)	K ₂ (dm ³ /g)	q _{s2} (g/dm ³)		
FENOL	ACN	70	5,77×10 ⁻⁴ ± 2,50×10 ⁻²	130,00 ± 4,09×10 ³	1,33×10 ⁻³ ± 4,70×10 ⁻²	37,99 ± 5,80×10 ³		
		95	3,14×10 ⁻⁴ ± 15,90×10 ⁻²	724,75 ± 8,82×10 ³	1,22×10 ⁻³ ± 1,10×10 ⁻²	321,26 ± 10,08×10 ³		
	MeOH	70	3,46×10 ⁻¹ ± 8,80×10 ⁻⁵	168,50 ± 1,13×10 ⁻⁴	8,80×10 ⁻⁴ ± 5,33×10 ⁻⁷	41,00 ± 0,02		
		95	5,92×10 ⁻⁴ ± 1,80×10 ⁻¹	436,00 ± 1,60×10 ⁴	2,15×10 ⁻³ ± 3,60×10 ⁻¹	10,00 ± 8,80×10 ⁵		
KOFEINA	ACN	70	2,38×10 ⁻³ ± 0,42	63,62 ± 4,02×10 ³	1,05×10 ⁻² ± 0,32	79,92 ± 4,50×10 ⁴		
		95	6,75×10 ⁻³ ± 9,90×10 ⁻⁸	164,08 ± 2,05×10 ⁻³	8,60×10 ⁻¹ ± 9,50×10 ⁻⁵	2,50×10 ⁻¹ ± 1,70×10 ⁻⁵		
	MeOH	70	5,17×10 ⁻³ ± 10,12	50,00 ± 7,60×10 ⁴	1,10×10 ⁻² ± 5,33	59,85 ± 1,02×10 ⁵		
		95	6,98×10 ⁻³ ± 51,52	57,42 ± 2,60×10 ⁻⁶	8,68×10 ⁻³ ± 41,54	50,00 ± 2,68×10 ⁻⁶		

Tabela 5.10. Analiza statystyczna: wartości SUM, SD, testu Fishera dla modeli izoterm adsorpcji w kolumnie Shodex SILICA 5NH 4D

Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma liniowa		
			SUM	SD	F _{test}
FENOL	ACN	70	0,40	0,14	$5,80 \times 10^4$
		95	9,94	0,72	$5,60 \times 10^4$
	MeOH	70	18,58	0,99	$1,10 \times 10^4$
		95	4,48	0,48	$5,80 \times 10^4$
KOFEINA	ACN	70	0,08	0,06	$5,05 \times 10^4$
		95	1,20	0,24	$2,90 \times 10^4$
	MeOH	70	0,32	0,12	$5,60 \times 10^4$
		95	0,30	0,12	$5,60 \times 10^4$
Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma Langmuira		
			SUM	SD	F _{test}
FENOL	ACN	70	$1,70 \times 10^{-11}$	$9,72 \times 10^{-7}$	$6,41 \times 10^{14}$
		95	6,75	0,61	$3,90 \times 10^4$
	MeOH	70	1,73	$3,10 \times 10^{-1}$	$5,60 \times 10^4$
		95	$1,91 \times 10^{-10}$	$3,25 \times 10^{-6}$	$6,41 \times 10^{14}$
KOFEINA	ACN	70	$6,30 \times 10^{-2}$	$5,70 \times 10^{-2}$	$3,20 \times 10^4$
		95	$2,10 \times 10^{-2}$	$3,30 \times 10^{-2}$	$81,62 \times 10^4$
	MeOH	70	$3,06 \times 10^{-11}$	$1,27 \times 10^{-6}$	$2,82 \times 10^{14}$
		95	$2,81 \times 10^{-11}$	$1,22 \times 10^{-6}$	$2,82 \times 10^{14}$

Tabela 5.10. c.d. Analiza statystyczna: wartości SUM, SD, testu Fishera dla modeli izoterm adsorpcji w kolumnie Shodex SILICA 5NH 4D

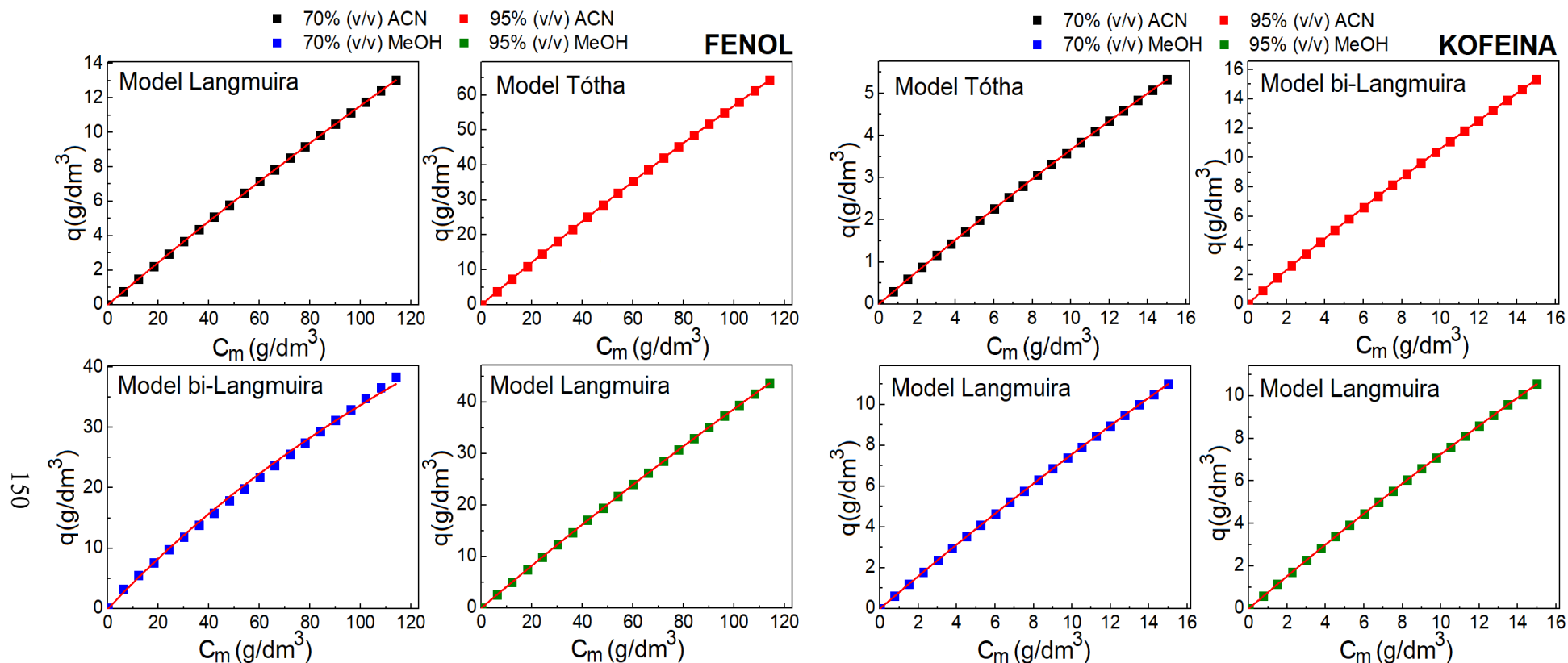
Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma Tótha		
			SUM	SD	F _{test}
FENOL	ACN	70	$1,77 \times 10^{-1}$	$1,02 \times 10^{-1}$	$3,86 \times 10^4$
		95	$3,57 \times 10^{-4}$	$4,60 \times 10^{-3}$	$4,68 \times 10^8$
	MeOH	70	$0,13 \times 10^{-1}$	$2,75 \times 10^{-1}$	$4,80 \times 10^5$
		95	$3,65 \times 10^{-4}$	$4,60 \times 10^{-3}$	$2,11 \times 10^8$
KOFEINA	ACN	70	$4,32 \times 10^{-5}$	$1,55 \times 10^{-3}$	$2,96 \times 10^7$
		95	$4,01 \times 10^{-3}$	$1,40 \times 10^{-2}$	$2,66 \times 10^6$
	MeOH	70	$2,20 \times 10^{-3}$	$1,10 \times 10^{-2}$	$2,45 \times 10^6$
		95	$3,47 \times 10^{-3}$	$1,38 \times 10^{-2}$	$1,44 \times 10^6$
Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma bi-Langmuira		
			SUM	SD	F _{test}
FENOL	ACN	70	$5,68 \times 10^{-5}$	$1,80 \times 10^{-3}$	$8,50 \times 10^7$
		95	$4,57 \times 10^{-4}$	$5,35 \times 10^{-3}$	$2,58 \times 10^8$
	MeOH	70	$4,43 \times 10^{-9}$	$1,66 \times 10^{-5}$	$9,80 \times 10^{12}$
		95	$4,60 \times 10^{-2}$	$1,70 \times 10^{-2}$	$1,20 \times 10^5$
KOFEINA	ACN	70	$9,30 \times 10^{-5}$	$2,34 \times 10^{-5}$	$9,73 \times 10^6$
		95	$2,41 \times 10^{-11}$	$1,19 \times 10^{-6}$	$3,13 \times 10^{14}$
	MeOH	70	$4,08 \times 10^{-2}$	$4,80 \times 10^{-2}$	$9,40 \times 10^4$
		95	$9,37 \times 10^{-3}$	$2,34 \times 10^{-2}$	$3,80 \times 10^5$

Tabela 5.11. Porównanie analizowanych modeli izoterm adsorpcji w oparciu o wartości stosunku testów Fishera w kolumnie Shodex SILICA 5NH 4D

Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		bi-Langmuir vs Langmuir			Tóth vs Langmuir		
			$F_{N-16,N-18,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-l_i,N-l_j}$	$F_{N-17,N-18,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-l_i,N-l_j}$
FENOL	ACN	70	2,25	$1,33 \times 10^{-7}$	fałsz	2,23	$6,02 \times 10^{-11}$	fałsz
		95	2,25	$6,62 \times 10^3$	prawda	2,23	$12,00 \times 10^3$	prawda
	MeOH	70	2,25	$1,75 \times 10^8$	prawda	2,23	8,57	prawda
		95	2,25	$1,87 \times 10^{-10}$	fałsz	2,23	$3,30 \times 10^{-7}$	fałsz
Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		bi-Langmuir vs Langmuir			Tóth vs Langmuir		
			$F_{N-17,N-19,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-l_i,N-l_j}$	$F_{N-18,N-19,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-l_i,N-l_j}$
KOFEINA	ACN	70	2,20	304,06	prawda	2,18	925,00	prawda
		95	2,20	$3,83 \times 10^8$	prawda	2,18	32,60	prawda
	MeOH	70	2,20	$3,33 \times 10^{-10}$	fałsz	2,18	$8,70 \times 10^{-9}$	fałsz
		95	2,20	$1,35 \times 10^{-9}$	fałsz	2,18	$5,11 \times 10^{-9}$	fałsz

Tabela 5.12. Porównanie analizowanych modeli izoterm adsorpcji (heterogenicznych) w oparciu o wartości stosunku testów Fishera w kolumnie Shodex SILICA 5NH 4D

Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		bi-Langmuir vs Tóth		
			$F_{N-16,N-17,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-l_i,N-l_j}$
FENOL	ACN	95	2,29	0,55	fałsz
	MeOH	70	2,29	$2,04 \times 10^7$	prawda
Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		$F_{N-17,N-18,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-l_i,N-l_j}$
KOFEINA	ACN	70	2,23	0,33	fałsz
	ACN	95	2,23	$1,17 \times 10^8$	prawda



Rysunek 5.14. Dopasowanie najbardziej adekwatnych modeli izoterm adsorpcji do danych doświadczalnych dla fenolu i kofeiny w różnych składach eluentów w kolumnie Shodex SILICA 5NH 4D

V.1.4.5. Podsumowanie

Analiza równowag adsorpcyjnych w kolumnach chromatograficznych Hypersil GOLD HILIC oraz Shodex SILICA 5NH 4D wskazuje, że heterogeniczność energetyczna powierzchni fazy stacjonarnej zależy od składu fazy ruchomej, rodzaju fazy stacjonarnej oraz właściwości analitu. W obu przypadkach dominują centra niskoenergetyczne, odpowiedzialne za główny mechanizm sorpcji, jednak w wybranych układach ujawniają się dodatkowe miejsca wysokoenergetyczne zdolne do silniejszych oddziaływań.

W kolumnie Hypersil GOLD HILIC fenol wykazuje heterogeniczność w układzie 95:5 (v/v) ACN:H₂O, a kofeina w układzie 70:30 (v/v) ACN:H₂O natomiast w pozostałych warunkach powierzchnia fazy stacjonarnej wykazuje jednorodność energetyczną. W kolumnie Shodex SILICA 5NH 4D dodatkowe centra aktywne występują dla fenolu w układach 95:5 (v/v) ACN:H₂O oraz 70:30 (v/v) MeOH:H₂O, a dla kofeiny w układach zawierających acetonitryl. W praktycznej interpretacji izoterm adsorpcji wybór odpowiedniego modelu zależy od charakteru powierzchni fazy stacjonarnej. Liniowy przebieg zależności Scatcharda oraz rozkład energii adsorpcji wskazujący na dominację jednego rodzaju centrów aktywnych świadczą o jednorodnej energetycznie powierzchni fazy stacjonarnej. W takich warunkach model Langmuira jest wystarczający i poprawnie opisuje proces adsorpcji. Natomiast, gdy zależności Scatcharda są nieliniowe oraz występuje wiele centrów aktywnych o zróżnicowanej energii oddziaływań, powierzchnia fazy stacjonarnej wykazuje heterogeniczność energetyczną. W takich warunkach model Langmuira nie zapewnia odpowiedniego opisu procesu, a bardziej adekwatne stają się modele uwzględniające heterogeniczność powierzchni fazy stacjonarnej, takie jak izoterma bi-Langmuira oraz model Tótha.

V.1.5. Analiza równowagi adsorpcyjnej wybranych adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych w oparciu o metodę statyczną

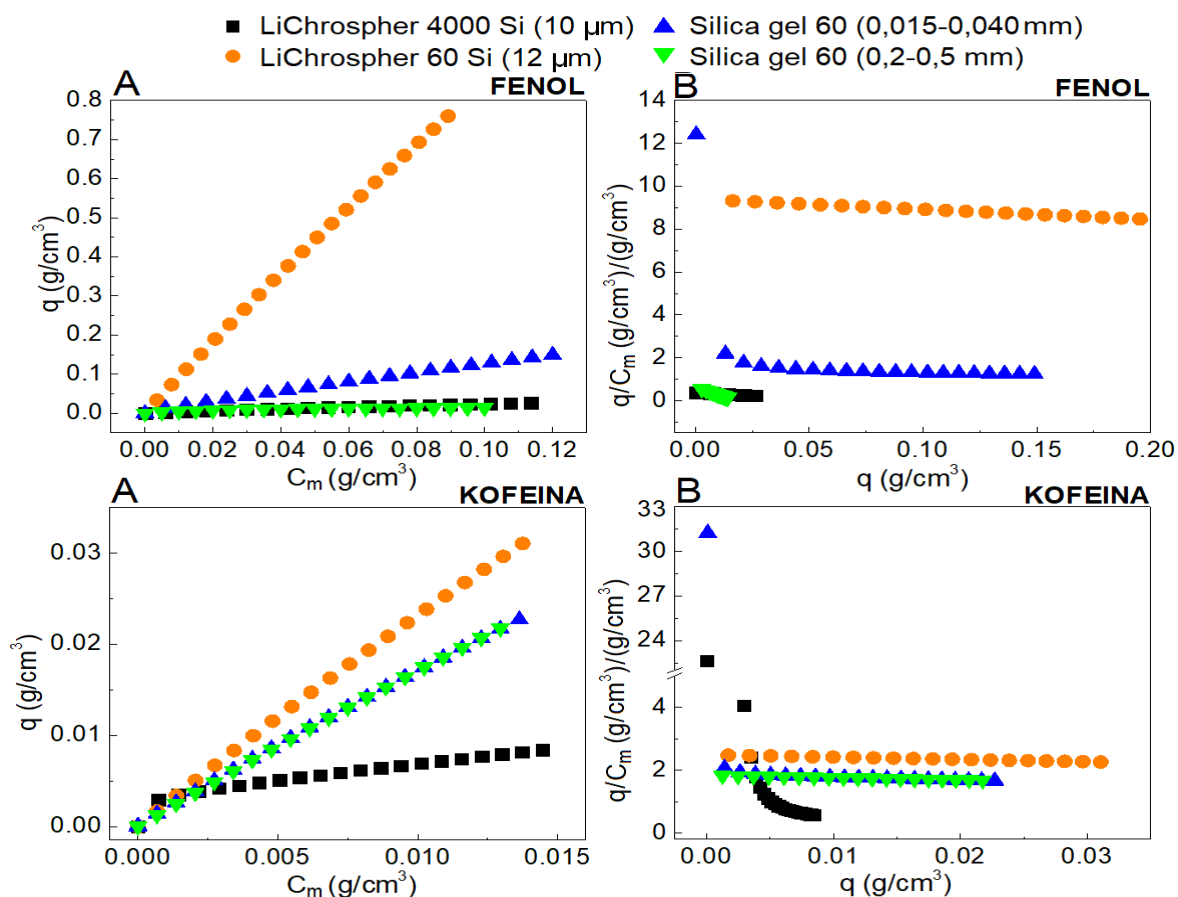
V.1.5.1. Adsorbenty komercyjne

Badania równowagi adsorpcyjnej dla komercyjnych adsorbentów przeprowadzono z wykorzystaniem substancji testowych: fenolu i kofeiny. Analizę wykonano w układach zawierających 95:5 (v/v) ACN:H₂O (rys. 5.15 A i B i 5.16) oraz 95:5 (v/v) MeOH:H₂O (rys. 5.17 A i B i 5.18) dla czterech wybranych adsorbentów komercyjnych: LiChrospher 4000 Si (10 µm), LiChrospher 60 Si (12 µm), Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) oraz Silica gel 60 (0,2–0,5 mm). Dla fenolu dla składu fazy ruchomej 95:5 (v/v) ACN:H₂O uzyskane wyniki wskazują, że spośród badanych adsorbentów komercyjnych jedynie Silica gel 60

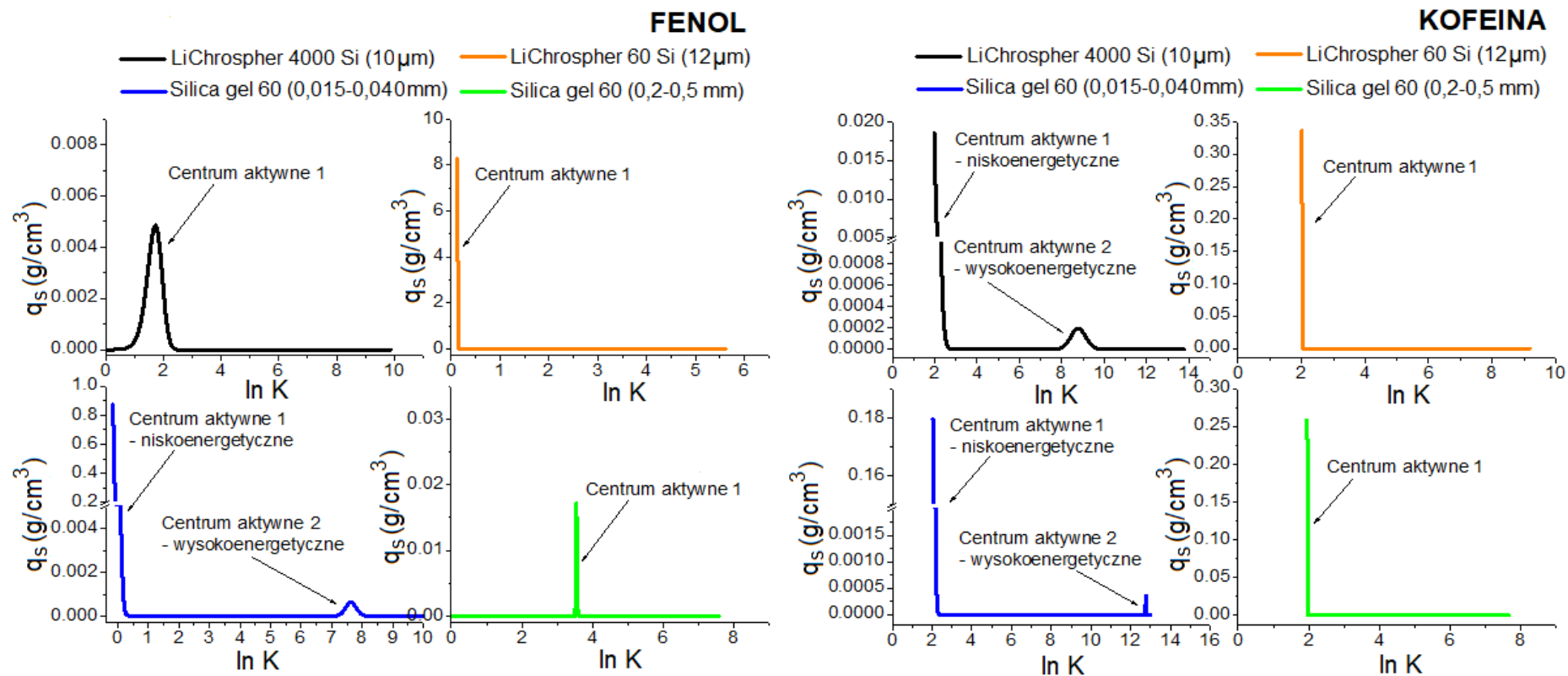
(0,015–0,040 mm) wykazuje cechy heterogeniczności energetycznej powierzchni. Zależność Scatcharda (rys. 5.15 B) dla tych warunków ma charakter nieliniowy, co wskazuje na zróżnicowaną energię oddziaływań fenolu z powierzchnią adsorbentu. Dodatkowo analiza rozkładu energii adsorpcji ujawniła obecność dwóch wyraźnie rozdzielonych rodzajów miejsc adsorpcyjnych różniących się energią oddziaływań, co potwierdza heterogeniczny energetycznie charakter badanego adsorbentu. Dla pozostałych trzech adsorbentów komercyjnych zależności Scatcharda są liniowe, a rozkład energii adsorpcji wskazuje na obecność pojedynczego centrum aktywnego, co wskazuje na jednorodny energetycznie charakter powierzchni adsorbentów. W analizowanych warunkach chromatograficznych największą pojemność sorpcyjną względem fenolu (rys. 5.16) wykazuje adsorbent LiChrospher 60 Si (12 μm), natomiast najmniejszą adsorbent LiChrospher 4000 Si (10 μm). Oznacza to, że adsorbent LiChrospher 60 Si (12 μm) może dysponować większą liczbą dostępnych miejsc adsorpcyjnych lub charakteryzuje się bardziej korzystnymi właściwościami powierzchniowymi dla adsorpcji fenolu. Wyższa pojemność sorpcyjna może wynikać z większej powierzchni właściwej oraz lepszej dostępności centrów aktywnych. Z kolei niższa pojemność sorpcyjna adsorbentu LiChrospher 4000 Si (10 μm) wskazuje na mniejszą dostępność miejsc adsorpcyjnych.

Dla kofeiny w układzie 95:5 (v/v) ACN:H₂O zaobserwowano istotne różnice w rozkładach energii adsorpcji badanych adsorbentów komercyjnych. Dla adsorbentów LiChrospher 4000 Si (10 μm) oraz Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) zaobserwowano wyraźną heterogeniczność energetyczną powierzchni. Potwierdza to nieliniowa zależność Scatcharda (rys. 5.15 B) oraz analiza rozkładu energii adsorpcji, wskazująca na obecność więcej niż jednego rodzaju centrów aktywnych (rys. 5.16). W przypadku adsorbentu Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) miejsca o najwyższej energii adsorpcji wykazują wyraźnie większe wartości $\ln K$ dla kofeiny (około 13) niż dla fenolu (około 7,5), co wskazuje na silniejsze oddziaływania adsorpcyjne kofeiny z powierzchnią adsorbentu. Natomiast adsorbenty LiChrospher 60 Si (12 μm) oraz Silica gel 60 (0,2–0,5 mm) wykazują jednorodność energetyczną powierzchni. W ich przypadku zależność Scatcharda ma charakter liniowy, a rozkład energii adsorpcji wskazuje na obecność jednego rodzaju centrów aktywnych. W analizowanych warunkach najwyższą pojemność sorpcyjną względem kofeiny wykazuje adsorbent LiChrospher 60 Si (12 μm), natomiast najniższą adsorbent LiChrospher 4000 Si (10 μm). Podobnie jak w przypadku fenolu może świadczyć to o bardziej korzystnych właściwościach powierzchniowych adsorbentu LiChrospher 60 Si (12 μm), sprzyjających efektywnemu zatrzymywaniu większej ilości analitu. Natomiast niższa pojemność sorpcyjna

adsorbentu LiChrospher 4000 Si (10 μm) może być związana z mniejszą dostępnością miejsc adsorpcyjnych, ograniczoną dostępnością porów lub mniejszą powierzchnią właściwą adsorbentu.



Rysunek 5.15. Izotermy adsorpcji wyznaczone doświadczalnie (A) oraz zależności Scatcharda (B) dla fenolu i kofeiny dla adsorbentów komercyjnych w składzie eluentu 95:5 (v/v) ACN:H₂O

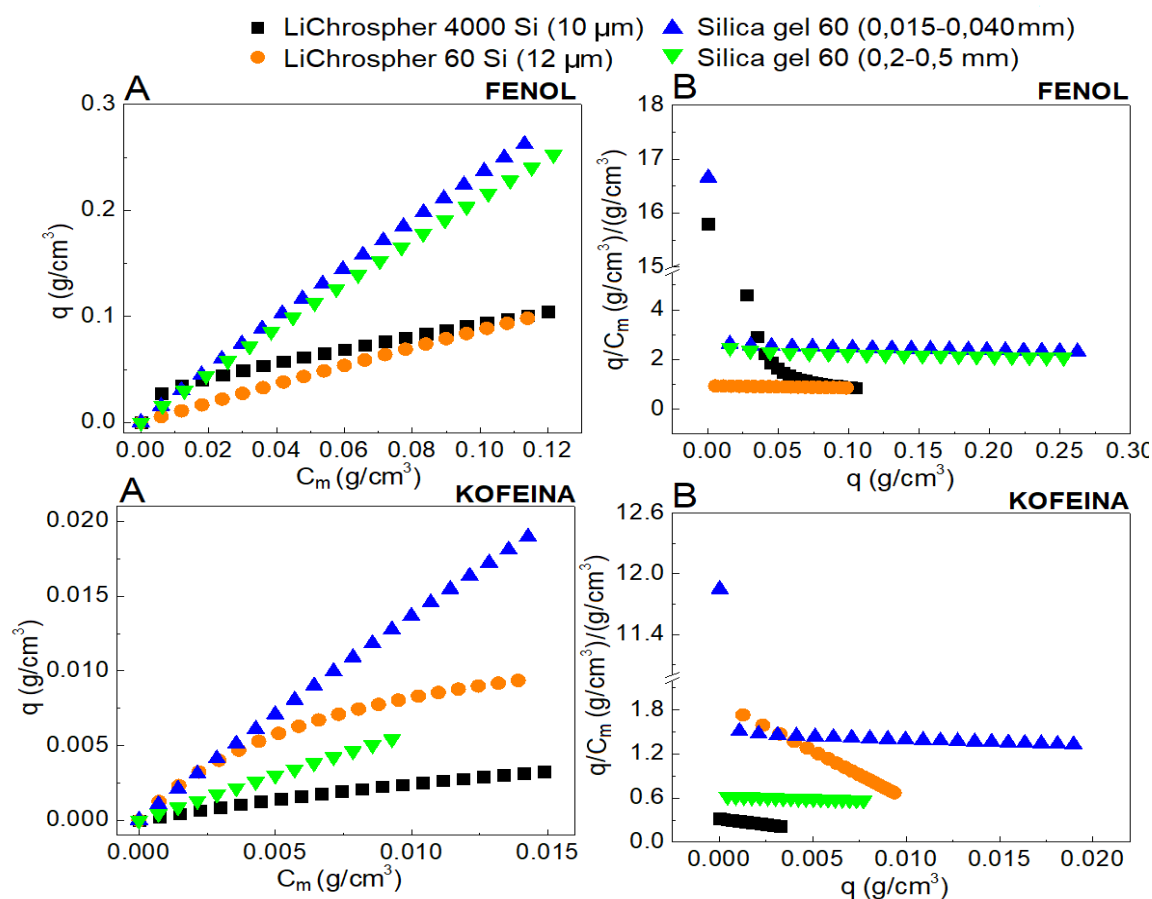


Rysunek 5.16. Rozkład energii adsorpcji dla adsorbentów komercyjnych dla fenolu i kofeiny w składzie eluentu 95:5 (v/v) ACN:H₂O

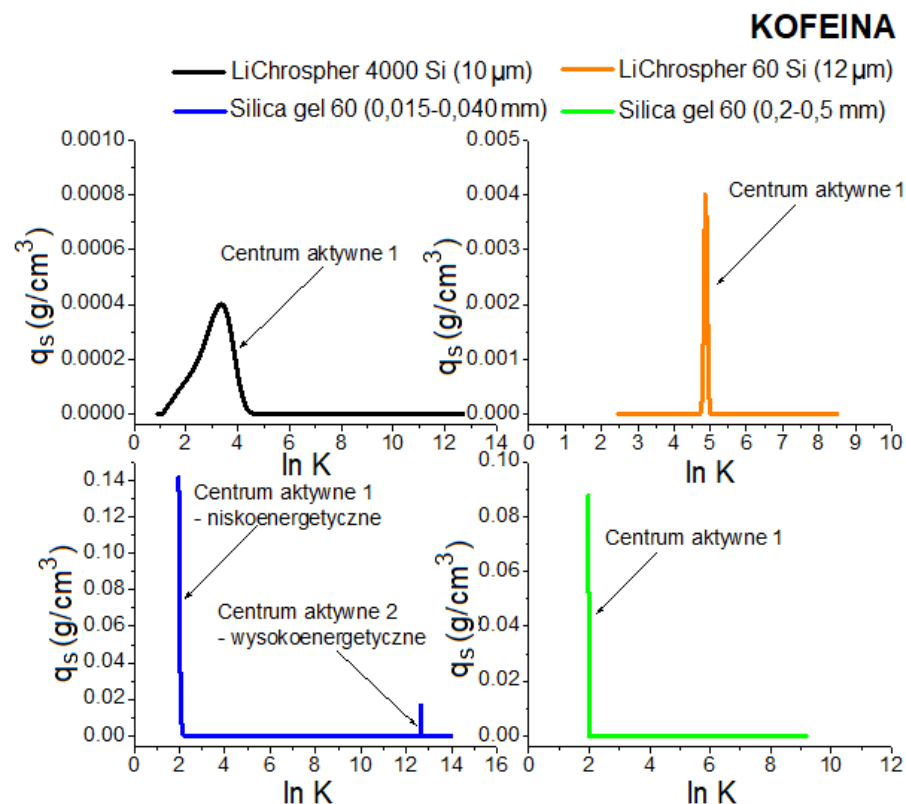
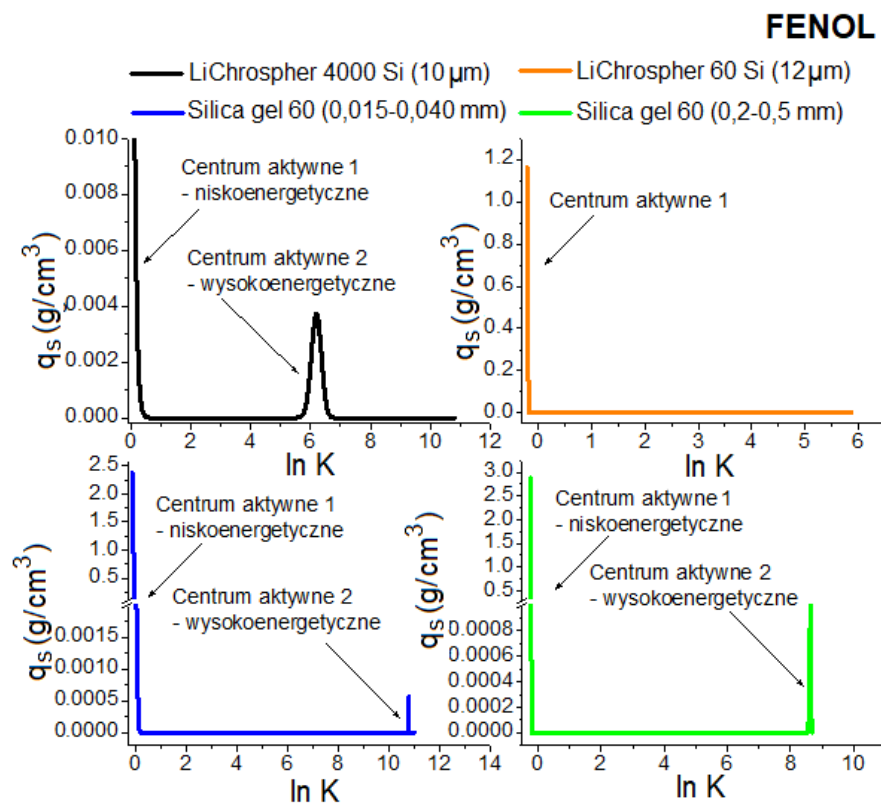
Analiza adsorpcji fenolu w układzie zawierającym 95:5 (v/v) MeOH:H₂O na badanych adsorbentach komercyjnych wykazała istotne różnice zarówno w pojemności sorpcyjnej, jak i charakterystyce energetycznej powierzchni. Dla adsorbentów LiChrospher 4000 Si (10 µm), Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) oraz Silica gel 60 (0,2–0,5 mm) zaobserwowano heterogeniczność energetyczną powierzchni. Potwierdzają to nieliniowe zależności Scatcharda (rys. 5.17 B) oraz rozkłady energii adsorpcji (rys. 5.18) wskazujące na obecność więcej niż jednego rodzaju centrów aktywnych. Wśród analizowanych adsorbentów Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) wykazuje największy udział centrów wysokoenergetycznych, co znajduje odzwierciedlenie w wyraźnie nieliniowym przebiegu zależności Scatcharda. Oznacza to, że oddziaływania między fenolem a powierzchnią tego adsorbentu są silniejsze niż w przypadku pozostałych badanych adsorbentów. Odmienny charakter powierzchni wykazuje adsorbent LiChrospher 60 Si (12 µm), dla którego zależność Scatcharda jest zbliżona do liniowej. Sugeruje to stosunkowo jednorodny energetycznie rozkład energii centrów adsorpcyjnych. W warunkach 95:5 (v/v) MeOH:H₂O najwyższą pojemność sorpcyjną względem fenolu wykazuje adsorbent Silica gel 60 (0,2–0,5 mm), natomiast najniższą adsorbent LiChrospher 4000 Si (10 µm). Oznacza to, że powierzchnia Silica gel 60 (0,2–0,5 mm) charakteryzuje się większą liczbą efektywnie dostępnych miejsc adsorpcyjnych, podczas gdy dla adsorbentu LiChrospher 4000 Si (10 µm) liczba takich miejsc jest ograniczona.

Dla kofeiny w układzie 95:5 (v/v) MeOH:H₂O, dla adsorbentów LiChrospher 4000 Si (10 µm), LiChrospher 60 Si (12 µm) oraz Silica gel 60 (0,2–0,5 mm), zaobserwowano jednorodny energetycznie charakter powierzchni fazy stacjonarnej. Potwierdzają to liniowe zależności Scatcharda (rys. 5.17 B) oraz rozkłady energii adsorpcji (rys. 5.18), gdzie występuje pojedyncze centrum aktywne. Odmienne właściwości wykazuje adsorbent Silica gel 60 (0,015–0,040 mm), dla którego zaobserwowano heterogeniczność energetyczną powierzchni. Zależność Scatcharda jest nieliniowa, a analiza rozkładu energii adsorpcji wskazuje na obecność więcej niż jednego rodzaju centrów aktywnych. Adsorbent Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) charakteryzuje się wyraźnym udziałem centrów wysokoenergetycznych, co znajduje odzwierciedlenie w silnej nieliniowości zależności Scatcharda. Obecność tych miejsc wskazuje na występowanie centrów adsorpcyjnych o wysokim powinowactwie do kofeiny, co sprzyja adsorpcji tego związku na powierzchni adsorbentu. W warunkach 95:5 (v/v) MeOH:H₂O najwyższą pojemność sorpcyjną względem kofeiny wykazuje adsorbent Silica gel 60 (0,015–0,040 mm), natomiast najniższą LiChrospher 4000 Si (10 µm). Uzyskane doświadczalnie izotermy adsorpcji

wraz z wykresami Scatcharda oraz wyznaczonymi rozkładami energii adsorpcji dostarczają bezpośrednich informacji niezbędnych do wyboru odpowiedniego modelu izotermy adsorpcji. Porównanie jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji omówiono w kolejnym podrozdziale.



Rysunek 5.17. Izotermy adsorpcji wyznaczone doświadczalnie (A) oraz zależności Scatcharda (B) dla fenolu i kofeiny dla adsorbentów komercyjnych w składzie eluentu 95:5 (v/v) MeOH:H₂O



Rysunek 5.18. Rozkład energii adsorpcji dla adsorbentów komercyjnych dla fenolu i kofeiny w składzie eluentu 95:5 (v/v) MeOH:H₂O

V.1.5.2. Porównanie jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji dla adsorbentów komercyjnych

Wyniki przeprowadzonych badań dla fenolu i kofeiny dla faz ruchomych o składzie 95:5 (v/v) ACN:H₂O oraz 95:5 (v/v) MeOH:H₂O zaprezentowano na rysunkach 5.19 i 5.20, na których przedstawiono uzyskane doświadczalnie izoterm adsorpcji wraz z ich dopasowaniem do najbardziej adekwatnego modelu izoterm. Dobór modelu izoterm przeprowadzono na podstawie analizy rozkładu energii adsorpcji oraz oceny jakości dopasowania do danych eksperymentalnych, uwzględniającej wartości parametrów SUM i SD oraz wyniki testu Fishera. Wartości wyestymowanych parametrów modeli przedstawiono w tabeli 5.13, natomiast wyniki analizy statystycznej zamieszczono w tabeli 5.14.

Dla fenolu w układzie zawierającym acetonitryl wyniki AED wskazują na występowanie heterogeniczności energetycznej powierzchni dla adsorbentu Silica gel 60 (0,015–0,040 mm). W takich warunkach modele heterogeniczne, takie jak izoterma bi-Langmuira czy Tótha, zapewniają znacznie lepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych niż klasyczny model Langmuira. Model Tótha (tab. 5.13) potwierdza tę interpretację: wartość parametru ν znacząco odbiega od jedności ($\nu \approx 0,35$), co wskazuje na zróżnicowany rozkład energii adsorpcji. Dodatkowo analiza statystyczna (tab. 5.14) obejmująca porównanie wartości SUM, SD oraz testu Fishera potwierdza przewagę modeli heterogenicznych nad modelem Langmuira w opisie tego układu. Niższe wartości SUM i SD oraz wyższe wartości testu Fishera uzyskane dla modeli bi-Langmuira i Tótha wskazują na ich zdecydowanie lepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych. Pozostałe adsorbenty komercyjne wykazują jednorodność energetyczną powierzchni. W tych układach model Langmuira zapewnia najlepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych, co potwierdza analiza statystyczna (tab. 5.14). Dodatkowo wartość parametru ν w modelu Tótha dla tych adsorbentów jest bliski jedności. Porównanie jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji przeprowadzono również w oparciu o wartości stosunku testów Fishera dla dwóch modeli, zgodnie z równaniami (4.4) i (4.5). Uzyskane wyniki statystyczne, przedstawione w tabelach 5.15 i 5.16, wskazują, że dla fenolu warunkach 95:5 (v/v) ACN:H₂O dla adsorbentu Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) model bi-Langmuira zapewnia lepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych niż model Tótha. Natomiast dla adsorbentów wykazujących jednorodność energetyczną powierzchni analiza statystyczna potwierdza lepsze dopasowanie modelu Langmuira.

Dla kofeiny w układzie 95:5 (v/v) ACN:H₂O adsorbenty LiChrospher 4000 Si (10 μ m) oraz Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) zgodnie z wcześniejszymi wynikami analiz

charakteryzują się powierzchnią heterogeniczną energetycznie. Zastosowanie modeli uwzględniających heterogeniczność, takich jak bi-Langmuir oraz Tóth, prowadzi do lepszej zgodności z danymi doświadczalnymi. Potwierdzają to również kryteria statystyczne (tab. 5.14), niższe wartości SUM i SD oraz wyższe wartości testu Fishera w porównaniu z modelem Langmuira. Dodatkowo dla adsorbentu LiChrospher 4000 Si (10 μm) parametr ν modelu Tótha (tab. 5.13) wynosi 0,60, natomiast dla Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) przyjmuje jeszcze niższą wartość 0,49. Tak wyraźne odchylenie od jedności świadczy o heterogeniczności energetycznej powierzchni, a jeszcze niższa wartość parametru ν dla Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) wskazuje dodatkowo na większe zróżnicowanie centrów aktywnych i szerszy rozkład energii adsorpcji. Pozostałe adsorbenty komercyjne badane w tych samych warunkach (95:5 (v/v) ACN:H₂O), wykazują jednorodny energetycznie charakter powierzchni, co potwierdza analiza statystyczna oraz wartości parametru ν modelu Tótha, które są bliskie jedności. Wyestymowane parametry q_s i K (tab. 5.13) mieszczą się w oczekiwanym zakresie i odzwierciedlają odpowiednio pojemność adsorpcyjną oraz powinowactwo adsorbentu do fazy stacjonarnej, co potwierdza zasadność zastosowania modelu Langmuira do opisu danych doświadczalnych. Uzyskane wyniki statystyczne, przedstawione w tabelach 5.15 i 5.16 wskazują, że dla kofeiny w warunkach 95:5 (v/v) ACN:H₂O dla adsorbentu LiChrospher 4000 Si (10 μm) model bi-Langmuira zapewnia lepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych niż model Tótha. Natomiast dla adsorbentu Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) model Tótha zapewnia lepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych niż model bi-Langmuira.

Dla fenolu w układzie 95:5 (v/v) MeOH:H₂O wyniki badań AED wskazują, że adsorbenty komercyjne LiChrospher 4000 Si (10 μm), Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) oraz Silica gel 60 (0,2–0,5 mm) wykazują heterogeniczność energetyczną powierzchni. Dla tych adsorbentów modele bi-Langmuira oraz Tótha odwzorowują dane eksperymentalne znacznie lepiej niż model Langmuira. Dodatkowo potwierdzają to wartości parametru ν modelu Tótha (tab. 5.13), które wynoszą odpowiednio: dla LiChrospher 4000 Si (10 μm) 0,07, dla Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) 0,83 oraz dla Silica gel 60 (0,2–0,5 mm) 0,69. Tak znaczące odchylenia wartości parametru ν od jedności wskazuje na silnie zróżnicowaną energię adsorpcji fenolu z powierzchnią tych adsorbentów oraz konieczność stosowania modeli heterogenicznych w celu poprawnego opisu procesu adsorpcji. Interpretację tę w pełni potwierdza analiza statystyczna (tab. 5.14). Dla modeli bi-Langmuira i Tótha uzyskano niższe wartości SUM i SD oraz wyższe wartości testu Fishera w porównaniu z modelem Langmuira. Natomiast dla adsorbentu LiChrospher 60 Si (12 μm) zgodnie z wcześniejszymi badaniami

zaobserwowano jednorodność energetyczną powierzchni. Potwierdza te obserwacje wartość parametru ν modelu Tótha, który jest bliski jedności. W tych warunkach model Langmuira zapewnia najlepsze dopasowanie do danych doświadczalnych. Zgodnie z analizą statystyczną (tab. 5.15 i tab 5.16) dla fenolu w układzie 95:5 (v/v) MeOH:H₂O dla adsorbentu LiChrospher 4000 Si (10 μ m) model bi-Langmuira zapewnia lepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych niż model Tótha, dla adsorbentu Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) model Tótha zapewnia lepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych niż model bi-Langmuira podobnie dla adsorbentu Silica gel 60 (0,2–0,5 mm) model Tótha zapewnia lepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych niż model bi-Langmuira.

Dla kofeiny w układzie 95:5 (v/v) MeOH:H₂O dla adsorbentu Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) wyniki badań AED wskazują na wyraźną heterogeniczność energetyczną powierzchni. Potwierdzeniem jest również wartość parametru ν modelu Tótha (tab. 5.13), który wynosi 0,84. W takich warunkach modele bi-Langmuira i Tótha zapewniają lepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych. Interpretację tę potwierdza również analiza statystyczna (tab. 5.14), obejmująca wartości SUM, SD oraz testu Fishera, które dla modeli bi-Langmuira i Tótha przyjmują odpowiednio niższe wartości SUM i SD oraz wyższe wartości testu Fishera w porównaniu z modelem Langmuira. Natomiast adsorbenty komercyjne: LiChrospher 4000 Si (10 μ m), LiChrospher 60 Si (12 μ m) oraz Silica gel 60 (0,2–0,5 mm) zgodnie z badaniami AED wykazują jednorodny energetycznie charakter powierzchni. Wartości parametru ν dla tych adsorbentów są bliskie jedności, co uzasadnia lepsze dopasowanie modelu Langmuira do danych eksperymentalnych. Dodatkowo obserwacje te potwierdza analiza statystyczna przedstawiona w tabeli 5.14. Uzyskane wyniki analizy statystycznej przedstawione w tabelach 5.15 i 5.16 wskazują, że dla kofeiny w warunkach 95:5 (v/v) MeOH:H₂O dla adsorbentu Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) model bi-Langmuira zapewnia lepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych niż model Tótha.

Tabela 5.13. Wartości wyestymowanych parametrów modeli izoterm adsorpcji wraz z przedziałami ufności dla adsorbentów komercyjnych

Adsorbenty komercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma liniowa	Izoterma Langmuira		Izoterma Tótha		
				K (cm ³ /g)	K (cm ³ /g)	q _s (g/cm ³)	K (cm ³ /g)	q _s (g/cm ³)	ν
LiChrospher 4000 Si (10 μm)	FENOL	ACN	95	0,26 ± 1,13 × 10 ⁻²	5,73 ± 5,72 × 10 ⁻³	0,007 ± 4,7 × 10 ⁻⁵	5,67 ± 2,60 × 10 ⁻²	6,70 × 10 ⁻² ± 3,8 × 10 ⁻⁴	1,00 ± 4,20 × 10 ⁻³
		MeOH	95	1,00 ± 8,80 × 10 ⁻²	17,10 ± 5,45	0,14 ± 2,08 × 10 ⁻²	12,14 ± 33,89	569 ± 2,40 × 10 ³	0,07 ± 29,40
	KOFEINA	ACN	95	0,69 ± 7,74 × 10 ⁻²	252,00 ± 88,94	0,01 ± 2,41 × 10 ⁻²	336,18 ± 273,09	0,014 ± 1,27 × 10 ⁻³	0,60 ± 6,60 × 10 ⁻¹
		MeOH	95	0,24 ± 7,90 × 10 ⁻³	31,60 ± 1,4 × 10 ⁻³	0,01 ± 3,40 × 10 ⁻⁷	31,62 ± 1,01 × 10 ⁻³	0,01 ± 3,80 × 10 ⁻⁷	0,99 ± 2,40 × 10 ⁻⁵
LiChrospher 60 Si (12 μm)	FENOL	ACN	95	8,70 ± 7,60 × 10 ⁻²	1,13 ± 1,33 × 10 ⁻⁶	8,27 ± 9,07 × 10 ⁻⁶	5,54 ± 4,30	1,67 ± 1,36	1,00 ± 3,60 × 10 ⁻¹
		MeOH	95	0,88 ± 7,34 × 10 ⁻³	0,81 ± 1,40 × 10 ⁻⁶	1,16 ± 1,92 × 10 ⁻⁶	0,82 ± 4,90 × 10 ⁻³	1,15 ± 7,04 × 10 ⁻³	1,00 ± 2,17 × 10 ⁻³
	KOFEINA	ACN	95	2,31 ± 2,05 × 10 ⁻²	7,42 ± 1,95 × 10 ⁻⁵	0,33 ± 8,20 × 10 ⁻⁷	7,42 ± 4,16 × 10 ⁻⁵	0,33 ± 1,92 × 10 ⁻⁶	0,99 ± 2,00 × 10 ⁻⁶
		MeOH	95	0,81 ± 7,20 × 10 ⁻²	130 ± 1,76 × 10 ⁻²	0,01 ± 9,25 × 10 ⁻⁶	130 ± 1,08 × 10 ⁻³	0,01 ± 2,70 × 10 ⁻⁷	0,99 ± 2,50 × 10 ⁻⁵
Silica gel 60 (0,015-0,040 mm)	FENOL	ACN	95	1,29 ± 2,60 × 10 ⁻²	2,01 ± 4,12 × 10 ⁻¹	0,76 ± 1,31 × 10 ⁻¹	0,06 ± 4,30 × 10 ⁻¹	33,98 ± 2,63 × 10 ²	0,35 ± 4,50 × 10 ⁻¹
		MeOH	95	2,35 ± 2,20 × 10 ⁻²	0,93 ± 2,70 × 10 ⁻²	2,75 ± 7,50 × 10 ⁻²	0,54 ± 1,88 × 10 ⁻¹	4,79 ± 1,70	0,83 ± 8,90 × 10 ⁻²
	KOFEINA	ACN	95	1,71 ± 1,85 × 10 ⁻²	9,45 ± 7,60 × 10 ⁻¹	0,19 ± 1,40 × 10 ⁻²	0,68 ± 1,33	2,95 ± 5,90	0,49 ± 1,80 × 10 ⁻¹
		MeOH	95	1,35 ± 1,26 × 10 ⁻²	7,68 ± 1,90 × 10 ⁻¹	0,19 ± 4,40 × 10 ⁻³	4,66 ± 1,33	0,31 ± 9,30 × 10 ⁻²	0,84 ± 7,60 × 10 ⁻²
Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)	FENOL	ACN	95	0,18 ± 2,20 × 10 ⁻²	34,7 ± 1,04 × 10 ⁻³	0,02 ± 1,90 × 10 ⁻⁷	34,80 ± 3,65 × 10 ⁻⁵	0,02 ± 2,00 × 10 ⁻⁸	0,99 ± 2,50 × 10 ⁻⁶
		MeOH	95	2,12 ± 2,20 × 10 ⁻²	0,95 ± 6,14 × 10 ⁻²	2,43 ± 1,45 × 10 ⁻¹	0,29 ± 2,80 × 10 ⁻¹	8,06 ± 7,82	0,69 ± 1,70 × 10 ⁻¹
	KOFEINA	ACN	95	1,71 ± 1,40 × 10 ⁻²	7,09 ± 1,10 × 10 ⁻⁵	0,26 ± 3,70 × 10 ⁻⁷	7,20 ± 6,00 × 10 ⁻²	0,25 ± 2,17 × 10 ⁻³	1,00 ± 3,03 × 10 ⁻³
		MeOH	95	0,59 ± 4,50 × 10 ⁻³	7,07 ± 2,10 × 10 ⁻¹	0,08 ± 2,60 × 10 ⁻³	14,50 ± 7,40 × 10 ¹	0,04 ± 2,27 × 10 ⁻¹	1,00 ± 2,33

Tabela 5.13. c.d. Wartości wyestymowanych parametrów modeli izoterm adsorpcji wraz z przedziałami ufności dla adsorbentów komercyjnych

Adsorbenty komercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma bi-Langmuira			
				K_1 (cm ³ /g)	q_{s1} (g/cm ³)	K_2 (cm ³ /g)	q_{s1} (g/cm ³)
LiChrospher 4000 Si (10 µm)	FENOL	ACN	95	$5,66 \pm 4,60 \times 10^4$	$3,30 \pm 2,14 \times 10^2$	$5,66 \pm 4,40 \times 10^4$	$3,40 \pm 2,40 \times 10^2$
		MeOH	95	$481,00 \pm 1,58 \times 10^{-2}$	$0,03 \pm 2,30 \times 10^{-7}$	$0,85 \pm 5,70 \times 10^{-5}$	$0,79 \pm 4,67 \times 10^{-5}$
	KOFEINA	ACN	95	$6056,00 \pm 3,80 \times 10^2$	$0,003 \pm 3,30 \times 10^{-6}$	$7,18 \pm 0,10$	$0,05 \pm 6,80 \times 10^{-4}$
		MeOH	95	$31,67 \pm 1,70 \times 10^{-2}$	$0,01 \pm 1,30 \times 10^{-5}$	$0,36 \pm 12,44$	$5,90 \times 10^{-4} \pm 1,90 \times 10^{-2}$
LiChrospher 60 Si (12 µm)	FENOL	ACN	95	$2,49 \pm 1,27 \times 10^5$	$2,00 \pm 4,90 \times 10^6$	$2,49 \pm 1,27 \times 10^5$	$2,00 \pm 4,90 \times 10^6$
		MeOH	95	$6,79 \pm 1,30 \times 10^6$	$0,12 \pm 3,40 \times 10^6$	$6,85 \pm 4,90 \times 10^6$	$0,08 \pm 3,40 \times 10^6$
	KOFEINA	ACN	95	$108,00 \pm 7,26 \times 10^6$	$0,02 \pm 3,60 \times 10^5$	$108,00 \pm 7,20 \times 10^6$	$0,02 \pm 3,60 \times 10^5$
		MeOH	95	$131,00 \pm 2,40 \times 10^{-1}$	$0,014 \pm 1,10 \times 10^{-4}$	$72,00 \pm 25,70$	$1,28 \times 10^{-4} \pm 1,09 \times 10^{-4}$
Silica gel 60 (0,015-0,040 mm)	FENOL	ACN	95	$0,85 \pm 2,15 \times 10^{-5}$	$1,55 \pm 3,50 \times 10^{-5}$	$2055,00 \pm 5,50 \times 10^{-1}$	$5,00 \times 10^{-3} \pm 1,20 \times 10^{-7}$
		MeOH	95	$0,26 \pm 0,43 \times 10^2$	$4,55 \pm 4,26 \times 10^2$	$1,63 \pm 0,50 \times 10^2$	$0,83 \pm 0,78 \times 10^2$
	KOFEINA	ACN	95	$18,80 \pm 1,50 \times 10^5$	$0,05 \pm 3,80 \times 10^3$	$22,57 \pm 1,30 \times 10^5$	$0,05 \pm 3,90 \times 10^3$
		MeOH	95	$1,98 \pm 3,58 \times 10^2$	$0,31 \pm 3,20 \times 10^1$	$12,62 \pm 3,30 \times 10^2$	$0,07 \pm 5,55$
Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)	FENOL	ACN	95	$34,90 \pm 8,50 \times 10^{-2}$	$0,02 \pm 1,20 \times 10^{-3}$	$32,44 \pm 0,11 \times 10^{-1}$	$1,40 \times 10^{-3} \pm 1,20 \times 10^{-3}$
		MeOH	95	$0,35 \pm 8,31 \times 10^{-1}$	$5,74 \pm 11,87$	$13,59 \pm 28,12$	$0,03 \pm 9,50 \times 10^{-2}$
	KOFEINA	ACN	95	$20,50 \pm 5,70 \times 10^4$	$0,05 \pm 1,10 \times 10^5$	$20,40 \pm 2,80 \times 10^5$	$0,05 \pm 1,10 \times 10^5$
		MeOH	95	$1,96 \pm 3,60 \times 10^3$	$0,08 \pm 6,60 \times 10^1$	$9,14 \pm 1,50 \times 10^3$	$0,05 \pm 2,80 \times 10^1$

Tabela 5.14. Analiza statystyczna: wartości SUM, SD, testu Fishera dla modeli izoterm adsorpcji dla adsorbentów komercyjnych

Adsorbenty komercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma liniowa		
				SUM	SD	F _{test}
LiChrospher 4000 Si (10 µm)	FENOL	ACN	95	$4,22 \times 10^{-5}$	$1,49 \times 10^{-3}$	$2,33 \times 10^3$
		MeOH	95	$3,93 \times 10^{-3}$	$1,36 \times 10^{-2}$	$5,53 \times 10^2$
	KOFEINA	ACN	95	$4,36 \times 10^{-5}$	$1,44 \times 10^{-3}$	$3,44 \times 10^2$
		MeOH	95	$4,90 \times 10^{-7}$	$1,50 \times 10^{-4}$	$3,80 \times 10^3$
LiChrospher 60 Si (12 µm)	FENOL	ACN	95	$1,60 \times 10^{-3}$	$8,90 \times 10^{-3}$	$5,60 \times 10^4$
		MeOH	95	$2,08 \times 10^{-5}$	$1,05 \times 10^{-3}$	$6,30 \times 10^4$
	KOFEINA	ACN	95	$2,63 \times 10^{-6}$	$3,62 \times 10^{-4}$	$5,50 \times 10^4$
		MeOH	95	$3,01 \times 10^{-5}$	$1,26 \times 10^{-3}$	$5,51 \times 10^2$
Silica gel 60 (0,015-0,040 mm)	FENOL	ACN	95	$3,40 \times 10^{-4}$	$4,03 \times 10^{-3}$	$1,06 \times 10^4$
		MeOH	95	$1,90 \times 10^{-4}$	$3,09 \times 10^{-3}$	$5,20 \times 10^4$
	KOFEINA	ACN	95	$2,24 \times 10^{-6}$	$3,26 \times 10^{-4}$	$3,60 \times 10^4$
		MeOH	95	$1,12 \times 10^{-6}$	$2,31 \times 10^{-4}$	$5,03 \times 10^4$
Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)	FENOL.	ACN	95	$1,55 \times 10^{-4}$	$2,80 \times 10^{-3}$	$3,07 \times 10^2$
		MeOH	95	$2,11 \times 10^{-4}$	$3,30 \times 10^{-3}$	$4,09 \times 10^4$
	KOFEINA	ACN	95	$1,00 \times 10^{-6}$	$2,30 \times 10^{-4}$	$6,30 \times 10^4$
		MeOH	95	$2,35 \times 10^{-8}$	$4,25 \times 10^{-5}$	$8,12 \times 10^4$

Tabela 5.14. c.d. Analiza statystyczna: wartości SUM, SD, testu Fishera dla modeli izoterm adsorpcji dla adsorbentów komercyjnych

Adsorbenty komercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma Langmuira		
				SUM	SD	F _{test}
LiChrospher 4000 Si (10 µm)	FENOL	ACN	95	$1,02 \times 10^{-10}$	$2,28 \times 10^{-6}$	$4,60 \times 10^8$
		MeOH	95	$5,51 \times 10^{-4}$	$5,25 \times 10^{-3}$	$1,90 \times 10^3$
	KOFEINA	ACN	95	$5,20 \times 10^{-6}$	$5,10 \times 10^{-4}$	$1,40 \times 10^3$
		MeOH	95	$2,90 \times 10^{-15}$	$1,20 \times 10^{-8}$	$3,13 \times 10^{11}$
LiChrospher 60 Si (12 µm)	FENOL	ACN	95	$8,73 \times 10^{-15}$	$2,14 \times 10^{-8}$	$4,89 \times 10^8$
		MeOH	95	$2,43 \times 10^{-16}$	$3,67 \times 10^{-9}$	$2,55 \times 10^{15}$
	KOFEINA	ACN	95	$7,07 \times 10^{-17}$	$1,93 \times 10^{-9}$	$9,72 \times 10^{14}$
		MeOH	95	$7,09 \times 10^{-13}$	$1,98 \times 10^{-7}$	$1,14 \times 10^{10}$
Silica gel 60 (0,015-0,040 mm)	FENOL	ACN	95	$4,56 \times 10^{-5}$	$1,51 \times 10^{-3}$	$3,77 \times 10^4$
		MeOH	95	$6,40 \times 10^{-7}$	$1,83 \times 10^{-4}$	$7,31 \times 10^6$
	KOFEINA	ACN	95	$5,70 \times 10^{-8}$	$5,35 \times 10^{-5}$	$6,80 \times 10^5$
		MeOH	95	$2,96 \times 10^{-9}$	$1,22 \times 10^{-5}$	$9,12 \times 10^6$
Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)	FENOL	ACN	95	$1,20 \times 10^{-13}$	$7,96 \times 10^{-8}$	$2,00 \times 10^{11}$
		MeOH	95	$3,18 \times 10^{-6}$	$4,21 \times 10^{-4}$	$1,29 \times 10^6$
	KOFEINA	ACN	95	$9,10 \times 10^{-19}$	$7,11 \times 10^{-10}$	$3,33 \times 10^{15}$
		MeOH	95	$5,32 \times 10^{-11}$	$2,10 \times 10^{-6}$	$1,65 \times 10^7$

Tabela 5.14. c.d. Analiza statystyczna: wartości SUM, SD, testu Fishera dla modeli izoterm adsorpcji dla adsorbentów komercyjnych

Adsorbenty komercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma Tótha		
				SUM	SD	F _{test}
LiChrospher 4000 Si (10 µm)	FENOL	ACN	95	$5,85 \times 10^{-12}$	$2,40 \times 10^{-6}$	$2,98 \times 10^8$
		MeOH	95	$1,22 \times 10^{-4}$	$2,60 \times 10^{-3}$	$5,27 \times 10^3$
	KOFEINA	ACN	95	$3,27 \times 10^{-6}$	$4,15 \times 10^{-4}$	$1,40 \times 10^4$
		MeOH	95	$4,48 \times 10^{-13}$	$1,53 \times 10^{-6}$	$1,28 \times 10^{10}$
LiChrospher 60 Si (12 µm)	FENOL	ACN	95	$6,11 \times 10^{-4}$	$5,80 \times 10^{-3}$	$4,40 \times 10^4$
		MeOH	95	$1,38 \times 10^{-11}$	$9,03 \times 10^{-7}$	$2,81 \times 10^{10}$
	KOFEINA	ACN	95	$1,71 \times 10^{-14}$	$3,08 \times 10^{-7}$	$2,54 \times 10^{13}$
		MeOH	95	$2,07 \times 10^{-13}$	$1,10 \times 10^{-7}$	$2,47 \times 10^9$
Silica gel 60 (0,015-0,040 mm)	FENOL	ACN	95	$2,01 \times 10^{-5}$	$1,03 \times 10^{-3}$	$5,40 \times 10^5$
		MeOH	95	$2,66 \times 10^{-7}$	$1,22 \times 10^{-4}$	$1,10 \times 10^8$
	KOFEINA	ACN	95	$1,93 \times 10^{-8}$	$3,19 \times 10^{-5}$	$1,27 \times 10^7$
		MeOH	95	$1,21 \times 10^{-11}$	$3,19 \times 10^{-7}$	$1,27 \times 10^8$
Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)	FENOL	ACN	95	$7,22 \times 10^{-17}$	$7,98 \times 10^{-6}$	$1,41 \times 10^7$
		MeOH	95	$1,17 \times 10^{-6}$	$2,62 \times 10^{-4}$	$2,21 \times 10^7$
	KOFEINA	ACN	95	$1,30 \times 10^{-12}$	$2,77 \times 10^{-7}$	$1,45 \times 10^{10}$
		MeOH	95	$2,45 \times 10^{-8}$	$4,72 \times 10^{-5}$	$2,19 \times 10^4$

Tabela 5.14. c.d. Analiza statystyczna: wartości SUM, SD, testu Fishera dla modeli izoterm adsorpcji dla adsorbentów komercyjnych

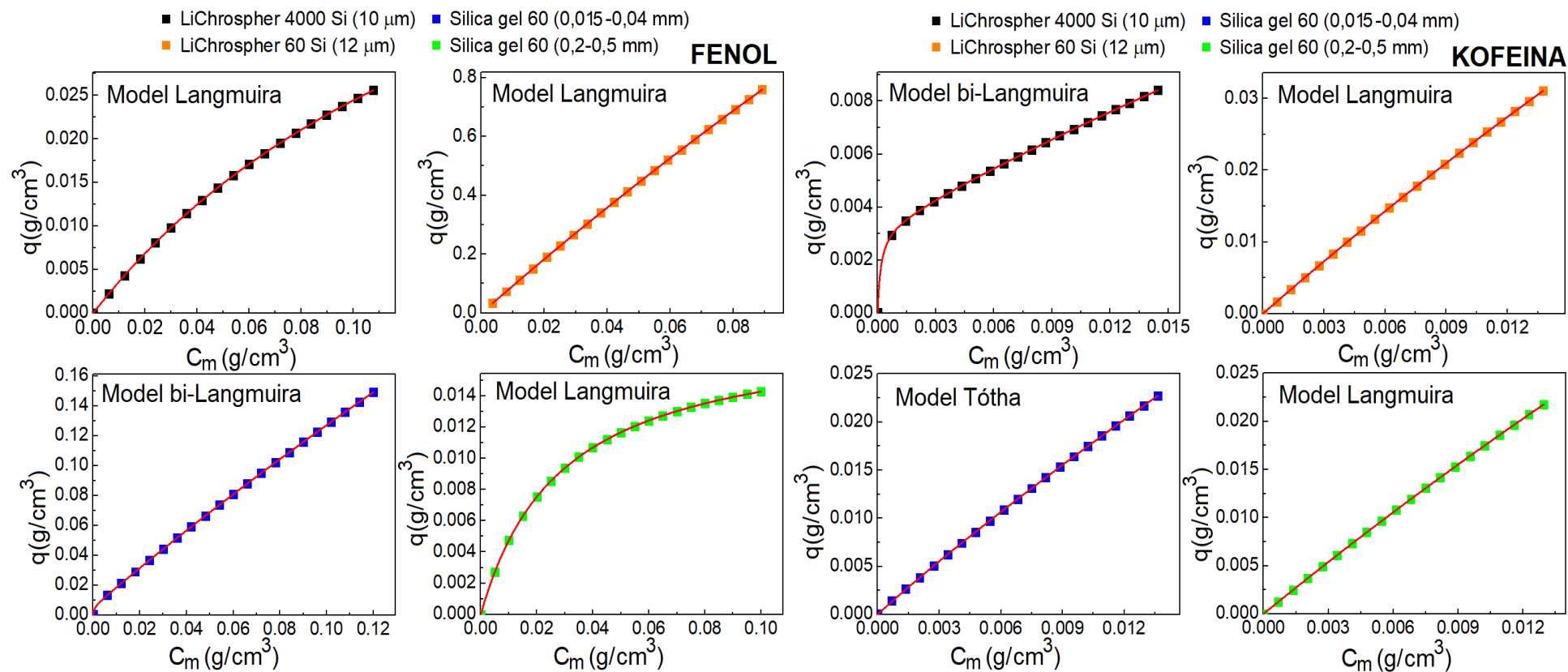
Adsorbenty komercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma bi-Langmuira		
				SUM	SD	F _{test}
LiChropsher 4000 Si (10 µm)	FENOL	ACN	95	$1,02 \times 10^{-10}$	$2,52 \times 10^{-6}$	$2,04 \times 10^8$
		MeOH	95	$2,86 \times 10^{-14}$	$4,10 \times 10^{-8}$	$1,59 \times 10^{13}$
	KOFEINA	ACN	95	$7,58 \times 10^{-12}$	$6,50 \times 10^{-7}$	$4,50 \times 10^8$
		MeOH	95	$2,39 \times 10^{-13}$	$1,10 \times 10^{-6}$	$1,70 \times 10^{10}$
LiChrospher 60 Si (12 µm)	FENOL	ACN	95	$3,16 \times 10^{-3}$	$1,36 \times 10^{-2}$	$6,04 \times 10^3$
		MeOH	95	$5,67 \times 10^{-4}$	$5,95 \times 10^{-3}$	$4,82 \times 10^2$
	KOFEINA	ACN	95	$2,00 \times 10^{-4}$	$3,44 \times 10^{-3}$	$1,48 \times 10^2$
		MeOH	95	$4,50 \times 10^{-13}$	$1,68 \times 10^{-7}$	$7,90 \times 10^9$
Silica gel 60 (0,015-0,040 mm)	FENOL	ACN	95	$3,42 \times 10^{-14}$	$4,36 \times 10^{-8}$	$2,26 \times 10^{13}$
		MeOH	95	$4,90 \times 10^{-7}$	$1,70 \times 10^{-4}$	$4,26 \times 10^7$
	KOFEINA	ACN	95	$2,40 \times 10^{-6}$	$3,65 \times 10^{-4}$	$7,20 \times 10^6$
		MeOH	95	$2,26 \times 10^{-9}$	$1,12 \times 10^{-5}$	$5,37 \times 10^9$
Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)	FENOL	ACN	95	$6,47 \times 10^{-12}$	$6,17 \times 10^{-7}$	$1,66 \times 10^9$
		MeOH	95	$9,66 \times 10^{-7}$	$2,46 \times 10^{-4}$	$1,89 \times 10^7$
	KOFEINA	ACN	95	$2,75 \times 10^{-6}$	$4,14 \times 10^{-4}$	$4,80 \times 10^3$
		MeOH	95	$5,20 \times 10^{-11}$	$2,28 \times 10^{-6}$	$7,06 \times 10^6$

Tabela 5.15. Porównanie analizowanych modeli izoterm adsorpcji w oparciu o wartości stosunku testów Fishera dla adsorbentów komercyjnych

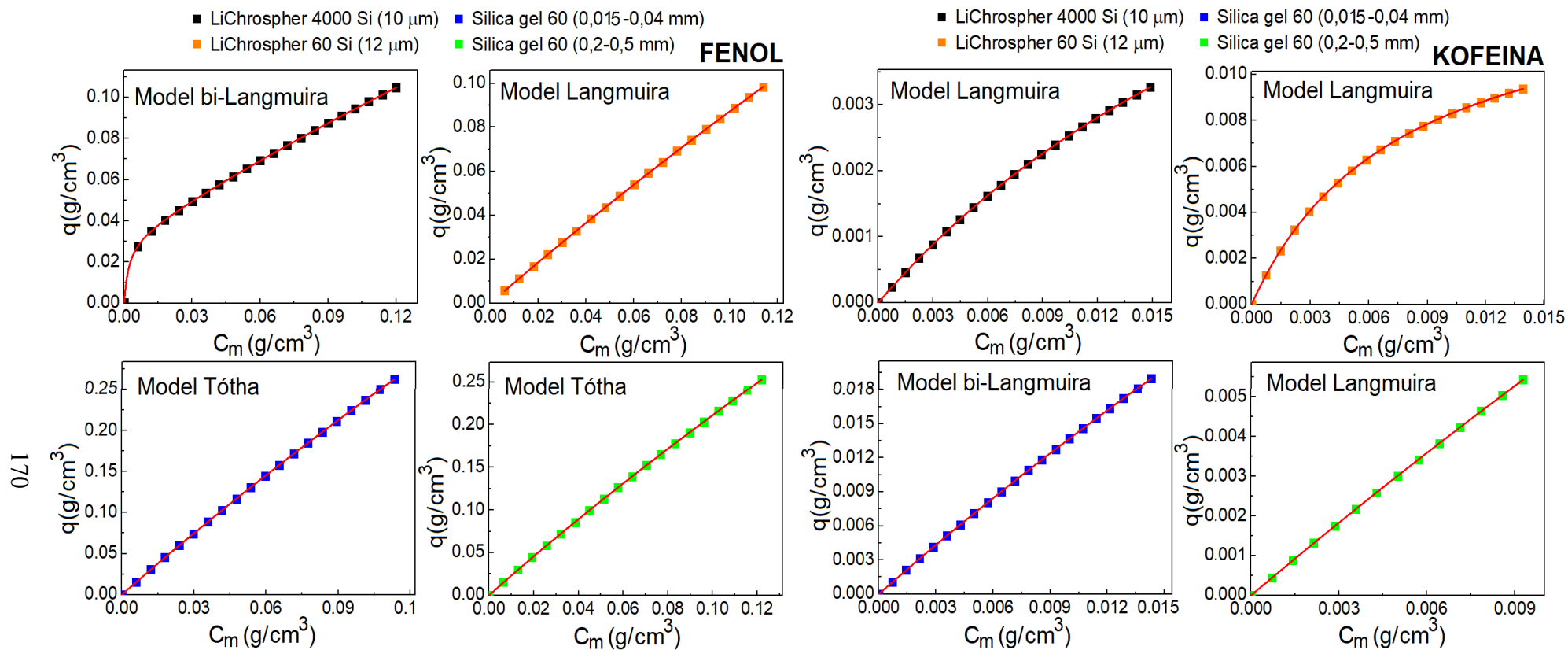
Adsorbenty komercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		bi-Langmuir vs Langmuir			Tóth vs Langmuir		
				$F_{N-i,N-j,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-i,N-j,5\%}$	$F_{N-i,N-j,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-i,N-j,5\%}$
LiChrospher 4000 Si (10 µm)	FENOL	ACN	95	2,20	0,44	fałsz	2,18	0,65	fałsz
		MeOH	95	2,15	$8,37 \times 10^9$	prawda	2,14	2,77	prawda
	KOFEINA	ACN	95	2,15	$3,20 \times 10^5$	prawda	2,14	10,00	prawda
		MeOH	95	2,15	0,05	fałsz	2,14	0,04	fałsz
LiChrospher 60 Si (12 µm)	FENOL	ACN	95	2,20	$1,23 \times 10^{-5}$	fałsz	2,18	$8,99 \times 10^{-5}$	fałsz
		MeOH	95	2,25	$1,89 \times 10^{-13}$	fałsz	2,23	$1,10 \times 10^{-5}$	fałsz
	KOFEINA	ACN	95	2,20	$1,52 \times 10^{-13}$	fałsz	2,18	0,03	fałsz
		MeOH	95	2,25	0,69	fałsz	2,23	0,22	fałsz
Silica gel 60 (0,015-0,040 mm)	FENOL	ACN	95	2,15	$5,99 \times 10^8$	prawda	2,14	14,32	prawda
		MeOH	95	2,20	5,83	prawda	2,18	15,05	prawda
	KOFEINA	ACN	95	2,15	10,59	prawda	2,14	18,67	prawda
		MeOH	95	2,15	$5,88 \times 10^2$	prawda	2,14	13,93	prawda
Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)	FENOL	ACN	95	2,20	$8,30 \times 10^{-3}$	fałsz	2,18	$7,05 \times 10^{-5}$	fałsz
		MeOH	95	2,25	14,65	prawda	2,23	17,13	prawda
	KOFEINA	ACN	95	2,25	$1,44 \times 10^{-12}$	fałsz	2,23	$4,35 \times 10^{-6}$	fałsz
		MeOH	95	2,75	0,43	fałsz	2,72	$1,33 \times 10^{-3}$	fałsz

Tabela 5.16. Porównanie analizowanych modeli izoterm adsorpcji (heterogenicznych) w oparciu o wartości stosunku testów Fishera dla adsorbentów komercyjnych

Adsorbenty komercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH % (v/v)		bi-Langmuir vs Tóth		
				$F_{N-i,N-j,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-i,N-j}$
LiChrospher 4000 Si (10 µm)	FENOL	MeOH	95	2,15	$3,02 \times 10^9$	prawda
	KOFEINA	ACN	95	2,15	$3,22 \times 10^4$	prawda
Silica gel 60 (0,015 -0,040 mm)	FENOL	ACN	95	2,15	$4,18 \times 10^7$	prawda
		MeOH	95	2,20	0,39	fałsz
	KOFEINA	ACN	95	2,15	0,57	fałsz
		MeOH	95	2,15	42,28	prawda
Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)	FENOL	MeOH	95	2,25	0,85	fałsz



Rysunek 5.19. Dopasowanie najbardziej adekwatnych modeli izoterm adsorpcji do danych doświadczalnych dla fenolu i kofeiny z zastosowaniem adsorbentów komercyjnych w składzie eluentu 95:5 (v/v) ACN:H₂O



Rysunek 5.20. Dopasowanie najbardziej adekwatnych modeli izoterm adsorpcji do danych doświadczalnych dla fenolu i kofeiny z zastosowaniem adsorbentów komercyjnych w składzie eluentu 95:5 (v/v) MeOH:H₂O

V.1.5.3. Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazały, że adsorpcja fenolu i kofeiny zależy zarówno od właściwości zastosowanych adsorbentów, jak i od rodzaju fazy ruchomej i badanego analitu. W układach zawierających acetonitryl najwyższą pojemność sorpcyjną względem obu analitów wykazywał adsorbent LiChrospher 60 Si (12 μm), natomiast najniższą LiChrospher 4000 Si (10 μm), co może wskazywać odpowiednio na większą i mniejszą dostępność miejsc adsorpcyjnych. W układach zawierających metanol pojemność sorpcyjna zależała od rodzaju analitu, dla fenolu najwyższe wartości uzyskano dla Silica gel 60 (0,2–0,5 mm), natomiast dla kofeiny dla Silica gel 60 (0,015–0,040 mm). Niezależnie od badanego związku, najniższą pojemnością sorpcyjną w tych warunkach wykazywał ponownie adsorbent LiChrospher 4000 Si (10 μm).

We wszystkich analizowanych układach adsorbent Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) charakteryzował się wyraźnie heterogeniczną energetycznie powierzchnią, co potwierdzają nieliniowe zależności Scatcharda oraz rozkłady energii adsorpcji wskazujące na obecność centrów aktywnych o różnej energii. Adsorbent ten charakteryzował się również największym udziałem centrów wysokoenergetycznych, co znajdowało odzwierciedlenie w silnej nieliniowości wykresów Scatcharda. Natomiast LiChrospher 60 Si (12 μm) wykazywał najbardziej jednorodny energetycznie charakter powierzchni, o czym świadczą liniowe zależności Scatcharda oraz obecność jednego dominującego rodzaju centrów adsorpcyjnych niezależnie od warunków eksperymentalnych.

W przypadku adsorbentów wykazujących heterogeniczny energetycznie charakter powierzchni najlepsze dopasowanie modelu izoterm adsorpcji uzyskano przy zastosowaniu modelu bi-Langmuira lub modelu Tótha, ponieważ modele te uwzględniają zróżnicowaną energię adsorpcji i pozwalają opisać współistnienie więcej niż jednego rodzaju miejsc aktywnych. Natomiast dla adsorbentów o powierzchni jednorodnej energetycznie najlepiej dopasowanym modelem pozostaje model Langmuira.

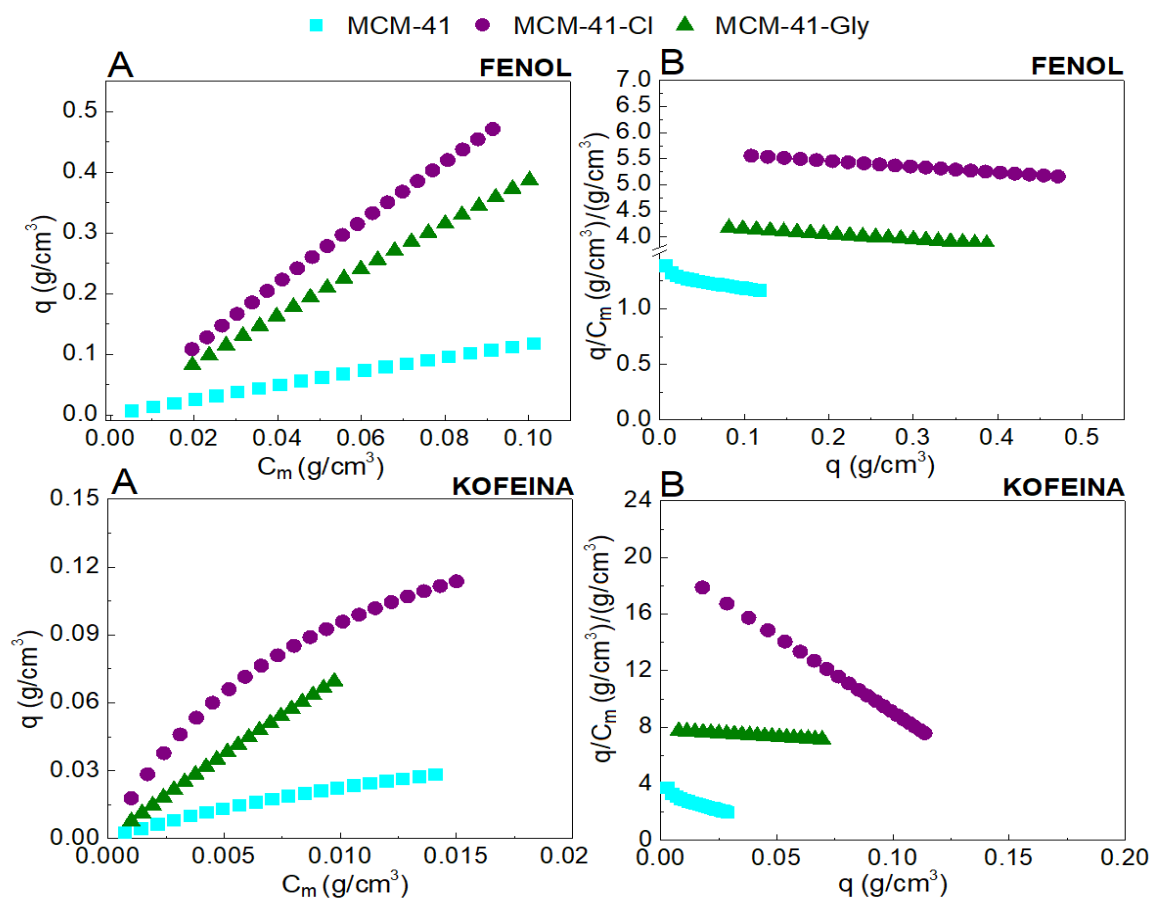
V.1.5.4. Adsorbenty niekomercyjne

Dla trzech wybranych niekomercyjnych adsorbentów: MCM-41, MCM-41-Cl (modyfikowany grupami chloropropylowymi) oraz MCM-41-Gly (modyfikowany grupami glicydylowymi) wyznaczono metodą statyczną izoterm adsorpcji, a także odpowiadające im zależności Scatcharda oraz rozkłady energii adsorpcji dla fenolu i kofeiny. Badania przeprowadzono w układach zawierających 95:5 (v/v) ACN:H₂O (rys. 5.21 A i B, 5.22) oraz 95:5 (v/v) MeOH:H₂O (rys. 5.23 A i B, 5.24).

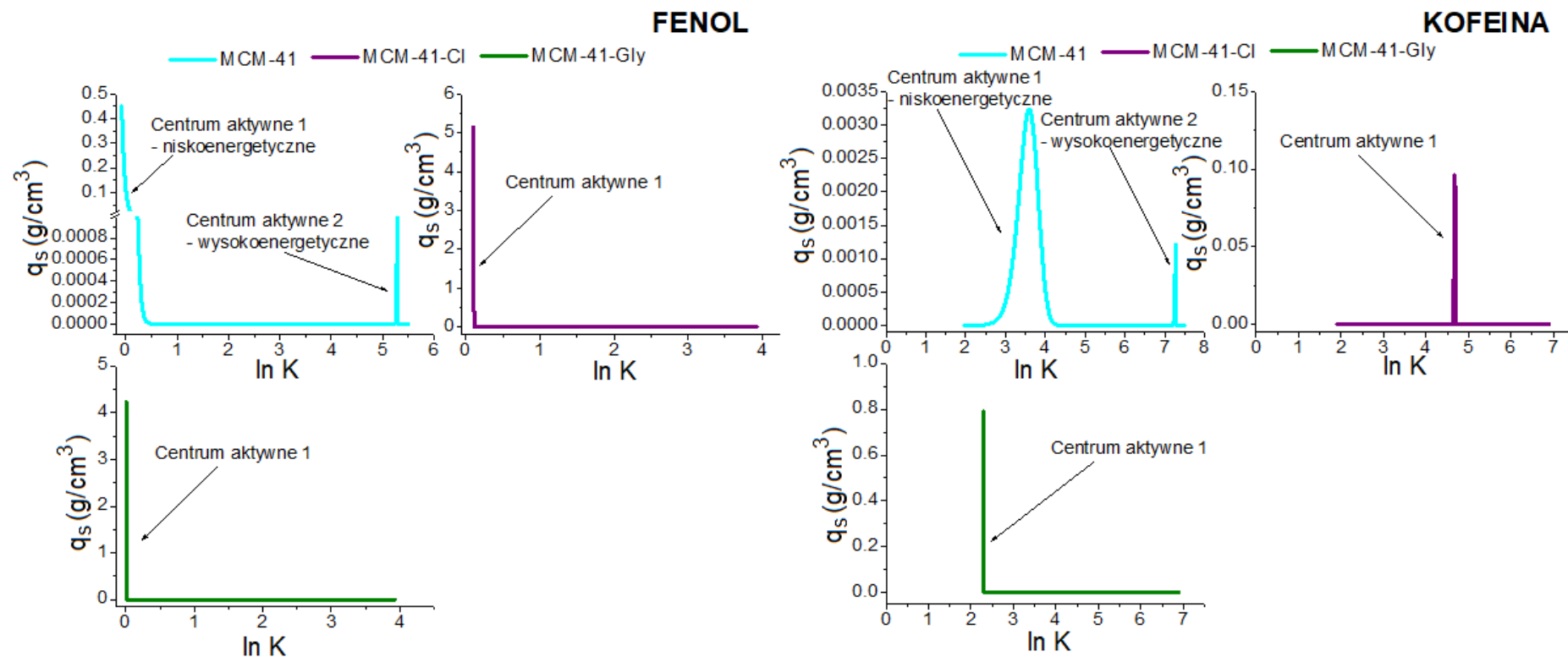
Dla fenolu w układzie 95:5 (v/v) ACN:H₂O wyniki badań wskazują, że spośród analizowanych adsorbentów niekomercyjnych jedynie MCM-41 charakteryzuje się heterogeniczną energetycznie powierzchnią. Potwierdza to zarówno nieliniowa zależność Scatcharda (rys. 5.21 B), jak i rozkład energii adsorpcji (rys. 5.22), który ujawnia obecność dwóch rodzajów centrów aktywnych o różnej energii. Natomiast zmodyfikowane adsorbenty niekomercyjne MCM-41-Cl oraz MCM-41-Gly charakteryzują się bardziej jednorodnym energetycznie charakterem powierzchni. Potwierdzają to liniowe zależności Scatcharda oraz rozkłady energii adsorpcji z pojedynczym centrum aktywnym. Otrzymane wyniki sugerują, że modyfikacja chemiczna powierzchni prowadzi do ograniczenia jej heterogeniczności energetycznej. W analizowanych warunkach najwyższą pojemność sorpcyjną względem fenolu wykazuje adsorbent MCM-41-Cl, natomiast najniższą niezmodyfikowany MCM-41. Wyniki te wskazują, że modyfikacja powierzchni grupami chloropropyłowymi sprzyja adsorpcji fenolu oraz prowadzi do zmniejszenia heterogeniczności energetycznej powierzchni. Konsekwencją tych zmian jest wzrost pojemności sorpcyjnej adsorbentu w porównaniu z MCM-41.

Dla kofeiny w układzie 95:5 (v/v) ACN:H₂O adsorbent MCM-41 charakteryzuje się heterogenicznym charakterem powierzchni, co potwierdzają nieliniowe zależności Scatcharda (rys. 5.21 B) oraz rozkład energii adsorpcji wskazujący na obecność co najmniej dwóch rodzajów centrów aktywnych (rys. 5.22). Wyższe wartości parametru $\ln K$ dla wysokoenergetycznych miejsc adsorpcyjnych w porównaniu z fenolem świadczą o większym powinowactwie kofeiny do powierzchni adsorbentu. Wynika to prawdopodobnie z obecności w cząsteczce kofeiny grup funkcyjnych umożliwiających tworzenie różnorodnych oddziaływań z centrami aktywnymi powierzchni MCM-41. Odmienne właściwości wykazują adsorbenty MCM-41-Cl i MCM-41-Gly, w których powierzchnia charakteryzuje się większą jednorodnością energetyczną. Dla tych adsorbentów zależność Scatcharda ma charakter liniowy, natomiast rozkład energii adsorpcji wykazuje pojedyncze centrum aktywne. Jednocześnie rodzaj modyfikacji powierzchni wpływa na siłę oddziaływań kofeiny z adsorbentem. Dla adsorbentu MCM-41-Cl wartość $\ln K$ dla centrum aktywnego wynosi około 4,7, co wskazuje na wysokie powinowactwo kofeiny do powierzchni zmodyfikowanej grupami -Cl. Natomiast dla adsorbentu MCM-41-Gly wartość $\ln K$ jest niższa i wynosi około 2,3, co sugeruje słabsze oddziaływania kofeiny z powierzchnią zmodyfikowaną grupami glicydylowymi. Wyniki te wskazują, że modyfikacja -Cl sprzyja adsorpcji kofeiny w większym stopniu niż modyfikacja -Gly. W analizowanych warunkach

największą pojemność sorpcyjną wobec kofeiny wykazuje adsorbent MCM-41-Gly, natomiast najniższą niezmodyfikowany MCM-41.



Rysunek 5.21. Izotermy adsorpcji wyznaczone doświadczalnie (A) oraz zależności Scatcharda (B) dla fenolu i kofeiny dla adsorbentów niekomercyjnych w składzie eluentu 95:5 (v/v) ACN:H₂O

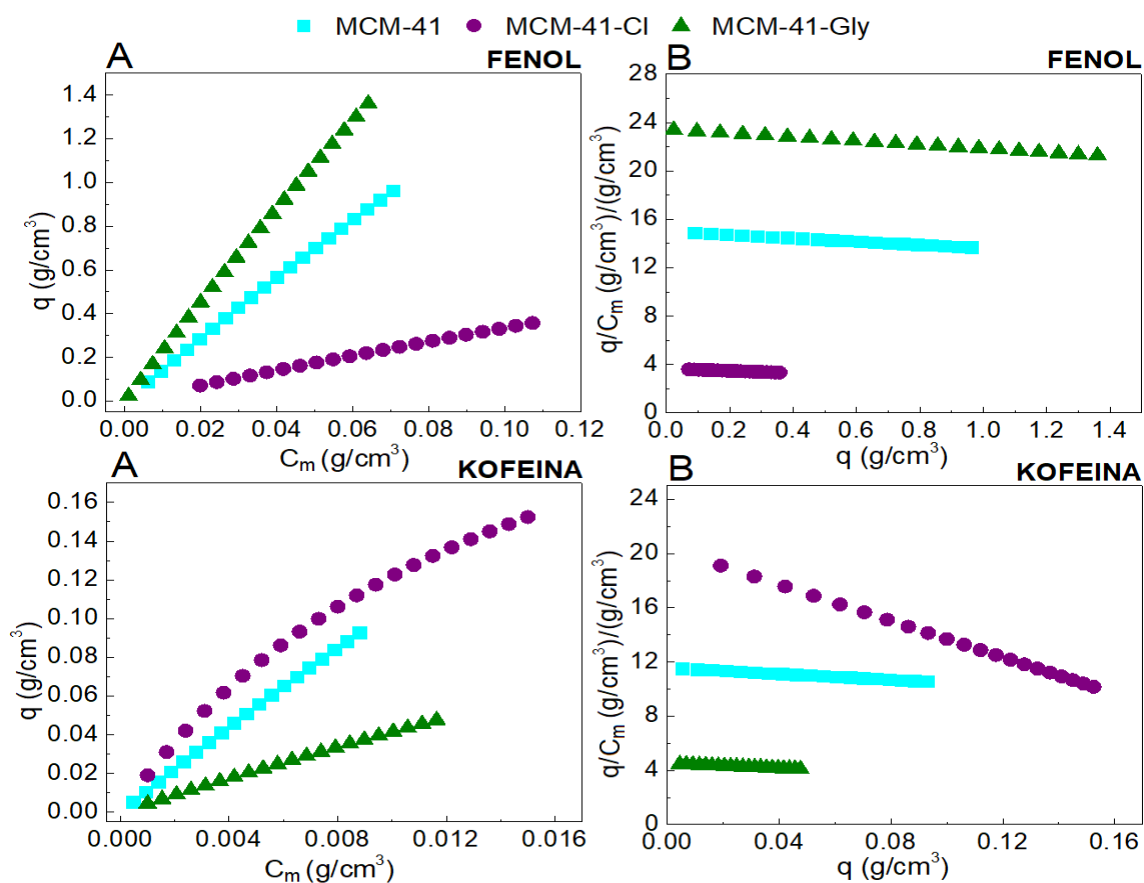


Rysunek 5.22. Rozkład energii adsorpcji dla adsorbentów niekomercyjnych dla fenolu i kofeiny w składzie eluentu 95:5 (v/v) ACN:H₂O

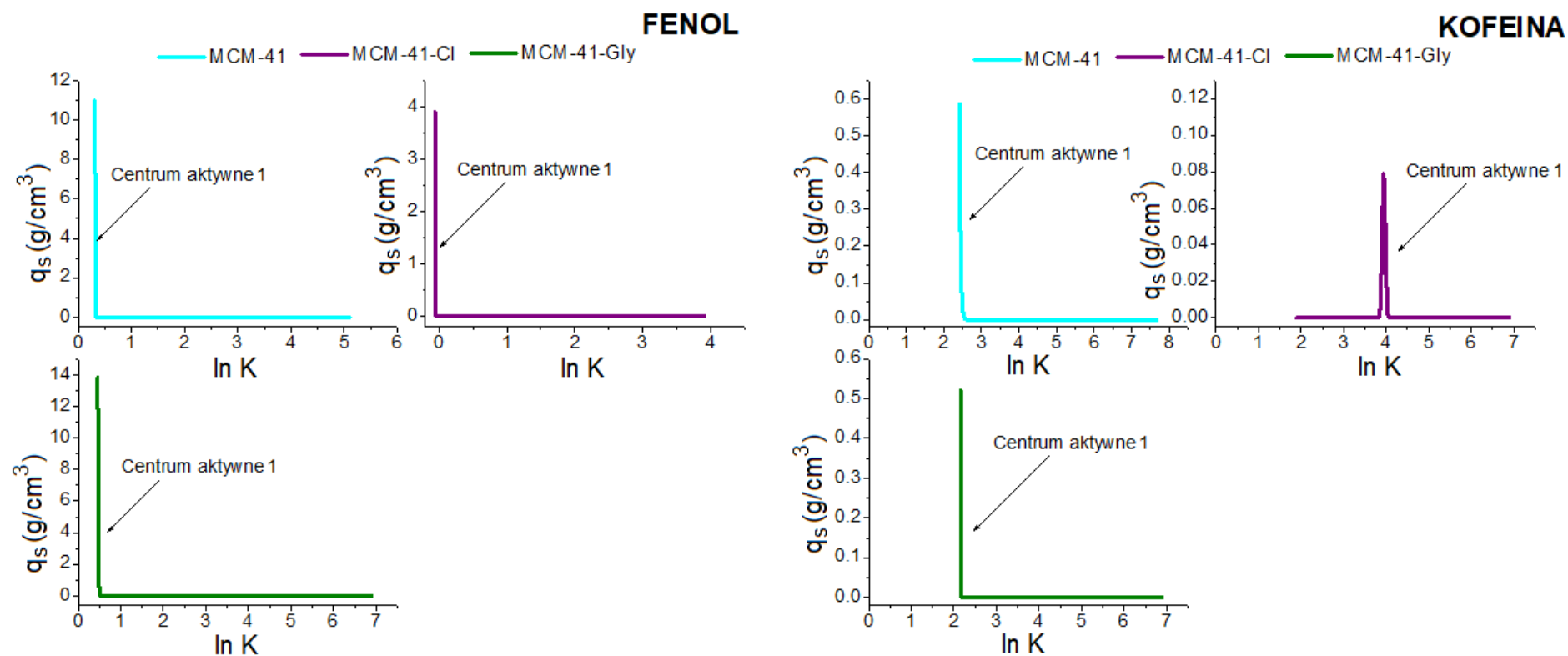
Dla fenolu w składzie eluentu 95:5 (v/v) MeOH:H₂O wszystkie badane adsorbenty niekomercyjne: MCM-41, MCM-41-Cl oraz MCM-41-Gly wykazują jednorodny energetycznie charakter powierzchni. Świadczy o tym liniowa zależność Scatcharda (rys. 5.23 B) oraz rozkład energii adsorpcji wykazujący pojedyncze centrum aktywne (rys. 5.24). Pomimo podobnego charakteru energetycznego powierzchni pojemność sorpcyjna fenolu na badanych adsorbentach była zróżnicowana. Najwyższą pojemność sorpcyjną uzyskano dla adsorbentu MCM-41-Gly, natomiast najniższą dla MCM-41-Cl. Wyniki te wskazują, że o wielkości adsorpcji decyduje nie tylko jednorodność energetyczna powierzchni, lecz również charakter chemiczny grup obecnych na powierzchni adsorbentu. Można przypuszczać, że obecność grup glicydylowych sprzyja adsorpcji fenolu, podczas gdy modyfikacja grupami chloropropyłowymi prowadzi do jej osłabienia w analizowanym układzie. Obserwowane różnice mogą wynikać z odmiennych oddziaływań pomiędzy cząsteczkami fenolu a grupami funkcyjnymi obecnymi na powierzchni poszczególnych adsorbentów.

Dla kofeiny w składzie eluentu 95:5 (v/v) MeOH:H₂O wszystkie badane adsorbenty niekomercyjne wykazywały jednorodny energetycznie charakter powierzchni. Pomimo podobnego charakteru energetycznego powierzchni energia oddziaływań kofeiny z powierzchnią adsorbentu zależała od rodzaju modyfikacji. Najwyższą wartość $\ln K$ dla centrum aktywnego (ok. 3,9) uzyskano dla adsorbentu MCM-41-Cl, co wskazuje na największe powinowactwo kofeiny do powierzchni tego adsorbentu. Dla adsorbentów MCM-41 oraz MCM-41-Gly wartości $\ln K$ były niższe i wynosiły około 2,5, co wskazuje na słabszy charakter oddziaływań adsorbent–adsorbat. Jednocześnie najwyższą pojemność sorpcyjną względem kofeiny uzyskano dla adsorbentu MCM-41, natomiast najniższą dla MCM-41-Cl.

Przedstawione wyniki dotyczące jednorodności i heterogeniczności energetycznej powierzchni, stanowią istotne wskazówki umożliwiające właściwy dobór modelu izoterm adsorpcji. Zagadnienia te zostaną omówione w kolejnym podrozdziale, w którym przedstawiono porównanie jakości dopasowania wybranych modeli izoterm adsorpcji do uzyskanych danych eksperymentalnych.



Rysunek 5.23. Izotermy adsorpcji wyznaczone doświadczalnie (A) oraz zależności Scatcharda (B) dla fenolu i kofeiny dla adsorbentów niekomercyjnych w składzie eluentu 95:5 (v/v) MeOH:H₂O



Rysunek 5.24. Rozkład energii adsorpcji dla adsorbentów niekomercyjnych dla fenolu i kofeiny w składzie eluentu 95:5 (v/v) MeOH:H₂O

V.1.5.5. Porównanie jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji dla adsorbentów niekomercyjnych

Wyniki badań przeprowadzonych dla fenolu i kofeiny z zastosowaniem faz ruchomych o składzie 95:5 (v/v) ACN:H₂O oraz 95:5 (v/v) MeOH:H₂O przedstawiono na rysunkach 5.25 i 5.26. Zaprezentowano na nich wyznaczone doświadczalnie izotermy adsorpcji wraz z dopasowaniem modelu izoterm najlepiej opisującego uzyskane dane. Wyboru odpowiedniego modelu dokonano na podstawie analizy rozkładu energii adsorpcji oraz oceny jakości dopasowania, obejmującej wartości SUM, SD oraz wyniki testu Fishera. Wartości wyestymowanych parametrów modeli zestawiono w tabeli 5.17., natomiast wyniki analizy statystycznej przedstawiono w tabeli 5.18.

Dla fenolu w układzie 95:5 (v/v) ACN:H₂O, w przypadku adsorbentu MCM-41 wykazującego heterogeniczny energetycznie charakter powierzchni, najlepsze dopasowanie uzyskano dla modeli bi-Langmuira oraz Tótha. Interpretację tę potwierdzają wyniki analizy statystycznej (tab. 5.18), obejmujące wartości SUM, SD oraz testu Fishera. Dla modeli bi-Langmuira i Tótha wartości SUM i SD były wyraźnie niższe niż dla modelu Langmuira, natomiast wartości testu Fishera wyższe, co wskazuje na lepsze odwzorowanie danych eksperymentalnych. Dodatkowym argumentem potwierdzającym heterogeniczny energetycznie charakter powierzchni jest wartość parametru ν modelu Tótha (tab. 5.17), który wynosił 0,70. Odminną sytuację zaobserwowano dla adsorbentów MCM-41-Cl oraz MCM-41-Gly, charakteryzujących się bardziej jednorodnym energetycznie charakterem powierzchni. W obu przypadkach parametr ν modelu Tótha przyjmował wartość równą 1, co świadczy o braku istotnej heterogeniczności energetycznej powierzchni i potwierdza zasadność zastosowania modelu Langmuira. Wniosek ten znajduje potwierdzenie również w wynikach analizy statystycznej, dla których najlepsze dopasowanie uzyskano właśnie dla modelu Langmuira. Porównanie jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji przeprowadzono również na podstawie wartości stosunku testów Fishera dla dwóch modeli, zgodnie z równaniami (4.4) i (4.5). Uzyskane wyniki analizy statystycznej, przedstawione w tabelach 5.19 i 5.20, wskazują, że dla fenolu w składzie eluentu zawierającym 95:5 (v/v) ACN:H₂O dla adsorbentu MCM-41 model Tótha zapewnia statystycznie istotnie lepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych niż model bi-Langmuira.

Dla kofeiny w układzie zawierającym 95:5 (v/v) ACN:H₂O adsorbent MCM-41 wykazał wyraźnie heterogeniczny energetycznie charakter powierzchni, co znajduje odzwierciedlenie w najlepszym dopasowaniu modeli heterogenicznych, tj. modelu bi-Langmuira oraz modelu Tótha. Wniosek ten potwierdzają wyniki analizy statystycznej

(tab. 5.19), wskazujące na niższe wartości SUM i SD oraz wyższe wartości testu Fishera dla modeli heterogenicznych w porównaniu z modelem Langmuira. Dodatkowo wartość parametru ν modelu Tótha (tab. 5.17) wynosi 0,68, co wskazuje na występowanie miejsc adsorpcyjnych o zróżnicowanej energii. Dla adsorbentów MCM-41-Cl oraz MCM-41-Gly zaobserwowano bardziej jednorodny charakter energetyczny powierzchni. W obu przypadkach najlepsze dopasowanie uzyskano dla modelu Langmuira, a wartości parametru ν modelu Tótha, zbliżone były do jedności. Porównanie jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji na podstawie wartości stosunku testów Fishera wykazało, że dla adsorbentu MCM-41 oba modele heterogeniczne opisują dane lepiej niż model Langmuira, przy czym model bi-Langmuira zapewnia najlepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych.

W układzie zawierającym 95:5 (v/v) MeOH:H₂O wszystkie badane adsorbenty niekomercyjne: MCM-41, MCM-41-Cl oraz MCM-41-Gly wykazały jednorodny charakter powierzchni zarówno wobec fenolu, jak i kofeiny. W konsekwencji najbardziej adekwatnym modelem opisującym proces adsorpcji w tych warunkach jest model Langmuira. Interpretację tę potwierdzają wartości parametru ν modelu Tótha (tab. 5.17), które dla wszystkich adsorbentów były zbliżone do jedności. Wyniki analizy statystycznej (tab. 5.18), obejmującej wartości SUM, SD oraz testu Fishera, również wskazują na przewagę modelu Langmuira nad modelami heterogenicznymi. Potwierdza to również analiza oparta na wartości stosunku testów Fishera dla dwóch modeli (tab. 5.19), która wykazała, że model Langmuira zapewnia najlepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych w badanych warunkach.

Tabela 5.17. Wartości wyestymowanych parametrów modeli izoterm adsorpcji wraz z przedziałami ufności dla adsorbentów niekomercyjnych

Adsorbenty niekomercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma liniowa	Izoterma Langmuira		Izoterma Tótha		
				K (cm ³ /g)	K (cm ³ /g)	q _s (g/cm ³)	K (cm ³ /g)	q _s (g/cm ³)	ν
MCM-41	FENOL	ACN	95	1,2 ± 1,2×10 ⁻²	1,20± 6,40×10 ⁻²	1,10±5,50×10 ⁻²	0,39 ± 0,29	3,39±2,53	0,70±0,138
		MeOH	95	13,90 ± 0,10	1,36± 1,20×10 ⁻⁶	10,96±9,02×10 ⁻⁶	1,36± 2,60×10 ⁻⁶	10,96 ±2×10 ⁻⁵	0,99±6,8×10 ⁻⁷
	KOFEINA	ACN	95	2,2 ± 9,9×10 ⁻²	46,64 ± 2,04	0,07 ±2,14×10 ⁻³	29,50 ± 5,04	0,13 ±2,8×10 ⁻²	0,68±7,7×10 ⁻²
		MeOH	95	10,8 ±9,3×10 ⁻²	10,9±1,36×10 ⁻⁵	1,06 ±1,23×10 ⁻⁶	10,92 ±1,4×10 ⁻²	1,06 ±1,4×10 ⁻⁵	1±4,6×10 ⁻⁴
MCM-41-Cl	FENOL	ACN	95	5,3 ± 4,4×10 ⁻²	1,10 ±5,70×10 ⁻⁷	5,15 ±2,47×10 ⁻⁶	1,11 ±8,70×10 ⁻³	5,06 ±4×10 ⁻²	1±2,9×10 ⁻³
		MeOH	95	3,4 ± 2,9×10 ⁻²	0,94 ±5,39×10 ⁻⁷	3,90 ±2,07×10 ⁻⁶	0,94 ±9,90×10 ⁻⁷	3,9 ±4,23×10 ⁻⁶	0,99±3,9×10 ⁻⁷
	KOFEINA	ACN	95	9,1 ± 7,3×10 ⁻¹	107 ± 1,34×10 ⁻³	0,18 ±1,14×10 ⁻⁶	107,5±9,8×10 ⁻⁵	0,18 ±3,6×10 ⁻⁷	0,99±2,4×10 ⁻⁶
		MeOH	95	11,70 ± 7×10 ⁻¹	67 ± 1×10 ⁻⁴	0,30 ±2,71×10 ⁻⁷	67 ± 2,26×10 ⁻⁵	0,30 ±1,6×10 ⁻⁷	0,99±5×10 ⁻⁷
MCM-41-Gly	FENOL	ACN	95	3,9 ± 3,4×10 ⁻²	1 ± 5,50×10 ⁻⁷	4,23 ±2,16×10 ⁻⁶	1,01 ±6,70×10 ⁻³	4,17 ±2,8×10 ⁻²	1±2,47×10 ⁻³
		MeOH	95	21,70 ± 0,20	1,58 ±3,38×10 ⁻⁶	14,77±2,92×10 ⁻⁵	1,58 ±7,20×10 ⁻⁶	14,8 ±6,8×10 ⁻⁵	0,99±1,7×10 ⁻⁶
	KOFEINA	ACN	95	7,30 ± 0,10	9,89± 7,97×10 ⁻⁶	0,79 ±5,90×10 ⁻⁷	9,89 ±1,65×10 ⁻⁵	0,8 ±1,35×10 ⁻⁶	0,99±6×10 ⁻⁷
		MeOH	95	4,20 ± 0,04	8,67 ±7,55×10 ⁻⁶	0,52 ±4,19×10 ⁻⁷	0,52 ±9,54×10 ⁻⁷	8,7 ±1,56×10 ⁻⁵	0,99±6,6×10 ⁻⁷

Tabela 5.17. c.d. Wartości wyestymowanych parametrów modeli izoterm adsorpcji wraz z przedziałami ufności dla adsorbentów niekomercyjnych

Adsorbenty niekomercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma bi-Langmuira			
				K_1 (cm ³ /g)	q_{s1} (g/cm ³)	K_2 (cm ³ /g)	q_{s2} (g/cm ³)
MCM-41	FENOL	ACN	95	$10,90 \pm 29,06$	$0,025 \pm 0,12$	$0,38 \pm 1,65$	$2,82 \pm 10,38$
		MeOH	95	$4,36 \pm 1,80 \times 10^5$	$2,00 \pm 4,50 \times 10^6$	$4,18 \pm 2,30 \times 10^5$	$2 \pm 4,50 \times 10^6$
	KOFEINA	ACN	95	$2,00 \times 10^5 \pm 4,35 \times 10^4$	$5,13 \times 10^{-4} \pm 5 \times 10^{-7}$	$40,70 \pm 4,13 \times 10^{-3}$	$7,70 \times 10^{-2} \pm 4 \times 10^{-6}$
		MeOH	95	$5,00 \pm 7,90 \times 10^7$	$0,10 \times 10^{-4} \pm 5 \times 10^6$	$0,50 \pm 7,45 \times 10^8$	$0,10 \pm 11,47 \times 10^7$
MCM-41-Cl	FENOL	ACN	95	$7,60 \pm 4,70 \times 10^3$	$0,60 \pm 1,07 \times 10^3$	$2 \pm 8,70 \times 10^3$	$0,60 \pm 0,93 \times 10^2$
		MeOH	95	$7,04 \pm 4,60 \times 10^3$	$0,40 \pm 7,60 \times 10^2$	$2 \pm 7,70 \times 10^3$	$0,40 \pm 2,10 \times 10^2$
	KOFEINA	ACN	95	$107,80 \pm 1,30 \times 10^{-1}$	$0,17 \pm 6 \times 10^{-3}$	$99,80 \pm 3,84$	$0,006 \pm 6 \times 10^{-3}$
		MeOH	95	$67,22 \pm 3,90 \times 10^{-3}$	$0,22 \pm 3,70 \times 10^{-3}$	$66,40 \pm 2,70 \times 10^{-2}$	$0,08 \pm 3,70 \times 10^{-3}$
MCM-41-Gly	FENOL	ACN	95	$3,19 \pm 1,35 \times 10^5$	$0,50 \pm 1,20 \times 10^5$	$2 \pm 1,80 \times 10^5$	$0,50 \pm 1,20 \times 10^5$
		MeOH	95	$1,56 \pm 3,18 \times 10^{-5}$	$6,89 \pm 8 \times 10^{-3}$	$1,60 \pm 1,90 \times 10^{-5}$	$7,87 \pm 8 \times 10^{-3}$
	KOFEINA	ACN	95	$9,79 \pm 3,88 \times 10^{-6}$	$0,38 \pm 1,27 \times 10^{-5}$	$9,97 \pm 2,03 \times 10^{-6}$	$0,41 \pm 1,27 \times 10^{-5}$
		MeOH	95	$8,53 \pm 9,04 \times 10^{-5}$	$0,13 \pm 1,04 \times 10^{-4}$	$8,72 \pm 1,92 \times 10^{-5}$	$0,36 \pm 1,03 \times 10^{-4}$

Tabela 5.18. Analiza statystyczna: wartości SUM, SD, testu Fishera dla modeli izoterm adsorpcji dla adsorbentów niekomercyjnych

Adsorbenty niekomercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma liniowa		
				SUM	SD	F _{test}
MCM-41	FENOL	ACN	95	$5,16 \times 10^{-5}$	$1,61 \times 10^{-3}$	$4,06 \times 10^4$
		MeOH	95	$2,33 \times 10^{-3}$	$1,10 \times 10^{-2}$	$5,80 \times 10^4$
	KOFEINA	ACN	95	$6,42 \times 10^{-5}$	$1,80 \times 10^{-3}$	$2,20 \times 10^3$
		MeOH	95	$2,00 \times 10^{-5}$	$1,03 \times 10^{-3}$	$5,80 \times 10^4$
MCM-41-Cl	FENOL	ACN	95	$6,80 \times 10^{-4}$	$5,80 \times 10^{-3}$	$6,08 \times 10^4$
		MeOH	95	$3,89 \times 10^{-4}$	$4,40 \times 10^{-3}$	$5,90 \times 10^4$
	KOFEINA	ACN	95	$4,23 \times 10^{-3}$	$1,40 \times 10^{-2}$	$6,70 \times 10^2$
		MeOH	95	$3,88 \times 10^{-3}$	$1,39 \times 10^{-2}$	$1,20 \times 10^3$
MCM-41-Gly	FENOL	ACN	95	$4,57 \times 10^{-4}$	$4,80 \times 10^{-3}$	$5,90 \times 10^4$
		MeOH	95	$5,07 \times 10^{-3}$	$1,59 \times 10^{-2}$	$5,56 \times 10^4$
	KOFEINA	ACN	95	$1,23 \times 10^{-5}$	$8,05 \times 10^{-4}$	$5,80 \times 10^4$
		MeOH	95	$6,54 \times 10^{-6}$	$5,82 \times 10^{-4}$	$5,65 \times 10^4$
Adsorbenty niekomercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma Langmuira		
				SUM	SD	F _{test}
MCM-41	FENOL	ACN	95	$5,49 \times 10^{-5}$	$1,70 \times 10^{-3}$	$1,72 \times 10^6$
		MeOH	95	$6,71 \times 10^{-15}$	$1,93 \times 10^{-8}$	$9,65 \times 10^{15}$
	KOFEINA	ACN	95	$3,06 \times 10^{-7}$	$1,27 \times 10^{-4}$	$2,20 \times 10^5$
		MeOH	95	$1,15 \times 10^{-16}$	$2,53 \times 10^{-9}$	$4,80 \times 10^{15}$

Tabela 5.18. c.d. Analiza statystyczna: wartości SUM, SD, testu Fishera dla modeli izoterm adsorpcji dla adsorbentów niekomercyjnych

Adsorbenty niekomercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma Langmuira		
				SUM	SD	F _{test}
MCM-41-Cl	FENOL	ACN	95	$7,09 \times 10^{-16}$	$6,11 \times 10^{-9}$	$2,77 \times 10^{16}$
		MeOH	95	$5,00 \times 10^{-16}$	$5,13 \times 10^{-9}$	$2,19 \times 10^{16}$
	KOFEINA	ACN	95	$9,78 \times 10^{-15}$	$2,27 \times 10^{-8}$	$1,40 \times 10^{14}$
		MeOH	95	$1,72 \times 10^{-14}$	$3,00 \times 10^{-8}$	$1,32 \times 10^{14}$
MCM-41-Gly	FENOL	ACN	95	$5,42 \times 10^{-16}$	$5,34 \times 10^{-9}$	$2,40 \times 10^{16}$
		MeOH	95	$9,00 \times 10^{-14}$	$6,88 \times 10^{-8}$	$1,48 \times 10^{15}$
	KOFEINA	ACN	95	$2,98 \times 10^{-17}$	$1,28 \times 10^{-9}$	$1,14 \times 10^{16}$
		MeOH	95	$1,94 \times 10^{-17}$	$1,01 \times 10^{-9}$	$9,04 \times 10^{15}$
Adsorbenty niekomercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma Tótha		
				SUM	SD	F _{test}
MCM-41	FENOL	ACN	95	$1,82 \times 10^{-7}$	$1,03 \times 10^{-4}$	$3,25 \times 10^7$
		MeOH	95	$1,49 \times 10^{-16}$	$2,96 \times 10^{-9}$	$2,72 \times 10^{15}$
	KOFEINA	ACN	95	$7,16 \times 10^{-8}$	$6,30 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^5$
		MeOH	95	$6,11 \times 10^{-13}$	$1,90 \times 10^{-7}$	$5,70 \times 10^{11}$
MCM-41-Cl	FENOL	ACN	95	$6,24 \times 10^{-10}$	$5,89 \times 10^{-6}$	$1,99 \times 10^{10}$
		MeOH	95	$7,05 \times 10^{-16}$	$6,26 \times 10^{-9}$	$9,80 \times 10^{15}$
	KOFEINA	ACN	95	$3,03 \times 10^{-13}$	$1,30 \times 10^{-7}$	$2,88 \times 10^{12}$
		MeOH	95	$1,24 \times 10^{-13}$	$2,60 \times 10^{-7}$	$1,14 \times 10^{13}$

Tabela 5.18. c.d. Analiza statystyczna: wartości SUM, SD, testu Fishera dla modeli izoterm adsorpcji dla adsorbentów niekomercyjnych

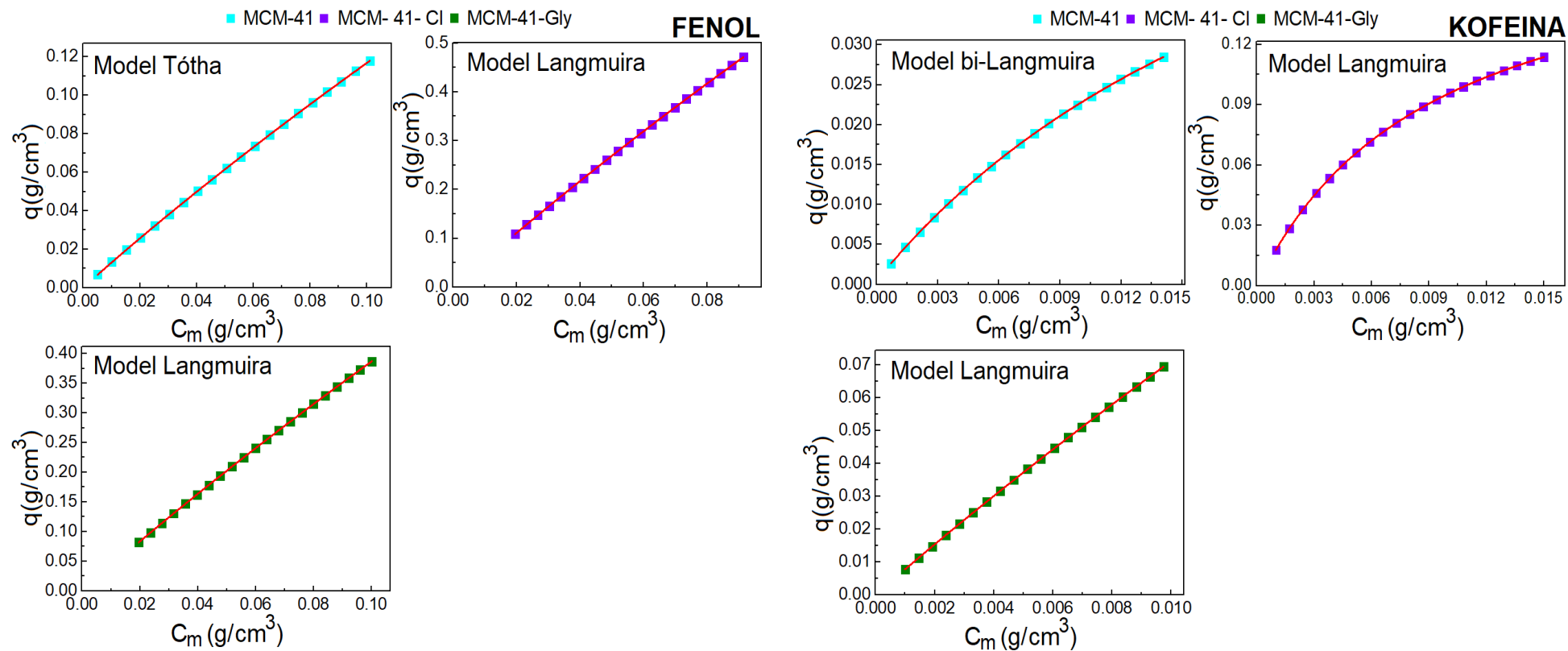
Adsorbenty niekomercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma Tótha		
				SUM	SD	F _{test}
MCM-41-Gly	FENOL	ACN	95	$3,17 \times 10^{-10}$	$4,19 \times 10^{-6}$	$2,59 \times 10^{10}$
		MeOH	95	$2,18 \times 10^{-14}$	$1,10 \times 10^{-8}$	$3,87 \times 10^{14}$
	KOFEINA	ACN	95	$6,24 \times 10^{-16}$	$1,91 \times 10^{-8}$	$3,45 \times 10^{15}$
		MeOH	95	$4,27 \times 10^{-16}$	$1,54 \times 10^{-8}$	$2,59 \times 10^{14}$
Adsorbenty niekomercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		Izoterma bi-Langmuira		
				SUM	SD	F _{test}
MCM-41	FENOL	ACN	95	$1,94 \times 10^{-7}$	$1,10 \times 10^{-4}$	$2,15 \times 10^7$
		MeOH	95	$7,70 \times 10^{-3}$	$2,20 \times 10^{-2}$	$3,70 \times 10^3$
	KOFEINA	ACN	95	$1,45 \times 10^{-13}$	$9,24 \times 10^{-8}$	$2,10 \times 10^{11}$
		MeOH	95	$5,50 \times 10^{-2}$	$5,90 \times 10^{-2}$	0,43
MCM-41-Cl	FENOL	ACN	95	0,11	$8,20 \times 10^{-2}$	72,76
		MeOH	95	$8,60 \times 10^{-2}$	$7,10 \times 10^{-2}$	52,74
	KOFEINA	ACN	95	$9,70 \times 10^{-13}$	$2,39 \times 10^{-7}$	$6,36 \times 10^{12}$
		MeOH	95	$8,26 \times 10^{-13}$	$2,20 \times 10^{-7}$	$1,23 \times 10^{13}$
MCM-41-Gly	FENOL	ACN	95	0,28	0,13	16,30
		MeOH	95	$3,73 \times 10^{-14}$	$1,48 \times 10^{-8}$	$1,60 \times 10^{14}$
	KOFEINA	ACN	95	$6,44 \times 10^{-16}$	$2,00 \times 10^{-8}$	$2,36 \times 10^{15}$
		MeOH	95	$1,00 \times 10^{-16}$	$2,43 \times 10^{-8}$	$17,80 \times 10^{14}$

Tabela 5.19. Porównanie analizowanych modeli izoterm adsorpcji w oparciu o wartości stosunku testów Fishera dla adsorbentów niekomercyjnych

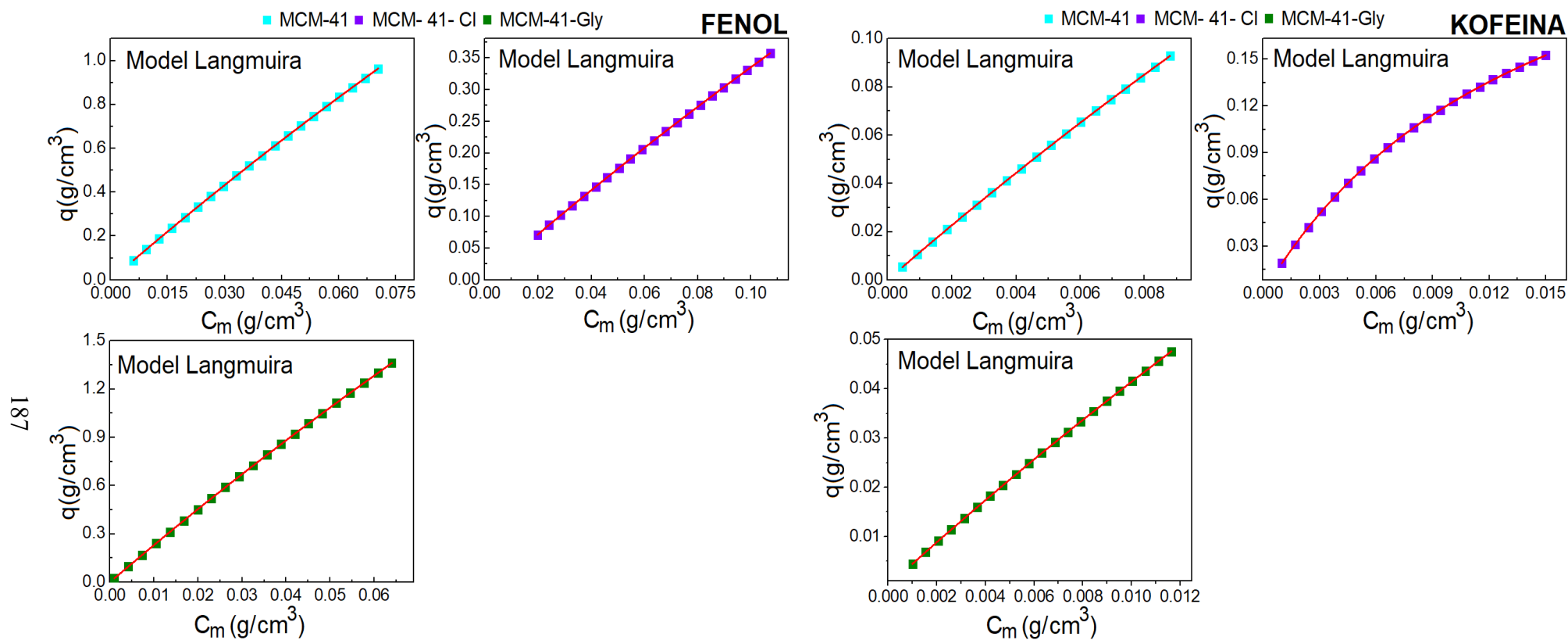
Adsorbenty niekomercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		bi-Langmuir vs Langmuir			Tóth vs Langmuir		
				$F_{N-i,N-j,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-l_i,N-l_j}$	$F_{N-i,N-j,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-l_i,N-l_j}$
MCM-41	FENOL	ACN	95	2,197	12,500	prawda	2,180	18,89	prawda
		MeOH	95	2,249	$3,830 \times 10^{-13}$	fałsz	2,230	0,280	fałsz
	KOFEINA	ACN	95	2,197	$9,545 \times 10^5$	prawda	2,180	2,730	prawda
		MeOH	95	2,249	$8,958 \times 10^{-17}$	fałsz	2,230	$1,187 \times 10^{-4}$	fałsz
MCM-41-Cl	FENOL	ACN	95	2,197	$2,627 \times 10^{-15}$	fałsz	2,180	$7,184 \times 10^{-7}$	fałsz
		MeOH	95	2,197	$2,408 \times 10^{-15}$	fałsz	2,180	0,447	fałsz
	KOFEINA	ACN	95	2,197	0,045	fałsz	2,180	0,020	fałsz
		MeOH	95	2,197	0,093	fałsz	2,180	0,086	fałsz
MCM-41-Gly	FENOL	ACN	95	2,197	$6,792 \times 10^{-16}$	fałsz	2,180	$1,079 \times 10^{-6}$	fałsz
		MeOH	95	2,197	0,108	fałsz	2,180	0,261	fałsz
	KOFEINA	ACN	95	2,197	0,207	fałsz	2,180	0,302	fałsz
		MeOH	95	2,197	0,196	fałsz	2,180	0,028	fałsz

Tabela 5.20. Porównanie analizowanych modeli izoterm adsorpcji (heterogenicznych) w oparciu o wartości stosunku testów Fishera dla adsorbentów niekomercyjnych

Adsorbenty niekomercyjne	Analit	Zawartość ACN/MeOH w eluencie % (v/v)		bi-Langmuir vs Tóth		
				$F_{N-i,N-j,5\%}$	$F_{M_i,M_j} = \frac{F_{M_i}}{F_{M_j}}$	$F_{M_i,M_j} \geq F_{N-l_i,N-l_j}$
MCM-41	FENOL	ACN	95	2,29	0,66	fałsz
	KOFEINA	ACN	95	2,29	$3,49 \times 10^5$	prawda



Rysunek 5.25. Dopasowanie najbardziej adekwatnych modeli izoterm adsorpcji do danych doświadczalnych dla fenolu i kofeiny z zastosowaniem adsorbentów niekomercyjnych w składzie eluentu 95:5 (v/v) ACN:H₂O



Rysunek 5.26. Dopasowanie najbardziej adekwatnych modeli izoterm adsorpcji do danych doświadczalnych dla fenolu i kofeiny z zastosowaniem adsorbentów niekomercyjnych w składzie eluentu 95:5 (v/v) MeOH:H₂O

V.1.5.6. Podsumowanie

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że charakter energetyczny powierzchni adsorbentów niekomercyjnych zależy od rodzaju analitu, składu fazy ruchomej oraz modyfikacji powierzchni. W układzie zawierającym 95:5 (v/v) ACN:H₂O heterogeniczny energetycznie charakter powierzchni obserwowano wyłącznie dla adsorbentu MCM-41, natomiast MCM-41-Cl i MCM-41-Gly wykazywały jednorodność energetyczną. Z kolei w układzie 95:5 (v/v) MeOH:H₂O wszystkie badane adsorbenty charakteryzowały się jednorodnym energetycznie charakterem powierzchni niezależnie od rodzaju analizowanego związku. Wykazano również, że modyfikacja krzemionki MCM-41 wpływa na energię oddziaływań adsorpcyjnych oraz pojemność sorpcyjną adsorbentu. Przeprowadzona analiza porównawcza jakości dopasowania modeli izoterm adsorpcji dla fenolu i kofeiny wykazała, że wybór najbardziej adekwatnego modelu jest ściśle związany z charakterem energetycznym powierzchni adsorbentu. Dla powierzchni jednorodnych energetycznie najlepsze dopasowanie uzyskano dla modelu Langmuira, natomiast dla powierzchni heterogenicznych energetycznie najbardziej odpowiednie okazały się modele bi-Langmuira lub Tótha. Wnioski te zostały potwierdzone wynikami analizy statystycznej (SUM, SD, test Fishera) oraz wartościami parametru ν modelu Tótha.

V.2. Analiza fizykochemiczna oraz granulometryczna adsorbentów stosowanych w chromatografii cieczowej

Parametry strukturalne, właściwości powierzchniowe oraz skład chemiczny adsorbentów mogą istotnie wpływać na efektywność procesów adsorpcyjnych, determinując zarówno stopień retencji poszczególnych związków, jak i selektywność ich rozdzielania. Adsorbenty komercyjne oraz niekomercyjne (otrzymywane w warunkach laboratoryjnych) mogą znacząco różnić się składem chemicznym powierzchni, morfologią, rozkładem wielkości ziaren, parametrami porowatości oraz powierzchnią właściwą.

W niniejszym rozdziale przedstawiono kompleksową charakterystykę fizykochemiczną i granulometryczną wybranych adsorbentów komercyjnych oraz niekomercyjnych. Obejmuje ona analizę morfologii i składu pierwiastkowego, rozkładu wielkości ziaren, parametrów porowatości, powierzchni właściwej, a także właściwości termicznych badanych adsorbentów.

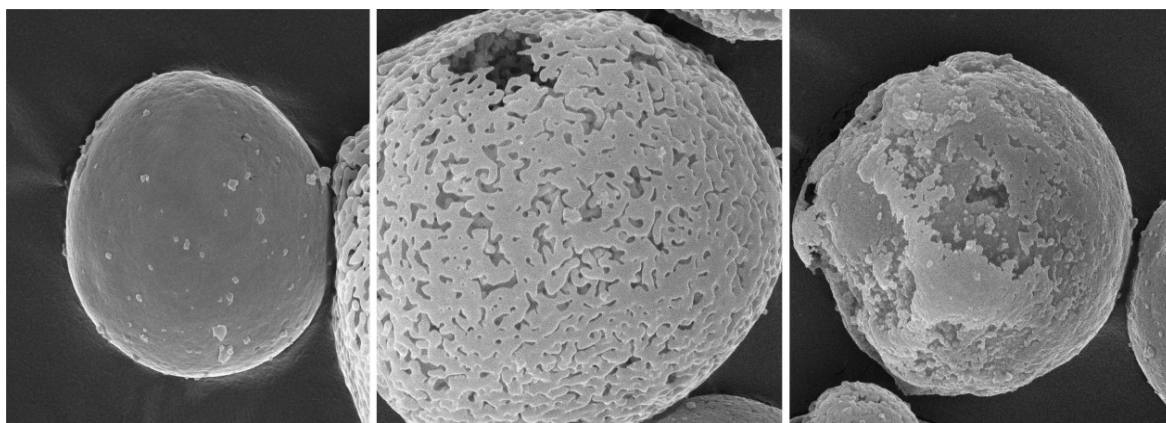
V.2.1. Analiza morfologii i składu pierwiastkowego adsorbentów metodą SEM-EDS oraz oznaczenie ich składu całkowitego techniką ICP-MS

V.2.1.1. Adsorbenty komercyjne

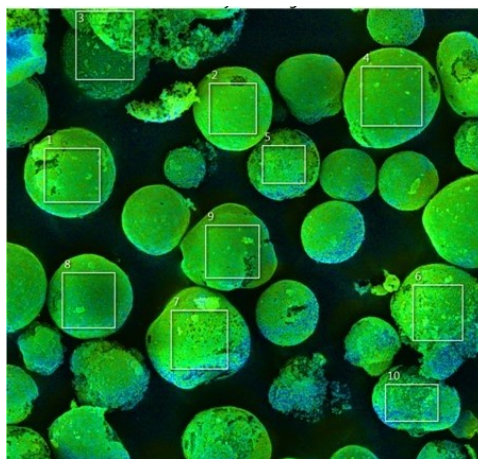
LiChrospher 4000 Si (10 μ m)

Na rysunku 5.27 przedstawiono obrazy SEM adsorbentu LiChrospher 4000 Si (10 μ m) uzyskane przy powiększeniu 100 kx, ukazujące morfologię typową dla sferycznych adsorbentów krzemionkowych stosowanych w HPLC, czyli dobrze uformowanych, niemal kulistych ziaren o rozwiniętej topografii powierzchniowej. Na uzyskanych obrazach obserwuje się zarówno ziarna o stosunkowo gładkiej powierzchni, jak i ziarna wykazujące obecność nieregularnych zagłębień, porów powierzchniowych oraz lokalnych niejednorodności morfologicznych. Miejscami widoczne są również mikropęknięcia. Obecność zagłębień, porów powierzchniowych oraz mikropęknięć może wpływać na dostępność miejsc adsorpcyjnych oraz przebieg procesów transportu masy w obrębie ziaren adsorbentu. Dane uzyskane z analizy EDS (rys. 5.28, tab. 5.21) potwierdzają dominujący udział tlenu i krzemu ($O \approx 61,32$ % mas.; $Si \approx 36,13$ % mas.) co jest zgodne ze składem SiO_2 . Analiza EDS dostarczyła również informacji o zawartości innych pierwiastków na powierzchni adsorbentu. Udział tych pierwiastków jest stosunkowo niski ($Cr \approx 0,43$ % mas.; $Fe \approx 1,92$ % mas.; $Ni \approx 0,20$ % mas.). Pomiary metodą ICP-MS (tab. 5.22.) wskazują również na bardzo wysoką czystość fazy krzemionkowej ($SiO_2 \approx 99,89$ %). Metoda ICP-MS pozwoliła oznaczyć dodatkowe pierwiastki w śladowych

stężeniach w zakresie ppm (np. P $\approx$ 407 ppm, Ca $\approx$ 409 ppm, Ti $\approx$ 133 ppm, Fe $\approx$ 106 ppm, Cr $\approx$ 5 ppm, Ni $\approx$ 5 ppm, Zr $\approx$ 11 ppm). Różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi metodami EDS i ICP-MS wynikają z charakteru obu technik analitycznych: EDS dostarcza informacji o lokalnym składzie chemicznym powierzchni oraz warstwy przypowierzchniowej materiału, natomiast ICP-MS umożliwia oznaczenie składu całkowitego próbki po jej mineralizacji (rozkładzie do roztworu) i może stanowić uzupełnienie analizy wykonanej metodą EDS. Śladowe ilości wapnia mogą wpływać na właściwości powierzchniowe krzemionki, w tym na charakter grup silanolowych, co potencjalnie może oddziaływać na zdolność powierzchni do tworzenia wiązań wodorowych. Z kolei obecność metali przejściowych (Fe, Ni, Cr) może lokalnie modyfikować energię centrów aktywnych. Wyniki analiz SEM-EDS oraz ICP-MS są zgodne z obserwacjami uzyskanymi z analiz równowag adsorpcyjnych. Obecność pierwiastków (m.in.: Fe, Cr, Ni) może lokalnie modyfikować aktywność grup silanolowych oraz różnicować energię miejsc wiążących, co może przyczyniać się do lokalnego zróżnicowania energii miejsc adsorpcyjnych oraz obserwowanej heterogeniczności energetycznej powierzchni w niektórych badanych układach (podrozdział V.1.5.1.).



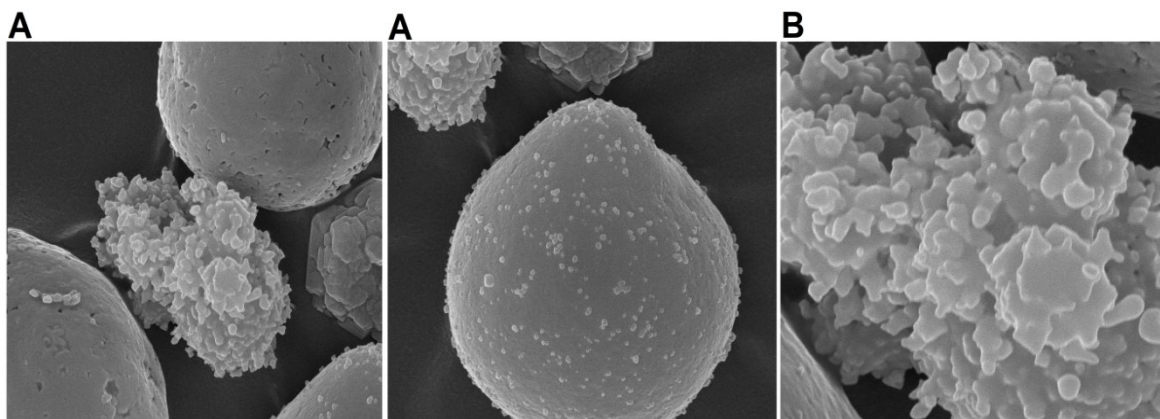
*Rysunek 5.27. Obrazy SEM powierzchni adsorbentu LiChrospher 4000 Si (10 μ m)
przy powiększeniu 100 kx*



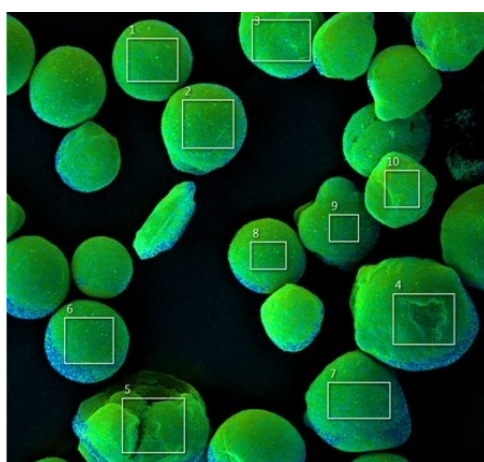
Rysunek 5.28. Obraz SEM adsorbentu LiChrospher 4000 Si (10 μm) z zaznaczonymi punktami analizy EDS

LiChrospher 60 Si (12 μm)

Obrazy SEM przedstawione na rysunkach 5.29 i 5.30 dla adsorbentu LiChrospher 60 Si (12 μm), uzyskane przy powiększeniach 100 kx (A) i 150 kx (B), ukazują morfologię sferycznych ziaren krzemionkowych. Oprócz obszarów o relatywnie gładkiej powierzchni obserwuje się liczne drobne cząstki i aglomeraty przylegające do powierzchni ziaren. Na powierzchni części ziaren widoczne są również przyczepione drobiny oraz lokalne niejednorodności morfologiczne. Dodatkowo obserwuje się obecność licznych, drobnych wypukłości oraz płytkich zagłębień, które świadczą o zróżnicowanej topografii powierzchniowej analizowanego adsorbentu. Analiza chemiczna powierzchni adsorbentu potwierdza skład krzemionkowy (tab. 5.21) (EDS: O $\approx$ 57,45 % mas., Si $\approx$ 39,91 % mas.). Analiza EDS wykazała również obecność innych pierwiastków na powierzchni adsorbentu: Cr, Fe i Ni (odpowiednio: 0,46 % mas.; 1,95 % mas.; 0,23 % mas.), a badania metodą ICP-MS (tab. 5.22) potwierdzają obecność tych metali w śladowych stężeniach (Cr $\approx$ 3 ppm, Fe $\approx$ 45 ppm, Ni $\approx$ 3 ppm). Dodatkowo analiza ICP-MS wykazała obecność m.in.: P $\approx$ 707 ppm, Ca $\approx$ 452 ppm, Ti $\approx$ 125, Zr $\approx$ 14 ppm. Obecność tych pierwiastków może lokalnie wpływać na właściwości powierzchniowe adsorbentu oraz na energię oddziaływań adsorbent–adsorbat. Jednak ich niewielka zawartość nie zmienia istotnie krzemionkowego charakteru materiału. Na podstawie obserwacji SEM można przypuszczać, że drobna chropowatość powierzchni oraz obecność licznych mikrostruktur sprzyjają zwiększeniu dostępności powierzchni adsorpcyjnej. Może to stanowić jedną z przyczyn obserwowanej w analizach równowag adsorpcyjnych (podrozdział V.1.5.1.) wyższej pojemności sorpcyjnej adsorbentu LiChrospher 60 Si (12 μm), szczególnie w układzie zawierającym 95 % (v/v) ACN.



Rysunek 5.29. Obrazy SEM w powiększeniu: A - 100 kx, B – 150 kx dla adsorbentu LiChrospher 60 Si (12 μ m)

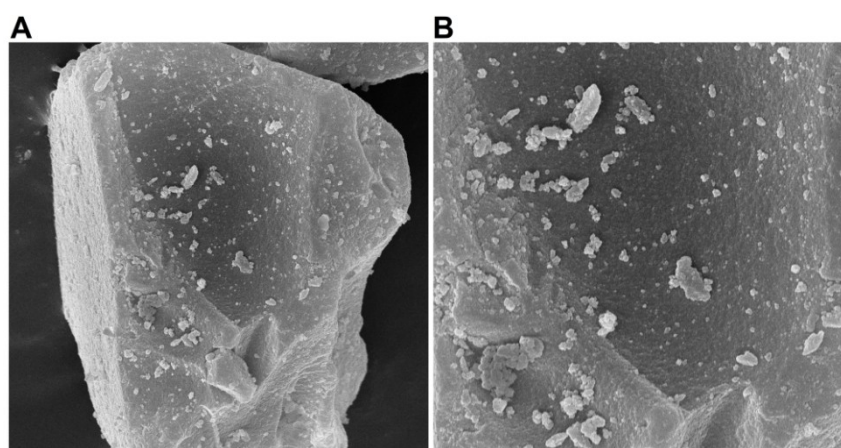


Rysunek 5.30. Obraz SEM adsorbentu LiChrospher 60 Si (12 μ m) z oznaczonymi punktami analizy EDS

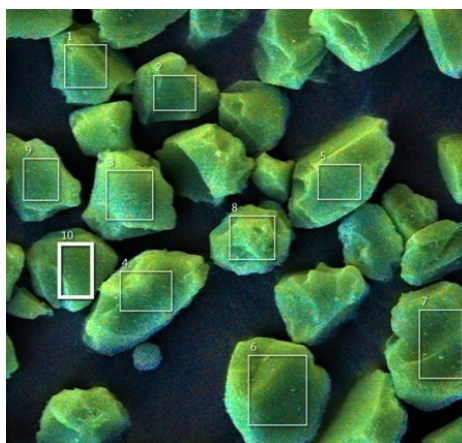
Silica gel 60 (0,015-0,040 mm)

Na rysunku 5.31 przedstawiono obrazy SEM adsorbentu Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) uzyskane przy powiększeniach 50 kx (A) oraz 100 kx (B). Obrazy ukazują nieregularne ziarna krzemionki o wyraźnie rozwiniętej topografii powierzchniowej i ostrych krawędziach. Na powierzchni ziaren obserwuje się liczne zagłębienia, mikropęknięcia oraz nierówności, a także lokalnie występujące drobne przyczepione fragmenty rozmieszczone w sposób nieregularny. Analiza morfologii wskazuje na wyraźnie chropowaty i niejednorodny charakter powierzchni adsorbentu. W badanym zakresie powiększeń nie zaobserwowano obszarów o wyraźnie wygładzonej powierzchni ani regularnych struktur powierzchniowych, natomiast dominują nieregularne mikrostruktury. Wyniki analizy EDS (rys. 5.32, tab. 5.21) potwierdzają skład krzemionki badanego adsorbentu ($O \approx 54,59$ % mas.; $Si \approx 42,52$ % mas.) oraz obecność na powierzchni krzemionki metali takich jak:

Fe $\approx$ 1,82 % mas.; Cr $\approx$ 0,44 % mas.; Ni $\approx$ 0,12 % mas., Sn $\approx$ 0,42 % mas. Analiza metodą ICP-MS (tab. 5.22.) wykazała obecność w składzie adsorbentu m.in.: P $\approx$ 668 ppm, Cl $\approx$ 140,1 ppm, Ca $\approx$ 0,212 %, Ti $\approx$ 112; K $\approx$ 8 ppm; S $\approx$ 0,118 %; Zr $\approx$ 31 ppm, co potwierdza występowanie śladowych zanieczyszczeń metalicznych i niemetalicznych, które mogą lokalnie modyfikować energię adsorpcyjną powierzchni. Wyniki analiz SEM-EDS i ICP-MS wskazują na obecność zróżnicowania morfologicznego oraz chemicznego powierzchni adsorbentu Silica gel 60 (0,015–0,040 mm), co może sprzyjać występowaniu niejednorodnych energetycznie miejsc adsorpcyjnych. Cechy te znajdują odzwierciedlenie w wynikach badań adsorpcyjnych, które wskazują na heterogeniczność energetyczną powierzchni tego adsorbentu niezależnie od stosowanych warunków chromatograficznych (podrozdział V.1.5.1.).



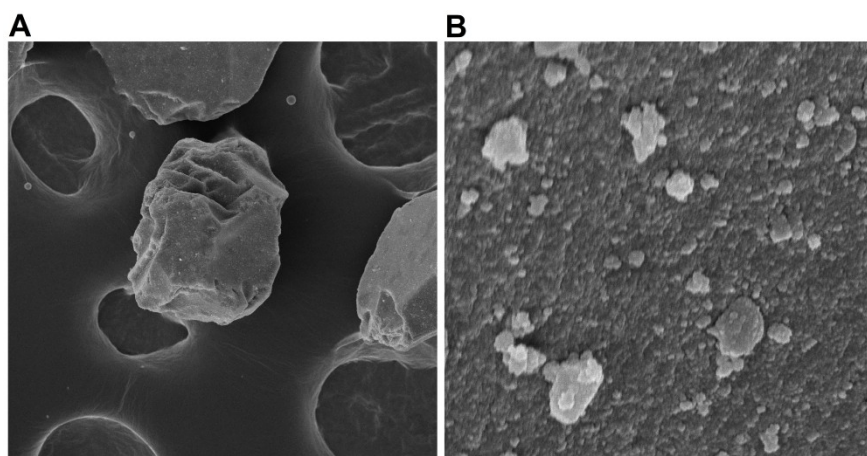
Rysunek 5.31. Obrazy SEM w powiększeniu: A-50 kx i B-100 kx dla adsorbentu Silica gel 60 (0,015-0,040 mm)



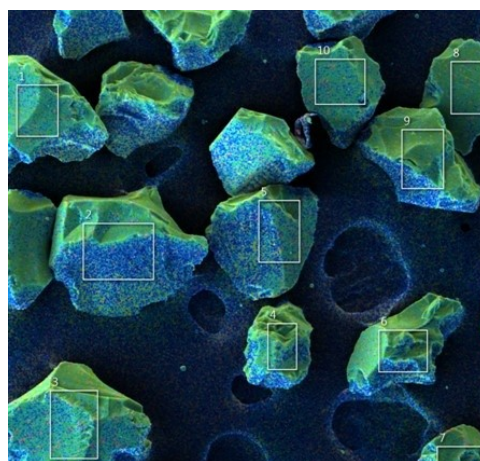
Rysunek 5.32. Obraz SEM adsorbentu Silica gel 60 (0,015-0,040 mm) z oznaczonymi punktami analizy EDS

Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)

Obrazy SEM adsorbentu Silica gel 60 (0,2–0,5 mm), uzyskane przy powiększeniach 2 kx (A) oraz 250 kx (B) (rys. 5.33), ukazują duże, nieregularne ziarna krzemionki o wyraźnie zaznaczonych krawędziach. Na powierzchni obserwuje się fragmenty o zróżnicowanej geometrii oraz liczne niejednorodności strukturalne. Powierzchnia ziaren jest wyraźnie chropowata, z obecnością drobnych przyczepionych cząstek, płytkich zagłębień, mikrouszkodzeń oraz nieregularnych mikrostruktur rozmieszczonych na całej powierzchni. W wielu obszarach widoczne są drobiny mogące częściowo pokrywać powierzchnię lub wypełniać lokalne zagłębienia. Taka nieregularna geometria ziaren oraz zróżnicowanie mikrostruktury mogą wpływać na lokalną dostępność miejsc adsorpcyjnych, co może mieć znaczenie dla transportu masy i przebiegu procesów sorpcji. Część powierzchni może być łatwo dostępna dla cząsteczek adsorbentu, natomiast wnęki i krawędzie ziaren mogą stanowić miejsca o odmiennych właściwościach energetycznych oraz ograniczonej dostępności dyfuzyjnej. Przedstawione obserwacje są zgodne z wynikami analizy równowagi adsorpcyjnej, która dla niektórych układów wskazuje na obecność dodatkowych centrów adsorpcyjnych charakteryzujących się wyższą energią adsorpcji. (podrozdział V.1.5.1.). Analiza składu powierzchniowego adsorbentu metodą EDS (rys. 5.34., tab. 5.21.) potwierdza skład krzemionki ($O \approx 55,45\%$ mas., $Si \approx 41,82\%$ mas.). Dodatkowo analiza EDS wykazała obecność pierwiastków takich jak: $Fe \approx 1,55\%$ mas., $Cr \approx 0,32\%$ mas., $Ni \approx 0,025\%$ mas., $Sn \approx 0,047\%$ mas., $Ca \approx 0,74\%$ mas. Pomiary metodą ICP-MS (tab. 5.22.) uzupełniają tę charakterystykę, wskazując na obecność pierwiastków w zakresie ppm m.in.: $P \approx 777$ ppm, $Cl \approx 93$ ppm, $K \approx 7$ ppm, $S \approx 0,125\%$, $Ca \approx 0,228\%$, $Ti \approx 109$ ppm, $Fe \approx 32$ ppm, $Ni \approx 4$ ppm, $Zr \approx 34$ ppm. Obecność tych pierwiastków może lokalnie modyfikować energię adsorpcyjną badanego adsorbentu.



Rysunek 5.33. Obrazy SEM w powiększeniu: A – 2 kx, B - 250 kx dla adsorbentu
Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)

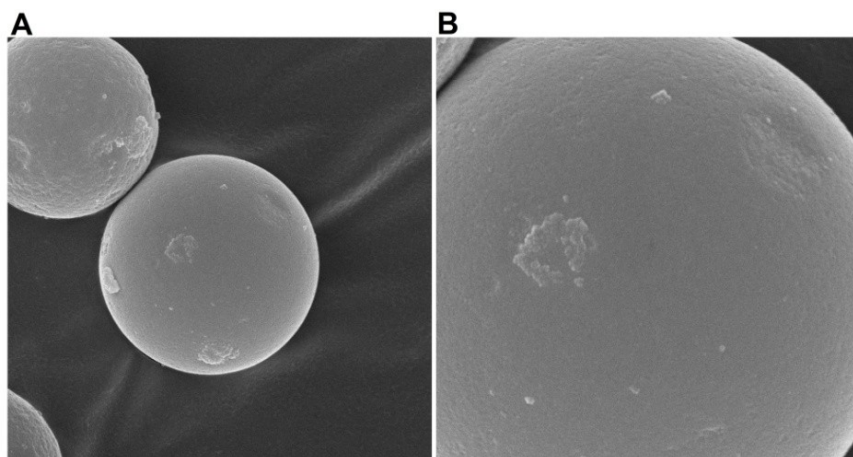


Rysunek 5.34. Obraz SEM adsorbentu *Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)* z oznaczonymi
punktami analizy EDS

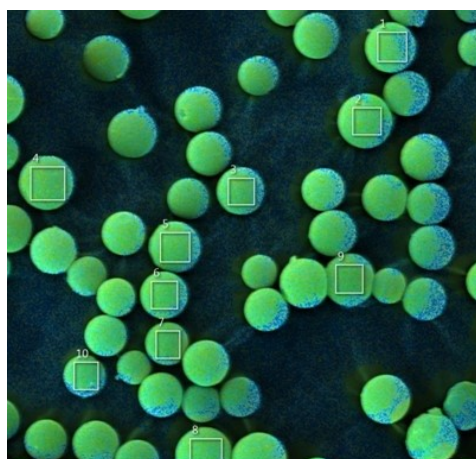
TSK-Gel Amide-80 - faza stacjonarna amidowa

Obrazy SEM fazy stacjonarnej amidowej pozyskanej z kolumny chromatograficznej TSK-Gel Amide-80 (rys. 5.35), uzyskane przy powiększeniach 100 kx (A) i 250 kx (B), przedstawiają jednorodne, niemal idealnie kuliste ziarna o gładkiej i równomiernej powierzchni. Ziarna charakteryzują się regularnym kształtem, typowym dla wysoko oczyszczonych żeli krzemionkowych stosowanych w chromatografii HILIC. Powierzchnia ziaren wykazuje drobną teksturę porową, jednak bez wyraźnych ostrych krawędzi oraz głębokich wnęk. Zaobserwowana morfologia wskazuje na wysoki stopień jednorodności strukturalnej materiału. Obserwacje te są zgodne z wynikami badań równowag adsorpcyjnych, według których dla większości analizowanych układów adsorbent ten wykazywał jednorodny energetycznie charakter powierzchni [251]. Analiza chemiczna powierzchni adsorbentu metodą EDS (rys. 5.36, tab. 5.21) potwierdza skład krzemionkowy

(O $\approx$ 58,33 % mas. i Si $\approx$ 37,65 % mas.) oraz obecność niewielkich ilości metali na powierzchni (Fe $\approx$ 2,97 % mas., Cr $\approx$ 0,70 % mas. i Ni $\approx$ 0,35 % mas.). Jednocześnie śladowe ilości metali wykryte na powierzchni mogą prowadzić do powstawania lokalnych miejsc o odmiennej energii adsorpcji, przyczyniając się do pewnego stopnia niejednorodności energetycznej powierzchni adsorbentu.



Rysunek 5.35. Obrazy SEM w powiększeniu: A-100 kx i B-250 kx fazy stacjonarnej amidowej pozyskanej z kolumny chromatograficznej TSK-Gel Amide-80

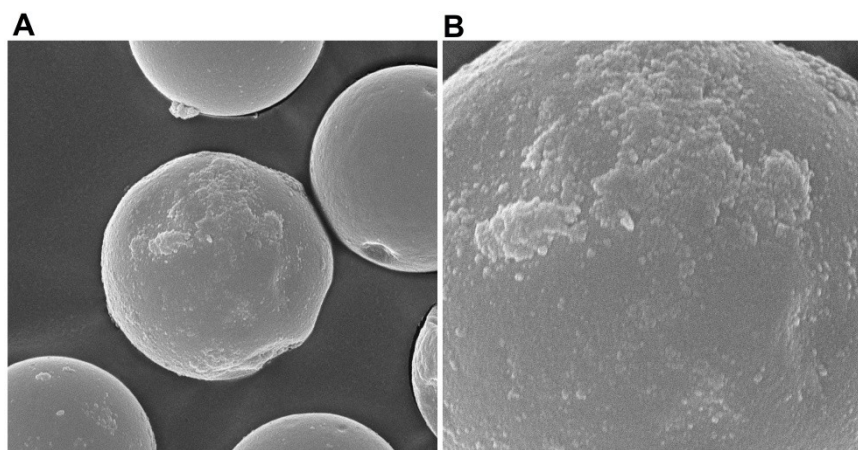


Rysunek 5.36. Obraz SEM fazy stacjonarnej amidowej pozyskanej z kolumny chromatograficznej TSK-Gel Amide-80 z oznaczonymi punktami analizy EDS

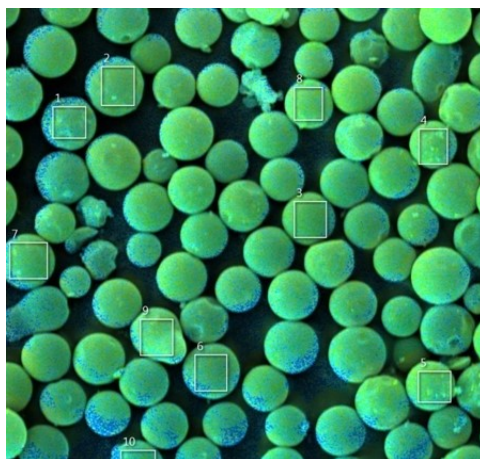
Eurospher II 100-5 HILIC – faza stacjonarna zwitterjonowa

Obrazy SEM (rys. 5.37) fazy stacjonarnej zwitterjonowej pozyskanej z kolumny chromatograficznej Eurospher II 100-5 HILIC, uzyskane przy powiększeniach 100 kx (A) i 250 kx (B), przedstawiają ziarna adsorbentu o stosunkowo sferycznym i jednorodnym kształcie. Powierzchnia ziaren jest stosunkowo gładka, jednak obserwuje się lokalne skupiska drobnych fragmentów. Taka morfologia wskazuje na jednorodny charakter powierzchni

adsorbentu, choć występowanie lokalnych nierówności może prowadzić do niewielkiego zróżnicowania dostępności miejsc adsorpcyjnych. Analiza EDS (rys. 5.38., tab. 5.21.) potwierdza skład krzemionki ($O \approx 56,42$ % mas., $Si \approx 39,13$ % mas.) przy jednoczesnym wykryciu metali, w szczególności $Fe \approx 3,28$ % mas. oraz obecności $Cr \approx 0,78$ % mas. i $Ni \approx 0,40$ % mas. Z jednej strony sferyczne i stosunkowo gładkie ziarna adsorbentu mogą sprzyjać bardziej jednolitemu charakterowi powierzchni oraz większej przewidywalności procesów retencyjnych. Z drugiej strony obecność śladowych ilości metali (Fe , Cr i Ni) wykrytych metodą EDS może prowadzić do powstawania lokalnych miejsc o odmiennej energii oddziaływań. Miejsca te mogą być związane z lokalnymi zmianami polarności powierzchni oraz potencjalną możliwością występowania dodatkowych oddziaływań specyficznych, przyczyniając się do pewnego stopnia heterogeniczności energetycznej adsorbentu. Obserwacje te pozostają zgodne z wynikami badań równowag adsorpcyjnych, które wskazują, że dla kofeiny powierzchnia adsorbentu wykazuje charakter zbliżony do jednorodnego energetycznie, natomiast dla fenolu w większości badanych układów obserwuje się cechy powierzchni heterogenicznej energetycznie [252].



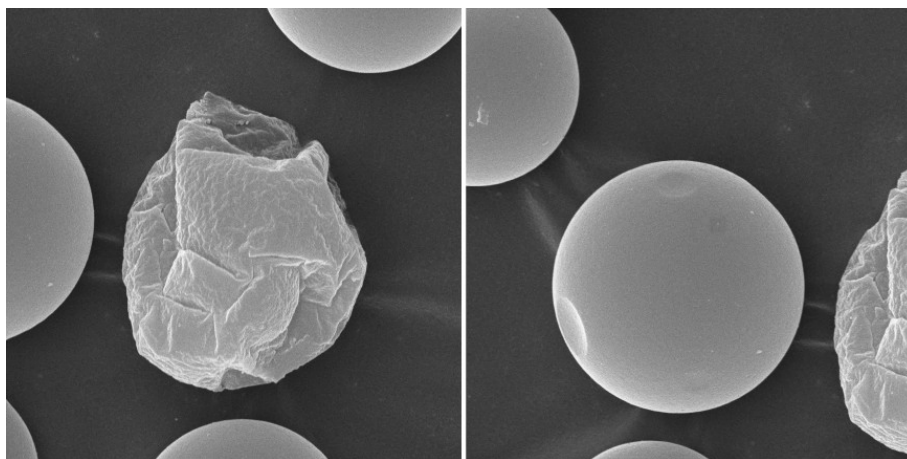
Rysunek 5.37. Obrazy SEM w powiększeniu: A – 100 kx i B – 250 kx fazy stacjonarnej zwitterjonowej pozyskanej z kolumny chromatograficznej Eurospher II 100-5 HILIC



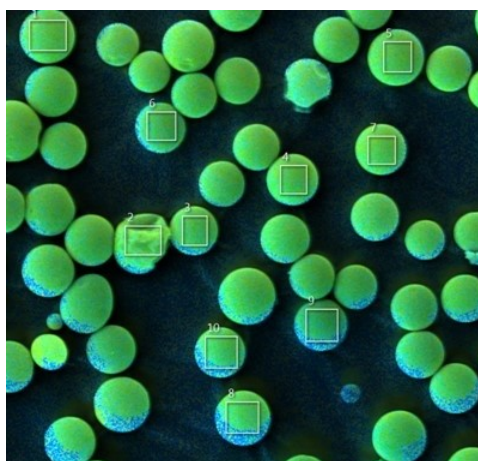
Rysunek 5.38. Obraz SEM fazy stacjonarnej zwitterjonowej pozyskanej z kolumny chromatograficznej Eurospher II 100-5 HILIC z oznaczonymi punktami analizy EDS

Nucleodur C₁₈ Gravity – faza stacjonarna C18

Obrazy SEM (rys. 5.39) fazy stacjonarnej C18 pozyskanej z kolumny chromatograficznej Nucleodur C18 Gravity, uzyskane przy powiększeniu 100 kx, przedstawiają ziarna o wyraźnie sferycznym kształcie oraz gładkiej, względnie jednorodnej topografii powierzchniowej. Na powierzchni obserwuje się jedynie drobne mikrostruktury, typowe dla chemicznie modyfikowanych adsorbentów krzemionkowych. Wyniki analizy składu pierwiastkowego metodą EDS (rys. 5.40, tab. 5.21) potwierdzają krzemionkowy charakter adsorbentu ($O \approx 51,33 \% \text{ mas.}$, $Si \approx 44,23 \% \text{ mas.}$). Jednocześnie wykryto obecność Fe, Cr oraz Ni na poziomie odpowiednio 3,22 % mas., 0,78 % mas. oraz 0,43 % mas. Obecność tych pierwiastków może przyczyniać się do lokalnego zróżnicowania właściwości energetycznych powierzchni adsorbentu. Interpretacja ta jest zgodna z wynikami badań równowag adsorpcyjnych, które dla części analizowanych układów wskazują na występowanie heterogeniczności energetycznej powierzchni [252].



Rysunek 5.39. Obrazy SEM w powiększeniu 100 kx fazy stacjonarnej C18 pozyskanej z kolumny chromatograficznej Nucleodur C₁₈ Gravity

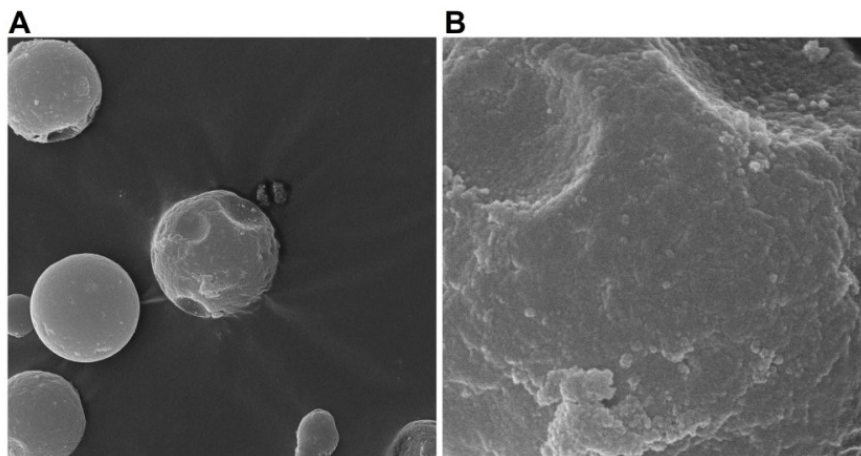


Rysunek 5.40. Obraz SEM fazy stacjonarnej C18 pozyskanej z kolumny chromatograficznej Nucleodur C₁₈ Gravity z oznaczonymi punktami analizy EDS

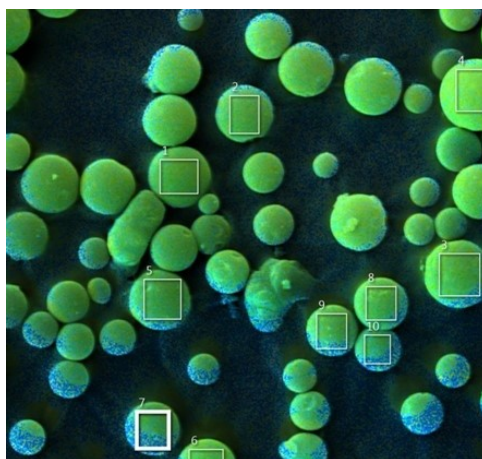
Purospher STAR NH₂ - faza stacjonarna aminopropylowa

Obrazy SEM (rys. 5.41) fazy stacjonarnej aminopropylowej pozyskanej z kolumny chromatograficznej Purospher STAR NH₂, uzyskane przy powiększeniach 50 kx (A) i 250 kx (B), przedstawiają jednorodne, kuliste ziarna o regularnym kształcie. Większość ziaren charakteryzuje się gładką powierzchnią, jednak lokalnie obserwuje się obszary o zwiększonej chropowatości obejmujące niewielkie skupiska drobnych fragmentów oraz nieregularne wypukłości powierzchniowe. Wyniki analizy składu pierwiastkowego metodą EDS (rys. 5.42, tab. 5.21) wskazują na dominujący krzemionkowy charakter adsorbentu (O ≈ 58,75 % mas., Si ≈ 37,49 % mas. Jednocześnie wykryto obecność: Fe, Cr i Ni na poziomie odpowiednio 2,76 % mas., 0,67 % mas. oraz 0,33 % mas. Pierwiastki te mogą przyczyniać się do lokalnego zróżnicowania energetycznego powierzchni, prowadząc do powstawania miejsc adsorpcyjnych o odmiennej energii oddziaływań. Obserwacje te pozostają zgodne z wynikami

badania równowag adsorpcyjnych, które dla części badanych układów wskazują na występowanie heterogenicznego energetycznie charakteru powierzchni [251].



Rysunek 5.41. Obrazy SEM w powiększeniu: A – 50 kx i B – 250 kx fazy stacjonarnej aminopropylowej pozyskanej z kolumny chromatograficznej Purospher STAR NH₂



Rysunek 5.42. Obraz SEM fazy stacjonarnej aminopropylowej pozyskanej z kolumny chromatograficznej Purospher STAR NH₂ z oznaczonymi punktami analizy EDS

Tabela 5.21. Wyniki analizy chemicznej powierzchni adsorbentów komercyjnych metodą EDS

Adsorbenty komercyjne	O % mas.	Si % mas.	Cr % mas.	Fe % mas.	Ni % mas.	Sn % mas.	Ca % mas.
LiChrospher 4000 Si (10 µm)	61,320	36,130	0,430	1,920	0,200	-	-
LiChrospher 60 Si (12 µm)	57,450	39,910	0,460	1,950	0,230	-	-
Silica gel 60 (0,015-0,040 mm)	54,590	42,520	0,440	1,820	0,120	0,420	-
Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)	55,450	41,820	0,320	1,550	0,025	0,047	0,740
Faza stacjonarna amidowa	58,330	37,650	0,700	2,970	0,350	-	-
Faza stacjonarna zwitterjonowa	56,420	39,130	0,780	3,280	0,400	-	-
Faza stacjonarna C18	51,330	44,230	0,780	3,220	0,430	-	-
Faza stacjonarna aminopropylowa	58,750	37,490	0,670	2,760	0,330	-	-

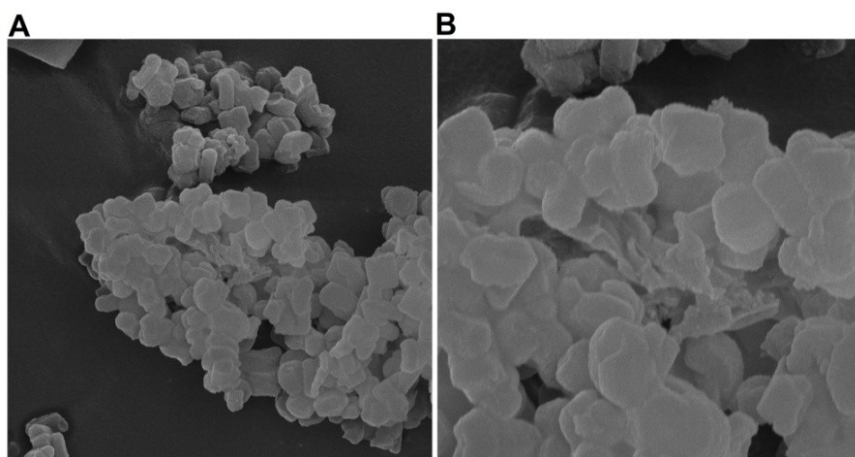
Tabela 5.22. Wyniki analizy całkowitego składu pierwiastkowego wybranych adsorbentów komercyjnych metodą ICP-MS

Skład pierwiastkowy	LiChrospher 4000 Si (10 µm)		LiChrospher 60 Si (12 µm)		Silica gel 60 (0,015–0,040 mm)		Silica gel 60 (0,2–0,5 mm)	
	Stężenie		Stężenie		Stężenie		Stężenie	
P	407	ppm	707	ppm	668	ppm	777	ppm
S	-	-	-	-	0,12	%	0,12	%
Cl	37	ppm	-	-	140,10	ppm	93	ppm
K	-	-	-	-	8	ppm	7	ppm
Ca	409	ppm	452	ppm	0,21	%	0,23	%
Ti	133	ppm	125	ppm	112	ppm	109	ppm
Cr	5	ppm	3	ppm	5	ppm	-	-
Mn	0,50	ppm	-	-	-	-	-	-
Fe	106	ppm	45	ppm	49	ppm	32	ppm
Ni	5	ppm	3	ppm	-	-	4	ppm
Cu	1	ppm	2	ppm	1	ppm	2	ppm
Zn	2	ppm	-	-	-	-	-	-
Sr	1	ppm	-	-	4	ppm	5	ppm
Zr	11	ppm	14	ppm	31	ppm	34	ppm
SiO ₂	99,89	%	99,86	%	99,57	%	100	%

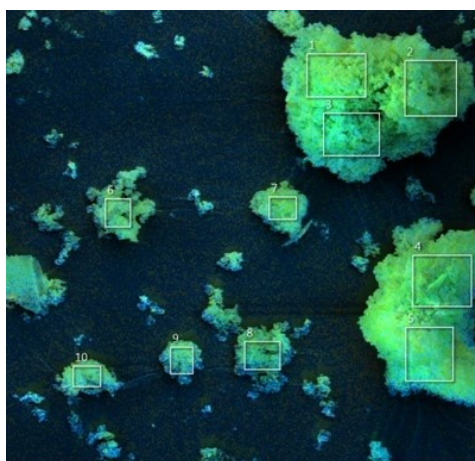
V.2.1.2. Adsorbenty niekomercyjne

MCM-41

Obrazy SEM adsorbentu niekomercyjnego typu MCM-41 (rys. 5.43), wykonane przy powiększeniach 100 kx (A) i 250 kx (B), przedstawiają nieregularne ziarna tworzące zwarte aglomeraty. Ziarna charakteryzują się nieostрым, nieregularnym kształtem typowym dla materiałów mezoporowatych. Powierzchnia pojedynczych ziaren wydaje się stosunkowo gładka, natomiast cały materiał występuje w postaci luźnych skupisk wieloziarnowych. Morfologia ta jest charakterystyczna dla adsorbentów typu MCM-41, które cechują się rozwiniętą i uporządkowaną strukturą mezoporowatą. Pory materiału zlokalizowane są głównie we wnętrzu ziaren, dlatego nie są obserwowane na obrazach SEM jako wyraźne otwarte struktury na powierzchni zewnętrznej. Analiza powierzchni adsorbentu metodą EDS (rys. 5.44, tab. 5.23) potwierdza, że MCM-41 składa się z krzemionki ($O \approx 59,11$ % mas. i $Si \approx 37,14$ % mas.). Analiza EDS wykazała, że na powierzchni tej krzemionki znajdują się również: $Cr \approx 0,7$ % mas., $Fe \approx 2,73$ % mas., $Ni \approx 0,32$ % mas. Natomiast analiza metodą ICP-MS (tab. 5.24) wskazuje na obecność śladowych ilości: $Fe \approx 81$ ppm, $Cr \approx 23$ ppm, $Ni \approx 7$ ppm oraz pierwiastków takich jak $Ca \approx 453$ ppm, $P \approx 790$ ppm, $Ti \approx 5$ ppm, $Zn \approx 4$ ppm, $Cu \approx 3$ ppm, $Cl \approx 13$ ppm, $K \approx 12$ ppm. Obecność metali (np. Fe, Cr i Ni) oraz pierwiastków takich jak Ca i P może powodować lokalne zróżnicowanie właściwości energetycznych powierzchni adsorbentu. W zależności od charakteru analitu oraz zastosowanej fazy ruchomej zróżnicowanie to może przejawiać się występowaniem powierzchni heterogenicznej energetycznie. Interpretacja ta jest zgodna z wynikami badań równowag adsorpcyjnych, w których dla układu zawierającego acetonitryl stwierdzono obecność dodatkowych centrów adsorpcyjnych o podwyższonej energii oddziaływań (podrozdział V.1.5.4.).



*Rysunek 5.43. Obrazy SEM w powiększeniu: A – 100 kx i B- 250 kx
adsorbentu MCM-41*

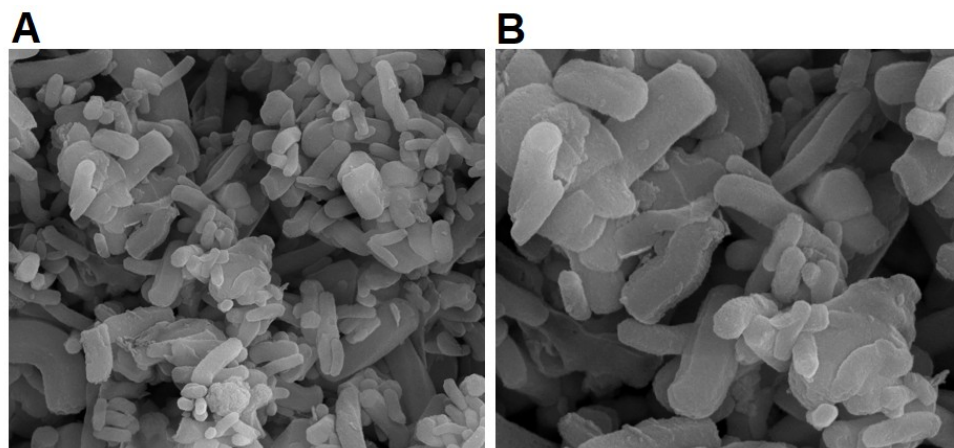


*Rysunek 5.44. Obraz SEM dla adsorbentu MCM-41 z oznaczonymi punktami
analizy EDS*

MCM-41-Cl

Obrazy SEM adsorbentu MCM-41-Cl (rys. 5.45), uzyskane przy powiększeniach 25 kx (A) i 50 kx (B), przedstawiają materiał złożony z drobnych, nieregularnych cząstek skupionych w postaci porowatych aglomeratów. Pojedyncze ziarna wykazują nieostre granice oraz nieregularny kształt, charakterystyczny dla mezoporowatych materiałów krzemionkowych typu MCM-41. Analiza składu chemicznego powierzchni metodą EDS wykazała (tab. 5.23) obecność chloru (1,0 % mas.), co potwierdza skuteczną funkcjonalizację powierzchni grupami chloropropylowymi. Dodatkowo stwierdzono obecność azotu (3,1 % mas.) oraz fluoru (0,6 % mas.). Analiza ICP-MS wykonana dla adsorbentu MCM-41-Cl (tab. 5.24) wskazuje na dominujący udział krzemu w strukturze materiału ($\text{Si} \approx 96,94$ % w przeliczeniu na skład odpowiadający SiO_2). Jednocześnie stwierdzono podwyższoną zawartość chloru (2,92 %), co dodatkowo potwierdza modyfikację powierzchni

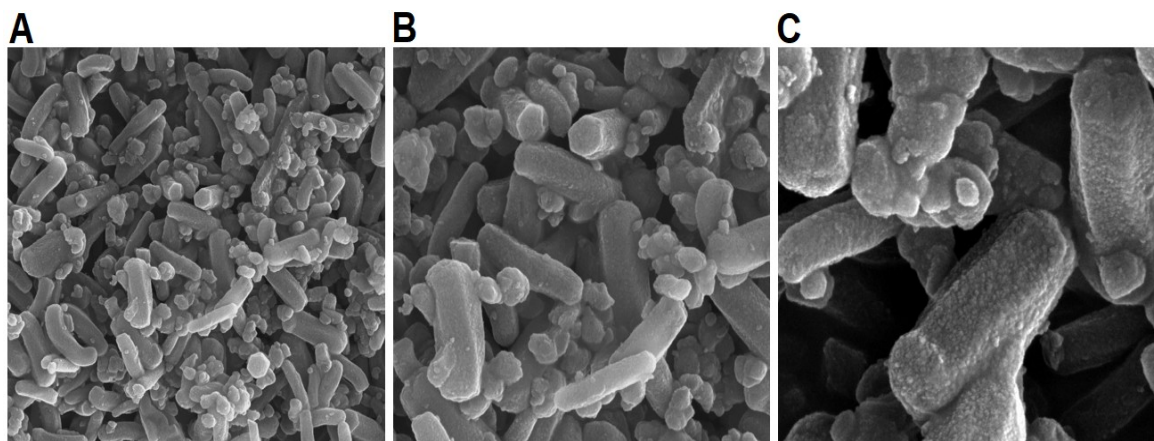
adsorbentu grupami chloropropyłowymi. Wyniki ICP-MS pozostają zgodne z analizą EDS, potwierdzając zarówno wysoką czystość krzemionkowej matrycy, jak i obecność chloru związanego z funkcjonalizacją powierzchni adsorbentu.



Rysunek 5.45. Obrazy SEM w powiększeniu: A - 25 kx, B – 50 kx dla adsorbentu MCM-41-Cl

MCM-41-Gly

Obrazy SEM adsorbentu MCM-41-Gly (rys. 5.46), uzyskane przy powiększeniach 25 kx (A), 50 kx (B) oraz 100 kx (C), przedstawiają agregaty drobnych, nieregularnych ziaren, charakterystyczne dla mezoporowatych materiałów typu MCM-41. Pojedyncze ziarna wykazują nieregularny, częściowo zaokrąglony kształt, tworząc luźne aglomeraty o drobnoziarnistej morfologii. Analiza obrazów SEM wskazuje na względnie jednorodny charakter morfologii powierzchni, przy jednoczesnej obecności nielicznych lokalnych niejednorodności strukturalnych. Analiza EDS adsorbentu MCM-41-Gly (tab. 5.23) wskazuje na dominujący krzemionkowy charakter powierzchni materiału ($O \approx 62,0$ % mas., $Si \approx 34,0$ % mas.). Zarejestrowano niewielkie ilości chloru (0,1 % mas.), fluoru (0,6 % mas.), miedzi (0,3 % mas.) oraz azotu (3,0 % mas.). Analiza ICP-MS przeprowadzona dla MCM-41-Gly (tab. 5.24) potwierdza wysoką czystość krzemionkowej matrycy, wskazując na dominujący udział krzemu odpowiadający SiO_2 na poziomie 99,87 %.



Rysunek 5.46. Obrazy SEM: A – 25 kx, B – 50 kx, C – 100 kx adsorbentu
MCM-41-Gly

Tabela 5.23. Wyniki analizy chemicznej powierzchni adsorbentów niekomercyjnych metodą
EDS

Adsorbenty niekomercyjne	O % mas.	Si % mas.	Cr % mas.	Fe % mas.	Ni % mas.	N % mas.	Cl % mas.	F % mas.	Cu % mas.
MCM-41	59,11	37,14	0,70	2,73	0,32	-	-	-	-
MCM-41-Cl	59,80	35,20	-	-	-	3,10	1,00	0,60	0,20
MCM-41-Gly	62,00	34,00	-	-	-	3,00	0,10	0,60	0,30

Tabela 5.24. Wyniki analizy całkowitego składu pierwiastkowego adsorbentów
niekomercyjnych metodą ICP-MS

Skład pierwiastkowy	MCM-41		MCM-41-Cl		MCM-41-Gly	
	Stężenie		Stężenie		Stężenie	
P	790	ppm	799	ppm	707	ppm
S	-	-	-	-	-	-
Cl	13	ppm	2,92	%	35	ppm
K	12	ppm	-	-	-	-
Ca	453	ppm	482	ppm	466	ppm
Ti	5	ppm	3	ppm	-	-
Cr	23	ppm	19	ppm	11	ppm
Mn	-	-	-	-	-	-
Fe	81	ppm	63	ppm	43	ppm
Ni	7	ppm	7	ppm	4	ppm
Cu	3	ppm	0,70	ppm	2	ppm
Zn	4	ppm	4	ppm	7	ppm
Sr	-	-	-	-	-	-
Zr	-	-	4	ppm	5	ppm
SiO ₂	99,86	%	96,94	%	99,87	%

V.2.1.3. Podsumowanie

Przeprowadzona analiza morfologiczna powierzchni adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych oraz analiza składu pierwiastkowego metodami EDS i ICP-MS wskazuje na dominujący krzemionkowy charakter wszystkich badanych materiałów. Zaobserwowane różnice w morfologii powierzchni, od regularnych, gładkich ziaren (np. LiChrospher, Eurospher II, Purospher STAR NH₂) po nieregularne i bardziej chropowate ziarna (np. Silica gel 60) mogą wpływać na dostępność miejsc adsorpcyjnych, a tym samym na efektywność i charakter procesów sorpcyjnych. Analiza ICP-MS wykazała obecność śladowych ilości pierwiastków, takich jak np. P, Ca, Ti, Zr, Fe, Cr i Ni, które mogą w pewnym stopniu modyfikować właściwości energetyczne powierzchni adsorbentów. Nieregularny kształt ziaren oraz lokalne defekty powierzchniowe, szczególnie charakterystyczne dla adsorbentów typu Silica gel 60, mogą sprzyjać zwiększonej heterogeniczności energetycznej powierzchni.

Analiza faz stacjonarnych pozyskanych z kolumn chromatograficznych wykazała, że adsorbenty te charakteryzują się wysokim stopniem sferyczności oraz relatywnie gładką topografią zewnętrzną. Obrazy SEM ujawniły jedynie lokalne niejednorodności morfologiczne, wskazując na zbliżony charakter struktury powierzchniowej badanych materiałów. Jednocześnie wyniki badań równowag adsorpcyjnych sugerują, że w niektórych warunkach chromatograficznych mogą występować różnice w charakterze energetycznym miejsc adsorpcyjnych. Zjawisko to może być związane z lokalnym zróżnicowaniem składu chemicznego powierzchni, wynikającym między innymi z obecności śladowych ilości pierwiastków takich jak Fe, Ni czy Cr.

Natomiast krzemionki mezoporowate: MCM-41, MCM-41-Cl oraz MCM-41-Gly wykazują typową drobnoziarnistą morfologię charakterystyczną dla materiałów mezoporowatych. Regularność ich struktury oraz względna jednorodność morfologiczna wskazują, że proces funkcjonalizacji grupami chloropropylowymi i glicydyłowymi nie powodował istotnych zmian w morfologii nośnika. Jednocześnie wprowadzenie tych grup funkcyjnych prowadzi do modyfikacji właściwości chemicznych powierzchni przy zachowaniu charakterystycznej struktury mezoporowatej MCM-41. Interpretacja ta pozostaje zgodna z wynikami badań równowag adsorpcyjnych, które wskazują na stosunkowo jednorodny charakter energetyczny powierzchni badanych materiałów.

V.2.2. Rozkład wielkości ziaren adsorbentów

V.2.2.1. Adsorbenty komercyjne

Na rysunku 5.47 przedstawiono wykres rozkładu wielkości ziaren dla adsorbentów komercyjnych. Oś pozioma przedstawia średnicę ziaren, d (μm), w skali logarytmicznej (zakres od około 10 μm do 1000 μm) natomiast oś pionowa procentowy udział objętościowy poszczególnych frakcji, V_{frakcji} (%).

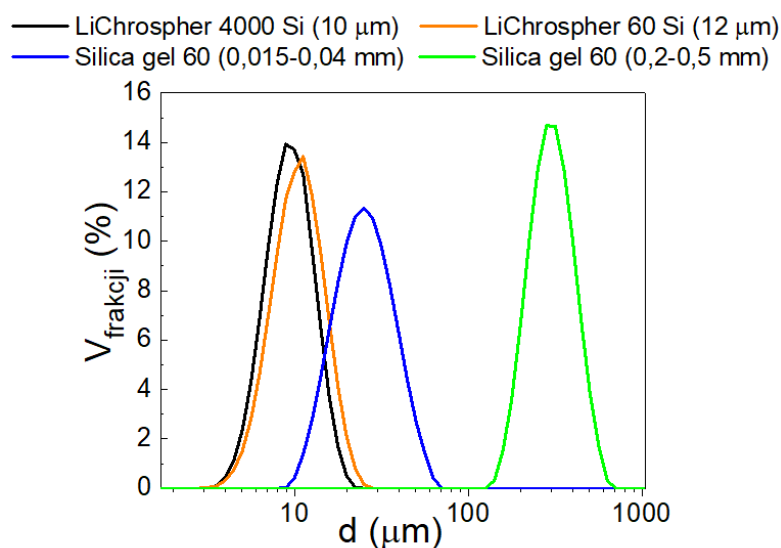
Dla adsorbentu LiChrospher 4000 Si deklarowana przez producenta przeciętna wielkość ziaren wynosi 10 μm . Na wykresie widoczny jest wyraźny pik odpowiadający najliczniejszej frakcji ziaren. Maksimum objętości osiągane jest dla ziaren o wielkości około 8,93 μm (wartość maksymalna 13,93 % udziału objętościowego). Analiza rozkładu wielkości ziaren wskazuje, że największy udział objętościowy przypada na ziarna o średnicach w zakresie od 5 do 12 μm , przy udziale objętościowym od 2 do 13,93 %.

Dla adsorbentu LiChrospher 60 Si deklarowana przez producenta przeciętna średnica ziaren wynosi 12 μm . Maksimum objętości osiągane jest dla ziaren o wielkości około 11,24 μm (wartość maksymalna 13,43 % udziału objętościowego). Analiza wykresu przedstawia, że zdecydowana większość ziaren znajduje się w tym zakresie. Badanie rozkładu wielkości ziaren wskazuje, że największy udział objętościowy przypada na ziarna o średnicach w zakresie od 5 do 20 μm , przy udziale objętościowym od 2 do 13,43 %.

Rozkład wielkości ziaren adsorbentu Silica gel 60, którego frakcja ziarnowa deklarowana przez producenta mieści się w przedziale od 0,015 do 0,040 mm charakteryzuje się rozkładem o wyraźnie monomodalnym kształcie. Większość ziaren koncentruje się wokół dominującego zakresu rozmiaru. Największe zagęszczenie obserwowane jest w okolicach 25 μm , co wskazuje na najczęściej występującą średnicę ziaren (11,34 % udziału objętościowego). Frakcja wykazuje rozkład przesunięty ku mniejszym wartościom, ale z zauważalnym ogonem w kierunku większych ziaren, oznacza to, że w adsorbencie występuje pewien udział ziaren zarówno drobniejszych, jak i nieco większych. Analiza rozkładu wielkości ziaren wskazuje, że największy udział objętościowy przypada na ziarna o średnicach w zakresie od 12 do 50 μm (0,012-0,050 mm), przy udziale objętościowym od około 2 do 11,34 %.

Dla adsorbentu Silica gel 60, dla którego frakcja ziarnowa deklarowana przez producenta zawiera się w przedziale od 0,2 do 0,5 mm, maksimum objętości osiągane jest dla ziaren o średnicy 0,28 mm (wartość maksymalna 14,68 % udziału objętościowego). Obrazuje to dobrze zarysowany pik przedstawiony na wykresie. Analiza rozkładu wielkości ziaren wskazuje, że największy udział objętościowy przypada na ziarna o średnicach

w zakresie od 158 do 563 μm (0,158-0,563 mm), przy udziale objętościowym od około 2 do 14,68 %.



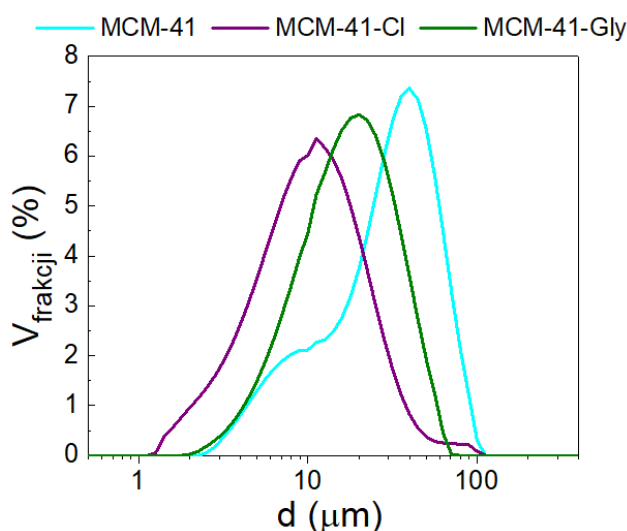
Rysunek 5.47. Rozkład wielkości ziaren adsorbentów komercyjnych

V.2.2.2. Adsorbenty niekomercyjne

Rysunek 5.48 przedstawia rozkład wielkości ziaren adsorbentów niekomercyjnych z grupy MCM-41. Dla adsorbentu MCM-41 rozkład wielkości ziaren zaczyna się od wartości rzędu kilku μm i wykazuje stopniowy wzrost udziału frakcji, aż do maksimum obserwowanego w okolicach 39,90 μm (wartość maksymalna 7,36 % udziału objętości). Po tej wartości następuje wyraźny spadek udziału frakcji przy większych średnicach. Kształt rozkładu jest stosunkowo szeroki, z wyraźnym przesunięciem ku większym ziarnom. Analiza rozkładu wielkości ziaren wskazuje, że największy udział objętościowy przypada na ziarna o średnicach w zakresie od 8 do 80 μm przy udziale objętościowym od około 2 do 7,36 %.

Adsorbent MCM-41-Cl, funkcjonalizowany grupami chloropropylowymi, wykazuje rozkład wielkości ziaren przesunięty w kierunku mniejszych średnic w porównaniu z niemodyfikowaną krzemionką MCM-41. Najmniejsze ziarna osiągają rozmiary około 1,26 μm , natomiast maksimum udziału objętościowego występuje dla ziaren o średnicy około 11,25 μm (maksymalny udział objętościowy 6,36 %). Dla większych średnic obserwuje się stopniowy spadek udziału objętościowego, przy czym rozkład ma charakter asymetryczny i jest skoncentrowany w zakresie mniejszych ziaren. Analiza rozkładu wielkości ziaren wskazuje, że największy udział objętościowy przypada na ziarna o średnicach od około 3,50 do 28 μm , dla których udział objętościowy mieści się w zakresie od 2 do 6,36 %.

Dla adsorbentu MCM-41-Gly, funkcjonalizowanego grupami glicydylowymi, rozkład wielkości ziaren ma charakter pośredni pomiędzy MCM-41 i MCM-41-Cl. Najmniejsze ziarna osiągają rozmiary około 2 μm , natomiast maksimum udziału objętościowego obserwuje się dla ziaren o średnicy około 20 μm (maksymalny udział objętościowy 6,84 %). Rozkład jest stosunkowo wąski w porównaniu z MCM-41, lecz szerszy niż w przypadku MCM-41-Cl. Analiza rozkładu wielkości ziaren wskazuje, że największy udział objętościowy przypada na ziarna o średnicach od około 6 do 44 μm , dla których udział objętościowy mieści się w zakresie od około 2 do 6,84 %.



Rysunek 5.48. Rozkład wielkości ziaren adsorbentów niekomercyjnych

V.2.2.3. Podsumowanie

Analiza rozkładu wielkości ziaren adsorbentów komercyjnych wykazała niewielkie różnice pomiędzy wartościami deklarowanymi przez producentów a wynikami uzyskanymi eksperymentalnie. Dla adsorbentów LiChrospher 4000 Si oraz LiChrospher 60 Si maksimum udziału objętościowego występowały odpowiednio przy 8,93 μm i 11,24 μm , przy dominujących zakresach wielkości ziaren wynoszących 5–12 μm oraz 5–20 μm . W przypadku adsorbentu Silica gel 60 uzyskane rozkłady wielkości ziaren zarówno dla frakcji 0,015–0,040 mm, jak i 0,2–0,5 mm były nieco szersze niż zakresy frakcji deklarowane przez producenta. Otrzymane wyniki wskazują, że rozkłady wielkości ziaren badanych adsorbentów są stosunkowo zgodne z charakterystyką producentów, choć obserwowane są niewielkie odchylenia dotyczące szerokości rozkładów ziarnowych.

Analiza niekomercyjnych adsorbentów typu MCM-41 wykazała różnice w rozkładzie wielkości ziaren pomiędzy badanymi materiałami. Dla niemodyfikowanego adsorbentu MCM-41 maksimum udziału objętościowego przypada na ziarna o wielkości 39,9 μm .

W przypadku adsorbentu MCM-41-Cl, funkcjonalizowanego grupami chloropropylowymi, maksimum to jest wyraźnie przesunięte ku mniejszym wartościom i występuje przy 11,25 μm . Adsorbent MCM-41-Gly, zawierający grupy glicydylowe, zajmuje pozycję pośrednią, osiągając maksimum udziału objętościowego dla ziaren o średnicy około 20 μm . Uzyskane wyniki wskazują, że funkcjonalizacja powierzchni MCM-41 grupami chloropropylowymi i glicydylowymi wpływa na charakter rozkładu wielkości ziaren, prowadząc do przesunięcia maksimum udziału objętościowego ku mniejszym średnicom. Zjawisko to może być związane ze zmianami właściwości powierzchniowych materiału wywołanymi obecnością grup funkcyjnych.

V.2.3. Analiza porowatości adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych

V.2.3.1. Izotermy adsorpcji/desorpcji azotu

Adsorbenty komercyjne

Na przedstawionych izotermach adsorpcji–desorpcji azotu dla badanych adsorbentów (rys. 5.49 i 5.50) oś pozioma przedstawia względne ciśnienie równowagowe (P/P_0), natomiast oś pionowa odpowiada objętości zaadsorbowanego azotu wyrażonej w cm^3/g w warunkach STP (standardowe warunki temperatury i ciśnienia: $T = 273,15 \text{ K}$, $P = 1\,013,25 \text{ hPa}$).

Dla adsorbentu LiChrospher 4000 Si (10 μm) (rys. 5.49 A) w początkowym zakresie względnych ciśnień ($P/P_0 < 0,1$) obserwuje się niewielki wzrost adsorpcji azotu (gałąź adsorpcyjna – czerwone punkty/linia), co może świadczyć o obecności niewielkiej ilości mikroporów lub adsorpcji zachodzącej na powierzchni mezoporów. W zakresie średnich wartości P/P_0 (0,4–0,8) ilość zaadsorbowanego azotu wzrasta stopniowo, natomiast przy wysokich wartościach względnego ciśnienia ($P/P_0 > 0,9$) obserwuje się gwałtowny przyrost adsorpcji związany z kondensacją kapilarną w mezoporach. Gałąź desorpcyjna (niebieskie punkty/linia) przebiega blisko gałęzi adsorpcyjnej, tworząc stosunkowo wąską pętlę histerezy. Taki przebieg jest charakterystyczny dla izotermy typu IV (A) według klasyfikacji IUPAC, typowej dla materiałów mezoporowatych. Obecność pętli histerezy wskazuje na różnice pomiędzy procesami napełniania i opróżniania porów podczas adsorpcji i desorpcji azotu. Jej kształt wykazuje cechy histerezy typu H1 według klasyfikacji IUPAC.

Dla adsorbentu LiChrospher 60 Si (12 μm) (rys. 5.49 B) uzyskana izoterma adsorpcji–desorpcji azotu odpowiada izotermie typu IV (B), charakterystycznej dla materiałów mezoporowatych wykazujących słabo zaznaczoną pętlę histerezy. W całym zakresie ciśnień względnych obserwuje się stopniowy wzrost ilości zaadsorbowanego azotu, bez wyraźnego, gwałtownego wzrostu związanego z kondensacją kapilarną. Gałęzie adsorpcji

i desorpcji przebiegają bardzo blisko siebie, co wskazuje na słabo rozwiniętą pętlę histerezy. Może to świadczyć o niewielkim udziale kondensacji kapilarnej oraz stosunkowo otwartej strukturze porów, w której procesy adsorpcji i desorpcji przebiegają w podobny sposób. Istotną cechą izotermy tego adsorbentu są znacznie większe wartości objętości zaadsorbowanego azotu w porównaniu z adsorbentem LiChrospher 4000 Si (10 μm). Maksymalna objętość zaadsorbowanego azotu przekracza 320 cm^3/g , podczas gdy dla LiChrospher 4000 Si (10 μm) osiąga około 18 cm^3/g . Wynik ten wskazuje na znacznie większą całkowitą objętość porów oraz bardziej rozwiniętą powierzchnię właściwą badanego adsorbentu.

Izoterma adsorpcji–desorpcji azotu dla adsorbentu Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) (rys. 5.49 C) odpowiada typowi IV (A). W zakresie niskich wartości ciśnienia względnego ($P/P_0 < 0,1$) nie obserwuje się gwałtownego wzrostu adsorpcji, typowego dla materiałów o silnie rozwiniętej mikroporowatości, co wskazuje na niewielki udział mikroporów w strukturze badanego adsorbentu. Wraz ze wzrostem ciśnienia względnego ilość zaadsorbowanego azotu stopniowo rośnie, natomiast w obszarze wysokich wartości P/P_0 (około 0,8–1,0) obserwuje się wyraźne zwiększenie nachylenia izotermy, związane z kondensacją kapilarną zachodzącą w mezoporach. Gałęzie adsorpcji i desorpcji przebiegają blisko siebie, tworząc wąską pętlę histerezy o niewielkiej szerokości. Świadczy to o niewielkich różnicach pomiędzy procesami adsorpcji i desorpcji oraz sugeruje dobrą dostępność układu porów dla cząsteczek adsorbentu. Maksymalna objętość zaadsorbowanego azotu osiąga około 165 cm^3/g , co potwierdza obecność rozwiniętej struktury mezoporowatej.

Izoterma adsorpcji–desorpcji azotu uzyskana dla adsorbentu Silica gel 60 (0,2–0,5 mm) (rys. 5.49 D) odpowiada izotermie typu IV (B). W zakresie niskich wartości ciśnienia względnego ($P/P_0 < 0,1$) obserwuje się stopniowy przyrost objętości zaadsorbowanego azotu, co wskazuje na niewielki udział mikroporów. W środkowym zakresie ciśnień względnych adsorpcja przebiega płynnie, natomiast przy wyższych wartościach P/P_0 obserwuje się zwiększenie nachylenia izotermy związane z kondensacją kapilarną zachodzącą w mezoporach. Gałęzie adsorpcji i desorpcji przebiegają bardzo blisko siebie, praktycznie się pokrywając, co wskazuje na brak wyraźnie rozwiniętej pętli histerezy. Taki przebieg izotermy sugeruje dobrą dostępność przestrzeni porowej oraz niewielkie różnice pomiędzy procesami adsorpcji i desorpcji zachodzącymi w porach adsorbentu.

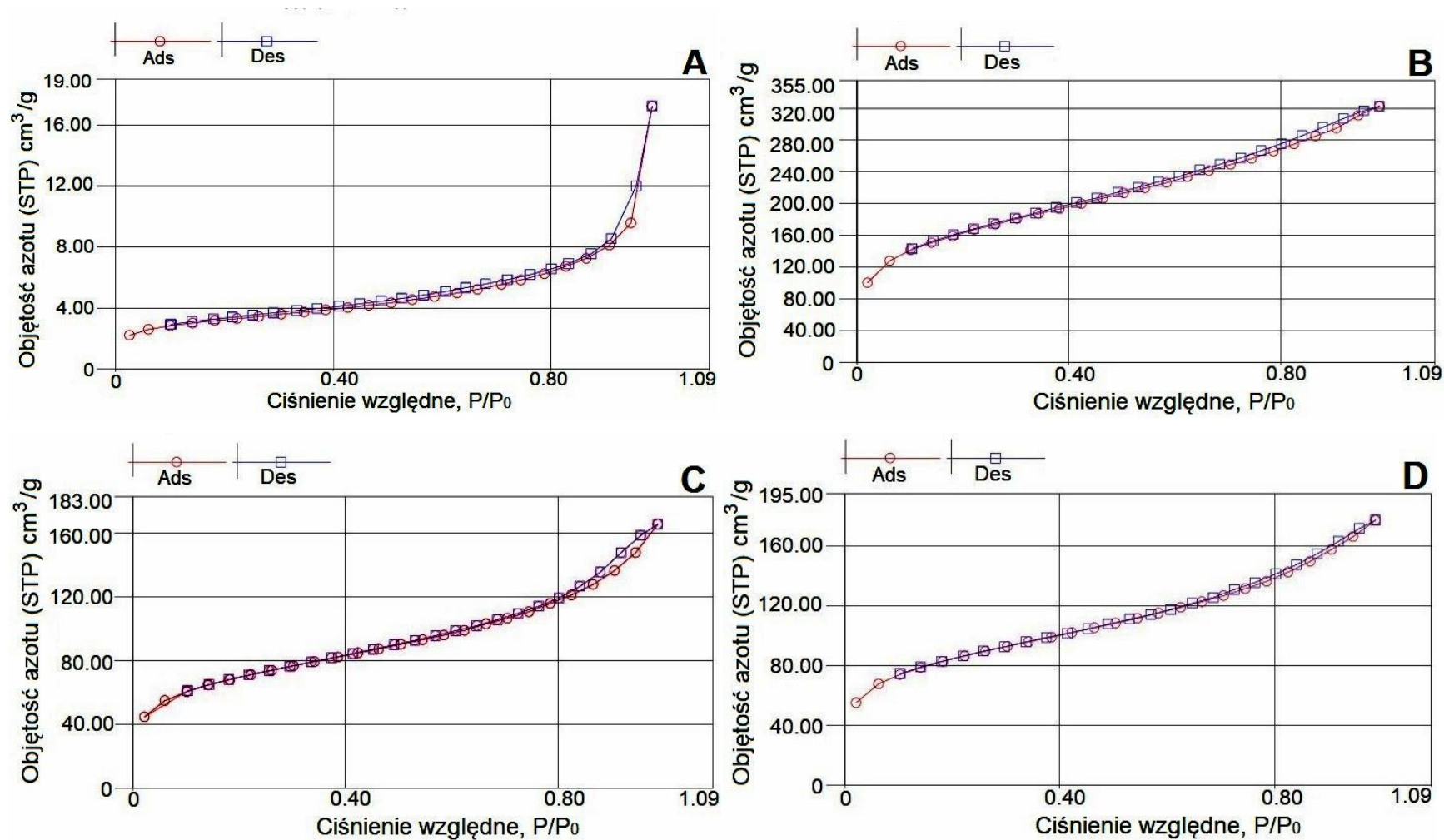
Izoterma adsorpcji–desorpcji azotu uzyskana dla fazy stacjonarnej amidowej pozyskanej z kolumny chromatograficznej TSK-Gel Amide-80 (rys. 5.50 A) odpowiada izotermie typu IV (A). W zakresie niskich wartości ciśnienia względnego ($P/P_0 < 0,4$)

obserwuje się stopniowy wzrost objętości zaadsorbowanego azotu, związany z tworzeniem wielowarstw adsorpcyjnych na powierzchni adsorbentu. W środkowym zakresie ciśnień względnych przyrost adsorpcji pozostaje umiarkowany, natomiast przy wysokich wartościach P/P_0 ($> 0,7$) następuje gwałtowny wzrost ilości zaadsorbowanego azotu, charakterystyczny dla kondensacji kapilarnej zachodzącej w mezoporach. Gałąź desorpcyjna odbiega wyraźnie od gałęzi adsorpcyjnej, tworząc szeroką pętlę histerezy. Jej przebieg wskazuje na odmienne procesy napełniania i opróżniania porów. Kształt pętli jest zbliżony do typu H2 (B) i może być związany z obecnością porów o złożonej geometrii oraz efektem przewężeń utrudniających desorpcję adsorbatu.

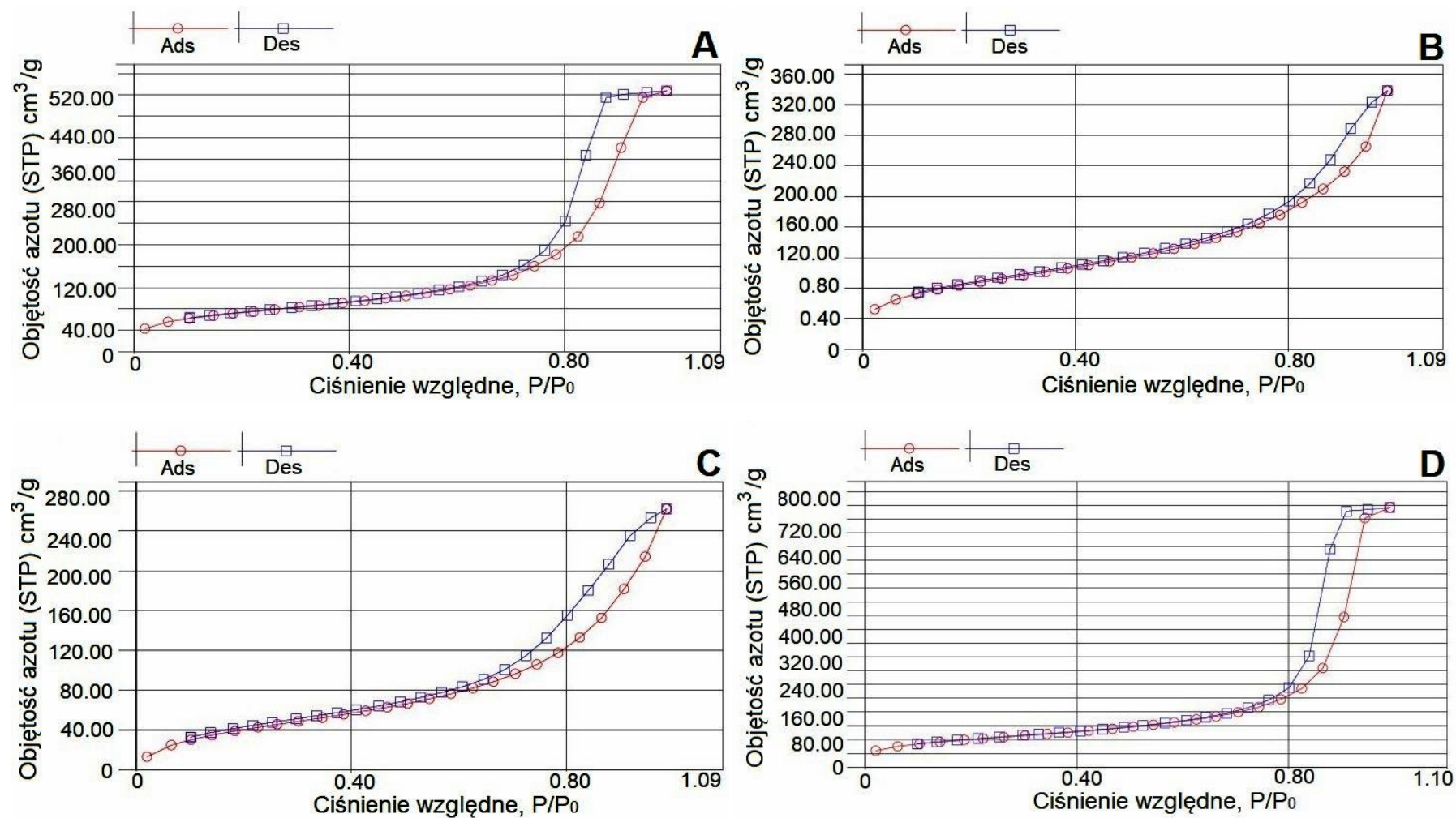
Dla fazy stacjonarnej zwitterjonowej pozyskanej z kolumny chromatograficznej Eurospher II 100-5 HILIC przedstawiona izoterma adsorpcji/desorpcji azotu (rys. 5.50 B) odpowiada izotermie typu IV (A). W zakresie niskich i średnich ciśnień względnych ($P/P_0 < 0,8$) obserwuje się stopniowy, ciągły wzrost objętości zaadsorbowanego azotu, charakterystyczny dla adsorpcji wielowarstwowej na wewnętrznych powierzchniach mezoporowatych. W wyższym zakresie P/P_0 pojawia się wyraźna rozbieżność pomiędzy gałęzią adsorpcyjną i desorpcyjną, prowadząca do powstania pętli histerezy. Wzrost ten nasila się szczególnie w pobliżu ciśnień zbliżonych do jedności, gdzie obserwowany jest gwałtowny przyrost objętości adsorbentu związany z kondensacją kapilarną w porach o większych rozmiarach. Pętla histerezy jest szeroka, otwarta i przesunięta ku wysokim wartościom P/P_0 . Jej kształt wykazuje cechy histerezy typu H3, która jest często związana z obecnością porów szczelinowych oraz otwartych przestrzeni międzycząsteczkowych.

Izoterma adsorpcji–desorpcji azotu dla fazy stacjonarnej C18 pozyskanej z kolumny chromatograficznej Nucleodur C18 Gravity (rys. 5.50 C) wykazuje typowy przebieg izotermi typu IV (A). W zakresie niskich wartości ciśnienia względnego ($P/P_0 < 0,4$) obserwuje się stopniowy, łagodny wzrost objętości adsorbentu, odpowiadający adsorpcji wielowarstwowej na powierzchni porów. W przedziale średnich ciśnień względnych ($0,4 < P/P_0 < 0,7$) krzywa adsorpcyjna rośnie równomiernie, bez gwałtownych zmian, co wskazuje na rozwiniętą strukturę mezoporowatą badanego materiału. Przy wyższych wartościach P/P_0 (powyżej 0,7) obserwuje się gwałtowny wzrost adsorpcji, związany z kondensacją kapilarną zachodzącą w mezoporach o większych rozmiarach. W tym zakresie pojawia się również wyraźne rozdzielenie gałęzi adsorpcyjnej i desorpcyjnej, prowadzące do powstania pętli histerezy. Pętla ta jest szeroka, otwarta i przesunięta ku wysokim wartościom ciśnienia względnego. Jej kształt wykazuje cechy histerezy typu H3.

Izoterma adsorpcji–desorpcji azotu dla fazy stacjonarnej aminopropylowej pozyskanej z kolumny chromatograficznej Purospher STAR NH₂ (rys. 5.50 D) wykazuje przebieg charakterystyczny dla materiałów mezoporowatych i odpowiada izotermie typu IV (A). W zakresie niskich ciśnień względnych ($P/P_0 < 0,4$) obserwuje się stopniowy wzrost objętości zaadsorbowanego azotu, co wskazuje na dominację adsorpcji mono- i wielowarstwowej oraz niewielki udział mikroporów. W środkowym zakresie ciśnień względnych krzywa adsorpcyjna przebiega równomiernie. Przy wyższych wartościach P/P_0 ($> 0,8$) występuje gwałtowny wzrost adsorpcji związany z kondensacją kapilarną zachodzącą w mezoporach. W tym zakresie obserwuje się również wyraźne rozdzielenie gałęzi adsorpcyjnej i desorpcyjnej, prowadzące do powstania dobrze rozwiniętej pętli histerezy. Jej kształt jest zbliżony do typu H1.



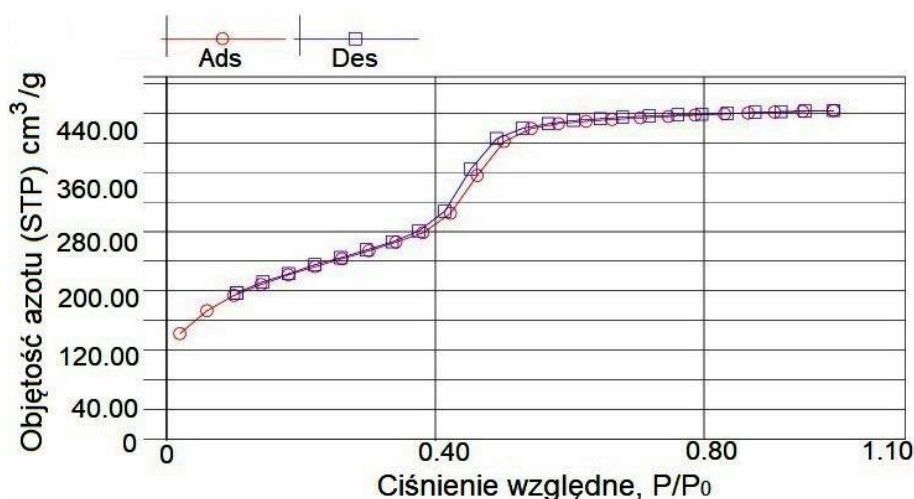
Rysunek 5.49. Izotermi adsorpcji/desorpcji azotu dla: A – LiChrospher 4000 Si (10 μm), B – LiChrospher 60 Si (12 μm), C – Silica gel 60 (0,015-0,040 mm), D – Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)



Rysunek 5.50. Izotermy adsorpcji/desorpcji azotu dla faz stacjonarnych: A – amidowej, B – zwitterjonowej, C – C18, D – aminopropylowej

Adsorbenty niekomercyjne

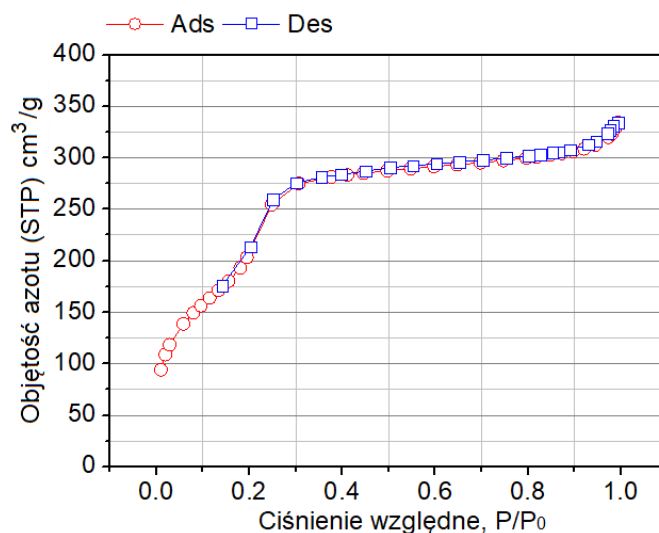
Izoterma adsorpcji–desorpcji azotu dla adsorbentu MCM-41 (rys. 5.51) wykazuje cechy charakterystyczne dla wysoko uporządkowanej mezoporowatości i odpowiada izotermie typu IV (A). W zakresie niskich ciśnień względnych ($P/P_0 < 0,4$) obserwuje się stopniowy wzrost ilości zaadsorbowanego azotu, związany z procesem adsorpcji wielowarstwowej na powierzchni wewnętrznej regularnych kanałów mezoporowatych. Brak wyraźnego, gwałtownego wzrostu adsorpcji w tym obszarze wskazuje na niewielki udział mikroporów w strukturze materiału. W przedziale P/P_0 0,4–0,5 występuje charakterystyczny, stromy skok objętości zaadsorbowanego azotu, będący efektem kondensacji kapilarnej zachodzącej w jednorodnych mezoporach. Po przekroczeniu $P/P_0 \approx 0,5$ krzywa adsorpcyjna ulega wyraźnemu wypłaszczeniu, co świadczy o niemal całkowitym wypełnieniu porów i osiągnięciu stanu nasycenia. Pętla histerezy jest bardzo wąska, a gałęzie adsorpcji i desorpcji w dużym stopniu się pokrywają, co wskazuje na typ H1 według klasyfikacji IUPAC. Tego rodzaju histereza jest charakterystyczna dla materiałów zawierających jednorodne, cylindryczne kanały mezoporowate o wąskim rozkładzie średnic. Uzyskane wyniki są zgodne z heksagonalną strukturą MCM-41 oraz potwierdzają wysoki stopień uporządkowania mezoporów.



Rysunek 5.51. Izoterma adsorpcji/desorpcji azotu dla adsorbentu MCM-41

Izoterma adsorpcji–desorpcji azotu dla adsorbentu MCM-41-Cl (rys. 5.52) zmodyfikowanego grupami chloropropyłowymi zachowuje charakter izotermi typu IV (A). W zakresie niskich ciśnień względnych ($P/P_0 < 0,2$) obserwuje się stopniowy wzrost ilości zaadsorbowanego azotu. W przedziale P/P_0 0,2–0,3 występuje wyraźny skok objętości adsorbowanego azotu związany z kondensacją kapilarną zachodzącą w mezoporach.

W dalszym zakresie ciśnień względnych ($P/P_0 > 0,3$) krzywa przechodzi w łagodny wzrost, a maksymalna objętość zaadsorbowanego azotu (320–330 cm³/g) jest wyraźnie niższa niż dla niemodyfikowanego MCM-41 (440 cm³/g). Wskazuje to na częściowe ograniczenie dostępnej objętości porów w wyniku modyfikacji powierzchni grupami chloropropylowymi. Pętla histerezy jest słabo rozwinięta, a gałęzie adsorpcji i desorpcji w dużym stopniu się pokrywają, co świadczy o niewielkich różnicach pomiędzy procesami napełniania i opróżniania porów.

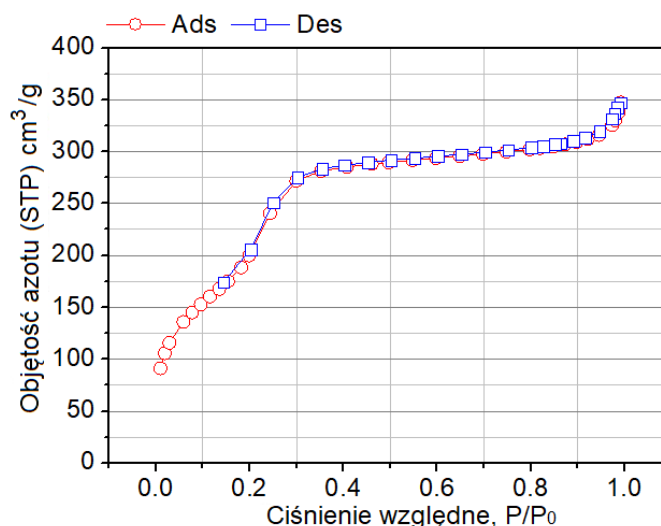


Rysunek 5.52. Izoterma adsorpcji/desorpcji azotu dla adsorbentu MCM-41-Cl

Izoterma adsorpcji–desorpcji azotu dla adsorbentu MCM-41-Gly (rys. 5.53) zmodyfikowanego grupami glicydyłowymi wykazuje cechy charakterystyczne dla izotermi typu IV (A). W zakresie niskich ciśnień względnych ($P/P_0 < 0,2$) obserwuje się stosunkowo intensywny wzrost ilości zaadsorbowanego azotu, bardziej wyraźny niż w przypadku niemodyfikowanego MCM-41. W przedziale P/P_0 0,2–0,3 widoczny jest wyraźny skok objętości zaadsorbowanego azotu odpowiadający procesowi kondensacji kapilarnej zachodzącej w mezoporach. Skok ten jest bardziej stromy niż dla MCM-41 oraz przesunięty w kierunku niższych wartości ciśnienia względnego, co sugeruje zmniejszenie efektywnej średnicy porów na skutek modyfikacji powierzchni. W dalszym zakresie ciśnień względnych ($P/P_0 > 0,3$) krzywa wykazuje stopniowy wzrost, a maksymalna objętość zaadsorbowanego azotu osiąga wartość około 340–350 cm³/g. Wartość ta jest niższa niż dla niemodyfikowanego MCM-41, lecz nieco wyższa niż dla adsorbentu MCM-41-Cl. Gałęzie adsorpcji i desorpcji nie pokrywają się całkowicie, jednak obserwowana pętla histerezy jest bardzo wąska i słabo rozwinięta. Taki przebieg wskazuje na niewielkie różnice pomiędzy procesami napełniania

i opróżniania mezoporów. Zaobserwowane zmiany mogą być związane z częściowym zmniejszeniem dostępnej objętości porowej oraz ograniczeniem dostępności mezoporów w wyniku zakotwiczenia grup glicydylowych na powierzchni adsorbentu.

Przedstawiona analiza izoterm adsorpcji–desorpcji azotu wybranych adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych umożliwia wstępną ocenę struktury porowej badanych materiałów. Szczegółowa analiza objętości porów oraz ich wielkości została omówiona w kolejnym podrozdziale.



Rysunek 5.53. Izoterma adsorpcji/desorpcji azotu dla adsorbentu MCM-41-Gly

V.2.3.2. Analiza wielkości i objętości porów adsorbentów

Adsorbenty komercyjne

Na rysunkach 5.54–5.57 przedstawiono rozkłady wielkości porów oraz skumulowaną objętość porów, wyznaczone metodą BJH dla adsorbentów komercyjnych. Górny wykres odnosi się do analizy opartej na etapie napełniania porów azotem (adsorpcja), natomiast dolny wykres przedstawia analizę opartą na etapie opróżniania porów (desorpcja). Należy zaznaczyć, że wyniki uzyskane na podstawie adsorpcji i desorpcji mogą się różnić, co jest związane z odmiennym przebiegiem procesów napełniania i opróżniania porów. Na osi poziomej przedstawiono promień porów (Å). Lewa oś pionowa odpowiada skumulowanej objętości porów (cm^3/g), określającej całkowitą objętość porów zgromadzoną do danego rozmiaru (krzywa czerwona – V). Natomiast prawa oś pionowa przedstawia różniczkowy rozkład objętości porów $dV(\log r)$, który informuje o udziale objętości porów o określonym promieniu (krzywa niebieska – $dV(\log r)$). Analizę metodą BJH uzupełniono o model

Dollimore’a–Heala (DH), modele mikroporowe Horvátha–Kawazoe (HK) oraz Saito–Foley (SF), a także obliczenia z wykorzystaniem teorii funkcjonału gęstości (DFT) (tab. 5.25, 5.26).

Dla adsorbentu LiChrospher 4000 Si (10 μm) (rys. 5.54 A) na podstawie analizy metodą BJH (tab. 5.25) wyznaczono całkowitą objętość porów równą 0,0233 cm^3/g zarówno dla gałęzi adsorpcyjnej, jak i desorpcyjnej. Zbliżone wartości uzyskano metodą DH, dla której całkowita objętość porów wynosiła 0,0227 cm^3/g dla obu gałęzi izotermy. Wyniki te wskazują na niewielką całkowitą objętość porów badanego adsorbentu. Analiza mikroporowatości przeprowadzona metodami HK oraz SF wykazała bardzo ograniczony udział mikroporów, których objętość wynosi odpowiednio 0,0047 cm^3/g (HK) oraz 0,0033 cm^3/g (SF). Otrzymane wyniki wskazują, że mikropory stanowią jedynie niewielką część struktury porowatej materiału. Analiza wielkości porów (tab. 5.26) wykazała występowanie maksimum przy promieniu porów równym 21,560 Å (2,156 nm; średnica: 4,312 nm) dla gałęzi adsorpcyjnej oraz 17,230 Å (1,723 nm; średnica 3,446 nm) dla gałęzi desorpcyjnej. Niewielkie różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi dla adsorpcji i desorpcji są zgodne z obserwowaną na izotermie pętlą histerezy. Analiza przeprowadzona metodą DFT wskazuje na istotny udział porów o rozmiarach zbliżonych do granicy zakresu mikroporów i najmniejszych mezoporów. Wyznaczona całkowita objętość porów wynosi 0,0172 cm^3/g , natomiast dominujący efektywny promień porów wynosi 7,713 Å (0,7713 nm; średnica 1,5426 nm).

Analiza wielkości i objętości porów adsorbentu LiChrospher 60 Si (12 μm) (rys. 5.54 B) wskazuje na wyraźnie bardziej rozwiniętą strukturę porowatą w porównaniu z adsorbentem LiChrospher 4000 Si. Zastosowanie metody BJH pozwoliło wyznaczyć całkowitą objętość porów równą 0,2783 cm^3/g dla gałęzi adsorpcyjnej oraz 0,2790 cm^3/g dla gałęzi desorpcyjnej (tab. 5.25). Bardzo dobra zgodność obu wartości wskazuje na niewielkie różnice pomiędzy procesami adsorpcji i desorpcji. Zbliżone wyniki uzyskano metodą DH. Wielkości porów wyznaczone metodą BJH (tab. 5.26) wykazują maksimum przy promieniu 16,220 Å (1,622 nm; średnica 3,244 nm) dla adsorpcji oraz 15,940 Å (1,594 nm; średnica 3,188 nm) dla desorpcji. Wyniki uzyskane metodą DH są zgodne z analizą BJH, co dodatkowo potwierdza wiarygodność uzyskanych danych. Objętość mikroporów wyznaczona metodami HK i SF wynosi odpowiednio 0,2368 cm^3/g oraz 0,1576 cm^3/g . Tak wysokie wartości wskazują na istotny udział najmniejszych porów. Całkowita objętość porów wyznaczona metodą DFT wynosi 0,4558 cm^3/g i jest wyraźnie wyższa od wartości uzyskanych metodami opartymi na modelu BJH. Dominujący efektywny promień porów wyznaczony metodą DFT wynosi 7,713 Å (0,7713 nm), co odpowiada

średnicy porów 1,5426 nm. Uzyskana wartość wskazuje na dominujący udział stosunkowo dużych mikroporów. Wyniki te wskazują na złożony charakter struktury porowatej badanego adsorbentu.

Objętości porów dla adsorbentu Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) (rys. 5.55 A) wyznaczone metodą BJH (tab. 5.25) wynoszą 0,2620 cm³/g dla gałęzi adsorpcyjnej oraz 0,1686 cm³/g dla gałęzi desorpcyjnej. Wartości uzyskane metodą DH wynoszą odpowiednio 0,3287 cm³/g (adsorpcja) oraz 0,1648 cm³/g (desorpcja). Wyraźna rozbieżność pomiędzy objętościami porów wyznaczonymi dla adsorpcji i desorpcji jest zgodna z obserwowaną na izotermie pętlą histerezy i wskazuje na występowanie kondensacji kapilarnej w mezoporach. Objętość porów wyznaczona metodą DFT wynosi 0,2294 cm³/g i jest wartością pośrednią pomiędzy wynikami uzyskanymi metodami BJH i DH. Promienie porów wyznaczone metodą BJH i DH (tab. 5.26) wynoszą odpowiednio 16,280 Å (1,628 nm; średnica 3,256 nm) dla gałęzi adsorpcyjnej oraz 15,910 Å (1,591 nm; średnica 3,182 nm) dla gałęzi desorpcyjnej. Niewielkie różnice pomiędzy tymi wartościami wskazują na obecność dominującej grupy porów o zbliżonych rozmiarach, mieszczących się w zakresie mezoporów. Metoda DFT wskazuje dodatkowo udział znacznie mniejszych porów o promieniu 7,713 Å (0,7713 nm; średnica 1,5426 nm).

Objętość porów dla adsorbentu Silica gel 60 (0,2–0,5 mm) wyznaczona metodą BJH (rys. 5.55 B, tab. 5.25) wynosi 0,1614 cm³/g dla gałęzi adsorpcyjnej oraz 0,1632 cm³/g dla gałęzi desorpcyjnej. Zbliżone wartości uzyskano metodą DH: odpowiednio 0,1579 cm³/g (adsorpcja) i 0,1596 cm³/g (desorpcja). Wielkości porów wyznaczone metodą BJH (tab. 5.26) wykazują maksimum przy promieniu 16,240 Å (1,624 nm; średnica 3,248 nm) dla adsorpcji oraz 15,920 Å (1,592 nm; średnica 3,184 nm) dla desorpcji. Takie same wartości uzyskano metodą DH, co wskazuje na dominujący udział mezoporów o podobnych rozmiarach. Zastosowanie modeli mikroporowych HK i SF wykazało mniejszościowy, lecz zauważalny udział mikroporów w strukturze badanego adsorbentu. Analiza przeprowadzona metodą DFT wskazuje na dodatkową frakcję porów o promieniu 7,713 Å (0,7713 nm; średnica 1,5426 nm), których całkowita objętość wynosi 0,2468 cm³/g. Wyższa wartość całkowitej objętości porów uzyskana metodą DFT może wynikać z uwzględnienia udziału najmniejszych porów, które nie są w pełni opisywane przez klasyczne modele BJH i DH.

Dla fazy stacjonarnej amidowej pozyskanej z kolumny chromatograficznej TSK-Gel Amide-80 (rys. 5.56 A) analiza metodą BJH wykazała całkowitą objętość porów równą 0,7246 cm³/g dla gałęzi adsorpcyjnej oraz 0,7537 cm³/g dla gałęzi desorpcyjnej (tab. 5.25). Wyznaczone promienie porów (tab. 5.26) wynoszą odpowiednio 69,060 Å (6,906 nm;

średnica 13,812 nm) dla gałęzi adsorpcyjnej oraz 59,490 Å (5,949 nm; średnica 11,898 nm) dla gałęzi desorpcyjnej, co potwierdza mezoporowaty charakter badanego adsorbentu. Takie same wartości uzyskano metodą DH. Metoda DFT wykazała całkowitą objętość porów równą 0,7338 cm³/g oraz dominujący promień porów wynoszący 44,610 Å (4,461 nm; średnica 8,922 nm). Pomimo niższych wartości promienia w porównaniu z metodami BJH i DH, wszystkie zastosowane modele wskazują na dobrze rozwiniętą strukturę mezoporowatą. Modele mikroporowe HK i SF wykazały objętość mikroporów równą odpowiednio 0,1049 cm³/g oraz 0,06741 cm³/g, przy promieniach 1,838 Å i 2,261 Å. Wyniki te świadczą o obecności niewielkiej, lecz zauważalnej frakcji mikroporów, jednak ich udział pozostaje znacznie mniejszy. Deklarowany przez producenta średni rozmiar porów wynoszący 80 Å jest zgodny z mezoporowatym charakterem materiału. Wyznaczone eksperymentalnie wartości średnic porów mieszczą się w zakresie charakterystycznym dla mezoporów, choć są nieco niższe od wartości deklarowanej. Różnice te mogą wynikać z zastosowania różnych modeli obliczeniowych oraz odmiennych sposobów definiowania i wyznaczania rozmiaru porów.

Analiza BJH (rys. 5.56 B) dla fazy stacjonarnej zwitterjonowej pozyskanej z kolumny Eurospher II 100-5 HILIC wykazuje całkowitą objętość porów równą 0,4356 cm³/g przy promieniu 16,290 Å (1,629 nm; średnica 3,258 nm) dla gałęzi adsorpcyjnej oraz 0,4440 cm³/g przy promieniu 15,870 Å (1,587 nm; średnica 3,174 nm) dla gałęzi desorpcyjnej (tab. 5.25 i 5.26). Metoda DH wykazuje bardzo zbliżone wartości, co wskazuje na dobrą zgodność wyników oraz dominujący udział mezoporów o podobnych rozmiarach. Analiza DFT wskazuje nieco większą całkowitą objętość porów (0,4735 cm³/g) oraz obecność dodatkowej frakcji bardzo małych porów o efektywnym promieniu 7,713 Å (0,7713 nm; średnica 1,5426 nm). Modele mikroporowe HK (0,1227 cm³/g; 1,838 Å) i SF (0,0801 cm³/g; 2,261 Å) wskazują na obecność pewnej ilości najwęższych porów, jednak ich udział jest stosunkowo niewielki. Wartość rozmiaru porów deklarowana przez producenta (100 Å) jest wyższa od średnicy porów wyznaczonej metodą BJH. Różnica ta może wynikać z zastosowania odmiennych metod wyznaczania parametrów porowatości oraz różnych sposobów definiowania rozmiaru porów.

Analiza porowatości fazy stacjonarnej C18 pozyskanej z kolumny Nucleodur C18 Gravity metodą BJH (rys. 5.57 A) wykazała całkowitą objętość porów równą 0,3856 cm³/g dla gałęzi adsorpcyjnej, przy promieniu porów 23,800 Å (2,380 nm; średnica 4,760 nm) (tab. 5.25 i 5.26). Dla gałęzi desorpcyjnej wartości te wynoszą odpowiednio 0,3972 cm³/g oraz 41,620 Å (4,162 nm; średnica 8,324 nm). Zbliżone wyniki uzyskano metodą DH, co potwierdza spójność analizy opartej na kondensacji kapilarnej. Wyznaczone rozmiary

porów wskazują na mezoporowaty charakter adsorbentu, natomiast wyraźna różnica pomiędzy promieniami porów uzyskanymi dla adsorpcji i desorpcji może być związana z odmiennym przebiegiem procesów napełniania i opróżniania porów, obserwowanym dla materiałów wykazujących histerezę adsorpcji–desorpcji. Metoda DFT wykazała całkowitą objętość porów równą $0,3769 \text{ cm}^3/\text{g}$ oraz efektywny promień porów wynoszący $38,980 \text{ \AA}$ ($3,898 \text{ nm}$; średnica $7,796 \text{ nm}$), co potwierdza mezoporowaty charakter adsorbentu i stanowi wartość pośrednią pomiędzy wynikami uzyskanymi metodą BJH dla adsorpcji i desorpcji. Modele mikroporowe HK ($0,0554 \text{ cm}^3/\text{g}$; $1,838 \text{ \AA}$) oraz SF ($0,0210 \text{ cm}^3/\text{g}$; $2,261 \text{ \AA}$) wskazują jedynie na niewielki udział mikroporów, który nie wpływa istotnie na całkowitą objętość porów. Deklarowany przez producenta rozmiar porów ($110 \text{ \AA}$) jest większy od wartości wyznaczonej eksperymentalnie.

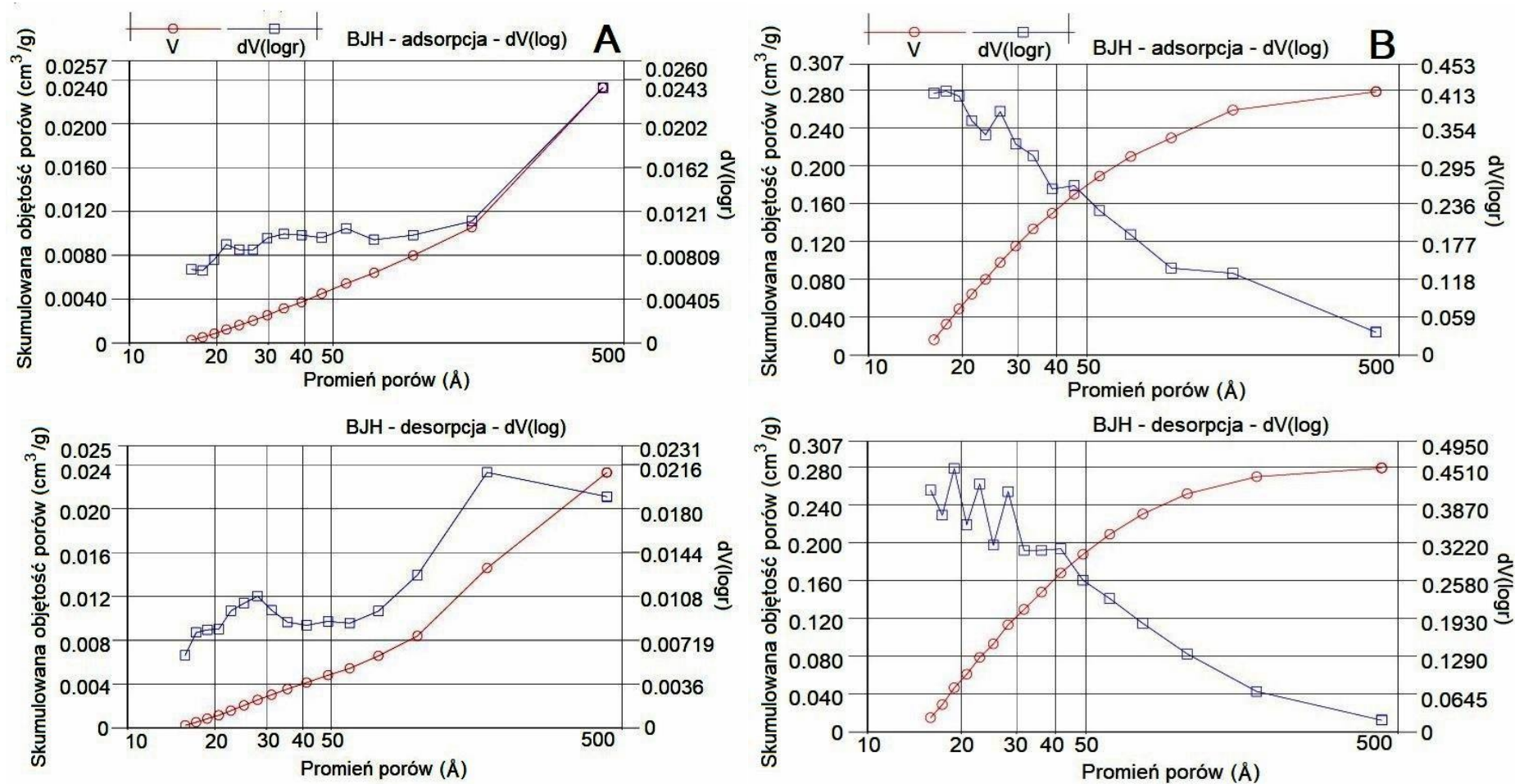
Analiza porowatości fazy stacjonarnej aminopropylowej pozyskanej z kolumny Purospher STAR NH_2 metodą BJH (rys. 5.57 B) wykazała całkowitą objętość porów równą $1,1450 \text{ cm}^3/\text{g}$ dla gałęzi adsorpcyjnej oraz $1,1890 \text{ cm}^3/\text{g}$ dla gałęzi desorpcyjnej (tab. 5.25). Zbliżone wartości uzyskano metodą DH (odpowiednio $1,1170 \text{ cm}^3/\text{g}$ i $1,1610 \text{ cm}^3/\text{g}$). Wynik uzyskany metodą DFT ($1,1400 \text{ cm}^3/\text{g}$) pozostaje zgodny z wartościami wyznaczonymi metodami BJH i DH, wskazując na znaczną całkowitą objętość porów badanego adsorbentu. Udział mikroporów określony metodami HK ($0,1149 \text{ cm}^3/\text{g}$; promień $1,838 \text{ \AA}$) oraz SF ($0,0744 \text{ cm}^3/\text{g}$; promień $2,261 \text{ \AA}$) jest stosunkowo niewielki, co wskazuje na dominujący udział mezoporów w strukturze materiału. Promienie porów (tab. 5.26) wyznaczone metodą BJH wynoszą $93,380 \text{ \AA}$ ($9,338 \text{ nm}$; średnica $18,676 \text{ nm}$) dla gałęzi adsorpcyjnej oraz $76,090 \text{ \AA}$ ($7,609 \text{ nm}$; średnica $15,218 \text{ nm}$) dla gałęzi desorpcyjnej. Takie same wartości uzyskano metodą DH. Metoda DFT wskazuje mniejszy efektywny promień porów równy $53,410 \text{ \AA}$ ($5,341 \text{ nm}$; średnica $10,682 \text{ nm}$). Wszystkie zastosowane metody wskazują jednoznacznie na dominację mezoporów w strukturze badanego adsorbentu. Deklarowana przez producenta średnica porów ($120 \text{ \AA}$) jest większa od wartości uzyskanych eksperymentalnie.

Tabela 5.25. Objętość porów wyznaczona metodami BJH, DH, HK, SF i DFT dla adsorbentów komercyjnych

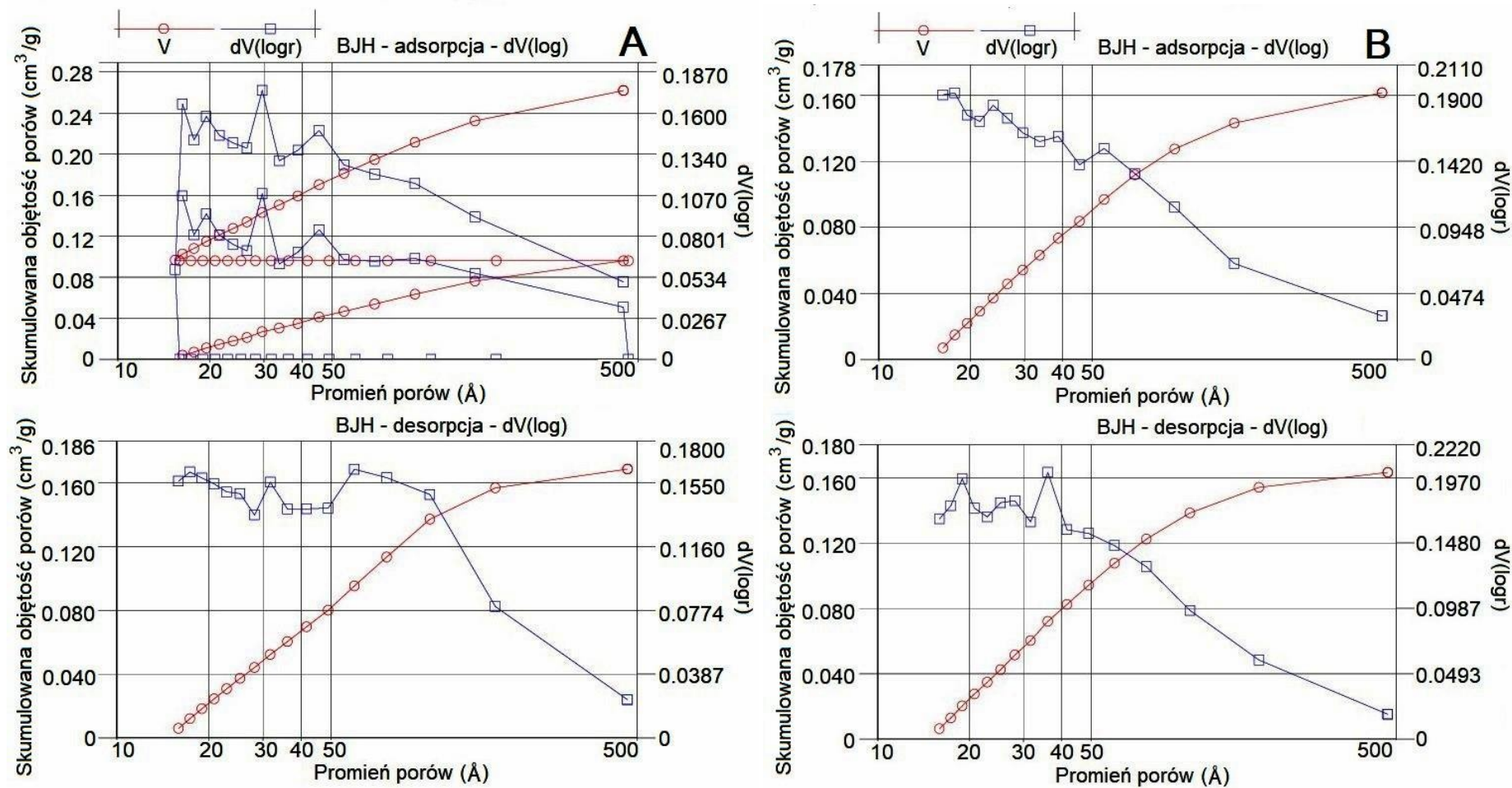
Adsorbenty komercyjne	BJH adsorpcja (cm ³ /g)	BJH desorpcja (cm ³ /g)	DH adsorpcja (cm ³ /g)	DH desorpcja (cm ³ /g)	HK (cm ³ /g)	SF (cm ³ /g)	DFT (cm ³ /g)
LiChrospher 4000 Si (10 µm)	0,0233	0,0233	0,0227	0,0227	0,0047	0,0033	0,0172
LiChrospher 60 Si (12 µm)	0,2783	0,2790	0,2725	0,2731	0,2368	0,1576	0,4558
Silica gel 60 (0,015-0,040 mm)	0,2620	0,1686	0,3287	0,1648	-	-	0,2294
Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)	0,1614	0,1632	0,1579	0,1596	0,1232	0,0856	0,2468
Faza stacjonarna amidowa	0,7246	0,7537	0,7077	0,7364	0,1049	0,0674	0,7338
Faza stacjonarna zwitterjonowa	0,4356	0,4440	0,4251	0,4337	0,1227	0,0801	0,4735
Faza stacjonarna C18	0,3856	0,3972	0,3764	0,3880	0,0554	0,0210	0,3769
Faza stacjonarna aminopropylowa	1,1450	1,1890	1,1170	1,1610	0,1149	0,0744	1,1400

Tabela 5.26. Wielkość porów wyznaczona metodami BJH, DH, HK, SF i DFT dla adsorbentów komercyjnych

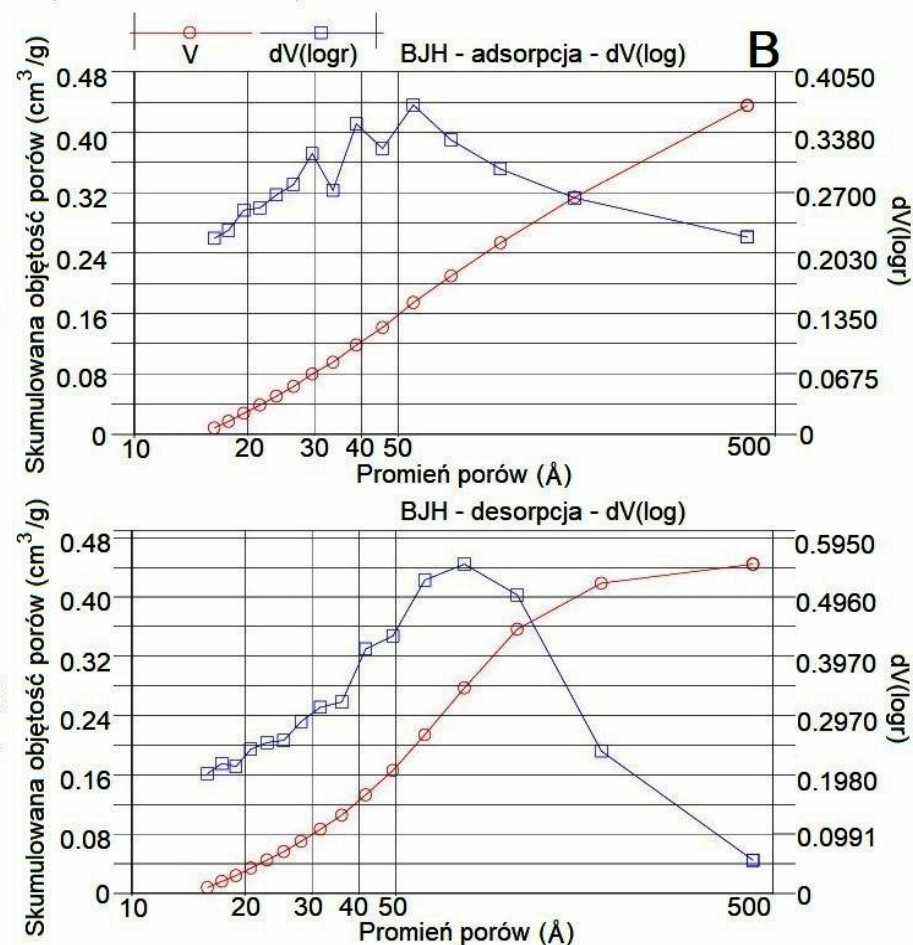
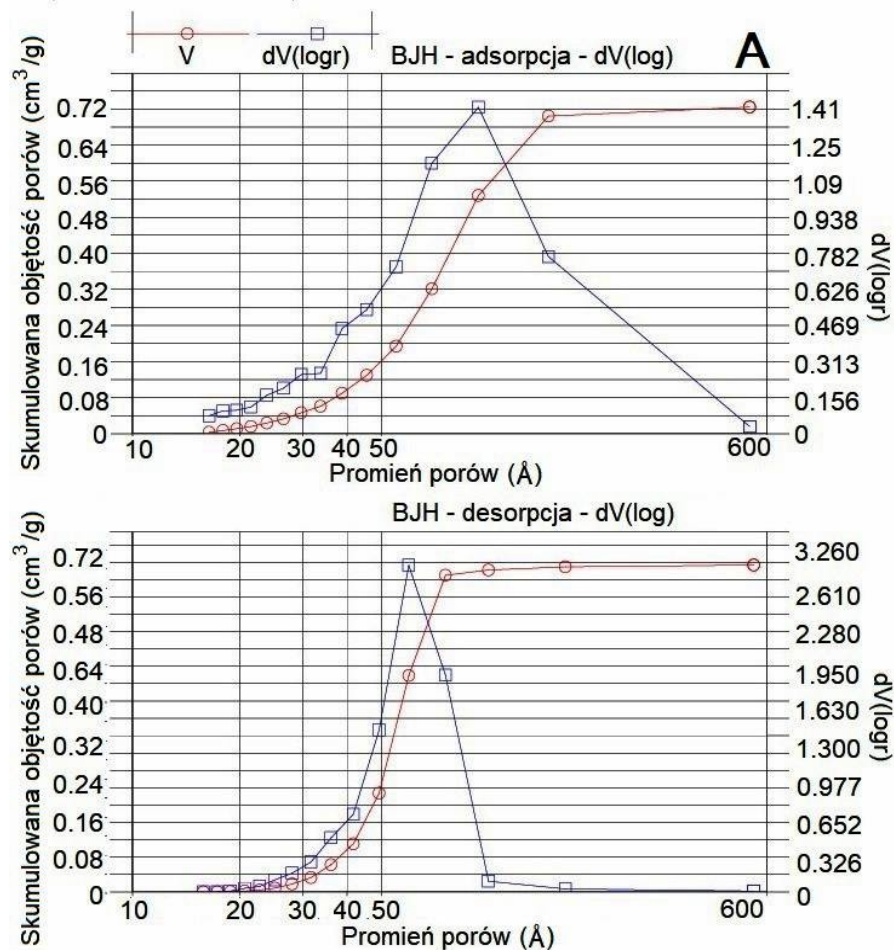
Adsorbenty komercyjne	BJH adsorpcja (Å)	BJH desorpcja (Å)	DH adsorpcja (Å)	DH desorpcja (Å)	HK (Å)	SF (Å)	DFT (Å)
LiChrospher 4000 Si (10 µm)	21,560	17,230	21,560	17,230	1,838	2,261	7,713
LiChrospher 60 Si (12 µm)	16,220	15,940	16,220	15,940	1,838	2,261	7,713
Silica gel 60 (0,015-0,040 mm)	16,280	15,910	16,280	15,910	-	-	7,713
Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)	16,240	15,920	16,240	15,920	1,838	2,261	7,713
Faza stacjonarna amidowa	69,060	59,490	69,060	59,490	1,838	2,261	44,610
Faza stacjonarna zwitterjonowa	16,290	15,870	16,290	15,870	1,838	2,261	7,713
Faza stacjonarna C18	23,800	41,620	23,800	41,620	1,838	2,261	38,980
Faza stacjonarna aminopropylowa	93,380	76,090	93,380	76,090	1,838	2,261	53,410



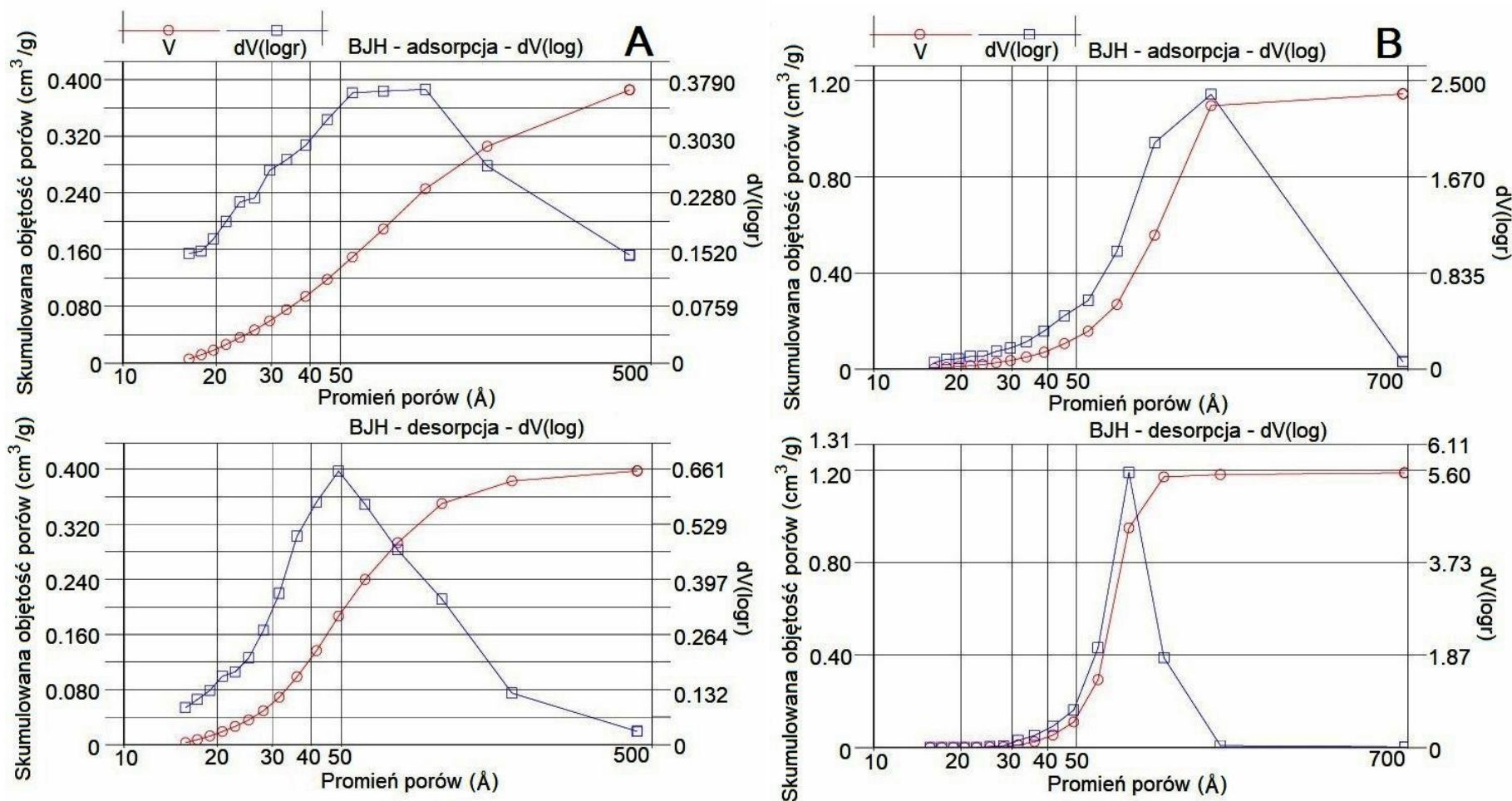
Rysunek 5.54. Rozkład wielkości i objętości porów metodą BJH (adsorpcja/desorpcja) dla adsorbentów komercyjnych: A – LiChrospher 4000 Si (10 μm), B – LiChrospher 60 Si (12 μm)



Rysunek 5.55. Rozkład wielkości i objętości porów metodą BJH (adsorpcja/desorpcja) dla adsorbentów komercyjnych: A – Silica gel 60 (0,015-0,040 mm), B – Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)



Rysunek 5.56. Rozkład wielkości i objętości porów metodą BJH (adsorpcja/desorpcja) dla faz stacjonarnych pozyskanych z kolumn chromatograficznych: A – amidowa, B – zwitterjonowa



Rysunek 5.57. Rozkład wielkości i objętości porów metodą BJH (adsorpcja/desorpcja) dla faz stacjonarnych pozyskanych z kolumn chromatograficznych: A – C18, B – aminopropylowa

Adsorbenty niekomercyjne

Analiza porowatości (tab. 5.27 i 5.28) dla adsorbentu MCM-41 metodami BJH oraz DH dla gałęzi adsorpcyjnej i desorpcyjnej wykazała dużą zgodność zarówno pod względem całkowitej objętości porów, jak i położenia maksimum. Jest to charakterystyczne dla materiałów o uporządkowanej strukturze mezoporowatej, typowej dla krzemionek MCM-41. Promienie porów wyznaczone metodami BJH i DH mieszczą się w bardzo wąskim przedziale 17,380–17,740 Å, co odpowiada średnicy około 3,5 nm (tab. 5.28). Niewielkie różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi dla adsorpcji i desorpcji wskazują na stosunkowo jednorodny charakter porów. Metoda DFT wykazała nieco większą efektywną średnicę porów (18,14 Å), co wynika z odmiennego sposobu modelowania procesu wypełniania mezoporów. Analiza DFT wykazuje również większą całkowitą objętość porów (0,6346 cm³/g) (tab. 5.27). Objętość i rozmiary mikroporów wyznaczone modelami HK oraz SF wynoszą odpowiednio: 0,3282 cm³/g i 1,838 Å dla modelu HK oraz 0,2225 cm³/g i 2,261 Å dla modelu SF, co wskazuje na obecność porów o średnicach poniżej 2 nm.

Dla zmodyfikowanych adsorbentów MCM-41-Cl (grupami chloropropyłowymi) oraz MCM-41-Gly (grupami glicydylowymi) analiza metodą BJH wykazała zachowanie charakterystycznej mezoporowatej struktury o wysokim stopniu uporządkowania. Dla MCM-41-Cl całkowita objętość porów wynosi 0,5088 cm³/g dla gałęzi adsorpcyjnej oraz 0,5069 cm³/g dla gałęzi desorpcyjnej, przy promieniach porów odpowiednio 25,553 Å i 25,169 Å. Niewielkie różnice pomiędzy parametrami wyznaczonymi z gałęzi adsorpcyjnej i desorpcyjnej sugerują stosunkowo jednorodny charakter porów. Dla adsorbentu MCM-41-Gly analiza metodą BJH wykazała całkowitą objętość porów równą 0,6251 cm³/g dla gałęzi adsorpcyjnej oraz 0,5302 cm³/g dla gałęzi desorpcyjnej. Promienie porów wynoszą odpowiednio 28,561 Å i 26,537 Å, co wskazuje na niewielkie zwiększenie rozmiarów mezoporów przy zachowaniu uporządkowanej struktury charakterystycznej dla materiałów typu MCM-41. Większe różnice pomiędzy wartościami wyznaczonymi z obu gałęzi izotermy, w porównaniu z materiałem MCM-41-Cl, mogą sugerować wpływ funkcjonalizacji powierzchni na dostępność przestrzeni porowej.

Zmiany objętości i rozmiaru porów obserwowane po modyfikacji powierzchni krzemionki MCM-41 można przypisać obecności grup funkcyjnych, które wpływają na dostępność przestrzeni porowej oraz charakter oddziaływań zachodzących na powierzchni adsorbentu.

Tabela 5.27. Objętość porów wyznaczona metodami BJH, DH, HK, SF i DFT dla adsorbentów niekomercyjnych

Adsorbenty niekomercyjne	BJH adsorpcja (cm ³ /g)	BJH desorpcja (cm ³ /g)	DH adsorpcja (cm ³ /g)	DH desorpcja (cm ³ /g)	HK (cm ³ /g)	SF (cm ³ /g)	DFT (cm ³ /g)
MCM-41	0,4997	0,5024	0,4922	0,4946	0,3282	0,2225	0,6346
MCM-41-Cl	0,5088	0,5069	---	---	---	---	---
MCM-41-Gly	0,6251	0,5302	---	---	---	---	---

Tabela 5.28. Wielkość porów wyznaczona metodami BJH, DH, HK, SF i DFT dla adsorbentów niekomercyjnych

Adsorbenty niekomercyjne	BJH adsorpcja (Å)	BJH desorpcja (Å)	DH adsorpcja (Å)	DH desorpcja (Å)	HK (Å)	SF (Å)	DFT (Å)
MCM-41	17,740	17,380	17,740	17,380	1,838	2,261	18,140
MCM-41-Cl	25,553	25,169	---	---	---	---	---
MCM-41-Gly	28,561	26,537	---	---	---	---	---

V.2.3.3. Podsumowanie

Przeprowadzona analiza porowatości badanych adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych wykazała wyraźne zróżnicowanie zarówno pod względem całkowitej objętości porów, jak i ich wielkości, co odzwierciedla odmienne właściwości strukturalne badanych materiałów.

LiChrospher 4000 Si (10 µm), charakteryzuje się bardzo niską objętością porów, co wskazuje na słabo rozwiniętą strukturę porowatą. W przeciwieństwie do niego LiChrospher 60 Si (12 µm) oraz Silica gel 60 (zarówno o większej, jak i mniejszej granulacji) wykazują znacznie większą objętość porów. Materiały te charakteryzują się bardziej rozwiniętą i złożoną strukturą porowatą, przy czym najwyższy stopień rozwinięcia porowatości stwierdzono dla adsorbentu LiChrospher 60 Si (12 µm).

W grupie adsorbentów komercyjnych pozyskanych z kolumn chromatograficznych obserwuje się wyraźne zróżnicowanie właściwości porowatych, przy jednoczesnej dominacji charakteru mezoporowatego. Faza amidowa (TSK-Gel Amide-80) charakteryzuje się dużą objętością porów oraz szerszym zakresem ich średnic. Faza zwitterjonowa (Eurospher II HILIC) wykazuje mniejszy rozmiar porów oraz bardziej jednorodny rozkład mezoporów. Faza C18 (Nucleodur C18) charakteryzuje się mniejszą objętością porów niż faza zwitterjonowa (Eurospher II HILIC), jednak wykazuje większe rozmiary mezoporów.

Natomiast faza aminopropylowa (Purospher STAR NH₂) wyróżnia się najwyższą objętością porów przekraczającą 1 cm³/g. We wszystkich przypadkach mikroporowatość ma charakter drugorzędny, a struktura porowata jest zdominowana przez mezopory.

Adsorbenty typu MCM-41 wykazują wysoce uporządkowaną strukturę mezoporowatą. W ich przypadku duża zgodność parametrów wyznaczonych z gałęzi adsorpcyjnej i desorpcyjnej metodą BJH wskazuje na jednorodny charakter porów oraz wysoki stopień uporządkowania struktury. Analiza adsorbentów modyfikowanych (MCM-41-Cl oraz MCM-41-Gly) wskazuje na zachowanie uporządkowanej struktury mezoporowatej przy jednoczesnych zmianach całkowitej objętości i rozmiaru porów. W szczególności adsorbent MCM-41-Gly charakteryzuje się większym rozmiarem porów oraz większymi różnicami pomiędzy parametrami wyznaczonymi z gałęzi adsorpcyjnej i desorpcyjnej. Może to być związane z wpływem wprowadzonych grup funkcyjnych na właściwości powierzchniowe materiału oraz dostępność przestrzeni porowej.

V.2.4. Analiza powierzchni właściwej adsorbentów

V.2.4.1. Adsorbenty komercyjne

Na rysunkach 5.58 i 5.59 przedstawiono wykresy uzyskane wielopunktową metodą BET, stosowaną do wyznaczania powierzchni właściwej adsorbentów na podstawie adsorpcji azotu w temperaturze 77 K. Na osi poziomej znajduje się ciśnienie względne P/P_0 , czyli stosunek ciśnienia równowagowego do ciśnienia nasycenia par azotu. Na osi pionowej przedstawiono wartość $1/[W((P_0/P) - 1)]$, gdzie W oznacza ilość zaadsorbowanego azotu. Punkty pomiarowe w odpowiednio dobranym zakresie ciśnień tworzą odcinek liniowy, do którego dopasowywana jest prosta regresji.

Pomiar powierzchni właściwej metodą BET adsorbentu LiChrospher 4000 Si (10 μm) (rys. 5.58 A, tab. 5.29) wykazał wartość 20,184 m²/g, co wskazuje na słabo rozwiniętą powierzchnię adsorpcyjną badanego materiału. Wysoka wartość współczynnika determinacji ($R^2 = 0,999$) potwierdza poprawność zastosowanego modelu BET w analizowanym zakresie ciśnień względnych. Niewielka powierzchnia właściwa pozostaje zgodna z wynikami analizy porowatości, wskazującymi na słabo rozwiniętą strukturę porowatą materiału. Cecha ta może częściowo wyjaśniać niższą zdolność adsorpcyjną materiału obserwowaną w badaniach równowagi adsorpcyjnej przedstawionych w podrozdziale V.1.5.1.

Analiza przeprowadzona dla adsorbentu LiChrospher 60 Si (12 μm) (rys. 5.58 B, tab. 5.29) wykazała bardzo wysoką powierzchnię właściwą równą 722,266 m²/g,

co świadczy o silnie rozwiniętej strukturze porowatej materiału. Wysoki współczynnik determinacji ($R^2 = 0,999$) potwierdza poprawność wyznaczonych parametrów. Uzyskana powierzchnia właściwa pozostaje zgodna z wynikami analizy porowatości, które wykazały znaczną objętość porów oraz dominujący udział mezoporów. Rozwinięta powierzchnia adsorpcyjna materiału znajduje odzwierciedlenie w wynikach badań równowagi adsorpcyjnej przedstawionych w podrozdziale V.1.5.1., w których adsorbent ten wykazywał wyższą pojemność sorpcyjną spośród badanych materiałów.

Analiza wykazała, że adsorbent Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) (rys. 5.58 C) charakteryzuje się powierzchnią właściwą równą 273,550 m²/g. Wysoki współczynnik determinacji ($R^2 = 0,999$, tab. 5.29), potwierdza poprawność wyznaczenia parametrów. Uzyskana powierzchnia właściwa pozostaje zgodna z wynikami analizy porowatości, potwierdzając obecność dobrze rozwiniętej powierzchni wewnętrznej oraz dominujący mezoporowaty charakter badanego adsorbentu.

Analiza adsorbentu Silica gel 60 (0,2–0,5 mm) (rys. 5.58 D) wykazała powierzchnię właściwą równą 331,911 m²/g. Wysoka wartość współczynnika determinacji ($R^2 = 0,999$) potwierdza poprawność wyznaczonych parametrów. Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszą analizą porowatości, potwierdzając dobrze rozwiniętą powierzchnię wewnętrzną oraz mezoporowaty charakter materiału.

Analiza powierzchni właściwej fazy stacjonarnej amidowej pozyskanej z kolumny TSK-Gel Amide-80 (rys. 5.59 A) wykazała powierzchnię właściwą równą 256,390 m²/g (tab. 5.29). Wysoki współczynnik determinacji ($R^2 = 0,999$) potwierdza poprawność zastosowania modelu BET w analizowanym zakresie ciśnień względnych. Otrzymana wartość powierzchni właściwej jest niższa od wartości podawanej przez producenta (450 m²/g). Różnica ta może wynikać z odmiennych warunków przygotowania próbki do analizy, a także z różnic pomiędzy badaną próbką a materiałem referencyjnym producenta.

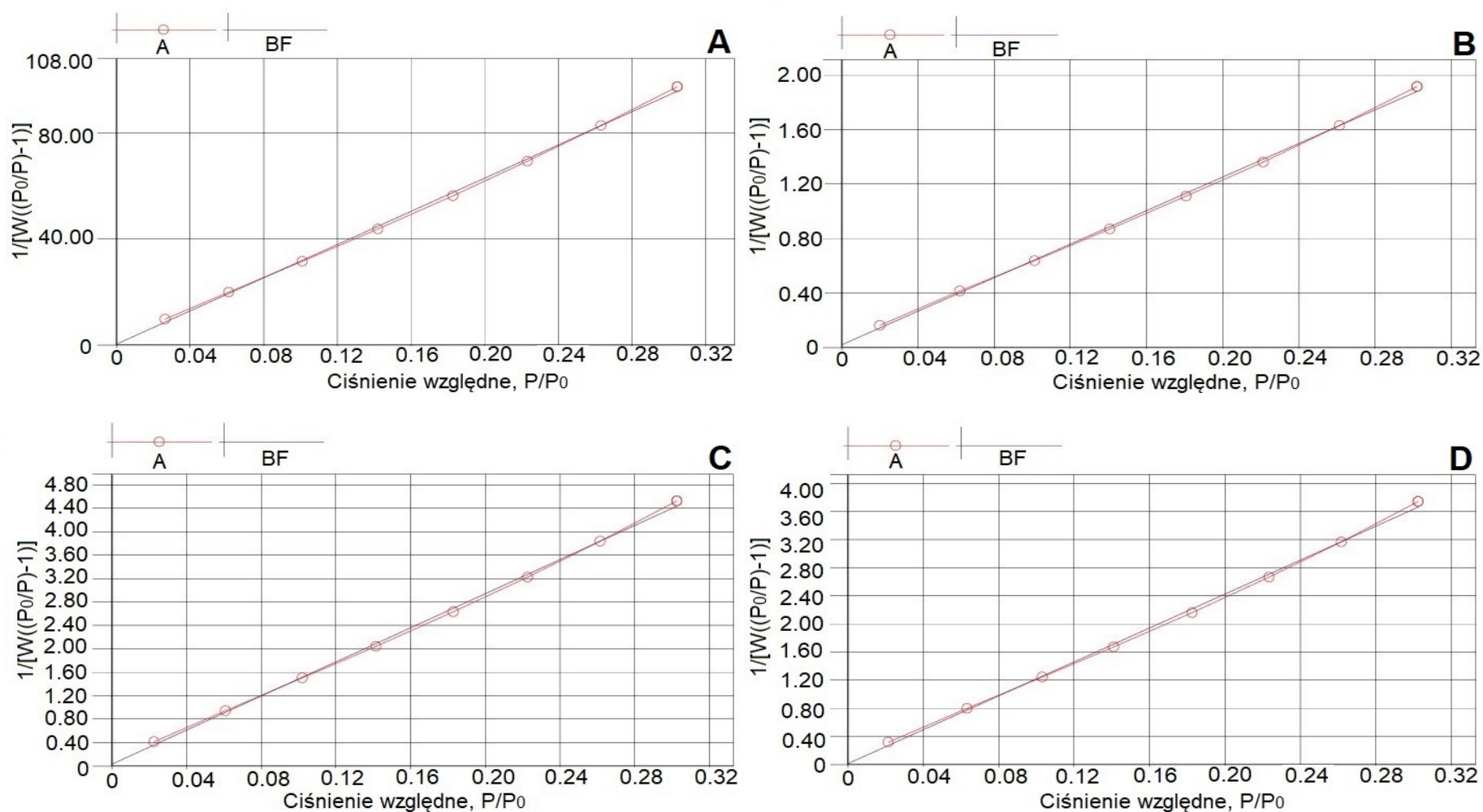
Analiza powierzchni właściwej fazy stacjonarnej zwitterjonowej, pozyskanej z kolumny Eurospher II 100-5 HILIC (rys. 5.59 B), wykazała wartość 301,729 m²/g (tab. 5.29), charakterystyczną dla materiałów mezoporowatych. Współczynnik determinacji osiągnął wartość $R^2 = 0,999$. Wysoka zgodność dopasowania potwierdza poprawność zastosowania modelu BET w analizowanym zakresie ciśnień względnych. Uzyskane wyniki świadczą o dobrze rozwiniętej powierzchni wewnętrznej materiału. Powierzchnia właściwa wyznaczona eksperymentalnie pozostaje w dobrej zgodności z wartością podawaną przez producenta (320 m²/g).

Analiza powierzchni właściwej fazy stacjonarnej C18, pozyskanej z kolumny Nucleodur C18 Gravity (rys. 5.59 C), wykazała wartość 162,554 m²/g (tab. 5.29). Wysoki współczynnik determinacji ($R^2 = 0,999$) potwierdza bardzo dobrą zgodność danych eksperymentalnych z modelem BET. Uzyskana powierzchnia właściwa jest znacznie niższa od wartości podawanej przez producenta (338 m²/g).

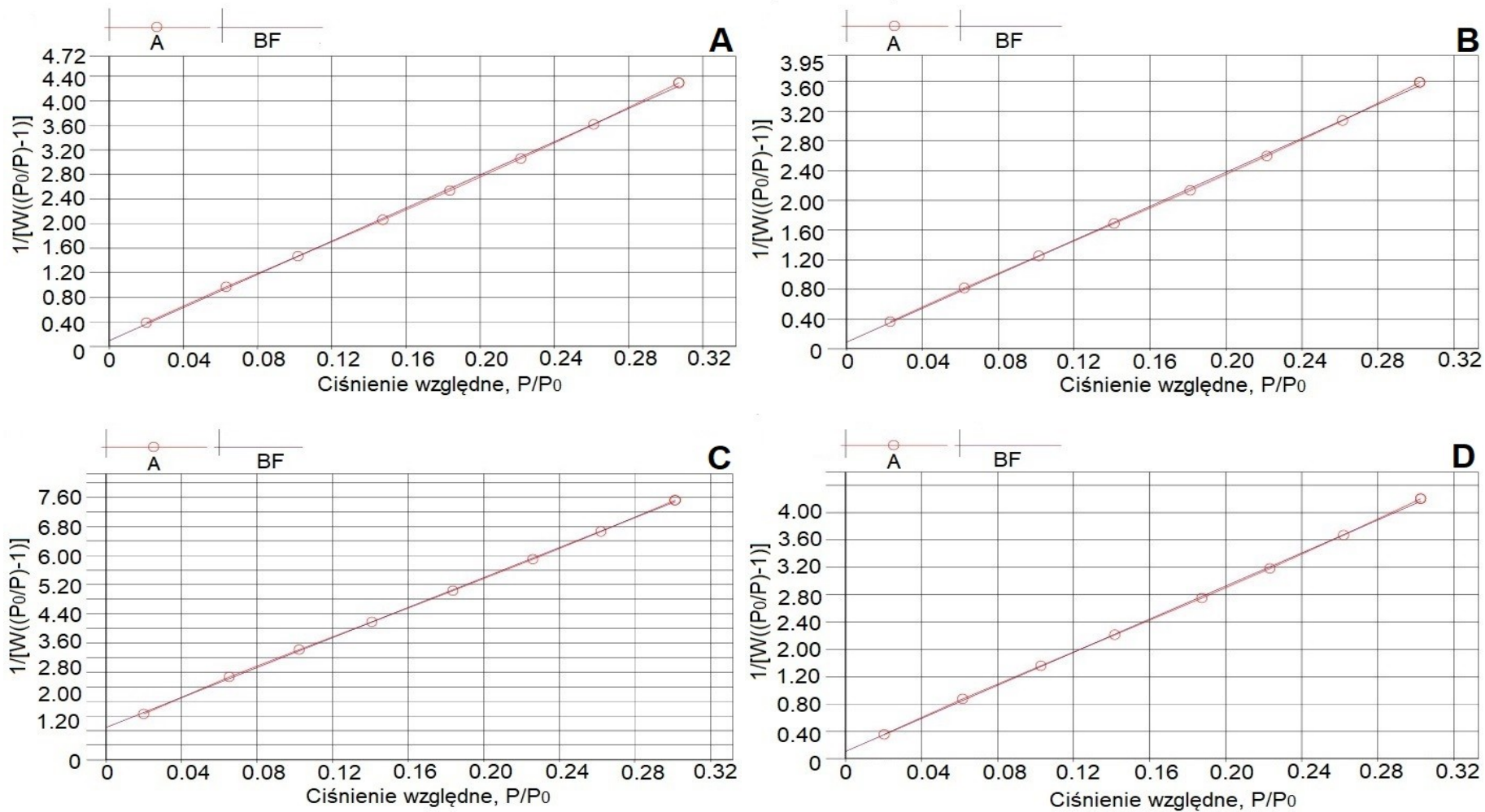
Analiza powierzchni właściwej fazy stacjonarnej aminopropylowej, pozyskanej z kolumny Purospher STAR NH₂ (rys. 5.59 D), wykazała wartość 285,286 m²/g (tab. 5.29). Wysoki współczynnik determinacji ($R^2 = 0,999$) potwierdza poprawność zastosowania modelu BET. Uzyskana powierzchnia właściwa jest nieco niższa od wartości podawanej przez producenta (330 m²/g), jednak pozostaje z nią w dobrej zgodności.

Tabela 5.29. Wyniki analizy powierzchni właściwej adsorbentów komercyjnych - wielopunktowa metoda BET

Wielopunktowa metoda BET				
Adsorbenty komercyjne	Powierzchnia właściwa (m ² /g)	Nachylenie prostej BET (g/cm ³)	R ²	C (stała)
LiChrospher 4000 Si (10 µm)	20,184	313,054	0,999	979,365
LiChrospher 60 Si (12 µm)	722,266	6,156	0,999	307,046
Silica gel 60 (0,015–0,040 mm)	273,550	14,561	0,999	467,678
Silica gel 60 (0,2–0,5 mm)	331,911	12,063	0,999	960,116
Faza stacjonarna amidowa	256,390	13,490	0,999	146,387
Faza stacjonarna zwitterjonowa	301,729	11,456	0,999	134,522
Faza stacjonarna C18	162,554	20,540	0,999	24,232
Faza stacjonarna aminopropylowa	285,286	12,102	0,999	116,398



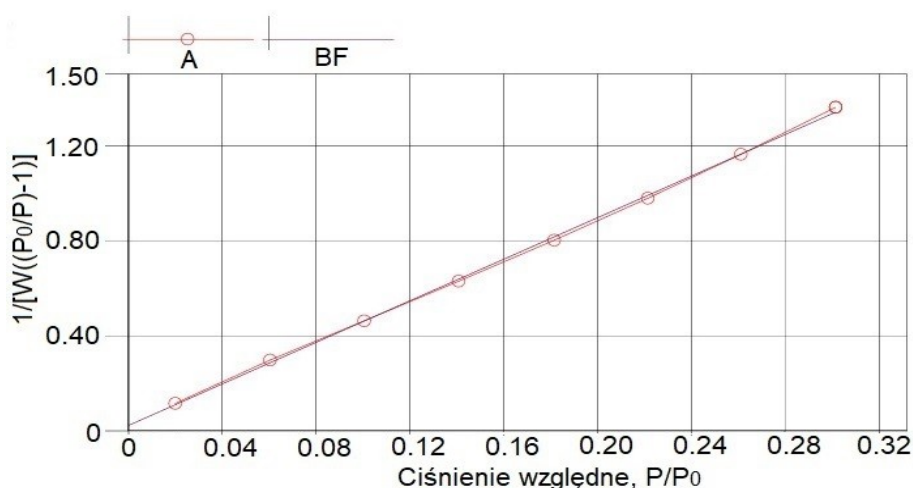
Rysunek 5.58. Wyniki analizy powierzchni właściwej wielopunktową metodą BET: A – LiChrospher 4000 Si (10 μm), B – LiChrospher 60 Si (12 μm), C – Silica gel 60 (0,015-0,040 mm), D – Silica gel 60 (0,2–0,5 mm)



Rysunek 5.59. Wyniki analizy powierzchni właściwej wielopunktową metodą BET dla faz stacjonarnych pozyskanych z kolumn chromatograficznych: A – amidowa, B – zwitterjonowa, C – C18, D – aminopropylowa

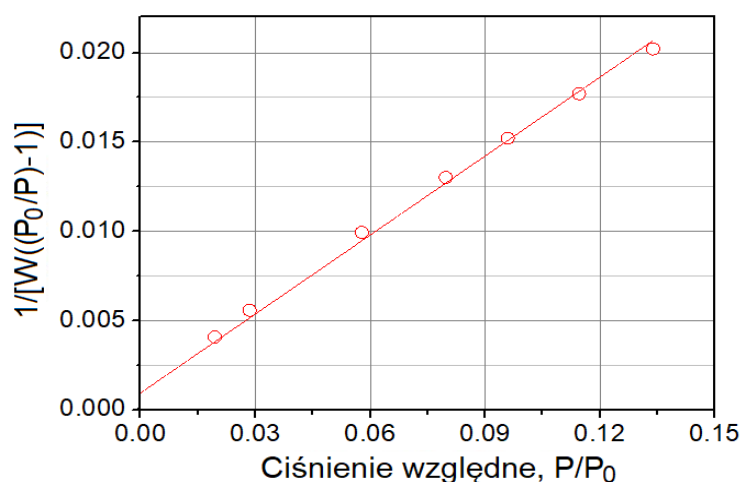
V.2.4.2. Adsorbenty niekomercyjne

Dla niekomercyjnego adsorbentu MCM-41 (tab. 5.30, rys. 5.60) analiza powierzchni właściwej wielopunktową metodą BET wykazała wartość 1150,108 m²/g, co wskazuje na bardzo dobrze rozwiniętą powierzchnię właściwą charakterystyczną dla materiałów mezoporowatych typu MCM-41. Wysoki współczynnik determinacji ($R^2 = 0,999$) potwierdza bardzo dobrą zgodność danych eksperymentalnych z modelem BET. Uzyskana wartość powierzchni właściwej pozostaje zgodna z wynikami wcześniejszej analizy porowatości, potwierdzając rozwiniętą strukturę porowatą badanego materiału. Wysoka wartość powierzchni właściwej niezmodyfikowanego MCM-41 stanowi punkt odniesienia do oceny wpływu modyfikacji powierzchni.



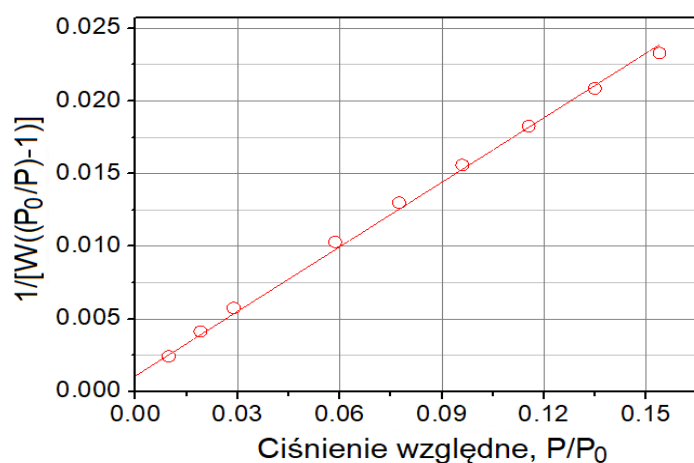
Rysunek 5.60. Wyniki analizy powierzchni właściwej wielopunktową metodą BET dla MCM-41

Powierzchnia właściwa adsorbentu MCM-41-Cl wynosi 922,389 m²/g, co oznacza spadek o około 20% w porównaniu z materiałem wyjściowym MCM-41. Obserwowane zmniejszenie powierzchni właściwej jest zgodne z oczekiwanym efektem funkcjonalizacji powierzchni, ponieważ wprowadzenie grup chloropropyłowych może częściowo ograniczać dostępność wewnętrznej powierzchni porów oraz zmieniać charakter powierzchni adsorbentu. Analiza wielopunktową metodą BET (rys. 5.61) wykazała bardzo dobrą zgodność danych eksperymentalnych z modelem BET ($R^2 = 0,999$). Pomimo zmniejszenia powierzchni właściwej materiał zachował wysoko rozwiniętą strukturę mezoporowatą charakterystyczną dla materiałów typu MCM-41. Wyniki wskazują, że przeprowadzona funkcjonalizacja wpływa głównie na właściwości powierzchniowe materiału, nie powodując znaczącego zaburzenia jego struktury porowatej.



Rysunek 5.61. Wyniki analizy powierzchni właściwej wielopunktową metodą BET dla MCM-41-Cl

Dla adsorbentu MCM-41-Gly uzyskana powierzchnia właściwa wynosi 859,533 m²/g i jest najniższa spośród trzech analizowanych adsorbentów niekomercyjnych. Spadek powierzchni właściwej o około 25% względem materiału wyjściowego MCM-41 można wiązać z wprowadzeniem grup glicydylowych, które zajmują część dostępnej przestrzeni porowej i mogą ograniczać dostęp cząsteczek azotu do wewnętrznej powierzchni porów. Pomimo zmniejszenia powierzchni właściwej materiał zachowuje wysoko rozwiniętą strukturę mezoporowatą charakterystyczną dla materiałów typu MCM-41, co potwierdzają wyniki wcześniejszych analiz porowatości. Analiza wielopunktową metodą BET (rys. 5.62) wykazała bardzo dobrą zgodność danych eksperymentalnych z modelem BET ($R^2 = 0,999$), potwierdzając poprawność wyznaczonych parametrów.



Rysunek 5.62. Wyniki analizy powierzchni właściwej wielopunktową metodą BET dla MCM-41-Gly

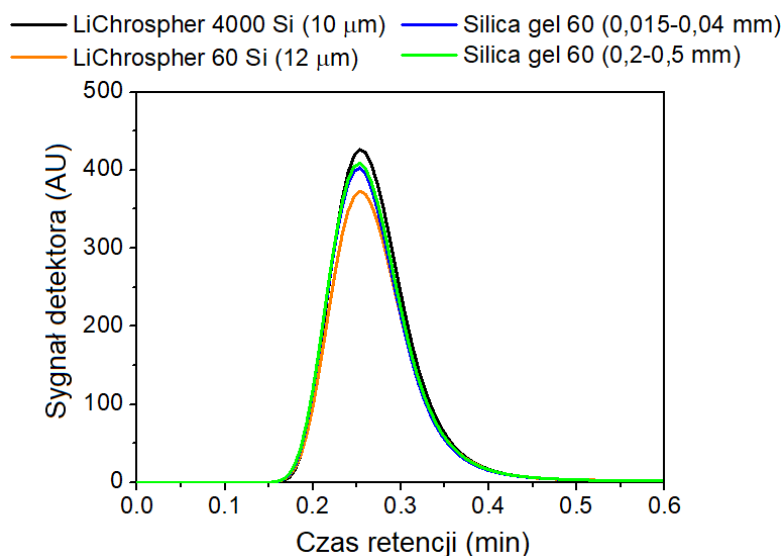
Tabela 5.30. Wyniki analizy powierzchni właściwej adsorbentów niekomercyjnych - wielopunktowa metoda BET

Wielopunktowa metoda BET				
Adsorbenty niekomercyjne	Powierzchnia właściwa (m²/g)	Nachylenie prostej BET (g/cm³)	R²	C (stała)
MCM-41	1150,108	4,371	0,999	198,231
MCM-41-Cl	922,389	159,000	0,999	90,508
MCM-41-Gly	859,533	155,300	0,999	97,711

V.2.4.3. Podsumowanie

Analiza powierzchni właściwej wykonana wielopunktową metodą BET wykazała istotne zróżnicowanie badanych adsorbentów pod względem dostępnej powierzchni adsorpcyjnej. Otrzymane wyniki potwierdziły wpływ zarówno struktury porowatej, jak i właściwości chemicznych powierzchni na parametry adsorpcyjne analizowanych materiałów.

Adsorbenty o słabo rozwiniętej porowatości, takie jak LiChrospher 4000 Si, charakteryzowały się niską powierzchnią właściwą, podczas gdy LiChrospher 60 Si oraz żele krzemionkowe wykazywały znacznie wyższe wartości tego parametru. Wyniki te pozostają zgodne z obserwacjami przedstawionymi na rysunku 5.63, na którym zaprezentowano przykładowe wyniki dla jednego z analizowanych związków testowych – kofeiny. Po kontakcie z adsorbentem LiChrospher 60 Si odnotowano najniższy sygnał kofeiny, co wskazuje na najwyższy stopień jej adsorpcji na tym adsorbencie. Należy jednak podkreślić, że wartość powierzchni właściwej wyznaczona metodą BET nie przekłada się bezpośrednio na zdolność adsorpcyjną adsorbentu. Metoda BET pozwala na wyznaczenie powierzchni właściwej na podstawie adsorpcji azotu, natomiast rzeczywista adsorpcja zachodzi z udziałem cząsteczek adsorbentu o odmiennych właściwościach i rozmiarach, takich jak np. kofeina. O efektywności procesu adsorpcji decyduje zatem nie tylko całkowita powierzchnia właściwa, lecz również dostępność miejsc adsorpcyjnych, rozmiar porów oraz możliwość transportu cząsteczek adsorbentu w strukturze porowatej materiału.



Rysunek 5.63. Porównanie chromatogramów kofeiny o stężeniu 6,75 g/dm³ po kontakcie z adsorbentami komercyjnymi w składzie eluentu 95:5 (v/v) ACN:H₂O

Analiza powierzchni właściwej adsorbentów niekomercyjnych typu MCM-41 potwierdza, że materiał wyjściowy MCM-41 charakteryzuje się bardzo rozwiniętą strukturą mezoporowatą. Modyfikacje powierzchniowe grupami chloropropyłowymi (–Cl) oraz glicydylowymi (–Gly) prowadzą do zmniejszenia powierzchni właściwej na skutek częściowego zajęcia przestrzeni porowej przez wprowadzone grupy funkcyjne. Pomimo obserwowanego spadku powierzchni właściwej wszystkie adsorbenty zachowują bardzo wysokie wartości powierzchni właściwej, co wskazuje na zachowanie uporządkowanej struktury mezoporowatej charakterystycznej dla materiałów typu MCM-41.

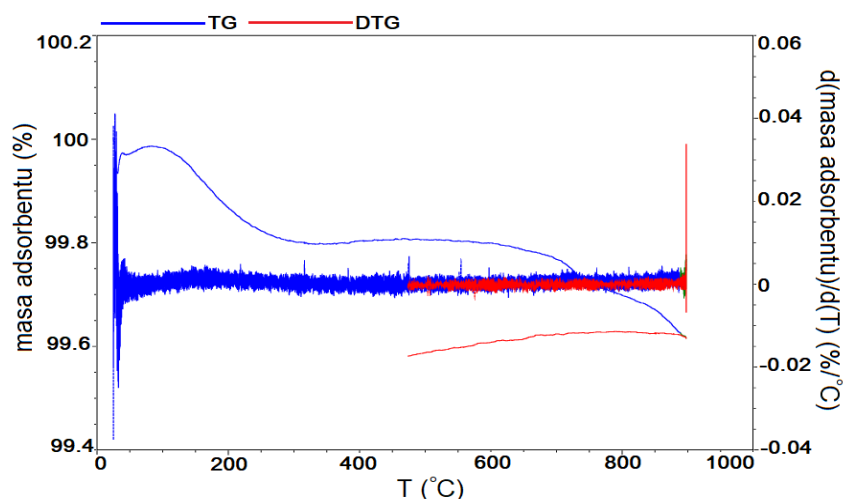
V.2.5. Analiza termograwimetryczna (TG-DTG) adsorbentów

V.2.5.1. Adsorbenty komercyjne

Na poniższych rysunkach 5.64-5.70 przedstawiono wyniki analizy termograwimetrycznej (TG-DTG) wybranych adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych. Oś pozioma przedstawia temperaturę w °C. Lewa oś pionowa przedstawia zmianę masy adsorbentu w procentach względem masy początkowej, natomiast prawa oś pionowa przedstawia pochodną zmiany masy względem temperatury w jednostkach (%/°C). Na wykresie widoczne są dwie główne krzywe: linia niebieska odpowiada przebiegowi TG (zmiana masy adsorbentu w funkcji temperatury), a linia czerwona DTG (szybkość zmian masy adsorbentu w funkcji temperatury).

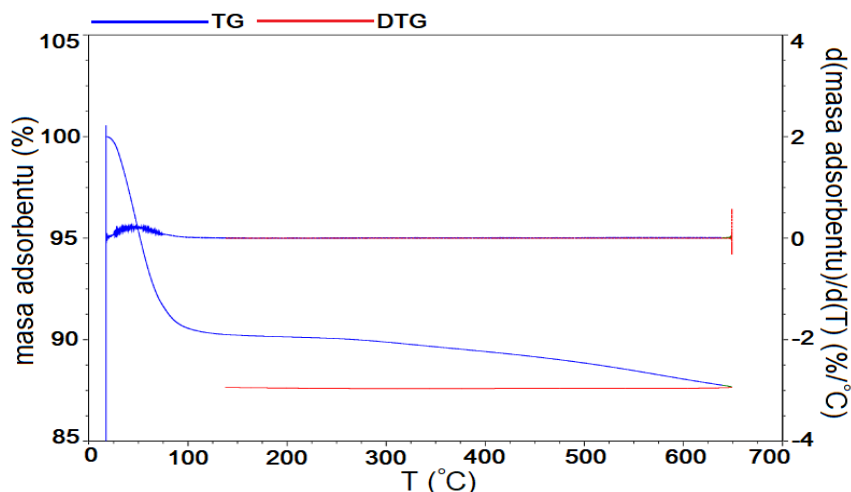
Dla adsorbentu LiChrospher 4000 Si (10 µm) (rys. 5.64) zaobserwowano niewielki spadek masy próbki do około 99,8 % w zakresie temperatur do 280 °C, co można przypisać

usunięciu fizycznie zaadsorbowanej wody oraz śladowych ilości substancji lotnych. W dalszym zakresie temperatur masa próbki pozostaje praktycznie niezmienną, co świadczy o wysokiej stabilności termicznej materiału. Brak wyraźnych efektów na krzywej DTG wskazuje, że podczas ogrzewania nie zachodzą istotne procesy rozkładu chemicznego. Całkowity ubytek masy wynoszący około 0,4 % potwierdza wysoką odporność termiczną adsorbentu.



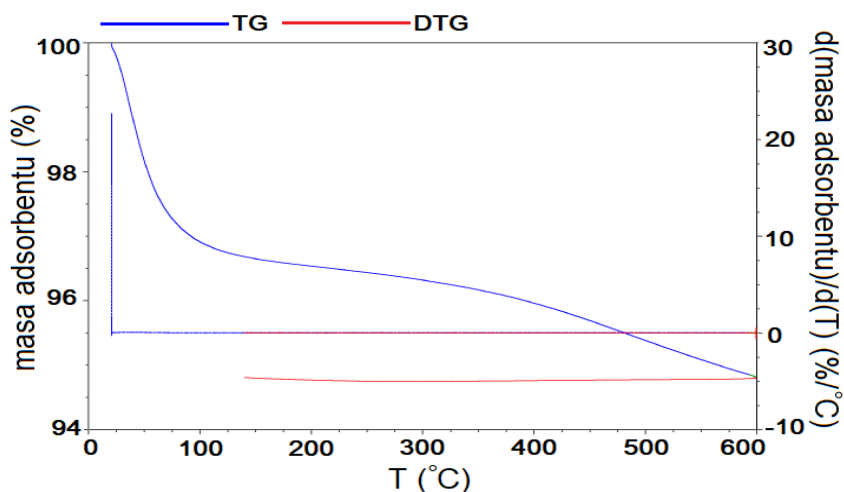
Rysunek 5.64. Wyniki analizy termogravimetrycznej (TG-DTG) adsorbentu *LiChrospher 4000 Si (10 µm)*

Dla adsorbentu LiChrospher 60 Si (12 µm) (rys. 5.65) zaobserwowano spadek masy do około 91 % poniżej 100 °C. W dalszym zakresie temperatur masa próbki zmniejsza się stopniowo, osiągając około 89–90 % wartości początkowej. Brak wyraźnych pików na krzywej DTG wskazuje na brak istotnych procesów rozkładu chemicznego. Całkowity ubytek masy wynoszący około 10–11 % jest charakterystyczny dla krzemionek o wysoko rozwiniętej powierzchni właściwej, zdolnych do adsorpcji większych ilości wody i innych substancji lotnych.



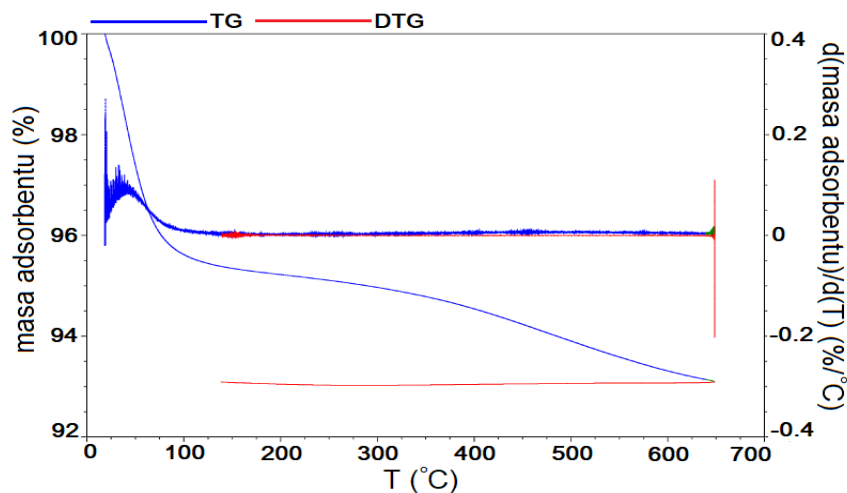
Rysunek 5.65. Wyniki analizy termograwimetrycznej (TG-DTG) adsorbentu
LiChrospher 60 Si (12 μ m)

Dla adsorbentu Silica gel 60 (0,015–0,040 mm) (rys. 5.66) w początkowym zakresie temperatur, do około 100 °C, obserwuje się spadek masy z wartości początkowej (100 %) do około 97 %. W dalszym zakresie temperatur, od 100 °C do 600 °C, ubytek masy przebiega stopniowo i prowadzi do osiągnięcia wartości około 95 %, co wskazuje na niewielki ubytek masy związany z desorpcją wody oraz substancji lotnych. Brak wyraźnych pików na krzywej DTG sugeruje, że procesy zachodzące w analizowanym przedziale temperatur mają charakter łagodny i nie są związane z gwałtownym rozkładem chemicznym. Uzyskane wyniki potwierdzają wysoką stabilność termiczną badanego adsorbentu w analizowanym zakresie temperatur.



Rysunek 5.66. Wyniki analizy termograwimetrycznej (TG-DTG) adsorbentu
Silica gel 60 (0,015-0,040 mm)

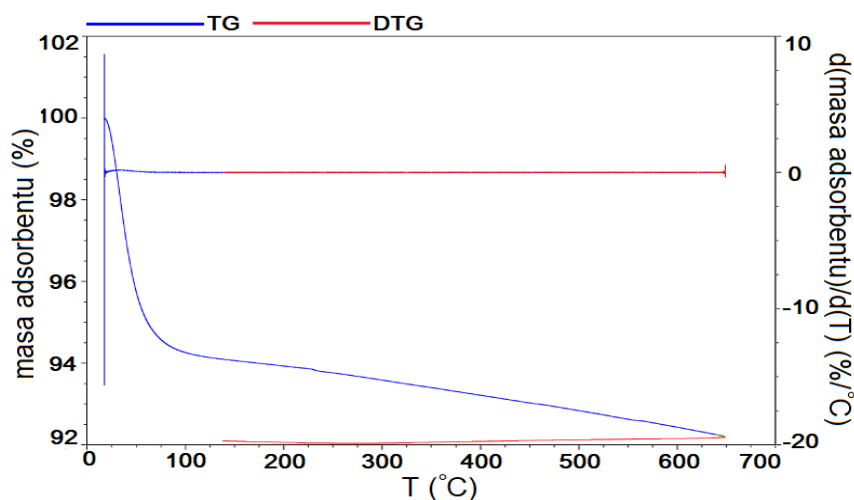
Dla adsorbentu Silica gel 60 (0,2–0,5 mm) (rys. 5.67) w początkowym zakresie temperatur, do około 100 °C, obserwuje się wyraźny spadek masy z poziomu 100 % do około 96 %. W dalszym zakresie temperatur (100–600 °C) ubytek masy przebiega stopniowo, osiągając wartość około 92–93 % masy początkowej, co świadczy o niewielkich zmianach strukturalnych adsorbentu. Brak wyraźnych pików na krzywej DTG wskazuje, że zachodzące procesy mają charakter łagodny i nie są związane z gwałtownym rozkładem chemicznym. Całkowity ubytek masy wynosi około 7–8 %.



Rysunek 5.67. Wyniki analizy termograwimetrycznej (TG-DTG) adsorbentu
Silica gel 60 (0,2-0,5 mm)

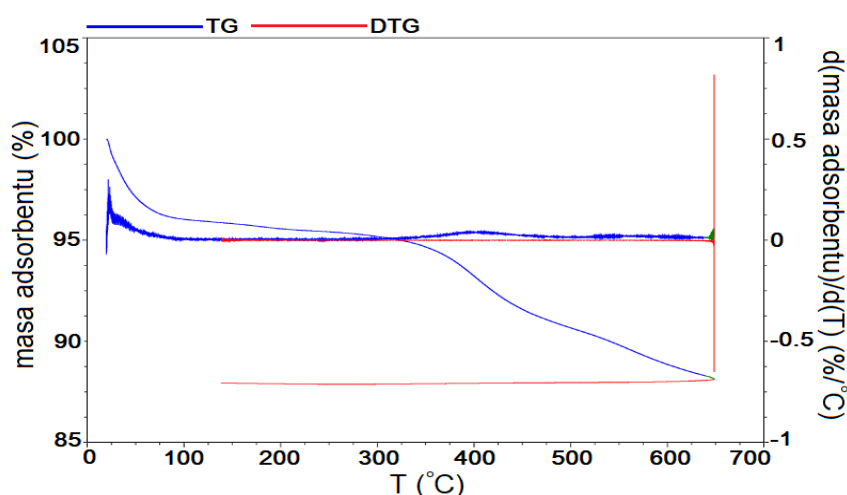
V.2.5.2. Adsorbenty niekomercyjne

Dla adsorbentu MCM-41 (rys. 5.68) w początkowym zakresie temperatur (do około 100 °C) obserwuje się spadek masy próbki z wartości początkowej (100 %) do około 94,5 %. W zakresie 100–650 °C masa próbki zmniejsza się stopniowo, osiągając około 92 % wartości początkowej. Brak wyraźnych pików na krzywej DTG wskazuje, że procesy zachodzące w tym zakresie temperatur mają charakter łagodny i nie są związane z gwałtownym rozkładem chemicznym. Całkowity ubytek masy wynoszący około 8 % potwierdza wysoką stabilność termiczną adsorbentu.



Rysunek 5.68. Wyniki analizy termograwimetrycznej (TG-DTG) adsorbentu MCM-41

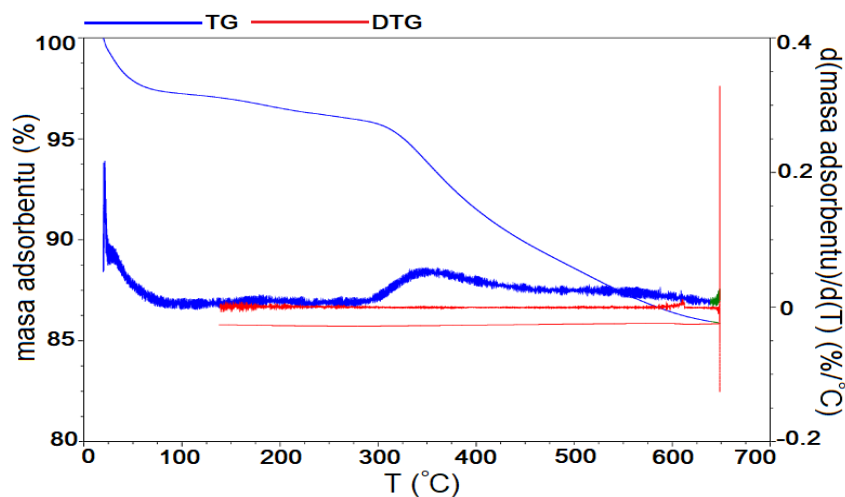
Dla adsorbentu MCM-41-Cl (rys. 5.69) w początkowym zakresie temperatur (do ok. 90 °C) obserwuje się spadek masy z wartości początkowej (~100 %) do około 96 %. W zakresie 100–330 °C masa próbki pozostaje praktycznie stała, a krzywa DTG przebiega blisko zera, co wskazuje na brak oznak gwałtownych przemian i dobrą stabilność termiczną adsorbentu. Kolejny etap rozpoczyna się od około 330 °C i trwa do ok. 650 °C, w którym krzywa TG wykazuje systematyczny spadek do poziomu 87 % masy początkowej. Towarzysząca temu krzywa DTG charakteryzuje się niską intensywnością sygnału i nie wykazuje ostrych pików, co świadczy o łagodnym charakterze zachodzących procesów. Całkowity ubytek masy w analizowanym zakresie wynosi ok. 13 %.



Rysunek 5.69. Wyniki analizy termograwimetrycznej (TG-DTG) adsorbentu MCM-41-Cl

Dla adsorbentu MCM-41-Gly (rys. 5.70) w pierwszym etapie ogrzewania, do około 60 °C, obserwuje się wyraźny spadek masy z wartości początkowej (~100 %) do około 97 %.

W dalszym zakresie temperatur, od 60 °C do około 320 °C, przebieg TG jest stabilny, a masa próbki utrzymuje się w przedziale 96–95 %. Krzywa DTG znajduje się blisko zera, co świadczy o braku oznak intensywnych przemian i dobrej stabilności struktury krzemionkowej. Kolejny, wyraźnie zaznaczony etap rozpoczyna się w okolicach 320 °C i trwa do około 660 °C: krzywa TG wykazuje systematyczny, stopniowy spadek do około 86 %. Całkowity ubytek masy w całym badanym zakresie wynosi około 14 %.



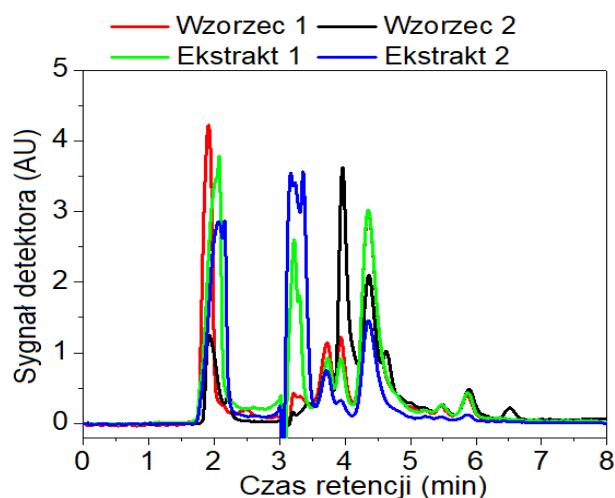
Rysunek 5.70. Wyniki analizy termograwimetrycznej (TG-DTG) adsorbentu MCM-41-Gly

V.2.5.3. Podsumowanie

Przeprowadzona analiza termograwimetryczna wykazała wysoką stabilność termiczną wszystkich badanych adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych. Obserwowane ubytki masy w niskich temperaturach były związane głównie z usuwaniem fizycznie zaadsorbowanej wody oraz śladowych ilości substancji lotnych obecnych na powierzchni i w porach materiałów. Brak gwałtownych zmian masy oraz wyraźnych efektów rozkładu chemicznego w zakresie temperatur stosowanych w chromatografii cieczowej potwierdza przydatność badanych adsorbentów do zastosowań chromatograficznych. Dla materiałów funkcjonalizowanych typu MCM-41 zaobserwowano większe całkowite ubytki masy niż dla krzemionki niemodyfikowanej, co potwierdza obecność grup funkcyjnych wprowadzonych podczas procesu modyfikacji powierzchni. Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowane procesy funkcjonalizacji nie powodują istotnego pogorszenia stabilności termicznej adsorbentów.

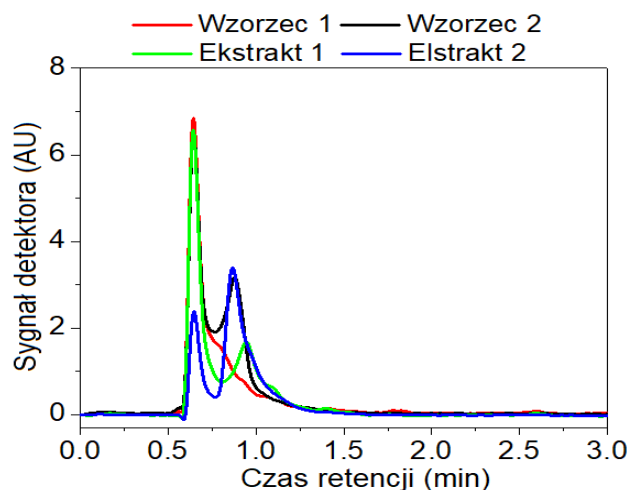
V.3. Analiza chromatograficzna heparyny sodowej

W niniejszej pracy przeprowadzono analizę dwóch wzorców heparyny sodowej oraz dwóch ekstraktów pochodzenia zwierzęcego zawierających heparynę. Celem badań było porównanie retencji badanego analitu w różnych układach chromatograficznych oraz ocena wpływu rodzaju kolumny i składu eluentu na selektywność, czułość oraz czas trwania analizy. Przykładowe wyniki uzyskane dla badanych układów z zastosowaniem eluentów zawierających 90 % (v/v) acetonitrylu przedstawiono na rysunkach 5.71–5.74. Na rysunkach 5.71 i 5.72 zaprezentowano chromatogramy uzyskane z zastosowaniem kolumn NUCLEOSIL 120-3 C18 oraz Hypercarb Porous Graphitic Carbon HPLC. W przypadku zastosowania niepolarniej kolumny C18 (rys. 5.71) uzyskano wysoką selektywność i czułość rozdzielania, a także istotne skrócenie czasu analizy w porównaniu z metodą opisaną w Farmakopei Europejskiej — do około 8 minut [250].



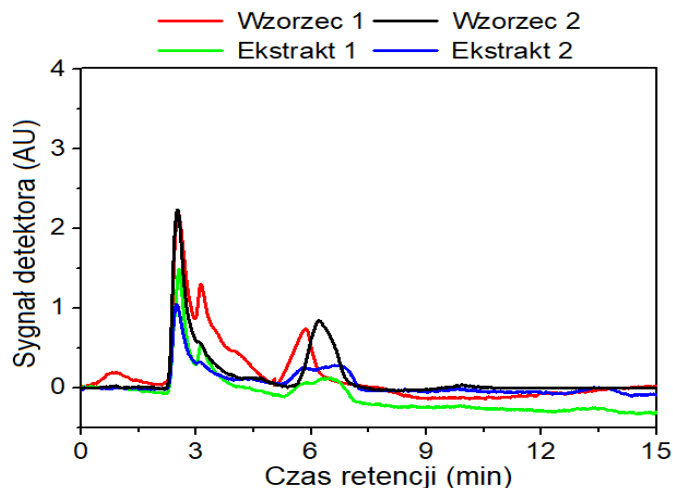
Rysunek 5.71. Wyniki analizy heparyny sodowej w kolumnie chromatograficznej NUCLEOSIL 120-3 C18 w składzie eluentu: 90:10 (v/v) ACN:H₂O

Dalsze skrócenie czasu analizy, do około 3 minut, można osiągnąć przy zastosowaniu kolumny węglowej (rys. 5.72). W tym układzie heparyna sodowa ulega stosunkowo szybkiemu wymywaniu z fazy stacjonarnej, co wynika z charakteru oddziaływań zachodzących na powierzchni adsorbentu węglowego oraz relatywnie słabszych interakcji w porównaniu z bardziej specyficznymi układami rozdziału. Tak szybka elucja umożliwia istotne skrócenie całkowitego czasu analizy, jednak może wiązać się z obniżeniem selektywności oraz rozdzielczości chromatograficznej.



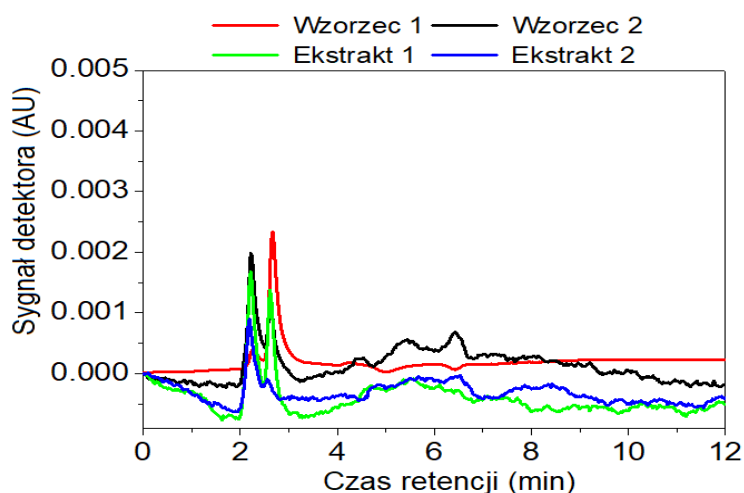
Rysunek 5.72. Wyniki analizy heparyny sodowej w kolumnie Hypercarb Porous Graphitic Carbon HPLC w składzie eluentu: 90:10 (v/v) ACN:H₂O

W układzie z kolumną aminopropylową (system HPLC, rys. 5.73) uzyskano lepszą selektywność separacji w porównaniu z kolumną węglową. Zastosowanie fazy stacjonarnej zawierającej grupy aminopropylowe sprzyja występowaniu oddziaływań elektrostatycznych i hydrofilowych pomiędzy cząsteczkami heparyny sodowej a powierzchnią fazy stacjonarnej, co przekłada się na większe zróżnicowanie czasów retencji poszczególnych frakcji. W rezultacie uzyskano chromatogram o bardziej czytelnej strukturze pików i lepszej rozdzielczości. Jednocześnie zwiększona selektywność wiąże się z wydłużeniem czasu analizy do około 15 minut. Jest to konsekwencja silniejszych oddziaływań analitu z fazą stacjonarną, które prowadzą do dłuższego zatrzymania heparyny sodowej w kolumnie. W efekcie uzyskano rozdział o wyższej jakości, jednak kosztem wydłużenia całkowitego czasu analizy w porównaniu z kolumną węglową oraz niepolarną kolumną C18.



Rysunek 5.73. Wyniki analizy heparyny sodowej w kolumnie LiChroCART Purospher STAR NH₂ w składzie eluentu: 90:10 (v/v) ACN:H₂O

W układzie z kolumną aminopropylową zastosowanie buforowanej fazy ruchomej o $\text{pH} = 5$ skraca czas analizy do około 12 minut, przy jedynie niewielkim obniżeniu selektywności separacji (rys. 5.74). Zastosowanie buforu wpływa na stan jonizacji powierzchni fazy stacjonarnej oraz charakter oddziaływań pomiędzy grupami funkcyjnymi wypełnienia a cząsteczkami heparyny sodowej. W konsekwencji zmienia się siła oddziaływań elektrostatycznych oraz retencja analitu, prowadząc do szybszego wymywania składników próbki z układu chromatograficznego. Uzyskane chromatogramy charakteryzują się krótszymi czasami retencji przy zachowaniu zadowalającej selektywności.



Rysunek 5.74. Wyniki analizy heparyny sodowej w kolumnie LiChroCART Purospher STAR NH_2 w składzie eluentu: 90:10 (v/v) ACN:bufor, $\text{pH} = 5$

V.3.1. Podsumowanie

Przeprowadzone badania umożliwiły ocenę zachowania heparyny sodowej w różnych układach chromatograficznych. Uzyskane chromatogramy pozwoliły na porównanie wpływu rodzaju kolumny i składu fazy ruchomej na selektywność, rozdzielczość oraz czas analizy. Wykazano, że zastosowanie kolumny C18 zapewnia korzystne parametry rozdzielania przy skróceniu czasu analizy w porównaniu z metodą referencyjną opisaną w Farmakopei Europejskiej. Kolumna węglowa umożliwiła dalsze skrócenie czasu oznaczenia, jednak przy obniżonej selektywności separacji, natomiast kolumna aminopropylowa zapewniła wyższą selektywność kosztem dłuższego czasu analizy. Zastosowanie buforowanej fazy ruchomej pozwoliło dodatkowo skrócić czas retencji przy zachowaniu zadowalających parametrów rozdzielania. Opracowane układy chromatograficzne mogą znaleźć zastosowanie w kontroli jakości materiałów zawierających heparynę pochodzenia zwierzęcego.

VI. WNIOSKI

Uzyskane wyniki badań oraz ich szczegółowa analiza pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

- Analiza wpływu temperatury wykazała, że zmiany retencji w warunkach HILIC zależą od składu fazy ruchomej, rodzaju fazy stacjonarnej oraz właściwości fizykochemicznych analitów. W większości badanych układów wzrost udziału rozpuszczalnika organicznego wiązał się ze zwiększeniem egzotermicznego charakteru retencji. Liniowe zależności van't Hoffa wskazywały na względną stabilność dominującego mechanizmu retencji w analizowanym zakresie temperatur. Odchylenia od liniowości, obserwowane przede wszystkim dla kwercetyny, sugerowały zróżnicowany udział poszczególnych oddziaływań w procesie retencji, zależny od temperatury, składu fazy ruchomej oraz rodzaju fazy stacjonarnej.
- Rodzaj modyfikatora organicznego istotnie wpływa na retencję związków w warunkach HILIC. Wykazano różnice w retencji badanych analitów w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika organicznego (acetonitryl vs metanol). Wyniki potwierdziły, że rodzaj rozpuszczalnika organicznego wpływa na względny udział mechanizmów podziału i adsorpcji, a tym samym na charakter retencji w układach HILIC.
- Sprawność kolumn pracująca w warunkach HILIC jest uwarunkowana zarówno składem fazy ruchomej, jak i właściwościami fazy stacjonarnej oraz analizowanego związku. Najwyższą sprawność dla badanych kolumn uzyskano przy zawartości 95 % (v/v) acetonitrylu w eluencie. W porównaniu z acetonitrylem zastosowanie metanolu prowadziło do niższej sprawności a w niektórych układach również do wzrostu ciśnienia i ograniczenia zakresu stosowanych przepływów. W przypadku kolumny Shodex SILICA 5NH 4D najniższą sprawność dla wszystkich analizowanych związków zaobserwowano w układzie zawierającym 70:30 (v/v) ACN:H₂O.
- Badania równowag adsorpcyjnych komercyjnych i niekomercyjnych faz stacjonarnych wykazały, że charakter procesu adsorpcji zależy od właściwości fizykochemicznych analitu, składu fazy ruchomej oraz rodzaju i struktury fazy stacjonarnej. W zależności od warunków adsorpcja zachodziła na energetycznie jednorodnych lub heterogenicznych powierzchniach, co znajdowało odzwierciedlenie w przebiegu izoterm, zależności Scatcharda oraz analizie rozkładu energii adsorpcji (AED).

Dla powierzchni jednorodnych energetycznie proces można było opisać za pomocą modelu Langmuira, natomiast w przypadku powierzchni heterogenicznych energetycznie lepsze dopasowanie uzyskiwano z zastosowaniem modeli bi-Langmuira lub Tótha, co potwierdzono analizą statystyczną.

- Analiza SEM-EDS i ICP-MS potwierdziła, że badane adsorbenty są materiałami na bazie krzemionki oraz wykazała obecność śladowych ilości innych pierwiastków (np. Fe, Cr, Ni), które mogą lokalnie wpływać na właściwości adsorpcyjne powierzchni. Zaobserwowane różnice morfologiczne oraz lokalne zróżnicowanie składu pierwiastkowego mogą przyczyniać się do heterogeniczności energetycznej powierzchni adsorbentów.
- Właściwości granulometryczne badanych adsorbentów zależały od ich rodzaju oraz zastosowanej modyfikacji powierzchni. Funkcjonalizacja krzemionek typu MCM-41 powodowała zmianę rozkładu wielkości ziaren, w tym przesunięcie maksimum udziału objętościowego w kierunku mniejszych średnic. Wyniki wskazują na wpływ modyfikacji powierzchni adsorbentów na rozmiar ziaren.
- Badane adsorbenty różniły się pod względem powierzchni właściwej i struktury porowatej. Adsorbenty o bardziej rozwiniętej porowatości oraz większej powierzchni właściwej wykazywały korzystniejsze właściwości sorpcyjne. Ponadto wykazano, że funkcjonalizacja krzemionek typu MCM-41 prowadziła do zmniejszenia powierzchni właściwej, co może wskazywać na częściowe ograniczenie dostępności przestrzeni adsorpcyjnej w wyniku modyfikacji chemicznej.
- Analiza TG-DTG wykazała wysoką stabilność termiczną badanych adsorbentów oraz brak istotnych przemian termicznych w zakresie temperatur stosowanych w badaniach chromatograficznych.
- Dobór fazy stacjonarnej i składu fazy ruchomej istotnie wpływa na parametry chromatograficznego oznaczania heparyny sodowej. Kolumna C18 zapewniała korzystne parametry rozdzielania przy krótszym czasie analizy niż metoda referencyjna opisana w farmakopei, kolumna węglowa umożliwiała dalsze skrócenie czasu analizy kosztem selektywności, natomiast kolumna aminopropylowa zapewniała większą selektywność przy wydłużonym czasie analizy. Zastosowanie buforowanej fazy ruchomej pozwalało dodatkowo skrócić czas retencji przy zachowaniu zadowalających parametrów rozdzielania.

VII. LITERATURA

- [1] A.H. Ali, *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review*, Ann. Adv. Chem., (2022), 6:01-02, <http://dx.doi.org/10.29328/journal.aac.1001026>.
- [2] F. Shaikh, A. Uzgare, *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): principle, applications, and the role of artificial intelligence – A review*, J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci., (2026), 15(4):13541, <https://doi.org/10.55251/jmbfs.13541>.
- [3] F. Gritti, G. Guiochon, *Perspectives on the evolution of the column efficiency in Liquid Chromatography*, Anal. Chem., (2013), 85(6):3017–3035, <https://doi.org/10.1021/ac3033307>.
- [4] F. Gritti, T. Farkas, J. Heng, G. Guiochon, *On the relationship between band broadening and the particle-size distribution of the packing material in liquid chromatography: Theory and practice*, J. Chromatogr. A, (2011), 1218(45):8209-8221, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.034>.
- [5] K. Broeckhoven, G. Desmet, *Advances and innovations in liquid chromatography stationary phase supports*, Anal. Chem., (2021), 93(1):257–272, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04466>.
- [6] G. Guiochon, *Preparative liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, (2002), 965(1-2):129-161, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01471-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01471-6).
- [7] B. Rushikesh, B. Mayur, C. Sandip, B. Piyush, G. Jayesh, S. Vijayraj, S. Ganesh, *A brief review on different chromatographic techniques*, J. Pharm. Res., (2024), 8(1):000294, <https://doi.org/10.23880/oajpr-16000294>.
- [8] C. Xiaodan, L. Wang, *Analysis of the application of high performance liquid chromatography*, IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci., (2021), 769:032020, <https://doi.org/10.1088/1755-1315/769/3/032020>.
- [9] D. Poonam, S. Dunuweera, J. Bietsch, R. Bandu, C. Wannere, S. Achanta, D. Krishnamurthy, B. Qu, C. H. Senanayake, *Recent advances and application of liquid chromatography in pharmaceutical industry*, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., (2025), 48:168–187, <https://doi.org/10.1080/10826076.2024.2448692>.
- [10] G. Chawla, K. Chaudhary, *A review of HPLC technique covering its pharmaceutical, environmental, forensic, clinical and other applications*, Int. J. Pharm. Chem. Anal., (2019), 6(2):27-39, <https://doi.org/10.18231/j.ijpca.2019.006>.
- [11] C.F. Poole, S.K. Poole, *Foundations of retention in partition chromatography*, J. Chromatogr. A, (2009), 1216(10):1530-1550, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.092>.

- [12] M.C. Asare, J. A. Kubde, R.L. Bakal, P.R. Hatwar, V.S. Kalamb, P.K. Tambakhe, *Ion exchange chromatography: A comprehensive review*, GSC Biol. Pharm. Sci., (2025), 31(01):026-037, <https://doi.org/10.30574/gscbps.2025.31.1.0127>.
- [13] V. D'Atri, M. Imiolek, C. Quinn, A. Finny, M. Lauber, S. Fekete, D. Guilleme, *Size exclusion chromatography of biopharmaceutical products: From current practices for proteins to emerging trends for viral vectors, nucleic acids and lipid nanoparticles*, J. Chromatogr. A, (2024), 1722:464862, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464862>.
- [14] E. L. Rodriguez, S. Poddar, S. Iftikhar, K. Suh, A.G. Woolfork, S. Ovbude, A. Pekarek, M. Walters, S. Lott, D.S. Hage, *Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years*, J. Chromatogr. B, (2020), 1157:22332, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122332>.
- [15] B. Trathnigg, M. I. Malik, N.V. Cuong, A. M. Skvortsov, *Monofunctional polymers in liquid adsorption chromatography: Determination of the interaction parameter in the range of weak interaction*, J. Chromatogr. A, (2008), 1207(1–2):122-129, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.040>.
- [16] S. Basak, D. Piyali, *Reverse Phase High-performance Liquid Chromatography: A comprehensive review of principles, instrumentation, analytical procedures, and pharmaceutical applications*, J. Prev. Diagn. Treat. Strateg. Med., (2025), 4(2):83-92, https://doi.org/10.4103/jpdtm.jpdtm_34_25.
- [17] P. Žuvela, M. Skoczylas, J. Jay Liu, T. Bączek, M. Wah Wong, B. Buszewski, *Column characterization and selection systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*, Chem. Rev., (2019), 119(6):3674–3729, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00246>.
- [18] C. Erkmen, W.H. Gebrehiwot, B. Uslu, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC): Latest applications in the pharmaceutical researches*, Curr. Pharm. Anal., (2021), 17(3):316-345, <https://doi.org/10.2174/1573412916666200402101501>.
- [19] B. Wei, L. Dai, K. Zhang, *Applications of hydrophilic interaction and mixed-mode liquid chromatography in pharmaceutical analysis*, J. Chromatogr. A, (2025), 1739:465524, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465524>.
- [20] T. Fukushima, M. Koishi, T. Sakamoto, M. Onozato, *Use of commercial Mixed-Mode stationary phases and sorbents in the High-Performance Liquid Chromatography analysis and solid-phase extraction of ionized and hydrophilic bioactive compounds*, Molecules, (2024), 29(10):2341, <https://doi.org/10.3390/molecules29102341>.

- [21] P. Ravisankar, S. Anusha, K. Supriya, U.A. Kumar, *Fundamental chromatographic parameters*, Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., (2019), 55(2):46-50, ISSN 0976 – 044X.
- [22] L. Blumberg, *Chromatographic parameters: Characteristic parameters of solute retention - an insightful description of column properties*, J. Chromatogr. A, (2022), 1685:463594, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463594>.
- [23] I.G. Zenkevich, A. Derouiche, *Features and advantages of the recurrent approximation of retention times in reversed-phase high-performance liquid chromatography*, Separations, (2024), 11(3):69, <https://doi.org/10.3390/separations11030069>.
- [24] V. David, J. Petre, S.C. Moldoveanu, *Challenges in the measurement of the volume of phases for HPLC columns*, Molecules, (2025), 30:2062, <https://doi.org/10.3390/molecules30092062>.
- [25] W. Zapała, *Modelowanie procesu retencji w wybranych rodzajach chromatografii cieczowej*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Rzeszowskiej, (2012), ISBN 978-83-7199-707.
- [26] F. Gritti, *Perspective on the future approaches to predict retention in liquid chromatography*, Anal. Chem., (2021), 93:5653–5664, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c05078>.
- [27] D. Antos, K. Kaczmarek, W. Piątkowski, *Chromatografia preparatywna jako proces rozdzielania mieszanin*, WNT Warszawa, (2011), ISBN 978-83-204-3708-9.
- [28] Y. Guo, D. Baran, L. Ryan, *Insights into the selectivity of polar stationary phases based on quantitative retention mechanism assessment in hydrophilic interaction chromatography*, J. Chromatogr. A, (2024), 1726:464973, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464973>.
- [29] A. Jaekel, M. Legelli, M. Wirtz, D. Meyer, N. Schröder, K. Streckel, S. Lamotte, *Selectivity optimization in liquid chromatography via stationary phase tuning*, J. Sep. Sci., (2023), 46:2300204, <https://doi.org/10.1002/jssc.202300204>.
- [30] B.K. Głód, P. Piszcz, *Podstawy Wysokosprawnej Chromatografii Cieczowej*, Wydawnictwo Naukowe UPH w Siedlcach, (2019), 64-71, ISBN 978-83-7051-967-4.
- [31] W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, (2010), 14:265, ISBN/ISSN: 978-83-01-14210-0.
- [32] F. Gritti, G. Guiochon, *Adsorption mechanism in RPLC. Effect of the nature of the organic modifier*, Anal. Chem., (2005), 77(13):4257-4272, <https://doi.org/10.1021/ac0580058>.
- [33] A. Haseeb, Y. Wondmagegne, M.X. Fernandes, J. Samuelsson, *Adsorption energy distributions: Theory and applications in liquid chromatography*, J. Chromatogr. Op., (2025), 8:100252, <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2025.100252>.

- [34] R. Vitek, J.C. Masini, *Nonlinear regression for treating adsorption isotherm data to characterize new sorbents: Advantages over linearization demonstrated with simulated and experimental data*, *Heliyon*, (2023), 9:15128, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15128>.
- [35] J. Zhang, J. Bai, M. Duan, J. Yang, L. Bian, *Derivation of adsorption capacity and adsorption isotherm by a single adsorbate concentration in liquid–solid system*, *Chem. Pap.*, (2021), 75:2459–2476, <https://doi.org/10.1007/s11696-020-01476-9>.
- [36] W. Nowicki, G. Nowicka, *Determination of the parameters of Langmuir-type isotherms by the frontal analysis method. Some identification aspects*, *Adsorpt. Sci. Technol.*, (2005), 23(8):619–631, <https://doi.org/10.1260/026361705775373260>.
- [37] S. Horváth, D. Lukács, E. Farsang, K. Horváth, *Unbiased determination of adsorption isotherms by inverse method in liquid chromatography*, *Molecules*, (2023), 28:1031. <https://doi.org/10.3390/molecules28031031>.
- [38] B.T. Danat, R.A. Wuana, H.F. Chahul, M.S. Iormungwa, *Review of adsorption isotherms models*, *Appl. Water. Sci.*, (2026), 16:72, <https://doi.org/10.1007/s13201-025-02682-0>.
- [39] T. Fornstedt, *Characterization of adsorption processes in analytical liquid–solid chromatography*, *J. Chromatogr. A*, (2010), 1217:792–812, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.044>.
- [40] M. Vigdorowitsch, A. Pchelintsev, L. Tsygankova, E. Tanygina, *Freundlich isotherm: An adsorption model complete framework*, *Applied Sciences*, (2021), 11(17):8078, <https://doi.org/10.3390/app11178078>.
- [41] S. Golshan-Shirazi, G. Guiochon, *Experimental characterization of the elution profiles of high concentration chromatographic bands using the analytical solution of the ideal model*, *Anal. Chem.*, (1989), 61(5):462–467, <https://doi.org/10.1021/ac00180a017>.
- [42] A. Andrzejewska, K. Kaczmarski, G. Guiochon, *Theoretical study of the accuracy of the pulse method, frontal analysis, and frontal analysis by characteristic points for the determination of single component adsorption isotherms*, *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216(7):1067–83, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.021>.
- [43] N. Marchetti, A. Cavazzini, L. Pasti, F. Dondi, *Determination of adsorption isotherms by means of HPLC: Adsorption mechanism elucidation and separation optimization*, *J. Sep. Sci.*, (2009), 32(5-6):727–741, <https://doi.org/10.1002/JSSC.200800425>.
- [44] J. Samuelsson, T. Undin, T. Fornstedt, *Expanding the elution by characteristic point method for determination of various types of adsorption isotherms*, *J. Chromatogr. A*, (2011), 1218(24):3737–3742, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.035>.

- [45] B. Liu-Jiao, Y. Xiao-Yan, L. Li, *A simple frontal analysis equation to determine the adsorption parameters of solute molecules on different adsorbents*, Chin. J. Chem., (2007), 25:219-227, <https://doi.org/10.1002/cjoc.200790044>.
- [46] P.P. Ylä-Mäkelä, D.R. Williams, *A comparison of frontal and nonfrontal methods for determining solid-liquid adsorption isotherms using inverse liquid chromatography*, Langmuir, (2007), 23:4095-4101, <https://doi.org/10.1021/la0632631>.
- [47] F. Gritti, G. Guiochon, *Effect of the flow rate on the measurement of adsorption data by dynamic frontal analysis*, J. Chromatogr. A, (2005), 1069(1):31-42, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.129>.
- [48] R. Lech-Przywara, M. Przywara, W. Zapała, *Rozdział: Właściwości adsorpcyjne wybranych polarnych faz stacjonarnych*, Innowacje w naukach inżyneryjno-technicznych – wybrane aspekty, Wydawnictwo TYGIEL, (2023), ISBN 97883-67104-79-1.
- [49] Y.B. Torkia, M. Khalfaoui, A.B. Lamine, *On the use of the Hill's model as local isotherm in the interpretation of the behaviour of the adsorption energy distributions*, J. Appl. Phys., (2014), 6:2278-4861, <https://doi.org/10.9790/4861-06316273>.
- [50] F. Gritti, G. Guiochon, *Limits of the numerical estimation of the adsorption energy distribution from adsorption isotherm data using the expectation-maximization method*, J. Chromatogr. A, (2007), 1144(2):208-220, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.057>.
- [51] A. Seidel-Morgenstern, *Experimental determination of single solute and competitive adsorption isotherms*, J. Chromatogr. A, (2004), 1037(1-2):255-272, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.108>.
- [52] A. Haseeb, Y. Wondmagegne, M. X. Fernandes, J. Samuelsson, *Introducing the adsorption energy distribution calculation for two component competitive adsorption isotherm data*, Anal. Chem., (2025), 97:1966-1971, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c04663>.
- [53] Y. Zhou, A. Ramirez, E. M. Yuill, Q. Wang, *Mechanistic studies to understand peak tailing due to sulfinic acid- and carboxylic acid-silanophilic interactions in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, (2024), 1721:464819, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464819>.
- [54] S. Bocian, B. Buszewski, *Residual silanols at reversed-phase silica in HPLC – a contribution for a better understanding*, J. Sep. Sci., (2012), 35(10-11):1191-1200, <https://doi.org/10.1002/jssc.201200055>.

- [55] F. Gritti, G. Guiochon, *Heterogeneity of the adsorption mechanism of low molecular weight compounds in Reversed-Phase Liquid Chromatography*, Anal. Chem., (2006), 78(16):5823–5834, <https://doi.org/10.1021/ac060392d>.
- [56] F. Gritti, G. Gotmar, B.J. Stanley, G. Guiochon, *Determination of single component isotherms and affinity energy distribution by chromatography*, J. Chromatogr. A, (2003), 988(2):185-203, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)02084-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)02084-8).
- [57] B.J. Stanley, G. Guiochon, *Importance of the accuracy of experimental data in the nonlinear chromatographic determination of adsorption energy distributions*, Langmuir, (1994), 10(11):4278–4285, <https://doi.org/10.1021/la00023a059>.
- [58] I. Quiñones, B. Stanley, G. Guiochon, *Estimation of the adsorption energy distributions for the Jovanovic–Freundlich isotherm model with Jovanovic local behavior*, J. Chromatogr. A, (1999), 849(1):45-60, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00509-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00509-9).
- [59] B.J. Stanley, G. Guiochon, *Numerical estimation of adsorption energy distributions from adsorption isotherm data with the expectation-maximization method*, J. Phys. Chem., (1993), 97(30):8098–8104, <https://doi.org/10.1021/j100132a046>.
- [60] P. Ziobrowski, M. Chutkowski, M. Przywara, L. Zapła, M. Kosińska-Pezda, W. Zapła, *Analysis of adsorption energy distribution in selected hydrophilic-interaction chromatography systems with amide, amine, and zwitterionic stationary phases*, J. Sep. Sci., (2021), 44:2577–2586, <https://doi.org/10.1002/jssc.202100160>.
- [61] T. Vanitha Madhuri, M. Krishna Pandreka, B. Geetha Gayatri, M. Yamini, G. Abhishek, E. Raju Gope, D. Raghava, K. Nageswara Rao, *Advances in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC)*, J. Pharm. Insights Res., (2024), 02(06):039-046, <https://doi.org/10.69613/t4nhz921>.
- [62] A. Chauhan, A. Sharma, A.D. Ankalg, N. Sharma, M.S. Ashawat, *UHPLC Technology: Recent developments and emerging applications in analytical chemistry*, Asian J. Pharm. Anal., (2025), 15(4):319-7, <https://doi.org/10.52711/2231-5675.2025.00050>.
- [63] T. Zhang, Y. Yu, S. Han, H. Cong, C. Kang, Y. Shen, B. Yu, *Preparation and application of UPLC silica microsphere stationary phase: A review*, Adv. Colloid Interface Sci., (2023), 323:103070, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.103070>.
- [64] P. Gumulka, J. Żandarek, M. Dąbrowska, M. Starek, *UPLC Technique in pharmacy — an important tool of the modern analyst*, Processes, (2022), 10:2498, <https://doi.org/10.3390/pr10122498>.

- [65] K. Bhattacharya, N. Chanu, A. Bhattacharjee, B. Sahariah, C. Devi, R. Bordoloi, *Ultra-Performance Liquid Chromatography - An updated review*, Res. J. Pharm. Technol., (2022), <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2022.00987>.
- [66] W. Yang, J.C. Schoeman, X. Di, L. Lamont, A.C. Harms, T. Hankemeier, *A comprehensive UHPLC-MS/MS method for metabolomics profiling of signaling lipids: Markers of oxidative stress, immunity and inflammation*, Anal. Chim. Acta, (2024), 1297:342348, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.342348>.
- [67] Y. Ling, M. Tan, X. Wang, Z. Meng, X. Quan, H. Ramaswamy, C. Wang, *Simultaneous determination of one-carbon folate metabolites and one-carbon-related amino acids in biological samples using a UHPLC-MS/MS method.*, Int. J. Mol. Sci., (2024), 25:3458, <https://doi.org/10.3390/ijms25063458>.
- [68] Y. Shen, S. Adhikari, G. Carr, C. Foti, A. R. Pereira, *Unraveling the bridging region of Lenacapavir atropisomers by two-dimensional liquid chromatography*, J. Pharm. Biomed. Anal., (2025), 267:117-129, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2025.117129>.
- [69] H. Fuchino, *Research on the quality evaluation of crude drugs*, J. Nat. Med., (2025), 79:15–27, <https://doi.org/10.1007/s11418-024-01845-8>.
- [70] I.K. Shaikhutdinov, T.K. Ryazanova, L.V. Limareva, A.V. Sokolov, *Application of metal-organic frameworks to High-Performance Liquid Chromatography*, J. Anal. Chem., (2023), 78:1–17, <https://doi.org/10.1134/S1061934823010100>.
- [71] X. Zhao, Ch. Zhao, R. Wu, J. Jin, X. Liu, Z. Zhang, S. Yang, K. Li, Z. Li, X. Qin, *Synthesis and chromatographic evaluating of the core-shell SiO₂ with tunable shell thickness and application for separation of Traditional Chinese Medicine oligosaccharides*, J. Chromatogr. A, (2025), 1748:465864, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.465864>.
- [72] M. Mabrouk, S.F. Hammad, A.A. Abdella, F.R. Mansour, *A novel enantioselective Chitosan-Based stationary phase prepared by molecular imprinting of a racemic template*, Chromatographia, (2024), 87:471–478, <https://doi.org/10.1007/s10337-024-04345-9>.
- [73] J.M. Juárez, J.F. Téllez, M.Á.L. Bercero, E.L. Moyano. M.B. Gómez Costa, *Synthesis of MCM-41 and SBA-15 from rice husk silica and their carbon replicas for hydrogen adsorption*, J. Chem. Technol. Biotechnol., (2025), 100:1609-1617, <https://doi.org/10.1002/jctb.7891>.
- [74] A. Radoičić, S. Šegan, A. Dramićanin, D. Milojković-Opsenica, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography for the analysis of pharmaceutical formulations*, Curr. Anal. Chem., (2024), <http://dx.doi.org/10.2174/0115734110290557240305045032>.

- [75] Y. Guo, D. Muscatiello, *An update on the progress in fundamental understanding of hydrophilic interaction liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, (2026), 1765:466520, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466520>.
- [76] B. Buszewski, S. Noga, *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) — a powerful separation technique*, Anal. Bioanal. Chem., (2012), 402:231–247, <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>.
- [77] A.E. Karatapanis, Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, *A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds*, J. Chromatogr. A, (2011), 1218(20):2871–2879, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.069>.
- [78] P. Jandera, *Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review*, Anal. Chim. Acta, (2011), 692:1–25, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047>.
- [79] C.M.K. Stienstra, E. Nazdrajić, W.S. Hopkins, *From reverse phase chromatography to HILIC: Graph transformers power method-independent machine learning of retention times*, Anal. Chem., (2025), 97:4461–4472, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c05859>.
- [80] H. Alkeifi, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) as a powerful tool for the determination of antiepileptic drugs: A critical review*, Biomed. Chromatogr. (2026), 40(5):70427, <https://doi.org/10.1002/bmc.70427>.
- [81] G. Greco, T. Letzel, *Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations*, J. Chromatogr. Sci., (2013), 51(7):684–93, <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt015>.
- [82] Y. Guo, *Recent progress in the fundamental understanding of hydrophilic interaction chromatography (HILIC)*, Analyst, (2015), 140:6452–6466, <https://doi.org/10.1039/C5AN00670H>.
- [83] B. Chauve, D. Guillarme, P. Cle'on, J.L. Veuthey, *Evaluation of various HILIC materials for the fast separation of polar compounds*, J. Sep. Sci., (2010), 33:752–764, <https://doi.org/10.1002/jssc.200900749>.
- [84] F. Hosseinkhani, L. Huang, T. Hankemeier, A.C. Dubbelman, F. Guled, A.C. Harms, T. Hankemeier, *Systematic evaluation of HILIC stationary phases for global metabolomics of human plasma*, Metabolites, (2022), 12:165, <https://doi.org/10.3390/metabo12020165>.
- [85] Y. Guo, N. Bhalodia, B. Fattal, I. Serris, *Evaluating the adsorbed water layer on polar stationary phases for Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)*, Separations, (2019), 6:19, <https://doi.org/10.3390/separations6020019>.

- [86] A. Abbood, *Role of HILIC stationary phases in pharmaceutical peptide analysis*, Inter. J. Adv. Pharm. Sci. Res., (2025), 5(4), <https://doi.org/10.54105/ijapsr.C4074.05040625>.
- [87] P. Jandera, *Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation in to multidimensional chromatography concepts*, J. Sep. Sci., (2008), 31:1421–1437, <https://doi.org/10.1002/jssc.200800051>.
- [88] S.J. Rathod, S.V. Luhar, S.B. Narkhede, *A brief review on Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)*, Inter. J. Pharm. Res., (2019), 11(4):882–888, <https://doi.org/10.31838/ijpr/2019.11.04.020>.
- [89] A. Teleki, R. Takors, *Quantitative profiling of endogenous metabolites using hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS)*, Methods Mol. Biol., (2019), 1859:185–207, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8757-3_10.
- [90] P. Jandera, P. Janas, *Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review*, Anal. Chim. Acta, (2017), 967:12–32, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.060>.
- [91] Y. Guo, *A survey of polar stationary phases for hydrophilic interaction chromatography and recent progress in understanding retention and selectivity*, Biomed. Chromatogr., (2022), 36:5332, <https://doi.org/10.1002/bmc.5332>.
- [92] S. Liu, H. Xu, J. Yu, L. Danyang, L. Mingyan, Q. Xiaoqiang, Q. Xinying, Y. Hongyuan, *Novel imidazolium-embedded N,N-dimethylaminopropyl-functionalized silica-based stationary phase for hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode chromatography*, Anal. Bioanal. Chem., (2015), 407:8989–8997, <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9064-9>.
- [93] M.A. Guarducci, A. Fochetti, A. Ciogli, G.A. Mazzocanti, *Compendium of the principal stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography: Where have we arrived?*, Separations, (2023), 10(1):22, <https://doi.org/10.3390/separations10010022>.
- [94] D. Sýkora, P. Řezanka, K. Záruba, V. Král, *Recent advances in mixed-mode chromatographic stationary phases*, J. Sep. Sci., (2019), 42:89–129, <https://doi.org/10.1002/jssc.201801048>.
- [95] D.V. McCalley, *Understanding and manipulating the separation in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, J. Chromatogr. A, (2017), 1523, 49–71, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.026>.
- [96] Z. Li, S. Li, F. Zhang, H. Geng, B. Yang, *A hydrolytically stable amide polar stationary phase for hydrophilic interaction chromatography*, Talanta, (2021), 231:122340, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122340>.

- [97] X. Zhao, H. Zhang, X. Zhou, L. Wang, L. Wan, R. Wu, *One-pot hydrothermal cross-linking preparation of Poly(Vinylpyrrolidone) immobilized silica stationary phase for Hydrophilic Interaction Chromatography*, J. Chromatogr. A, (2020), 1633:461656, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461656>.
- [98] J. Gao, G. Luo, Z. Li, H. Li, L. Zhao, H. Qiu, *A new strategy for the preparation of mixed-mode chromatographic stationary phases based on modified dialdehyde cellulose*, J. Chromatogr. A, (2020), 1618:460885, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460885>.
- [99] Y. Hu, T. Cai, H. Zhang, J. Chen, Z. Li, H. Qiu, *Poly(itaconic acid)-grafted silica stationary phase prepared in deep eutectic solvents and its unique performance in Hydrophilic Interaction Chromatography*, Talanta, (2019), 191:265–271, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.072>.
- [100] Y. Peng, F. Zhang, X. Pan, Y. Hou, B. Yang, *Poly(vinyl alcohol) – cationic cellulose copolymer encapsulated SiO₂ stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography*, RSC Adv., (2017), 7:21336-21341, <https://doi.org/10.1039/C7RA01958K>.
- [101] A. Ciogli, F. Buonsenso, N. Proietti, G. Mazzocanti, S. Manetto, A. Calcaterra, M. De Angelis, F. Gasparrini, *Preparation of a high-density vinyl silica gel to anchor cysteine via photo-click reaction and its applications in Hydrophilic Interaction Chromatography*, J. Chromatogr. A, (2022), 1675:463173, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463173>.
- [102] P. Zhang, Y. Hu, K. Liu, Y. Sun, L. He, W. Zhao, *Hydrophilic interaction chromatographic evaluation of zwitterionic polymer grafted silica gel via multiple binding sites*, J Sep Sci., (2024), 47:2400065, <https://doi.org/10.1002/jssc.202400065>.
- [103] K.K. Unger, A.I. Liapis, *Adsorbents and columns in analytical high-performance liquid chromatography: A perspective with regard to development and understanding*, J. Sep. Science, (2012), 35:1201-1212, <https://doi.org/10.1002/jssc.201200042>.
- [104] W. J. Cheong, *Porous silica particles as chromatographic separation media: A review*, Bull. Korean Chem. Soc., (2014), 35(12):3465–3474, <https://doi.org/10.5012/bkcs.2014.35.12.3465>.
- [105] J. Otis, J. Hofmann, T. Schmidt, C. Buttersack, R. Gläser, *Hydrophilic interaction liquid chromatography with methanol-water eluent on a zeolite*, Anal. Chim. Acta, (2023), 1267:341323, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341323>.
- [106] D. Khan, Shaily, *Synthesis and catalytic applications of organo-functionalized MCM-41 catalyst: A review*, Appl. Organomet. Chem., (2023), 37:7007, <https://doi.org/10.1002/aoc.7007>.

- [107] P. Yang, S. Gaib, Jun Lin, *Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery*, Chem. Soc. Rev., (2012), 41:3679-3698, <https://doi.org/10.1039/C2CS15308D>.
- [108] A. Guirguis, J.W. Maina, X. Zhang, L.C. Henderson, L. Kong, H. Shonk, L.F. Dumée, *Applications of nano-porous graphene materials – critical review on performance and challenges*, Mater. Horiz., (2020), 7:1218-1245, <https://doi.org/10.1039/C9MH01570A>.
- [109] S. Bhattacharyya, G. Lelong, M.L. Saboungi, *Recent progress in the synthesis and selected applications of MCM-41: a short review*, J. Exp. Nanosci., (2006), 1(3):375-395, <https://doi.org/10.1080/17458080600812757>.
- [110] T. Yasmin, K. Müller, *Synthesis and surface modification of mesoporous MCM-41 silica materials*, J. Chromatogr. A, (2010), 1217(20):3362-74, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.03.005>.
- [111] S. Pasricha, H. Kaur, P. Gahlot, S. Rai, *Functionalized MCM-41: Versatile catalysts for organic transformations*, Chemi. Select, (2022), 7:202103674, <https://doi.org/10.1002/slct.202103674>.
- [112] J.H. Clark, D. J. Macquarrie, *Catalysis of liquid phase organic reactions using chemically modified mesoporous inorganic solids*, Chem. Commun., (1998), 8:853-860, <https://doi.org/10.1039/A709143E>.
- [113] V. Candela-Nogueraa, M. Alfonsoa, P. Amoros, E. Aznara, M. Dolores Marcos, R. Martínez-Manez, *In-depth study of factors affecting the formation of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles*, Microporous and Mesoporous Mater., (2024), 363:112840, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2023.112840>.
- [114] M. Vallet-Regi, A. Ramila, R. P. del Real, J. Perez-Pariente, *A new property of MCM-41: Drug delivery system*, Chem. Mater., (2001), 13:308-311, <https://doi.org/10.1021/cm0011559>.
- [115] K. Kleestorfer, H. Vinek, A. Jentys, *Structure simulation of MCM-41 type materials*, J. Mol. Catal. A Chem., (2001), 166:53–57, [https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(00\)00463-5](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(00)00463-5).
- [116] T. Custodio dos Santos, S. Bourrelly, P. L. Llewellyn, J. Walkimar de M. Carneiro, C. Machado Ronconi, *Adsorption of CO₂ on amine-functionalised MCM-41: experimental and theoretical studies*, Phys.Chem., (2015), 17:11095, <https://doi.org/10.1039/C5CP00581G>.
- [117] M. Asadi, S. A. Molkabadi, S. Engameh, *The amine-functionalized MCM-41 for hydration and utilization of CO₂*, Pollution, (2024), 10(1):374-382, <https://doi.org/10.22059/POLL.2023.362270.1992>.

- [118] M.R. Mello, D. Phanon, G.Q. Silveira, P.L. Llewellyn, C.M. Ronconi, *Amine-modified MCM-41 mesoporous silica for carbon dioxide capture*, *Microporous Mesoporous Mater.*, (2011), 143(1):174-179, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2011.02.022>.
- [119] A. Steinhoff, A. Hölzel, U. Tallarek, *Mobile-phase contributions to analyte retention and selectivity in Reversed-Phase Liquid Chromatography: I. General Effects*, *J. Phys. Chem. B*, (2025), 129(25):6385–6400, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5c01695>.
- [120] C. F. Poole, S. N. Atapattu, *Study of system properties in reversed-phase liquid chromatography for binary and ternary solvent mobile phase compositions using the solvation parameter model*, *J. Chromatography Op.*, (2022), 2:100039, <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2022.100039>.
- [121] P. Hemström, K. Irgum, *Hydrophilic interaction chromatography*, *J. Sep. Science*, (2006), 29:1784-1821, <https://doi.org/10.1002/jssc.200600199>.
- [122] A. Khrisanfova, M. Smagina, G. Maksimov, G. Tsizin, O. Shpigun, A. Chernobrovkina, *Evaluating independent effect of mobile phase components on retention mechanism of ionizable analytes in hydrophilic interaction liquid chromatography*, *J. Chromatogr. A*, (2025), 1758:466201, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466201>.
- [123] H. Lardeux, V. D'Atri, D. Guillarme, *Recent advances and current challenges in hydrophilic interaction chromatography for the analysis of therapeutic oligonucleotides*, *Trends in Anal. Chem.*, (2024), 176:117758, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117758>.
- [124] H. Lardeux, K. Stavenhagen, C. Paris, R. Dueholm, C. Kurek, L. De Maria, F. Gnerlich, T. Leek, W. Czechtizky, D. Guillarme, M. Jora, *Unravelling the link between oligonucleotide structure and diastereomer separation in Hydrophilic Interaction Chromatography*, *Anal. Chem.*, (2024), 96(24):9994–10002, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c01384>.
- [125] K.J. Fountain, J. Xu, D.M. Diehl, D. Morrison, *Influence of stationary phase chemistry and mobile-phase composition on retention, selectivity, and MS response in hydrophilic interaction chromatography*, *J. Sep. Sci.*, (2010), 33(6-7):740-751, <https://doi.org/10.1002/jssc.200900660>.
- [126] Z. Hao, B. Xiao, N. Weng, *Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC)*, *J. Sep. Sci.*, (2008), 31(9):1449-1464, <https://doi.org/10.1002/jssc.200700624>.

- [127] P. Jandera, T. Hájek, *Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction – reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review*, J. Sep. Sci., (2018), 41:145–162, <https://doi.org/10.1002/jssc.201701010>.
- [128] F. Gritti, A. Höltzel, U. Tallarek, G. Guiochon, *The relative importance of the adsorption and partitioning mechanisms in hydrophilic interaction liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, (2015), 1376:112-125, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.087>.
- [129] Y. Guo, D. Baran, L. Ryan, *Quantitative assessment of retention mechanisms for ionized compounds in Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)*, Anal. Chem., (2025), 97:4057–4065, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c05880>.
- [130] M. Ntorkou, C.K. Zacharis, *Applications of hydrophilic interaction chromatography in pharmaceutical impurity profiling: A comprehensive review of two decades*, Molecules, (2025), 30:3567, <https://doi.org/10.3390/molecules30173567>.
- [131] X. Liang, A. Shen, Z. Guo, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, Anal. Sep. Sci., (2015) 1:63-85, <https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep004>.
- [132] C. F. Poole, *Influence of solvent effects on retention of small molecules in Reversed-Phase Liquid Chromatography*, Chromatographia, (2019), 82:49–64, <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3531-3>.
- [133] Y. Guo, D. Baran, *Hydrophilic partitioning or surface adsorption? A quantitative assessment of retention mechanisms for Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)*, Molecules, (2023), 28:6459, <https://doi.org/10.3390/molecules28186459>.
- [134] Y. Guo, B. Fattal, *Relative significance of hydrophilic partitioning and surface adsorption to the retention of polar compounds in hydrophilic interaction chromatography*, Anal. Chim. Acta, (2021), 1184:339025, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339025>.
- [135] L. Redón, X. Subirats, M. Rosés, *Volume and composition of semi-adsorbed stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography. Comparison of water adsorption in common stationary phases and eluents*, J. Chromatogr. A, (2021), 1656:462543, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462543>.
- [136] S.M. Melnikov, A. Höltzel, A. Seidel-Morgenstern, U. Tallarek, *Composition, structure, and mobility of water–acetonitrile mixtures in a silica nanopore studied by molecular dynamics simulations*, Anal. Chem., (2011), 83(7):2569–2575, <https://doi.org/10.1021/ac102847m>.

- [137] F. Gritti, *Retention mechanism in hydrophilic interaction liquid chromatography new insights revealed from the combination of chromatographic and molecular dynamics data*, J. Chromatogr. Sep. Tech., (2015), 6(7):1000309, <https://doi.org/10.4172/2157-7064.1000309>.
- [138] D. Kleiner, D. Muscatiello, Z. Gutierrez, V. Asare, Y. Guo, *Quantitative assessment of retention mechanisms of nucleosides on a bare silica stationary phase in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)*, Analytica, (2025), 6:39, <https://doi.org/10.3390/analytica6040039>.
- [139] H. Song, G. Desmet, D. Cabooter, *Evaluation of the kinetic performance differences between Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography and Reversed-Phase Liquid Chromatography under conditions of identical packing structure*, Anal. Chem., (2015), 87:12331–12339, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03697>.
- [140] E. Peris-García, M.J. Ruiz-Angel, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, *Comparison of the fitting performance of retention models and elution strength behaviour in hydrophilic-interaction and Reversed-Phase Liquid Chromatography*, Separations, (2021), 8(4):54, <https://doi.org/10.3390/separations8040054>.
- [141] P. Jandera, T. Hájek, Z. Šromová, *Mobile phase effects in reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography revisited*, J. Chromatogr. A, (2018) 1543:48-57, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.02.043>.
- [142] J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, *Extension of the linear solvent strength retention model including a parameter that describes the elution strength changes in liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, (2020), 1615:460757, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460757>.
- [143] E. Tyteca, A. Périat, S. Rudaz, G. Desmet, D. Guilleme, *Retention modeling and method development in hydrophilic interaction chromatography*, J. Chromatogr. A, (2014), 1337:116-127, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.032>.
- [144] E. Bacalum, M. Tanase, M. Cheregi, H.Y. Aboul-Enein, V. David, *Retention mechanism in zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography (ZIC-HILIC) studied for highly polar compounds under different elution conditions*, Rev. Roum. Chim., (2016), 61(6-7):531-539.
- [145] J. Kamińska, W. Zapała, *Influence of modifier concentration on retention in hydrophilic interaction chromatography - preliminary investigations*, Inż. Ap. Chem., (2015), 54(1):4-7.
- [146] M. Grčman, C. Podlipnik, M. Pompe, D. Kocar, *Molecular and thermodynamic insights into the enthalpy-entropy shift governing HILIC retention of labelled dextrans*, Molecules, (2025), 30:4711, <https://doi.org/10.3390/molecules30244711>.

- [147] L.D. Asnin, M.V. Stepanova, *Van't Hoff analysis in chiral chromatography*, J. Sep. Sci., (2018), 41(6):1319-1337, <https://doi.org/10.1002/jssc.201701264>.
- [148] S. Han, H. Yu, Y. Pei, Y. Chi, *Selectivity-column temperature relationship as a new strategy in predicting separation of structural analogues in HPLC by using different stationary phases*, RSC Adv., (2015), 5:62686-62696, <https://doi.org/10.1039/C5RA09524G>.
- [149] R. Lech-Przywara, W. Zapala, *Analysis of selected factors influencing the course of the process in liquid chromatography*, Adv. Sci. Technol. Res. J., 2025, 19(6):1–16, <https://doi.org/10.12913/22998624/202507>.
- [150] J. Kamińska, M. Chutkowski, L. Zapala, W. Zapala, *Studies on the sorption behavior of quercetin, phenol, and caffeine as test substances on diol mixed-mode HILIC column*, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., (2016), 39(3):161–170, <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2016.1141364>.
- [151] W. Zapala, P. Ziobrowski, L. Zapala, M. Chutkowski, *Influence of mobile phase composition and temperature on the retention behavior of selected test substances in diol-type column*, Sustainable Chem. Eng., (2020), 1(2):73, <https://doi.org/10.37256/sce.122020320.72-81>.
- [152] P. Ziobrowski, M. Chutkowski, L. Zapala, W. Zapala, *Retention behavior of selected test compounds using column filled with silica gel modified by amine groups*, Camera Separatoria, (2018), 10(2):43-51.
- [153] M. Tanase, A. Soare, V. David, S. C. Moldoveanu, *Sources of nonlinear van't Hoff temperature dependence in High-Performance Liquid Chromatography*, ACS Omega, (2019), 4(22):19808–19817, <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02689>.
- [154] C. Matsushita, K. Tsukagoshi, K. Tsuchiya, K. Yamashita, M. Murata, *Investigation of the separation efficiency of tube radial distribution chromatography with stationary outer phase using the van Deemter equation*, Chromatographia, (2020), 83:287–292, <https://doi.org/10.1007/s10337-019-03837-3>.
- [155] A. Gorja, P. Medala, M. Madhavi, G. Meghana, *A review on Ultra Performance Liquid Chromatography*, Saudi J. Med. Pharm. Sci., (2025), 11(4):279-286, <https://doi.org/10.36348/sjmps.2025.v11i04.007>.
- [156] K. Broeckhoven, G. Desmet, *Methods to determine the kinetic performance limit of contemporary chromatographic techniques*, J. Sep. Sci., (2021), 44:323–339, <https://doi.org/10.1002/jssc.202000779>.

- [157] K. Miyabe, *Development of analytical functions with high-performance liquid phase separation systems on the basis of the moment theory*, Anal. Sci., (2025), 41:1269–1287, <https://doi.org/10.1007/s44211-025-00821-w>.
- [158] K. Miyabe, *Simplification of moment analysis procedure for kinetic study of chromatographic behavior of core-shell particles*, Anal. Sci., (2021), 37:1553–1557, <https://doi.org/10.2116/analsci.21P094>.
- [159] Z. Guo, J. Pang, Z. Liu, *On the journey exploring nanoscale packing materials for ultra-efficient liquid chromatographic separation*, J. Chromatogr. Op., (2022), 2:100033, <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2022.100033>.
- [160] K. Miyabe, Y. Murata, *Moment analysis of chromatographic behavior of separation media for fast HPLC*, Anal. Sci., (2014), 30:277–283, <https://doi.org/10.2116/analsci.30.277>.
- [161] R.A. Alfaty, A.S. Rasheed, *Effect of superficially porous particles on chromatographic analysis time of flavonoids*, IHJPAS, (2025), 38(2), <https://doi.org/10.30526/38.2.3639>.
- [162] C. Luo, J.J. DeStefano, T.J. Langlois, B.E. Boyes, S.A. Schuster, J.M. Godinho, *Fundamental to achieving fast separations with high efficiency: A review of chromatography with superficially porous particles*, Biomed. Chromatogr., (2021), 35:5087, <https://doi.org/10.1002/bmc.5087>.
- [163] R. Lech-Przywara, T. Galek, M. Przywara, L. Zapala, W. Zapala, *Structural and surface characterization of adsorbents applied in liquid chromatography*, Adv. Sci. Technol. Res. J., (2025), 19(9):292–309, <https://doi.org/10.12913/22998624/207426>.
- [164] L.C. Sander, S.A. Wise, *Influence of stationary phase chemistry on shape recognition in liquid chromatography*, Anal. Chem., (1995), 67(18):3284–3292, <https://doi.org/10.1021/ac00114a027>.
- [165] H. Rusli, R.M. Putri, A. Alni, *Recent developments of liquid chromatography stationary phases for compound separation: from proteins to small organic compounds*, Molecules, (2022), 27:907, <https://doi.org/10.3390/molecules27030907>.
- [166] J. Valášek, L. Hekerle, M. Nechvátalová, A. Bednařík, J. Preisler, J. Urban, *Effect of stationary phase surface chemistry and particle architecture in proteomics*, J. Chromatogr. A, (2025), 1752:465976, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.465976>.
- [167] F. Gritti, *The role of particle size distribution on permeability and efficiency of slurry-packed liquid chromatography columns*, J. Chromatogr. A, (2026), 1771:466729, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2026.466729>.

- [168] K. Horváth, D. Lukács, A. Sepsey, A. Felinger, *Effect of particle size distribution on the separation efficiency in liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, (2014), 1361:203-208, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.017>.
- [169] A. Valverde, A. Cabrera-Codony, M. Calvo-Schwarzwalder, T. Myers, *Investigating the impact of adsorbent particle size on column adsorption kinetics through a mathematical model*, Int. J. Heat Mass Transfer, (2024), 218:124724, <https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2023.124724>.
- [170] I. Bacskey, A. Sepsey, A. Felinger, *Determination of the pore size distribution of high-performance liquid chromatography stationary phases via inverse size exclusion chromatography*, J. Chromatogr. A, (2014), 1339:110-117, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.085>.
- [171] K. Kaczmarek, J. Ch. Bellot, *Effect of particle-size distribution and particle porosity changes on mass-transfer kinetics*, Acta Chromatographica, (2003), 13.
- [172] T. Katayama, T. Iharada, Y. Obata, H. Sakamaki, K. Tsukagosh, *Effects of porous structure of separation column on chromatograms obtained by phase-separation mode in HPLC*, Chromatographia, (2025), 88:215–224, <https://doi.org/10.1007/s10337-025-04392-w>.
- [173] A. Giaquinto, Z. Liu, A. Bach, Y. Kazakevich, *Surface area of reversed-phase HPLC columns*, Anal. Chem., (2008), 80(16):6358–6364, <https://doi.org/10.1021/ac800772s>.
- [174] B. Lumley, T. Khong, D. Perrett, *The characterisation of chemically bonded chromatographic stationary phases by thermogravimetry*, Chromatographia, (2004), 60:59–62, <https://doi.org/10.1365/s10337-004-0329-2>.
- [175] M.R. Schilling, F. Preusser, G. Gutnikov, *Analysis of high-performance liquid chromatography bonded stationary phases using thermogravimetry*, J. Therm. Anal., (1992), 38:2483–2490, <https://doi.org/10.1007/BF01974626>.
- [176] T. Cecil, J. Bautista, M. M. Collinson, S. C. Rutan, *Preparation and characterization of stationary phase gradients on C8 liquid chromatography columns*, J. Chromatogr. A, (2024), 1727:464974, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464974>.
- [177] M. Martin, G. Guiochon, *Effects of high pressure in liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, (2005), 1090(1–2):16-38, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.005>.
- [178] M. Lämmerhofer, *Trends in stationary phases and column technologies*, J. Sep. Sci., (2025), 48(7):70215, <https://doi.org/10.1002/jssc.70215>.
- [179] J.C. Steinbach, F. Fait, H.A. Mayer, A. Kandelbaue, *Sol–gel-controlled size and morphology of mesoporous silica microspheres using hard templates*, ACS Omega, (2023), 8(33):30273–30284, <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03098>.

- [180] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, *Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, (2014), 1357:36-52, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.010>.
- [181] Y. Liu, K. Sun, C. Shao, X. Shi, J. Zeng, R. Guo, B. Zhang, *Performance of nano flow liquid chromatography using core-shell particles: A comparison study*, J. Chromatogr. A, (2021), 1648:462218, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462218>.
- [182] M.T. Nazari, C. Schnorr, C.V.T. Rigueto, I. Alessandretti, F. Melara, N.F. da Silva, L. Crestani, V. Ferrari, J. Vieillard, G.L. Dotto, J.S. Piccin, *A review of the main methods for composite adsorbents characterization*, Environm. Sci. Pol. Res., (2022), 29:88488–88506, <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23883-z>.
- [183] W. Zhou, R. Apkarian, Z.L. Wang, D. Joy, *Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM)*. In: Zhou W, Wang ZL (EDS) *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*, Springer, (2006), 1–40, https://doi.org/10.1007/978-0-387-39620-0_1.
- [184] D.E. Newbury, N.W.M. Ritchie, *Is Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-ray Spectrometry (SEM/EDS) Quantitative?*, Scanning, (2013), 35:141-168, <https://doi.org/10.1002/sca.21041>.
- [185] M.F. Al-Hakkani, *Guideline of inductively coupled plasma mass spectrometry “ICP–MS”: fundamentals, practices, determination of the limits, quality control, and method validation parameters*, SN Appl. Sci., (2019), 1:791, <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0825-5>.
- [186] G.K. Zoorob, J.W. McKiernan, J.A. Caruso, *ICP-MS for elemental speciation studies*, Mikrochim Acta, (1998), 128:145–168, <https://doi.org/10.1007/BF01243044>.
- [187] G. Carta, A. Ubiera, *Particle-size distribution effects in batch adsorption*, Aiche Journal, (2003), 49:3066-3073, <https://doi.org/10.1002/aic.690491208>.
- [188] Z. Zhang, Y. Shu, *Simulation of fixed-bed adsorption process considering particle size distribution*, Chin. J. Chem. Eng., (2024), 74:175-189, <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2024.06.016>.
- [189] G. Guiochon, T. Farkas, H. Guan-Sajonz, J-H Koh, M. Sarker, B. J. Stanley, T. Yun, *Consolidation of particle beds and packing of chromatographic columns*, J. Chromatogr. A, (1997), 762(1–2):83-88, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00642-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00642-5).

- [190] J. Billen, D. Guillarme, S. Rudaz, J.L. Veuthey, H. Ritchie, B. Grady, G. Desmet, *Relation between the particle size distribution and the kinetic performance of packed columns: Application to a commercial sub-2 μm particle material*, J. Chromatogr. A, (2007), 1161(1–2):224-233, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.088>.
- [191] K. Kaczmarski, M. Przywara, E. Lorenc-Grabowska, *Advanced modelling of adsorption process on activated carbon*, Chem. Eng. Res. Des., (2022), 181:27-40, <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2022.03.004>.
- [192] H. Li, J. Li, J. Bodycomb, G.S. Patience, *Experimental methods in chemical engineering: Particle Size Distribution by Laser Diffraction — PSD*, The Canadian J. Chem. Eng., (2019), 97(7):1974-1981, <https://doi.org/10.1002/cjce.23480>.
- [193] Y. Pei, B.A. Hinchliffe, C. Minelli, *Measurement of the size distribution of multimodal colloidal systems by Laser Diffraction*, ASC Omega, (2021), 6:14049-14058, <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00411>?
- [194] J. Stetefeld, S.A. McKenna, T.R. Patel, *Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences*, Biophys Rev., (2016), 8:409–427, <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- [195] P.A. Hassan, S. Rana, G. Verma, *Making sense of brownian motion: colloid characterization by Dynamic Light Scattering*, Langmuir, (2015), 31(1):3–12, <https://doi.org/10.1021/la501789z>.
- [196] A.K. Kuril, S. Elumalai, *Foundational approaches in Dynamic Light Scattering protocols for precise nanoparticle characterization*, Chemistry Select, (2025), 10:03698, <https://doi.org/10.1002/slct.202503698>?
- [197] O. Glatter, *Dynamic Light Scattering*, J. Colloid Interface Sci., (2018), 11:223-263, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813580-8.00011-0>.
- [198] J.F. Langford, M.R. Schure, Y. Yao, S.F. Maloney, A.M. Lenhoff, *Effects of pore structure and molecular size on diffusion in chromatographic adsorbents*, J. Chromatogr. A, (2006), 1126(1–2):95-106, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.06.060>.
- [199] W. Liu, Y. Zhang, S. Wang, L. Bai, Y. Deng, J. Tao, *Effect of pore size distribution and amination on adsorption capacities of polymeric adsorbents*, Molecules, (2021), 26:5267, <https://doi.org/10.3390/molecules26175267>.
- [200] J.M. Godinho, J.A. Naese, A.E. Toler, B.E. Boyes, R.A. Henry, J.J. DeStefano, J.P. Grinias, *Importance of particle pore size in determining retention and selectivity in reversed phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, (2020), 1634:461678, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461678>.

- [201] R. Bardestani, G.S. Patience, S. Kaliaguine, *Experimental methods in chemical engineering: specific surface area and pore size distribution measurements — BET, BJH, and DFT*, Can. J. Chem. Eng., (2019), 97:2781–2791, <https://doi.org/10.1002/cjce.23632>.
- [202] J. Villarroel-Rocha, D. Barrera, K. Sapag, *Introducing a self-consistent test and the corresponding modification in the Barrett, Joyner and Halenda method for pore-size determination*, Microporous Mesoporous Mater., (2014), 200:68-78, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2014.08.017>.
- [203] J. Landers, G.Y. Gor, A.V. Neimark, *Density functional theory methods for characterization of porous materials*, Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp., (2013), 437:3-32, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.01.007>.
- [204] J. Choma, M. Jaroniec, W. Burakiewicz-Mortka, M. Kloske, *Critical appraisal of classical methods for determination of mesopore size distributions of MCM-41 materials*, Appl. Surf. Sci., (2002), 196(1–4):216-223, [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(02\)00060-0](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(02)00060-0).
- [205] P. Kowalczyk, A.P. Terzyk, P.A. Gauden, L. Solarz, *Numerical analysis of Horvath–Kawazoe equation*, Comput. Chem., (2002), 26(2):125-130, [https://doi.org/10.1016/S0097-8485\(01\)00088-2](https://doi.org/10.1016/S0097-8485(01)00088-2).
- [206] F. Haghighatju, H.H. Rafsanjani, F. Esmaeilzadeh, *Estimation of the dimension of micropores and mesopores in single walled carbon nanotubes using the method Horvath–Kawazoe, Saito and Foley and BJH equations*, Micro. Nano. Lett., (2017), 12(1):1–5, <https://doi.org/10.1049/mnl.2016.0306>.
- [207] G. Horvat, M. Pantić, Ž. Knez, Z. Novak, *A brief evaluation of pore structure determination for bioaerogels*, Gels, (2022), 8:438, <https://doi.org/10.3390/gels8070438>.
- [208] K.O. Iwuozor, J.O. Ighalo, E.C. Emenike, C.A. Igwegbe, A.G. Adeniyi, *Do adsorbent pore size and specific surface area affect the kinetics of methyl orange aqueous phase adsorption?*, J. Chem. Lett., (2021), 2:188-198, <https://doi.org/10.22034/jchemlett.2022.327407.1048>.
- [209] F.S. Irwansyah, A.I. Amal, E.W. Diyanthi, E.P. Hadisantoso, A.R. Noviyanti, D.R. Eddy, R. Risdiana, *How to read and determine the specific surface area of inorganic materials using the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method.*, J. Sci. Eng., (2024), 4(1):61-70, <http://dx.doi.org/10.2017509/xxxx.xxxx>.
- [210] F. Ambroz, T.J. Macdonald, V. Martis, I.P. Parkin, *Evaluation of the BET theory for the characterization of meso and microporous MOFs*, Small Methods, (2018), 2:1800173, <https://doi.org/10.1002/smt.201800173>.

- [211] M. Thommes, K. Kaneko, A.V. Neimark, J. P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K.S.W. Sing, *Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report)*, Pure Appl. Chem., (2015), 87(9-10):1051–1069, <https://doi.org/10.1515/pac-2014-1117>.
- [212] H. Qiu, X. Liang, M. Sun, S. Ijang, *Development of silica-based stationary phases for high-performance liquid chromatography*, Anal Bioanal. Chem., (2011), 399:3307–3322, <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4611-x>.
- [213] F. Gritti, N. Trebel, A. Höltzel, U. Tallarek, *Prediction of surface excess adsorption and retention factors in reversed-phase liquid chromatography from molecular dynamics simulations*, J. Chromatogr. A, (2022), 1685:463627, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463627>.
- [214] Y. Wang, W. Pang, Z. Jin, *Effect of energetical and geometrical heterogeneity of kerogen on bet surface area characterization and methane adsorption*, Energy Fuels, (2022), 36:7569–7580, <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.2c01603>.
- [215] J. Villarroel-Rocha, D. Barrera, J.J. Arroyo-Gómez, K. Sapag, *Insights of adsorption isotherms with different gases at 77 K and their use to assess the BET area of nanoporous silica materials*, Adsorption, (2021), 27:1081–1093, <https://doi.org/10.1007/s10450-021-00339-3>.
- [216] Y. Tian, J. Wu, *A comprehensive analysis of the BET area for nanoporous materials*, AIChE Journal, (2017), 64(1):286-293, <https://doi.org/10.1002/aic.15880>.
- [217] G. Singh, S.C. Aher, P.V.S. Varma, D.B. Sathe, R.B. Bhatt, *Analysis of BET specific surface area in several recycled oxide powders*, J. Radioanal. Nucl. Chem., (2021), 327:555–564, <https://doi.org/10.1007/s10967-020-07528-4>.
- [218] H. Cheng, Q. Wang, S. Zhang, *Effect of different experimental conditions on the specific surface area calculation of coal*, Coke Chem., (2015), 58:284–289, <https://doi.org/10.3103/S1068364X15080086>.
- [219] M. Dembek, S. Bocian, *Stationary phases for green liquid chromatography*, Materials, (2022), 15(2):419, <https://doi.org/10.3390/ma15020419>.
- [220] E. M. Borges, D. A. Volmer, *Silica, hybrid silica, hydride silica and non-silica stationary phases for liquid chromatography. Part II: Chemical and thermal stability*, J. Chromatogr. Sci., (2015), 53(7):1107-1122, <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu173>.

- [221] S.J. Marin, B.A. Jones, W.D. Felix, J. Clark, *Effect of high-temperature on high performance liquid chromatography column stability and performance under temperature programmed conditions*, J. Chromatogr. A, (2004), 1030(1–2):255-262, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.092>.
- [222] M. Wesołowski, E. Leyk, *Coupled and simultaneous thermal analysis techniques in the study of pharmaceuticals*, Pharmaceutics, (2023), 15(6):1596, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061596>.
- [223] A. El-Naggar, *Thermal analysis of the modified and unmodified silica gels to estimate their applicability as stationary phase in gas chromatography*, J. Emerg. Trends Eng. Appl. Sci., (2013), 4:144-148.
- [224] M. Tomassetti, G. Favero, L. Campanella, *Kinetic thermal analytical study of saturated mono-, di- and tri-glycerides*, J. Therm. Anal. Calorim., (2013), 112:519–527, <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2821-5>.
- [225] J. Paulik, F. Paulik, *Complex thermoanalytical method for the simultaneous recording of T, TG, DTG, DTA, TGT, DTGT, TD and DTD curves Part I. Development and characterization of equipment*, Thermochim. Acta, (1971), 3(1):13-15, [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(71\)85052-9](https://doi.org/10.1016/0040-6031(71)85052-9).
- [226] V. D’Atri, R.C. Barrientos, G.L. Losacco, S. Rudaz, A. Delobel, E.L. Regalado, D. Guillarme, *Trends in pharmaceutical analysis: the evolving role of liquid chromatography*, Anal. Chem., (2025), 97:4706–4727, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c06662>.
- [227] R. Ahmed, *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): principles, applications, versatility, efficiency, innovation and comparative analysis in modern analytical chemistry and in pharmaceutical sciences*, Clin. Invest. (Lond.), (2024), 14(9):524-535, ISSN 2041-6792.
- [228] R. Ade, *A Review on “Chromatography: A versatile tool in pharmaceutical analysis and allied industries”*, Int. J. Res. Appl. Sci. Eng. Technol., (2025), 13(1):333-340, <https://doi.org/10.22214/ijraset.2025.66266>.
- [229] M.A. Elnekaib, K.A.K. Musa, M.A. Almdaaf, *The role of High-Performance Liquid Chromatography in the pharmaceutical analysis*, Mediterr J. Pharm., (2025), 5(3):57-62, <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.16748956>.

- [230] G.L. Losacco, R. Bennett, I.A.H. Ahmad, R.C. Barrientos, J.O. DaSilva, Y. Dong, A.W. Schuppe, Z. Wang, S. Aiken, I. Mangion, V.K. Aggarwal, E.L. Regalado, *Dual-gradient unified chromatography: A new paradigm for versatility in simultaneous multicomponent analysis*, *Ang. Chem.*, (2022), 34(45):202208854, <https://doi.org/10.1002/ange.202208854>.
- [231] Y. Song, A. Kouta, L.M. Cera, K. Xia, F. Zhang, R. Kraemer, J. Fareed, R.J. Linhardt, W. Jeske, *Absolute pharmacokinetics of heparin in primates*, *Carbohydrate Polymers*, (2023), 311:120779, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120779>.
- [232] E. Urso, G. Mantione, F. Sala, E. A. Yates, M. Guerrini, A. Naggi, *Structural variation in the linkage region of pharmaceutical heparin arising from oxidative treatments during manufacture*, *Carbohydrate Research*, (2022), 514:108540, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108540>.
- [233] R. Lech-Przywara, M. Chutkowski, M. Przywara, W. Zapala, *Column testing in quantitative determination of raw heparin in porcine intestinal mucus extracts by liquid chromatography – preliminary investigations*, *Biomed. J. Sci. & Tech. Res.*, (2022), 45(3):36519-36522, <https://dx.doi.org/10.26717/BJSTR.2022.45.007209>.
- [234] Y. Ouyang, C. Wu, X. Sun, J. Liu, R.J. Linhardt, Z. Zhang, *Development of hydrophilic interaction chromatography with quadruple time-of-flight mass spectrometry for heparin and low molecular weight heparin disaccharide analysis*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (2016), 30:277–284, <https://doi.org/10.1002/rcm.7437>.
- [235] E. Uslenghi, T. Kandola, S. Nizzolo, E. Saunders, T.G. Jun, M.A. Skidmore, E.A. Yates, M. Guerrini, M.A. Lima, A. Bisio, *A circular economy strategy for repurposing heparin manufacturing by-products as anti-inflammatory therapeutics*, *Proteoglycan Research*, (2025), 3:70032, <https://doi.org/10.1002/pgr2.70032>.
- [236] A. Devlin, C. Mycroft-West, P. Procter, L. Cooper, S. Guimond, M. Lima, E. Yates, M. Skidmore, *Tools for the quality control of pharmaceutical heparin*, *Medicina*, (2019), 55:636, <http://dx.doi.org/10.3390/medicina55100636>.
- [237] S.N.M.C.G. Oliveira, F.F. Bezerra, M.S. Pereira, A.M.F. Tovar, R.S. Aquino, P.A.S. Mourão, *Global use of bovine heparin: challenges and opportunities*, *Proteoglycan Research*, (2025), 3:70025, <https://doi.org/10.1002/pgr2.70025>.
- [238] Y. Zheng, J. Yan, C. Cao, Y. Liu, X. Liang, *Application of chromatography in purification and structural analysis of natural polysaccharides: A review*, *J. Sep. Sci.*, (2023), 46:2300368, <https://doi.org/10.1002/jssc.202300368>.

- [239] S. Beni, J.F.K. Limtiaco, C.K. Larive, *Analysis and characterization of heparin impurities*, Anal. Bioanal. Chem., (2011), 399:527–539, <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4121-x>.
- [240] W.L. Chuang, H. McAllister, L. Rabenstein, *Chromatographic methods for product-profile analysis and isolation of oligosaccharides produced by heparinase-catalyzed depolymerization of heparin*, J. Chromatogr. A, (2001), 932(1-2):65-74, [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)01241-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)01241-9).
- [241] B. Yang, A. Weyers, J.Y. Baik, E. Sterner, S. Sharfstein, S.A. Mousa, F. Zhang, J.S. Dordick, R.J. Linhardt, *Ultra-performance ion-pairing liquid chromatography with on-line electrospray ion trap mass spectrometry for heparin disaccharide analysis*, Anal. Biochem, (2011), 415(1):59-66, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.04.003>.
- [242] S. Yang, Y. Ouyang, Z. Zhang, J. Cui, W. Wang, *State-of-the-art chromatographic and mass spectrometric techniques in heparin structural analysis*, J. Pharm. Biomed. Anal., (2025), 255:116625, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2024.116625>.
- [243] www.chemspider.com
- [244] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [245] <https://go.drugbank.com/drugs/DB04216>
- [246] META.MIR.PUR.Potassium-Uranyl-Fluoride.SLD.IBI.PNNL
- [247] K.A. Adepoju, O.I. Shittu, A.U. Chukwu , *On the development of an exponentiated F test for one-way ANOVA in the presence of outlier(s)*, Math. Stat., (2016), 4(2):62-69, DOI:10.13189/ms.2016.040203.
- [248] T.K. Kim, *Understanding one-way ANOVA using conceptual figures*, Korean J. Anesthesiol, (2017), 70(1):22-26, <https://doi.org/10.4097/kjae.2017.70.1.22>.
- [249] A.G. González, *Practical considerations on indirect calibration in analytical chemistry, Uncertainty Quantification and Model Calibration*. InTech; (2017), 197-215, <https://doi.org/10.5772/intechopen.68806>.
- [250] European Pharmacopoeia 10.0., Heparin Sodium, 2817-2818.
- [251] P. Ziobrowski, *Badanie mechanizmu retencji w wybranych rodzajach chromatografii cieczowej*, Praca doktorska, Politechnika Rzeszowska, (2023).
- [252] J. Kamińska, *Badania retencji wybranych substancji w chromatografii cieczowej ze szczególnym uwzględnieniem chromatografii oddziaływań hydrofilowych*, Praca doktorska, Politechnika Rzeszowska, (2018).

VIII. DOROBEK NAUKOWY

Publikacje naukowe:

1. Regina Lech-Przywara, Weronika Sofińska-Chmiel, Mateusz Przywara, Wojciech Zapała, *Analysis of adsorption equilibria and surface energetic properties of stationary phases in selected hydrophilic interaction liquid chromatography systems*, Adv. Sci. Technol. Res. J., (2026), 20(9):270-285, <https://doi.org/10.12913/22998624/224180>.
2. Regina Lech-Przywara, Tomasz Galek, Mateusz Przywara, Lidia Zapała, Wojciech Zapała, *Structural and surface characterization of adsorbents applied in liquid chromatography*, Adv. Sci. Technol. Res. J., (2025), 19(9):292–309, <https://doi.org/10.12913/22998624/207426>.
3. Mateusz Przywara, Regina Lech-Przywara, Wojciech Zapała, *Effect of mixing technology on homogeneity and quality of sodium naproxen tablets: technological and analytical evaluation using HPLC method*, Molecules, (2025), 30(15):3119, <https://doi.org/10.3390/molecules30153119>
4. Regina Lech-Przywara, Wojciech Zapała, *Analysis of selected factors influencing the course of the process in liquid chromatography*, Adv. Sci. Technol. Res. J., (2025), 19(6):1–16, <https://doi.org/10.12913/22998624/202507>.
5. Mateusz Przywara, Regina Lech-Przywara, Wojciech Zapała, *Numerical investigation on flowability of pulverized biomass using the swelling bed model*, AgriEngineering, (2024), 6(2):1349-1364, <https://doi.org/10.3390/agriengineering6020078>.
6. Mateusz Przywara, Regina Lech-Przywara, Wojciech Zapała, Ireneusz Opaliński, *Mechanical properties of solid biomass as affected by moisture content*, AgriEngineering, (2023), 5(3):1118-1135, <https://doi.org/10.3390/agriengineering5030071>.
7. Regina Lech-Przywara, Mateusz Przywara, Agnieszka Bukowska, Tomasz Galek, Wojciech Zapała, *Brief analysis of selected sorption and physicochemical properties of three different silica-based adsorbents*, Biomed. J. Sci. Tech. Res., (2023), 51(2):42478–42485, <http://dx.doi.org/10.26717/BJSTR.2023.51.008068>.

8. Mateusz Przywara, Regina Lech-Przywara, Marcin Chutkowski, Wojciech Zapała, Ireneusz Opaliński, *Influence of moisture content and composition of agricultural waste with hard coal mixtures on mechanical and rheological properties*, AgriEngineering, (2023), 5(1):425-440, <https://doi.org/10.3390/agriengineering5010028>.

9. Regina Lech-Przywara, Marcin Chutkowski, Mateusz Przywara, Wojciech Zapała, *Column testing in quantitative determination of raw heparin in porcine intestinal mucus extracts by liquid chromatography – Preliminary Investigations*, Biomed. J. Sci. Tech. Res., (2022), 45(3):36519-36522, <http://dx.doi.org/10.26717/BJSTR.2022.45.007209>.

Rozdział w monografii:

1. Regina Lech-Przywara, Mateusz Przywara, Wojciech Zapała, Książka: *Innowacje w naukach inżynieryjno-technicznych – wybrane aspekty*, Rozdział: *Właściwości adsorpcyjne wybranych polarnych faz stacjonarnych*, Wydawnictwo TYGIEL, (2023), 61-73, ISBN 978-83-67104-79-1.

Udział w konferencjach naukowych:

1. Regina Lech-Przywara, Mateusz Przywara, Wojciech Zapała, *Retention analysis of test substances on an amine column*, Ogólnopolska Konferencja Naukowa "e-Factory of Science" X edycja, prezentacja, 25.11.2023 r.

2. Regina Lech-Przywara, Marcin Chutkowski, Mateusz Przywara, Wojciech Zapała, *Quantitative determination of heparin by liquid chromatography – preliminary investigation*, XI Polska Konferencja Chemii Analitycznej, poster, Łódź, 19-23.06.2022 r.

3. Regina Lech-Przywara, Agnieszka Bukowska, Mateusz Przywara, Wojciech Zapała, *Adsorption properties of selected polar stationary phases – preliminary investigation*, XI Polska Konferencja Chemii Analitycznej, poster, Łódź, 19-23.06.2022 r.

4. Regina Lech-Przywara, Mateusz Przywara, Wojciech Zapała, *Influence of the particle size distribution of adsorbents on the adsorption process of selected test substances in liquid chromatography*, National Scientific Conference Science and Young Researchers VI edition, prezentacja, 04.06.2022 r.

5. Mateusz Przywara, Regina Lech-Przywara, *Wpływ wilgotności materiałów sypkich na ich właściwości reologiczne*, Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna „OMNIBUS CZ. X”, prezentacja, Kraków, 19–20.08.2021 r.

6. Mateusz Przywara, Regina Lech-Przywara, *Modelowanie właściwości mechanicznych biomasy z wykorzystaniem metody elementów dyskretnych DEM*, Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna „OMNIBUS CZ. X”, prezentacja, Kraków, 19–20.08.2021 r.
7. Mateusz Przywara, Regina Lech-Przywara, *Badania wskaźników Carr’a produktów granulacji talerzowej ciągłej*, Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna „OMNIBUS CZ. X”, prezentacja, Kraków, 19–20.08.2021 r.
8. Regina Lech-Przywara, Wojciech Zapała, *Badanie rozkładu wielkości cząstek adsorbentów do chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC)*, Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna „OMNIBUS CZ. X”, prezentacja, Kraków, 19–20.08.2021 r.
9. Mateusz Przywara, Regina Lech-Przywara, Ireneusz Opaliński, Wojciech Zapała, *Influence of moisture content on the mechanical properties of biomass with lignite mixtures*, 2nd Scientific Summer School, poster, 07.08.2021 r.
10. Mateusz Przywara, Regina Lech-Przywara, Robert Dürr, Achim Kienle, Dorota Antos, *Investigation of the influence of operation parameters on particle separation in continuous hopper pan transfer granulation*, 2nd Scientific Summer School, prezentacja, 07.08.2021 r.
11. Regina Lech-Przywara, Marcin Chutkowski, Mateusz Przywara, Wojciech Zapała, *Research on selected properties of adsorbents for liquid chromatography*, 2nd Scientific Summer School, prezentacja, 07.08.2021 r.
12. Regina Lech-Przywara, Mateusz Przywara, Wojciech Zapała, *Examination of mechanical properties of activated carbons*, 2nd Scientific Summer School, prezentacja, 07.08.2021 r.
13. Mateusz Przywara, Regina Lech-Przywara, Wojciech Zapała, *Badania wpływu wybranych parametrów procesowych na przebieg granulacji talerzowej ciągłej*, Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn. „ALFA I OMEGA CZ. IV”, prezentacja, Kraków, 05-06.08.2021 r.,
14. Mateusz Przywara, Regina Lech-Przywara, Wojciech Zapała, *Wpływ udziału biomasy w mieszaninie z węglem brunatnym na zdolność płynięcia mieszaniny*, Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn. „ALFA I OMEGA CZ. IV”, prezentacja, Kraków, 05-06.08.2021 r.
15. Regina Lech-Przywara, Mateusz Przywara, Wojciech Zapała, *Metody analizy rozkładu wielkości ziaren adsorbentów węglowych*, Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn. „ALFA I OMEGA CZ. IV”, prezentacja, Kraków, 05-06.08.2021 r.

16. Regina Lech-Przywara, Mateusz Przywara, Wojciech Zapała, *Badania właściwości mechanicznych adsorbentów do chromatografii cieczowej*, Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn. „ALFA I OMEGA CZ. IV”, prezentacja, Kraków, 05-06.08.2021 r.
17. Regina Lech-Przywara, Mateusz Przywara, Wojciech Zapała, *Investigation of particle size distribution of adsorbents*, National Scientific Conference Science and Young Researchers V edition, poster, 5.06.2021 r.

Współpraca z innymi ośrodkami naukowymi:

1. **Instytut Chemii, Uniwersytet Śląski w Katowicach (dr hab. Mieczysław Sajewicz, Prof. UŚ)**

W ramach współpracy naukowej z Uniwersytetem Śląskim uzyskano wyniki oznaczeń składu pierwiastkowego wybranych adsorbentów komercyjnych i niekomercyjnych metodą ICP-MS, analiz termograwimetrycznych TG-DTG oraz pomiarów powierzchni właściwej metodą BET.

2. **Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie (dr Weronika Sofińska-Chmiel)**

W ramach współpracy naukowej uzyskano wyniki badań morfologii ziaren adsorbentów niekomercyjnych z zastosowaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) oraz analiz parametrów strukturalnych, obejmujących wyznaczenie powierzchni właściwej, wielkości oraz objętości porów.

STRESZCZENIE

Praca doktorska dotyczyła badania mechanizmu sorpcji w chromatografii cieczerwowej oddziaływań hydrofilowych (HILIC) oraz określeniu wpływu właściwości faz stacjonarnych i warunków chromatograficznych na przebieg procesów sorpcji i retencji. Złożony charakter retencji w HILIC wynika ze współdziałania różnych procesów i oddziaływań pomiędzy analitem, fazą ruchomą i stacjonarną, których względny udział zależy m.in.: od składu fazy ruchomej, temperatury oraz właściwości analitu i fazy stacjonarnej.

Badania obejmowały ocenę wpływu temperatury oraz wpływu modyfikatora fazy ruchomej na retencję związków testowych, a także ocenę sprawności wybranych kolumn chromatograficznych HILIC. Przeprowadzono badania równowag adsorpcyjnych komercyjnych i niekomercyjnych adsorbentów, obejmujące analizę rozkładu energii adsorpcji, ocenę heterogeniczności energetycznej powierzchni oraz dobór i weryfikację modeli izoterm adsorpcji. Istotną część pracy stanowiła kompleksowa charakterystyka adsorbentów pod względem ich składu chemicznego, morfologii, rozkładu wielkości ziaren, wielkości i objętości porów, powierzchni właściwej i stabilności termicznej. Dodatkowo przeprowadzono badania chromatograficzne heparyny sodowej w celu oceny możliwości jej oznaczania w materiałach pochodzenia zwierzęcego z wykorzystaniem różnych układów chromatograficznych.

Wykazano, że mechanizm retencji w warunkach HILIC zależy od składu fazy ruchomej, własności fazy stacjonarnej oraz właściwości analitu. Dla większości badanych układów uzyskano liniowe zależności van't Hoffa, natomiast obserwowane dla wybranych układów, szczególnie dla kwercetyny, odchylenia od liniowości wskazywały na zmienny udział poszczególnych oddziaływań w procesie retencji. Stwierdzono również, że rodzaj modyfikatora organicznego wpływa na charakter retencji. Wykazano różnice w retencji badanych analitów w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika organicznego (acetonitryl vs metanol). Najwyższą sprawność badanych kolumn uzyskano przy wysokiej zawartości acetonitrylu, natomiast zastosowanie metanolu prowadziło do obniżenia sprawności oraz w niektórych układach, do wzrostu ciśnienia w układzie chromatograficznym.

Badania adsorpcyjne wykazały, że powierzchnie badanych adsorbentów mogą charakteryzować się zarówno energetyczną jednorodnością, jak i heterogenicznością. W zależności od charakteru powierzchni proces adsorpcji opisywały modele: Langmuira, bi-Langmuira lub Tótha. Analiza SEM-EDS i ICP-MS potwierdziła krzemionkowy charakter badanych materiałów oraz wykazała zróżnicowanie ich morfologii i składu pierwiastkowego. Stwierdzono również różnice w powierzchni właściwej oraz objętości i wielkości porów

badanych adsorbentów. Analiza TG-DTG potwierdziła wysoką stabilność termiczną badanych adsorbentów w zakresie temperatur stosowanych w badaniach chromatograficznych.

Przeprowadzona analiza chromatograficzna heparyny sodowej z wykorzystaniem różnych faz stacjonarnych wykazała, że dobór warunków chromatograficznych pozwala na uzyskanie zróżnicowanych parametrów rozdzielania i czasu analizy. Kolumna C18 zapewniała korzystne parametry rozdzielania przy krótszym czasie analizy niż metoda referencyjna opisana w farmakopei, kolumna węglowa umożliwia dalsze skrócenie czasu oznaczenia, natomiast kolumna aminopropylowa zapewniała większą selektywność separacji. Zastosowanie buforowanej fazy ruchomej pozwalało dodatkowo skrócić czas retencji przy zachowaniu zadowalających parametrów rozdzielania.

Uzyskane wyniki pozwoliły na pogłębienie wiedzy dotyczącej czynników wpływających na retencję w warunkach HILIC oraz na powiązanie właściwości faz stacjonarnych z charakterem procesów sorpcyjnych i chromatograficznych. Przeprowadzone badania dostarczyły również informacji istotnych z punktu widzenia doboru warunków chromatograficznych do oznaczania heparyny sodowej w materiałach pochodzenia zwierzęcego.

ABSTRACT

The doctoral dissertation focused on investigating the sorption mechanism in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and on determining the influence of the properties of stationary phases and chromatographic conditions on the course of sorption and retention processes. The complex nature of retention in HILIC results from the interplay of various processes and interactions between the analyte, mobile phase, and stationary phase, whose relative contributions depend, among other factors, on the composition of the mobile phase, temperature, and the properties of both the analyte and stationary phase.

The studies included an assessment of the effects of temperature and mobile phase modifier on the retention of test compounds, as well as an evaluation of the efficiency of selected HILIC chromatographic columns. Adsorption equilibrium studies were conducted for commercial and non-commercial adsorbents, including an analysis of the adsorption energy distribution, an assessment of the energetic heterogeneity of the adsorbent surfaces, and the selection and evaluation of appropriate adsorption isotherm models. A significant part of the dissertation involved a comprehensive characterization of the adsorbents in terms of their chemical composition, morphology, particle size distribution, pore size and pore volume, specific surface area, and thermal stability. In addition, chromatographic studies of sodium heparin were conducted to assess the feasibility of its determination in materials of animal origin using different chromatographic systems.

It was demonstrated that the retention mechanism under HILIC conditions depends on the composition of the mobile phase, the properties of the stationary phase, and the properties of the analyte. Linear van't Hoff relationships were obtained for most of the investigated systems, whereas deviations from linearity observed for selected systems, particularly for quercetin, indicated a variable contribution of individual interactions to the retention process. It was also found that the type of organic modifier influences the retention mechanism. Differences in the retention of the investigated analytes were demonstrated depending on the organic solvent used (acetonitrile vs methanol). The highest efficiency of the investigated columns was achieved at a high acetonitrile content, whereas the use of methanol resulted in a decrease in column efficiency and, in some systems, an increase in the pressure within the chromatographic system.

Adsorption studies demonstrated that the surfaces of the investigated adsorbents may exhibit both energetic homogeneity and heterogeneity. Depending on the surface characteristics, the adsorption process was described by the Langmuir, bi-Langmuir, or Tóth

models. SEM-EDS and ICP-MS analyses confirmed the silica-based nature of the investigated materials and revealed differences in their morphology and elemental composition. Differences were also observed in the specific surface area, as well as in the pore volume and pore size of the investigated adsorbents. TG-DTG analysis confirmed the high thermal stability of the investigated adsorbents over the temperature range used in the chromatographic studies.

Chromatographic analysis of sodium heparin using different stationary phases demonstrated that the selection of chromatographic conditions enables different separation parameters and analysis times to be achieved. The C18 column provided favorable separation parameters with a shorter analysis time than that of the reference method described in the pharmacopoeia, while the carbon-based column enabled a further reduction in analysis time. The aminopropyl column, in turn, provided greater separation selectivity. The use of a buffered mobile phase additionally allowed for a reduction in retention time while maintaining satisfactory separation parameters.

The obtained results contributed to a deeper understanding of the factors influencing retention under HILIC conditions and enabled the properties of stationary phases to be related to the nature of sorption and chromatographic processes. The studies also provided information relevant to the selection of chromatographic conditions for the determination of sodium heparin in materials of animal origin.