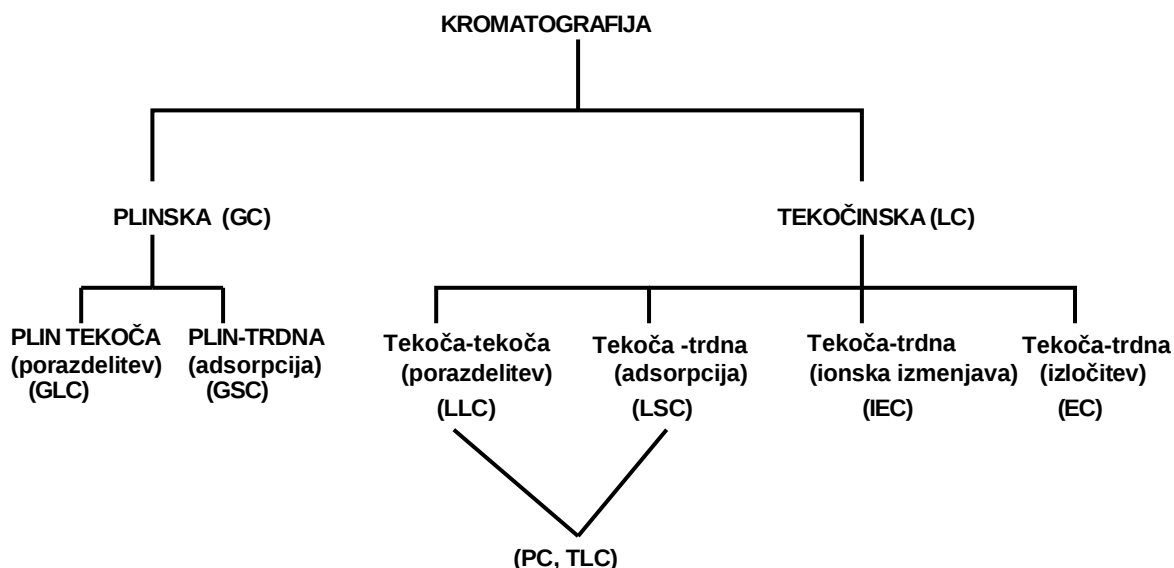


3. KROMATOGRAFIJA

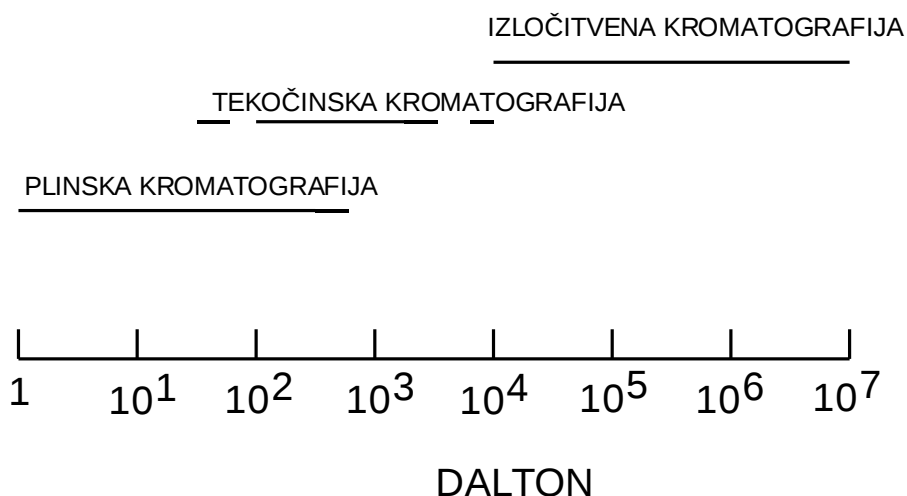
3.1. UVOD

Pod pojmom *kromatografija* razumemo vrsto postopkov separacije in/ali določitve kemijskih spojin, od najmanjših plinskih molekul do bioloških velemolekul (Sl. 3.1.). Kromatografska separacija je posledica razlik v hitrosti potovanja posameznih komponent pod vplivom mobilne faze (plin, tekočina), zaradi selektivnega zadrževanja (retenzije) komponent na stacionarni fazi (trdna površina ali nemobilna tekočina).



Slika 3.1. Shematski pregled kromatografskih metod

Danes zavzemajo kromatografske metode osrednje mesto v analizni kemiji organskih spojin, predvsem na področjih kemije naravnih spojin, farmacije, medicine in okolja. Tako lahko s plinsko kromatografijo ločimo organske spojine z maso do 1000 D ter nekatere hlapne anorganske substance, z izločitveno kromatografijo (SEC) pa celo molekule z molsko maso do 10^7 D (Sl.3.2.).



Slika 3.2. Območje kromatografskih metod glede na molekulsko maso topljenca

Pojem kromatografija je uvedel ruski botanik M.Cvet (1903), ko je na kolono s kalcijevim karbonatom nanese rastlinske pigmente iz listov (klorofil) in jih z izpiranjem s petrolejem separiral v karotene in ksantofile. To je bila dejansko metoda tekočinske kromatografije (LC). Šele v letu 1938 sta Izmailov in Shraiber opisala uporabo papirne (PC) in tankoslojne kromatografije (TLC), ki jo je razvil kasneje Stahl. Martin in Synge sta z delom o tekočinski porazdelitveni kromatografiji položila teoretske temelje tekočinski kromatografiji in dala osnove za razvoj papirne in plinske kromatografije. Za to delo sta leta 1952 prejela Nobelovo nagrado.

KROMATOGRFSKE METODE

Glede na naravo interakcije med topljencem in obema fazama sta kromatografskim metodam najbližji separacijski metodi ekstrakcija tekoče-tekoče in destilacija (porazdelitev topljenca med fazama). Glede na vrsto stacionarne in mobilne faze lahko delimo kromatografske metode v PLINSKO KROMATOGRAFIJO (GC) in TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO (LC)

VRSTE PLINSKE KROMATOGRAFIJE:

Porazdelitvena kromatografija plin-tekoče (GLC - Gas Liquid Chromatography)

Hlapne komponente vzorca se selektivno zadržujejo na stacionarni fazi in pod vplivom mobilne faze (dušik, helij, vodik) potujejo skozi kolono. Stacionarna faza je običajno nehlapna organska tekočina, s katero je prevlečen nosilec ('polnjena kolona') ali notranja stena kapilarne kolone. Ker je osnova separacije porazdelitev komponente med obema fazama (enako se topi v enakem), uporabljamo za različne skupine organskih spojin raznolike stacionarne faze. Ker je hlapnost organskih spojin in tako tudi stacionarnih faz odvisna tudi od temperature, morajo biti posamezne stacionarne faze obstojne v območju med 20-350°C.

Adsorpcijska kromatografija na trdnih sorbentih (GSC - Gas Solid Chromatography)

Separacija komponent poteka na osnovi sorpcije na trdnih adsorbentih ('molekulska sita', ki jih pripravljajo iz naravnih zeolitov) in desorpcije v plinsko fazo pri višjih temperaturah.

VRSTE TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE:

Adsorpcijska kromatografija (LSC - Liquid Solid Chromatography)

Tu je mobilna faza tekočina, stacionarna faza pa trden adsorbent (silikagel, Al_2O_3 , molekularna sita, aktivno oglje, porozna stekla). Tenkoplastno in deloma papirno kromatografijo lahko glede na mehanizem separacije tudi uvrščamo v to zvrst kromatografije. Uporaba adsorbentov je bila v tekočinski kromatografiji (HPLC) v začetku zelo razširjena, vendar so pri tej metodi številne težave: neponovljivost separacije, pri adsorpciji lahko pride do močne vezave nekaterih komponent (kemosorpcija), ki se ne izperejo iz kolone.

Porazdelitvena kromatografija (LLC - Liquid Liquid Chromatography)

Pri tem postopku je topljenec (molekula vzorca) porazdeljen med mobilno fazo (tekočina) in tekočo stacionarno fazo. Izpolnjen mora biti pogoj, da mobilna faza ne raztaplja stacionarne faze, ki je nanešana na inertnem nosilcu. Stacionarna faza je pogosto vezana na nosilec ("bonded phase chromatography") in sta tako sorpcija in porazdelitev vzrok za separacijo. Porazdelitveno kromatografijo delimo na "normalno fazno" (NP) in "reverzno fazno" (RP). Pri prvi je stacionarna faza polarna in mobilna faza nepolarna (separacija polarnih spojin). Pri "reverzni fazi" (RP) imamo obrnjene pogoje: stacionarna faza (običajno vezana na nosilcu) je nepolarna.

Ionska kromatografija (IC - Ion Chromatography)

Pri ionski kromatografiji uporabljamo zeolite ali umetne organske in anorganske smole (kationske in anionske izmenjalce). Osnova je ionska izmenjava med ionskimi skupinami v izmenjalcu in protioni vzorca. Medtem, ko je ta način separacije zelo preprost v običajni izvedbi, je pri HPLC precej zahteven: pogoji separacije so odvisni od vrste vplivov (pH, ionska moč itd) in je pogoje težko predvideti.

Izločitvena kromatografija (Size Exclusion Chromatography, Gelpermeation, Gel - filtration Chromatography)

Pri tej metodi mora biti stacionarna faza kemično inertna, glede na vrsto stacionarne faze imamo tudi različna poimenovanja (n.pr., Gelska kromatografija na Sephadex koloni). Separacija poteče zaradi različnih velikosti molekul vzorca in por v stacionarni fazi: manjše molekule prodrejo (difuzija) v mrežo polimerne stacionarne faze, medtem ko se srednje velike zadržujejo zaradi tega manj časa v koloni, največje pa potujejo skozi kolono hitro. Ta metoda je posebno uporabna za separacijo visokomolekularnih spojin in biomolekul od manjših molekul v vzorcu.

3.2. OSNOVNI POJMI IZ TEORIJE SEPARACIJE NA KOLONI

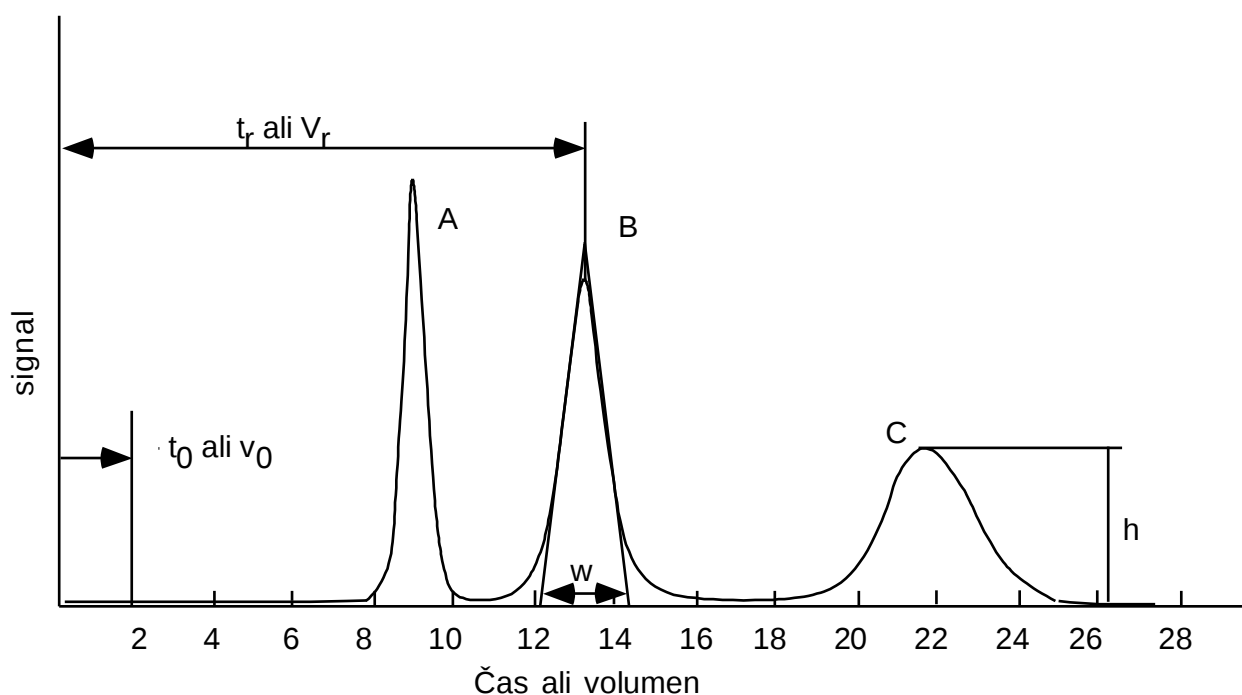
Proces separacije na kromatografski koloni lahko opišemo z različnimi parametri, kot npr. časom zadrževanja (retenzija) komponente na koloni (t_r) ali z ustreznim retencijskim volumnom (V_r) mobilne faze, ki je potreben, da se komponenta eluira iz kolone, številom teoretskih podov, ki ponazarjajo zmogljivost kolone (N), kapacitivnostjo ali porazdelitvenim razmerjem kolone (k') in njeno selektivnostjo (α). Vzrok zadrževanju določene komponente na koloni je porazdelitev topljenca med stacionarno in mobilno fazo.

Retenzijski čas

t_R komponente je čas, ki ga le-ta potrebuje za potovanje od injektorja do detektorja skozi kromatografsko kolono (Sl.3.3.) in je ob danih kromatografskih pogojih specifičen za posamezno substanco.

t_0 je čas, ki je potreben za prehod mobilne faze po enaki poti.

vbrizg



Slika 3.3. Značilen kromatogram večkomponentne mešanice

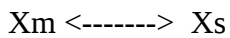
Iz vrednosti za t_0 in t_r v kromatogramu lahko dobimo ustrezne volumne, če poznamo pretok q (ml/min) in sicer

$$V_r = qt_r \text{ in } V_m = qt_0,$$

kjer V_r pomeni *retenzijski volumen* in $V_m = V_0$ *intersticialen volumen* mobilne faze ('void volume', 'dead volume'). V_0 dejansko predstavlja totalni volumen mobilne faze v koloni v slehernem trenutku (vključno z volumni injektorskega dela, priključkov in detektorja), medtem ko je V_r volumen mobilne faze, ki je potreben, da določeno komponento "izperemo" (eluiramo) iz stacionarne faze.

Porazdelitveni koeficient (K_D)

Vsaka komponenta X se porazdeli med stacionarno in mobilno fazo



Proces opišemo z ravnotežno konstanto

$$K_D = [X_s]/[X_m]$$

ki jo imenujemo *porazdelitveni (termodinamski) koeficient* za določeno komponento X. Visoka vrednost K_D pomeni, da je komponenta X pretežno v stacionarni fazi ter potuje počasneje skozi kolono. Tako je torej K_D merilo za zadrževanje določene komponente na koloni.

Kapacitivnost (porazdelitveno razmerje) kolone (k')

Namesto termodinamske konstante K_D (koeficienta porazdelitve) uporabljamo v GC in HPLC običajno kapacitivni faktor

$$k' = \frac{\text{štev. molov X v stac. fazi}}{\text{štev. molov X v mob. fazi}} = \frac{V_s \cdot [X]_s}{V_m \cdot [X]_m} = K_D \cdot V_s / V_m$$

kjer sta V_s in V_m ustrezna volumna obeh faz in ga lahko določimo direktno iz kromatograma (Sl. 3.3.). Razmerje V_s/V_m označujejo včasih z β (fazno razmerje) in izrazimo $k' = K_D/\beta$. Pri adsorpcijski kromatografiji moramo V_s nadomestiti z ustreznim izrazom, ki odgovarja aktivni površini adsorbenta.

Separacija (zadrževanje) komponent v mešanici je v bistvu odvisna od relativne množine vsake komponente v posamezni fazi (k') in ne od njunih relativnih koncentracij (K_D).

Selektivnost kolone - ločitev pasov

Selektivnost α se nanaša na zmožnost kolone, da loči dve komponenti.

$$\alpha = \frac{t_{rB} - t_0}{t_{rA} - t_0} = k'_B/k'_A = K_D(B)/K_D(A)$$

Selektivnost kolone izračunamo iz vrednosti k' in mora biti vedno večji od 2. Pri vrednostih okrog 1 je ločitev nemogoča; za izboljšanje selektivnosti je treba menjati stacionarno ali mobilno fazo oziroma obe, oziroma koeficient porazdelitve K_D (ali T kolone pri GC). Selektivnost je možno orientacijsko predvideti iz molekulskih interakcij med topljencem in stacionarno fazo (npr. vodikova vez ipd).

Učinkovitost kolone - razširitev pasov

Pod pojmom učinkovitost kolone ('column efficiency') razumemo hitrost razširjanja pasov posameznih komponent med potovanjem topila skozi kolono (ali vzdolž papirja oziroma plošče pri PC ali TLC). Ta parameter izrazimo kvantitativno s številom *teoretskih podov* ('Theoretical Plates'). To število pomeni, kolikokrat se topljenec porazdeli med fazama pri potovanju skozi kolono :

$$N = L/H = (t_r/\sigma)^2 = 16 (t_r/w)$$

kjer je L dolžina kolone, H je višina poda, σ standardni odmik vrha in $w = 4\sigma$ že znana širina vrha na osnovi, t.j. na bazni črti.

Koncept teoretskih podov (N) je prevzet iz teorije destilacije (destilacijske kolone za frakcionirano destilacijo), ki predpostavlja, da je takšna kolona sestavljena iz velikega števila podov (platojev), kjer obstaja ravnotežje topljenca med obema fazama. Torej predstavlja N potencialno separacijsko zmožnost kolone - čim večji je N tem večja je učinkovitost. Tako učinkovite kolone (visok N) zmanjšajo razšititev vrhov (ozki vrhovi).

Pomembno je, da je N proporcionalen dolžini kolone, zato je lahko merilo za učinkovitost kolone tudi parameter HETP (Height Equivalent to a Theoretical Plate) :

$$H = L/N$$

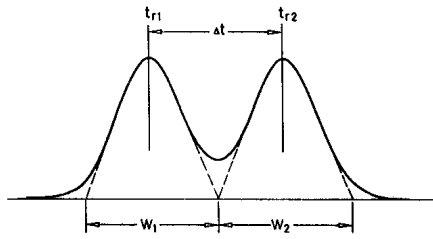
kjer je L dolžina kolone, običajno v milimetrih. Ta parameter omogoča primerjavo učinkovitosti različno dolgih kolon. Odvisnost višine teoretičnih podov od linearne hitrosti mobilne faze opisuje van Deemterjeva enačba.

Ločljivost

Ločljivost med dvema vrhoma, ki se lahko deloma prekrivata, določamo iz kromatograma in je definirana z

$$R = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{(w_2 + w_1)/2} = \frac{2 \Delta t}{w_2 + w_1}$$

Za dva sosednja vrhova, ki sta blizu skupaj, velja, da je $w_1 \cong w_2 = 4\sigma$ in $\Delta t \cong 2\sigma_1 + 2\sigma_2 \cong 4\sigma$. Tako dobimo za $R = \Delta t/w_2 = 1,0$. To je numerična vrednost za ločljivost dveh vrhov, pri katerih se tangenti ravno dotikata (Sl. 3.4.) . Za popolno ločitev vrhov na osnovni črti mora biti vrednost za ločljivost večja od 1,5.



Slika 3.4. Definicija ločljivosti (nepopolno ločena kromatografska vrhova)

Jasno je, da zgornja definicija ločljivosti velja le za vrhove z enako višino in enako širino, zato je pri odstopanjih potrebno upoštevati še druge parametre. Pri kromatografskih in ostalih separacijskih tehnikah je ločljivost zadovoljiva takrat, ko so komponente ločene v čim krajšem času tako, da je razdalja med dvema vrhovoma večja od širine vrhov.

KVANTITATIVNA ANALIZA

Čeprav je kvalitativna analiza s kromatografskimi metodami (predvsem z GC in HPLC) možna, je veliko pomembnejša kvantitativna analiza. Pri kvalitativni analizi je skoraj edini parameter, ki nam služi pri identifikaciji neke spojine, čas zadrževanja (t_r) neke komponente na določeni koloni pri točno določenih pogojih. Primerjava teh časov s tabeliranimi vrednostmi je zelo nezanesljiva, saj ima vrsta spojin skoraj enake čase zadrževanja na isti koloni. Z uporabo standardov se tem problemom le delno izognemo. Uporaba različnih mobilnih in stacionarnih faz (večkolonska kromatografija) je bila nedavno zelo obetavna, vendar je časovno in stroškovno neprimerna. Danes je na voljo vrsta 'sklopitev' GC in HPLC z masno specifičnimi in/ali selektivnimi detektorji, s katerimi je možna tako identifikacija posameznih komponent kot tudi njihova kvantitativna določitev v času, ki je v bistvu odvisen od časa separacije na kromatografski koloni (GC-MS, HPLC-MS, GC-IR). Kljub temu pa sta GC in HPLC danes najpomembnejši metodi za kvantitativno analizo večine organskih spojin v vzorcih hrane, vode, zdravil, v analizah okolja itd. Vsekakor pa je edinstvena prednost GC, HPLC in ostalih kromatografskih metod v sposobnosti separacije posameznih spojin med seboj in od osnove (matriksa) vzorca.

Večina detektorjev v kromatografiji daje signal, ki je sorazmeren koncentraciji topljenca v mobilni fazi. Za takšne detektorje je površina signala (vrh, ki ima bolj ali manj verno obliko Gauss-ove krivulje) sorazmerna masi neke komponente in obratno sorazmerna pretoku mobilne faze. Zato je izrednega pomena, da je pretok mobilne faze konstanten. Vedeti moramo tudi, da višina signala pomeni tisti čas, ko je polovico snovi prešlo skozi detektor, zato je treba biti previden pri uporabi višine vrha kot merilo koncentracije, če signali niso simetrični.

Večinoma zapišemo signale detektorjev pri GC in HPLC v analogni obliki kromatograma. Površino signala (vrha) lahko izračunamo z grafično ('ročno') integracijo ali s pomočjo integratorjev oziroma digitalnih računalnikov (PC) z ustrežno programsko opremo.

Računanje koncentracij

Z običajnimi integratorji dobimo vrednosti za t_R , višine vrhov (h) in površine vrhov iz katerih lahko izračunamo koncentracije posameznih komponent na več načinov: *umeritev s standardom, normalizacija površin, metoda internega standarda*.

a) *Umeritev s standardom (eksterni standard)*

To metodo pogosto uporabljamo, kadar poznamo volumen vzorca. Prednost te metode je v tem, da merimo le površini vrhov, ki nas zanimajo. Ustrezni standard(i) morajo biti kromatografirani pod enakimi pogoji kot vzorec. Pri tem ni potrebno injicirati enake množine vzorca in standarda. Koncentracije posameznih komponent izračunamo s pomočjo zveze $X_i = P_i \cdot K_i$, kjer je P_i površina vrha določene komponente in K_i razmerje med koncentracijo in površino določenega standarda oziroma naklon umeritvenega grafa. Umeritvene grafe (regresijske premice) uporabljamo, kadar hočemo zelo natančno določiti koncentracije posameznih komponent. Ker imamo pri izračunu koncentracij opravka s parametri kot so volumen in koncentracija, so lahko napake zaradi hlapnosti topila vzrok znatnim napakam.

b) *Umeritev z internim standardom*

Pri tej metodi kromatografiramo znano množino *internega standarda* in mu izračunamo razmerje površina/koncentracija (lahko tudi iz grafa). Nato dodamo k vzorcu znano množino tega standarda. Kot interni standard lahko uporabimo komponento, ki je ni v vzorcu in je popolnoma ločena od sosednih vrhov, vendar ima podobne retencijske čase kot komponenta, ki jo določujemo ter mora biti inertna do mobilne faze in ostalih komponent v vzorcu. Ta metoda ne zahteva ponovljivega injiciranja vzorcev in enakih kromatografskih pogojev, kar zmanjšuje glavni vir nenatančnosti, posebej pri GC, kjer običajno ne poznamo množino injiciranega vzorca. Glavni vir napak povzroča neidealni interni standard, zato uporabljamo za natančne določitve markirane spojine (s C^{13} , N^{15} , O^{18} ipd) določenih komponent.

c) *Normalizacija površin vrhov*

Ta metoda je primerna takrat, kadar kromatogram resnično odraža sestavo celotnega vzorca in so vse komponente dobro ločene med seboj. Merimo površino vsakega vrha in jo delimo z odgovarjajočimi faktorji odziva za določeno komponento. Delež (%) posamezne komponente dobimo iz s pomočjo izraza $X_i(\%) = (P_i / \sum P_i) \cdot 100$

Kadar nimamo na voljo posameznih standardov, lahko uporabimo kar % površine (višine) posamezne komponente od celokupne površine (višin) vseh vrhov. To je smiselno, kadar primerjamo kvantitativno sestavo enakih vzorcev.

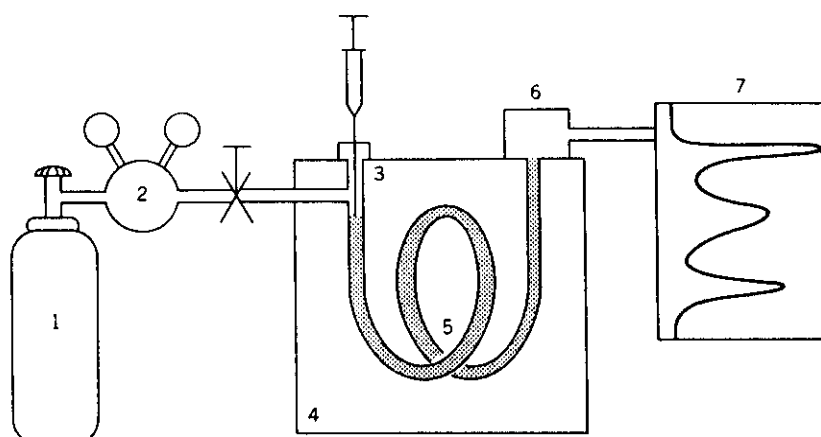
3.3. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Plinska kromatografija je primerna za separacijo in kvantitativno določitev termično stabilnih spojin, ki imajo ustrezen parni tlak (hlapnost) in so termično stabilne do 300 - 350° C. Največ uporabljamo GLC, ki jo običajno označujemo kar z GC, kjer poteka separacija na osnovi porazdelitve komponent v vzorcu med mobilno fazo (He , N_2) in stacionarno fazo (tekočina na nekem trdnem nosilcu). Za detekcijo imamo na voljo občutljive in selektivne detektorje (FID, ECD, MS) s katerimi lahko detektiramo množine pod 1 ng.

Plinski kromatograf

sestavljajo trije glavni, med seboj povezani deli: *injektor*, *kromatografska kolona* in *detektor*. Vsak od teh osnovnih delov ima vrsto dodatnih komponent (Sl. 3.5.), ki zagotavljajo:

- *konstanten pretok mobilne faze
- *injiciranje vzorca na kolono
- *ustrezno dolžino kolone (stacionarne faze)
- *primerno temperaturo kolone
- *detekcijo posamezne komponente na izhodu kolone
- *ustrezen signal posamezne komponente za nadaljnjo procesiranje



Slika 3.5. Funkcionalna shema plinskega kromatografa

a) Injektor

Pri polnjenih kolonah ('packed column') uporabljamo direktno injiciranje vzorca. Z brizgo ('syringe') prebodemo tesnilo ('septum') in vbrizgamo določen volumen vzorca v steklen vložek pred kolono, ki je segret na ustrezno temperaturo, da vzorec v hipu uparimo in splaknemo z nosilnim plinom (mobilna faza) v kolono. Za merjenje volumnov vzorca lahko uporabimo kalibrirane zanke, ki so vgrajene v večpotni ventil, in jih pri injiciranju preklopimo v pretok plina.

Pri kapilarnih kolonah je potrebno zmanjšati volumen vzorca s pomočjo 'spliterja' ('splitter'), kjer se od prvotne množine vzorca ($1 \mu\text{L}$) prenese na kolono le manjši del ($0,01 \mu\text{L}$). S tem preprečimo preobremenjenost kolone (kapacita kolone), izgubimo pa večino vzorca, kar vpliva na velikost signala. Pri zelo nizkih koncentracijah pa moramo injicirati vzorec na kolono brez 'spliterja' ('splittless' injection). Pri tem dobimo ogromen vrh topila z izrazitim repom ('tailing'), ki lahko moti analizo komponent z nizkimi časi zadrževanja. Ta rep lahko delno odpravimo s primernim izpiranjem injekcijskega dela v atmosfero takrat, ko je ves vzorec z delom topila prišel do kolone.

Za nekatere spojine, ki so termično nestabilne (mnoge polarne spojine) ali pa se ne ločijo zadovoljivo, lahko pripravimo bolj hlapne in obstojne derivate. Danes poznamo več odličnih reagentov, ki pretvorijo polarne skupine (-OH, -COOH, -NH₂, ipd) v ustrezne derivate hitro in kvantitativno (trimetilsililacetamid, trifluoroacetil itd.). Pogosto dajejo ti derivati tudi večje signale kot originalne spojine (fluorirani derivati za ECD).

b) Kolone v GC

V plinski kromatografiji uporabljamo dve vrsti kolon: polnjene in kapilarne kolone.

Polnjene kolone ('packed columns') so običajno kovinske ali steklene z notranjim premerom od 2 - 8 mm in dolžine okrog 3 m. Napolnjene so s trdnim, inertnim polnilom, ki je prevlečen s tekočo stacionarno fazo (običajno od 10-20 %). Velikost delcev polnila znaša običajno 100/120 mesh (150 - 125 μm). Notranji premer kolone mora biti vsaj 8-krat večji od premera delcev polnila.

Kapilarne kolone imajo običajno notranji premer, ki je manjši od 1 mm in so narejene iz staljenega kvarca ('fused silica'), ki daje tudi daljšim kolonom (do 50 m) prožnost. Od različnih vrst kapilarnih kolon so danes največ v uporabi odprte kapilarne kolone, ki imajo notranje stene prevlečene z ustrezno stacionarno fazo (1-2 μm) z oznako WCOT ('Wall-Coated-Open-Tubular'). Glavna prednost teh kolon so krajši časi analize, večja inertnost, daljša življenjska doba, boljša ponovljivost in visoke vrednosti N (učinkovitost) ter zmanjšano izcejanje ('krvavenje') stacionarne faze.

Naloga tekoče 'stacionarne' faze je separacija (selektivno zadrževanje posameznih komponent). Selektivnost je merilo za zadrževanje polarnih spojin glede na nepolarno fazo. Stacionarne faze klasificiramo običajno glede na njihovo selektivnost. Zaradi kompleksne narave interakcij med topilom in topljencem je optimalna izbira stacionarne faze zelo težka.

V praksi pa si lahko pomagamo z enostavnim pristopom. Če imajo posamezne komponente v vzorcu različna vrelišča, uporabimo nepolarno fazo. Če imajo nekatere komponente podobna vrelišča, bomo izbrali stacionarno fazo, ki bo močno zadrževala eno ali več komponent. Ravno tako lahko uporabimo za izbiro stacionarne faze staro kemijsko pravilo: 'enako se topi v enakem'. Tako bomo za separacijo alkoholov vzeli kot stacionarno fazo poliglikole, za separacijo ogljikovodikov pa nepolarno stacionarno fazo ipd. Za nekatere spojine (halogenirane in dušikove) uporabljamo posebne stacionarne faze.

Z izbiro primerne stacionarne faze smo določili osnovni parameter kromatografske separacije, ki jo lahko izboljšamo z dodatnimi parametri kot so dolžina kolone, temperatura, pretok plina (optimizacija kolone) in ne nazadnje z izbiro detektorja.

c) Detektorji za GC

Na izhodu kromatografske kolone je nameščen detektor, s katerim zaznamo komponente, ki jih eluiramo iz kolone s pomočjo mobilne faze. Prostornina detektorja mora biti čim manjša, da preprečimo ponovno mešanje komponent po separaciji. Detektor daje analizni signal, ki ga ustrezen senzor pretvori v analogni električni signal. Ta signal ojačimo in ga pošljemo direktno na registrirni instrument (rekorder), ki nam prikazuje analogni zapis, ali pa ga pretvorimo v digitalno obliko in vodimo na integrator oziroma v računalnik. Detektorski sistem s temi perifernimi enotami zagotavlja zvezni zapis v obliki koncentracijskih profilov (vrhov) komponent, ki se eluirajo iz kolone. V plinski kromatografiji poznamo vrsto različnih detektorjev kot so: TCD-Thermal Conductivity Detector, TED-Thermoionic Emission Detector, FPD-Flame Photometric Detector, PID-Photoionization Detector, NPD-Nitrogen Phosphorus Detector, FID-Flame Ionization Detector, ECD Electron Capture Detector,... Pri rutinskem delu se največkrat uporablja FID in ECD detektorja. Prvi je skoraj univerzalen detektor za večino organskih spojin, medtem ko se ECD uporablja za detekcijo spojin s prostimi elektronskimi pari (halogenidi,

aromatske spojine...). Bistvene značilnosti posameznih detektorjev so občutljivost, linearnost in selektivnost.

Detektor na osnovi toplotne prevodnosti (TCD) je edini univerzalni detektor za vse spojine, ki jih lahko separiramo na GC koloni in ima linearno območje nad 10^4 . Ker je nedestruktiven, ga lahko uporabimo tudi v preparativni plinski kromatografiji. Zaradi nizke občutljivosti (nad 0,3 ng/ml), pa ni primeren za analizo sledov.

Plamensko-ionizacijski detektor (FID) je osnovan na merjenju toka, ki izvira iz ionov in elektronov, nastalih pri gorenju organskih spojin v čistem plamenu vodik/zrak. Če pride v detektor organska spojina iz kolone, tok močno naraste in je sorazmeren z množino snovi v eluatu. Nastali tok povzroči padec napetosti na visokoomskem upor; ta napetostni signal ojačimo in peljemo na izhodno enoto (rekorder ali integrator). Detektor je 1000 krat bolj občutljiv kot TCD in je linearen v območju 10^6 . Njegova meja zaznavnosti je okoli 5 pg/sek. Ker ni občutljiv na vrsto permanentnih plinov (CO, CO₂, SO₂, NO, NO₂, NH₃), je zelo primeren za analizo organskega onesnaženja v zraku.

V detektorju na zajetje elektronov (ECD) eluent iz kolone vodimo preko dveh elektrod, od katerih ima ena nanešen radioaktiven izotop, ki emitira elektrone (β sevalec, npr. Ni⁶³). Ti visokoenergijski elektroni povzročijo po trkih z nosilnim plinom (N₂) nastanek plazme (ioni, elektroni, radikali). S primernim potencialom dobimo nek konstanten tok, ki predstavlja bazno linijo. Ko pride iz kolone elektrofilna spojina, pride do zajetja elektronov, kar povzroči negativen signal, ki je sorazmeren množini eluirane komponente. Da dosežemo najnižjo mejo zaznavnosti (0,1 pg/sek), moramo iz nosilnega plina odstraniti sledove kisika in vlage. Največjo občutljivost dosežemo s polikloriranimi spojinami (pesticidi), linearno območje pa je omejeno na dve do največ štiri velikostne rede

3.4. TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA

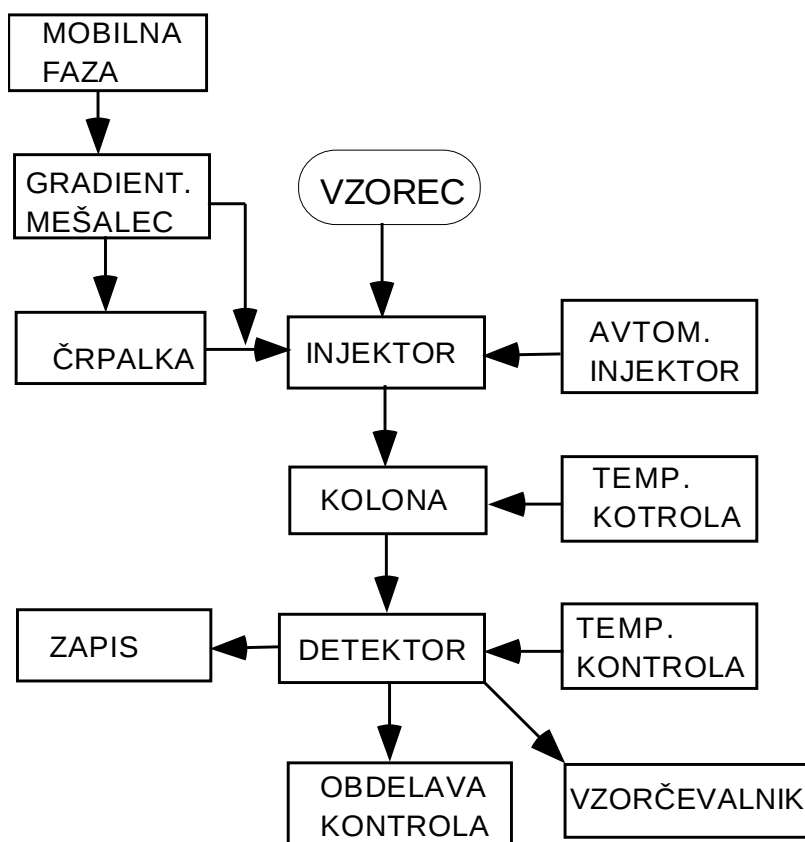
V tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti ali pri visokih pritiskih (HPLC - High Pressure Liquid Chromatography, High Performance Liquid Chromatography) so uporabni vsi našteti načini separacije. Komponente (topljenec) raztopimo in jih nato pod visokom pritiskom (do 200 barov) potiskamo skozi (kovinsko) kolono s pomočjo mobilne faze. Kolona je napolnjena z delci polnila (običajno velikost <10 μ m), ki so prekriti s stacionarno fazo. Z izbiro ustreznih faz in ostalih pogojev, dosežemo separacijo večkomponentne mašanice v nekaj minutah.

Pri HPLC je bistvenega pomena izbira stacionarne in mobilne faze. Sestavo (polarnost) mobilne faze lahko med separacijo tudi programirano spreminjamo - ta način imenujemo gradientno izpiranje za razliko od izokratskega, pri katerem ostane polarnost mobilne faze (lahko tudi večkomponentna) v času separacije nespremenjena.

Z razvojem črpalk za visoke pritiske in konstantne pretoke brez pulziranja, tehnologije kolon in različnih detektorjev, je postala HPLC ob GLC nepogrešljiva metoda za separacijo in določevanje večine organskih (in anorganskih) spojin po načelu: "Kar lahko raztopiš, lahko tudi ločiš in določiš". Odlikujejo jo: hitrost, občutljivost, ločljivost, majhna množina vzorca (pogosto tudi slaba stran, saj otežuje identifikacijo neznane komponente) in večkratna ("neomejena") uporaba kolone. Ena od odlik kromatografskih metod je uporaba v zelo širokem masnem območju (sl.3.2.).

KOMPONENTE HPLC SISTEMA

Osnovne komponente HPLC sistema so: razervoar z mobilno fazo, črpalka, injektor, kolona z detektorjem in rekorder (Sl 3.6.). Sodobni sistemi dopuščajo modularno sestavo in uporabo mikroračunalnikov za kontrolo procesa, zbiranje in obdelavo podatkov.



Slika 3.6. Shema HPLC sistema

Mobilna faza

Njena sestava je pri HPLC bistvenega pomena za separacijo. Glavne zahteve so: ne sme vplivati na lastnost kolone, topiti mora vzorec, kompatibilna mora biti z detektorjem (čista) in imeti mora nizko viskoznost.

Tehnika HPLC zahteva, da mobilno fazo pred uporabo razplinimo (mehurčki na nizkotlačnem sistemu povzročajo velik šum v detektorju). Z že omenjeno tehniko "gradientnega izpiranja" (sprememba kemične sestave oziroma polarosti mobilne faze med procesom) dosežemo krajše čase zadrževanja močno vezanih komponent na koloni in s tem bistveno skrajšamo čas analize. Razen tega dosežemo celotno ločljivost komponent v mešanici, izboljša obliko vrhov (brez repov) in občutljivost (oblike vrhov se malo razlikujejo).

Značilna topila, ki jih upotabljam kot mobilne faze v HPLC so naslednja:

ADSORPCIJA/PORAZDELITEV; heksan, metilenklorid, kloroform, metanol, acetonitril

REVERZNA FAZA: metanol/voda, acetonitril/voda, reagenti z ionskimi pari

IONSKA IZMENJAVA: vodne puferske raztopine

IZLOČITVENA KROMATOGRAFIJA: tetrahidrofuran, kloroform

Črpalke

Poleg kolone so **črpalke** najpomembnejši del sleherne HPLC tehnike. Visok tlak (do 400 barov) je potreben za premagovanje upora pri pretoku mobilne faze skozi kolono, ki je

napolnjena z mikronskimi delci stacionarne faze. Črpalni sistem (rezervoar z mobilno fazo, gradientni mešalec in črpalke) mora zadostiti številnim zahtevam:

1. Črpanje konstantnega volumna (tekočine) mora biti neodvisno od "povratnega pritiska" (upora) kolone.
2. Pretok mobilne faze (tekočine) mora biti brez "pulziranja" (nihanja), kar zmanjšuje šum detektorja
3. Na izhodu moramo doseči visok tlak (do 600 barov).
4. Dobro je, če lahko črpamo neomejeno množino topila (mobilne faze) z možnostjo recikliranja, isokratskega in gradientnega izpiranja.
5. Zaželeno je široko območje pretokov mobilne faze (do 10 ml/min) za različne HPLC tehnike.

Tem zahtevam ne odgovarja nobena črpalka, vendar se jim močno približajo tri izvedbe: batna črpalka s povratnim ventilom, batna črpalka z večjim rezervoarjem in dvo ali tribatna črpalka s posebnim prenosnikom. Danes se najbolj uporablja tretja izvedba, kjer je pulziranje pretoka zmanjšano na minimum, pravtako pa ni omejitev pri volumnu mobilne faze kot pri batni črpalki z večjim rezervoarjem.

Kromatografsko separacijo s tekočinsko kromatografijo lahko izvedemo pri konstantni sestavi mobilne faze (izokratsko izpiranje) ali pa jo med analizo spreminjamo, da pospešimo izpiranje substanc, ki se močneje zadržijo na koloni (gradientno izpiranje). Pri gradientnem izpiranju mešamo dve ali več topil in s tem spreminjamo separacijske pogoje. Sestavo mobilne faze lahko spreminjamo zvezno ali v korakih. Sedaj uporabljamo dve osnovni izvedbi mešanja mobilnih faz: gradientno izpiranje pri visokem tlaku in gradientno izpiranje pri nizkem tlaku. Prvi način je starejši in uporablja dve ali več črpalk, ki jih kontroliramo preko skupnega kontrolerja. Mešanje različnih topil nastopi za črpalkami pri visokem tlaku (slika 3.6.). Druga cenejša izvedba je gradientno izpiranje pri nizkem tlaku. Pri tej tehniki potrebujemo le eno v ta namen prirejeno črpalko, zato je na način gradientnega izpiranja mnogo cenejši. Topila se preko posebnega gradientnega mešalca mešajo pri nizkem tlaku pred vstopom v črpalko. Zaradi cenejše izvedbe je ta tehnika močno izpodrinila prejšnjo.

Injektorji

Vzorec moramo nanesti na kolono naenkrat, ne da bi vplivali na polnitev (stacionarno fazo).

Najboljši način injiciranja v pretoku mobilne faze predstavlja vrtljivi injektor z zanko s stalnim volumnom ("loop injection"). Pri teh injektorjih v raznih izvedbah ("Rheodyne") dosežemo odlično ponovljivost injiciranja in omogočajo avtomatično doziranje vzorcev različnih volumnov. Za zaščito kolone uporabljamo med injektorjem in kolono včasih "predkolono" z enako stacionarno fazo kot kolona. Na ta način preprečimo onesnaženje kolone, če uporabljamo vzorce brez predhodne obdelave (krvni serum, odpadne vode ipd).

Kolona predstavlja srce kromatografskega sistema in je najbolj zahtevni del HPLC ter zavisi tako od izbire vrste in kvalitete stacionarne faze kot od tehnologije polnjenja, ki zahteva poseben postopek.

Čeprav je klasična tekočinska kromatografija (LC) -odprte kolone še vedno v uporabi (predvsem za preparativno delo), je HPLC zaradi že omenjenih prednosti (hitrost, občutljivost, ločljivost) postala nepogrešljiva metoda za separacijo in kvantitativno analizo. Razlika med klasično LC in HPLC je v aparativnem sestavu, medtem ko so osnovni mehanizmi separacija in teorija enaki.

Kolona, napolnjena z delci, povzroča upor v pretoku tekočine: čim daljša je kolona in čim manjši so delci, tem večji je upor. Tlak pogosto podajamo v enotah Psi (pravilno Psig), t.j. "pounds-per-square-inch above gravity". Če preračunamo, dobimo pretvorbeni faktor 1 bar = 14,4 Psi.

Čeprav je teorija LC napovedala večjo učinkovitost kolone z zmanjšanjem velikosti delcev, je to uspelo šele po letu 1960, ko so razvili sferične neporozne delce (inertne), običajno iz stekla (40 μm), ki so bili prevlečeni s tanko opno ("pellicular resin") iz silikagela, Al_2O_3 , umetnih smol ali poliamidov. S takšnimi delci v koloni je bil potreben za pretok mobilne faze 0,5-5 ml/min pritisk do 300 barov. To je bil začetek HPLC. S takimi kolonami so dosegli stokratno učinkovitost v primerjavi s klasično LC, kar je povečalo analitski pomen HPLC. Ker pa je volumen stacionarne faze (površina) pri teh delcih manjši, se zmanjša kapaciteta kolone za več kot velikostni red v primerjavi z običajno LC.

Zmanjšanje delcev pod 10 μm vodi pri poroznih delcih do povečanja učinkovitosti kolone (teorija napoveduje optimalno dimenzijo 3 μm). Prvi takšni delci so bili ionski izmenjalci in po letu 1970 so tudi za ostale tehnike HPLC uvedli delce med 5-15 μm , s katerimi so izboljšali učinkovitost v primerjavi z običajno LC. Zaradi tega so postale kolone tudi krajše (15-25 cm). Poleg tega je pri teh poroznih mikro delcih ("micropack") površina na enoto volumna približno enaka kot pri delcih za običajno kolonsko LC in je tudi kapaciteta kolone primerljiva in omogoča preparativno HPLC.

Kolone za HPLC so običajno iz nerjavnega jekla (za pritiske do 700 barov oz. 10000 Psi), le za nižje tlake (pod 10 barov) lahko uporabimo steklene ali teflonske kolone. Če je potrebna kontrola temperature, kolono temostatiramo.

Izbira stacionarne faze (polnitve kolone) in mobilne faze je najpomembnejši del separacijskega postopka pri HPLC. Ta je v veliki meri empirična, saj ne obstoja konsistentna teorija, ki bi omogočala optimalno izbiro mehanizma oziroma stacionarne faze. Večina proizvajalcev HPLC opreme (Waters, LDC, Hewlett-Packard, Varian, LKB, Perkin-Elmer itd) in materialov za kromatografijo (Merck, Du Pont, Supelco in drugi) v svojih katalogih in obvestilih (Application Notes) navajajo separacijske pogoje za skupine in posamezne spojine v različnih vzorcih. Ti podatki so lahko dobro vodilo za začetek ali rutinsko delo. Za boljše razumevanje mehanizmov separacije in optimizacijo kromatografskih pogojev v HPLC pa je potreben študij bogate literature s tega področja.

Detektorji

Običajno uporabljamo pri HPLC pretočne detektorje. Da zmanjšamo razširitev ozkih vrhov, uporabljamo pri teh detektorjih celice z majhnim volumnom (10 μl ali manjše).

Glavne zahteve so: visoka občutljivost, visoko dinamično območje in linearnost v širokem območju. Večina detektorjev, ki jih uporabljamo pri HPLC, je manj občutljiva kot so GC detektorji in daje običajno skope informacije o strukturi (UV in fluorescenčni spektri), zato je problem identifikacije še vedno vezan (podobno kot pri TLC in GC) na masni, infrardeči in NMR spektrometer.

V tabeli 3.2. so navedene glavne karakteristike najbolj značilnih detektorjev za HPLC (spektrofotometer-SF, fluorimeter, refraktometer-RI, elektrokemični detektor-EC).

Tabela 3.2. Primerjava HPLC detektorjev

Parameter	SF	RI	Fluorescenčni	EC
specifičnost občutljivost gradientna tehnika omejitev	selektiven 10^{-9} možna topilo	univerzalen 10^{-7} - T odvisnost	selektiven 10^{-10} možna din. območje	selektiven 10^{-9} možna adsorpcija topila