

KROMATOGRAFIJA

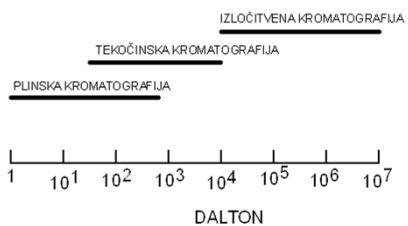
Kromatografija

Kromatografija vključuje postopke separiranja in/ali določitve kemijskih spojin (od najmanjših plinskih molekul do bioloških velemolekul)

Področja uporabe:

- Kemije naravnih spojin,
- Farmacija,
- Medicina
- Raziskave v okolju.

Kromatografija



Kromatografija

Kromatografska separacija je posledica razlik v hitrosti potovanja posameznih komponent skozi kromatografsko kolono pod vplivom mobilne faze (plin, tekočina) zaradi selektivnega zadrževanja (retencije) komponent na stacionarni fazi (trdna površina ali nemobilna tekočina).

Kromatografija

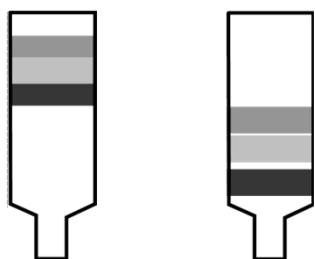
Kromatografija

»barva« »zapis«

Cvet 1906:

Razvil je metodo za ločevanje rastlinskih barvil (pigmentov) z uporabo kolon, napoljenih s CaCO_3 . Po dodatku rastlinskega ekstrakta je z izpiranjem kolone z organskim topilom ločil več barvnih pasov.

Ločevanje na koloni



Ločevanje na koloni

- animacija

Kromatografija

Separacijski proces: komponente vzorca potujejo z mobilno fazo skozi stacionarno fazo.

Potekajo lahko različni procesi:

- Površinska adsorpcija
- Porazdelitev
- Raztapljanje
- Ionska izmenjava

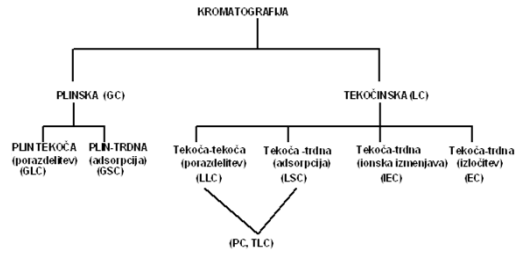
.....

Kromatografija

DELITEV KROMATOGRFSKIH METOD
(glede na stacionarne in mobilne faze):

- PLINSKA KROMATOGRAFIJA (GC)
- TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA (LC)

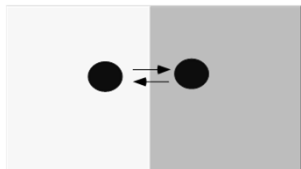
Delitev kromatografskih metod



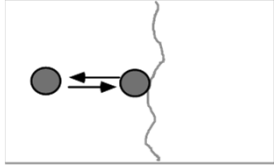
PLINSKA KROMATOGRAFIJA:

- *Porazdelitvena kromatografija plin-tekoče (GLC - Gas Liquid Chromatography)*
- *Adsorpcijska kromatografija na trdnih sorbentih (GSC - Gas Solid Chromatography)*

Porazdelitvena kromatografija



Adsorpcijska kromatografija



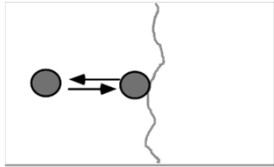
Tenkoplastna kromatografija



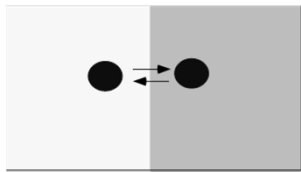
TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA:

- *Adsorpcijska kromatografija (LSC - Liquid Solid Chromatography)*
- *Porazdelitvena kromatografija (LLC - Liquid Liquid Chromatography)*
- *Ionska kromatografija (IC - Ion Chromatography)*
- *Izločitvena kromatografija (Size Exclusion Chromatography)*
- *Gelpermeation, Gel - filtration Chromatography)*

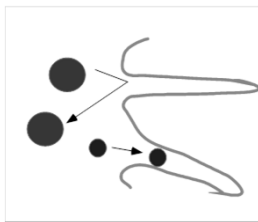
Adsorpcijska kromatografija



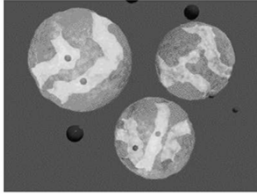
Porazdelitvena kromatografija



Izločitvena kromatografija



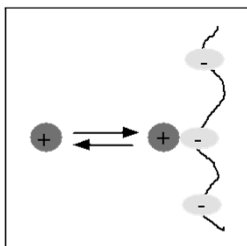
Izključitvena kromatografija



Izključitvena kromatografija

animacija

Ionsko izmenjevalna kromatografija



Separiranje na koloni

Vzrok zadrževanju določene komponente na koloni je porazdelitev topljenca med stacionarno in mobilno fazo.

Separacija na koloni

Osnove teorije separacije na koloni

Parametri:

- Retencijski čas (t_r) - čas zadrževanja komponente na koloni
- Retencijski volumen (V_r)
- Število teoretskih podov (N) – zmogljivost kolone
- Kapacitivnost kolone
- Porazdelitveno razmerje kolone (k')
- Selektivnost (α).

Teorije separiranja

Teorije:

Plate theory:

1941 Martin, Synge: Glede na naravo interakcije med topljencem in obema fazama sta kromatografskim metodam najbližji separacijski metodi ekstrakcija tekoče-tekoče in destilacija (porazdelitev topljenca med fazama).

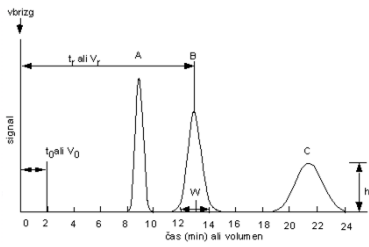
Rate theory:

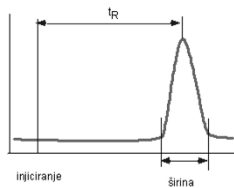
1956 Deemter: Temelji na dinamiki

Retencijski čas

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

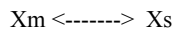
t_0 je čas, ki je potreben za prehod mobilne faze po enaki poti.





Porazdelitveni koeficient (K_D)

Vsaka komponenta X se porazdeli med stacionarno in mobilno fazo



Ravnotežna konstanta-Porazdelitveni (termodinamski) koeficient

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

Kapacitivnost - K' ; retencijski faktor

Kapacitivnost (porazdelitveno razmerje)

$K' = (\text{štev. molov X v stac. fazi})/(\text{štev. molov X v mob. fazi})$

$$K' = V_s \cdot [X]_s / V_m \cdot [X]_m = K_D \cdot V_s / V_m$$

$$K' = (V_R - V_m) / V_m = (t_R - t_0) / t_0 = t'_R / t_0$$

V_Rretencijski volumen komponente

V_mmrtvi volumen

Učinkovitost kolone ('column efficiency') - razširitev pasov

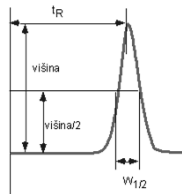
Učinkovitost kolone kvantitativno izrazimo s številom teoretskih podov N ('Theoretical Plates').

To število pomeni, kolikokrat se topljenec porazdeli med stacionarno in mobilno fazo pri prehodu skozi kolono :

$$N = L/H = 16 (t_R/w)^2$$

Učinkovitost kolone-izračun N

$$N = L/H = 16 (tr/w)^2$$



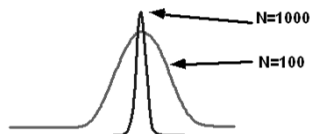
Teoretska višina poda - H

Karakteristka kolone, ki izhaja iz teorije destilacije. Čim manjši je ta parameter, učinkovitejša je kolona

$$H = L/N$$

L... Dolžina kromatografske kolone

Učinkovitost kolone



Lastnosti kromatografske kolone

van Deemter-jeva enačba:

$$H = A + B/v + Cv$$

A - naključna (vrtinčasta) difuzija med delci stacionarne faze (»Eddy« difuzion)

B - vzdolžna difuzija

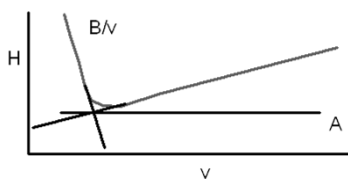
C - masni prenos med fazami

v - hitrost mobilne faze

Koeficienta B in C sta odvisna od hitrosti mobilne faze

van Deemter-jeva enačba

$$H = A + B/v + C \cdot v$$



Van Demmterjevi koeficienti A

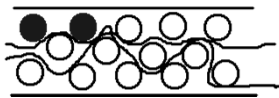
Koeficient A je predvsem odvisen od načina polnjenja kolone

Na koeficient A vpliva velikost delcev polnila in način polnjenja (zmanjševanje »slepih prostorov« v koloni)

Ko enkrat napolnimo kolono, na koeficient A ne moremo več vplivati!

Širjenje vrhov- naključna difuzija

"Eddy "difusion "Vrtinčasta difuzija"



Van Demmterjevi koeficienti- B

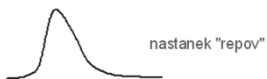
Koeficient B- Vzdolžna difuzija

Širjenje vrhov zaradi difuzije molekul analita v mobilni fazi (Pogostejša je difuzija »nazaj«).

Na koeficient B vpliva pretok. Če povečamo pretok, zmanjšamo difuzijo.

Pretok mora biti čim večji (omejitve instrumenta), pretok pa vpliva tudi na koeficient C (kompromis!)

Širjenje vrhov- nastanek repov



Van Deemterjevi koeficienti - C

Koeficient C – Masni prenos med fazami (prečna difuzija)

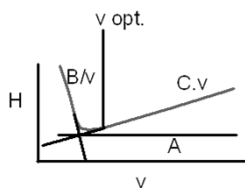
»Debelejše« in viskoznejše stacionarne faze imajo večji C

Zmanjšanje koeficienta C:

- Uporaba »tanjših« stacionarnih faz
- Uporaba manj viskoznih stacionarnih faz
- Uporaba manjšega pretoka (kompromis glede na faktor B)

Optimiranje hitrosti mobilne faze

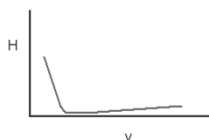
Optimalno hitrost določimo s pomočjo van Deemterjeve enačbe in eksperimentalnih parametrov



Kapilarne kolone

Kapilarne kolone

Vpliv faktorja A in C je majhen
(kolone niso polnjene in plast stacionarne faze je tanka)



Tekočinska kromatografija

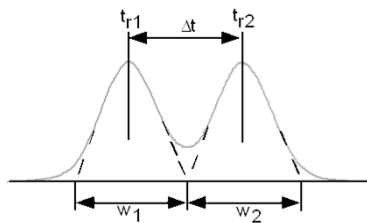
Tekočinska kromatografija:

Navadno so faktorji A, B in C dobri!

A kvalitetna industrijska polnjenja kolon!

B in C sta majhna zaradi manjše difuzije!

Ločljivost



Selektivnost kolone- ločitev pasov

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

$$\alpha = (t_{rB} - t_0) / (t_{rA} - t_0) = K'_B / K'_A = K_{D(B)} / K_{D(A)}$$

Ločljivost

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

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

Kromatografija- kvalitativna analiza

Kromatografija je »slepa« tehnika!

Dokažemo lahko prisotnost neke (neznane) substance, ne moremo pa direktno ugotoviti, za kakšno substanco gre!

Problem detektorjev!

Retencijski podatki (retencijski čas)- tr je značilen za substance – primerjava s standardnimi substancami!

Pomembna je ponovljivost retencijskih parametrov (eksperimentalni pogoji!)

Kromatografija- kvantitativna analiza

Računanje koncentracij

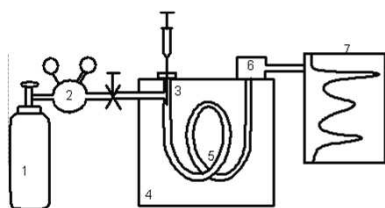
- a) *Umeritev s standardom (eksterni standard)*
- b) *Umeritev z internim standardom*
- c) *Normalizacija površin vrhov*

Plinska kromatografija

Plinski kromatograf

- injektor
- kromatografska kolona
- detektor.

Plinski kromatograf



Plinska kromatografija

Kolone v GC

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

Kolone v GC

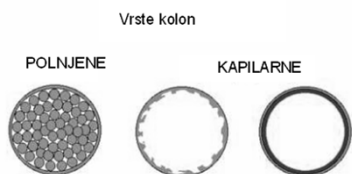
Polnjene kolone ('packed columns'):
kovinske ali steklene z notranjim premerom od 2 - 8 mm in dolžine okrog 3 m. Napolnjene so s trdnim, inertnim polnilom, ki je prevlečen s tekočo stacionarno fazo (običajno od 10-20 %).
Velikost delcev polnila: 100/120 mesh (150 – 125 μm).
Notranji premer kolone: vsaj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

Kolone v GC

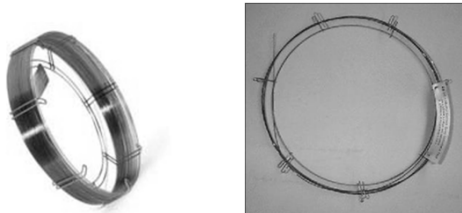
Kapilarne kolone (iz staljenega kvarca ('fused silica')):

Notranji premer manjši od 1 mm, dolžina do 50 m.
Stene so prevlečene z ustrezno stacionarno fazo (1-2 μm) - WCOT ('Wall-Coated-Open-Tubular').
Prednosti: krajši časi analize, večja inertnost, daljša življenjska doba, boljša ponovljivost in visoke vrednosti N (učinkovitost) ter zmanjšano izcejanje ('krvavenje') stacionarne faze.

Kolone v GC



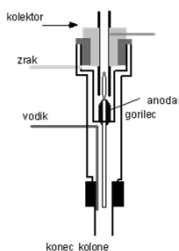
Kapilarne kromatografske kolone



Detektorji za GC

- TCD-Thermal Conductivity Detector
- FPD-Flame Photometric Detector
- PID-Photoionization Detector
- NPD-Nitrogen Phosphorus Detector
- FID-Flame Ionization Detector
- ECD Electron Capture Detector

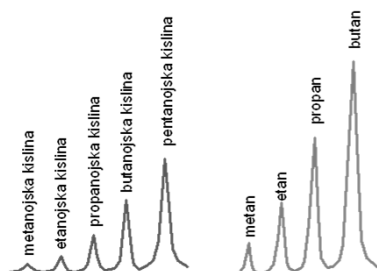
Plamenski ionizacijski detektor



Plamenski ionizacijski detektor

- animacija

Plamenski ionizacijski detektor



ECD detektor

- princip

TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA

HPLC - High Pressure Liquid Chromatography , High Performance Liquid Chromatography)

Princip:

Komponente (topljenec) raztopimo in jih nato pod visokom pritiskom (do 200 barov) potiskamo skozi (kovinsko) kolono s pomočjo mobilne faze.

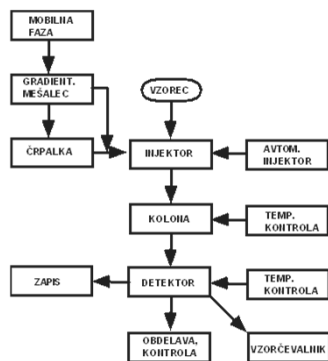
1 bar = 10^5 Pa

1 psi = 6894,76 Pa

TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA

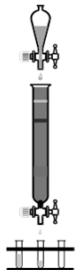
KOMPONENTE HPLC SISTEMA:

- rezervoar z mobilno fazo,
- črpalka,
- injektor,
- kolona z detektorjem in
- rekorder



Klasična kolonska kromatografija

- Na kolono naneseemo vzorec, nato pustimo teči topilo
- Topilo teče zaradi gravitacije
- Zbiramo posamezne frakcije
- Analiziramo posamezne frakcije



HPLC

- Uporabljamo visokotlačno črpalko
- Kolone so polnjene z majhnimi delci
- Uporabimo "on-line" detektor

Mobilna faza

Značilna topila:

ADSORPCIJA/PORAZDELITEV

NORMALNA FAZA: heksan, metilenklorid, kloroform, metanol, acetonitril

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

IONSKA IZMENJAVA: vodne pufrske raztopine

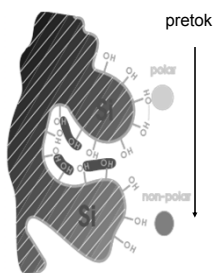
IZLOČITVENA KROMATOGRAFIJA:

tetrahidrofur, kloroform

Vrste HPLC

- Normalna faza (NP)
- Reverzna faza (RP)
- Ionska izmenjava (IEC)
- Kapilarna elektroforeza
- Izključitev

Normalna faza



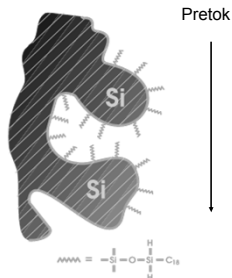
- Polarna stacionarna faza (SiO_2 , Al_2O_3)
- Napolarna mobilna faza (n.pr., heksan, metilen klorid)
- Ločujemo polarne spojine

HPLC z normalno fazo

- Ločevanje temelji na adsorpciji/desorpciji analita na polarno stacionarno fazo
- Primerna za ločevanje izomerov in čiščenje vzorcev
- Voda v mobilni fazi spreminja lastnosti kolone

Reverzna faza

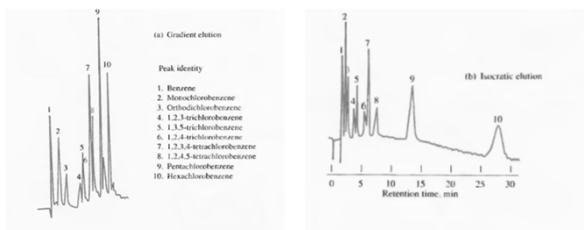
- Napolarna stacionarna faza (n.pr., C₁₈)
- Polarna mobilna faza., (voda, metanol, acetonitril)
- Ločujemo nepolarne spojine



Reverzna faza

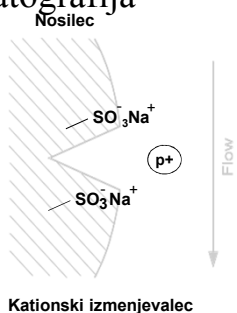
- Ločevanje temelji na porazdelitvi analita med mobilno in stacionarno fazo (hidrofobne interakcije)
- Predvidimo lahko vrstni red elucije
- Primerna za ločevanje majhnih molekul

Izokraska/gradientna elucija



Ionska kromatografija

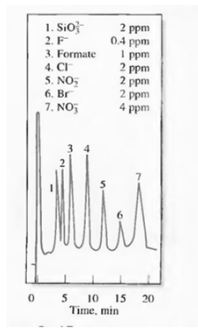
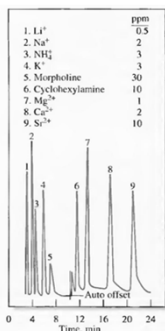
- 2 vrsti: kationska in anionska izmenjava
- Stacionarno fazo predstavljajo ionske skupine, ki so vezane na trdne nosilce
- Ionska mobilna faza (pufer)
- Ločevanje ionskih substanc



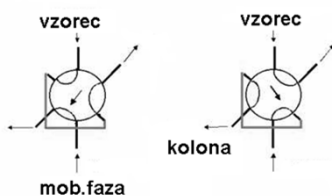
Ionska kromatografija

- Ločevanje temelji na ionskih interakcijah analita z ionskimi skupinami na stacionarni fazi in protiioni v mobilni fazi
- Tipične aplikacije: ločevanje amino kislin, anorganskih ionov (F^- , Cl^- , NO_2^-), polinukleotidov in proteinov

Ionska kromatografija



HPLC-injektor



HPLC črpalke

Zahteve:

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.

HPLC

- črpalka

HPLC kolona

- Dolžina 3-25 cm notranji premer 4,6 mm
- Velikost delcev 3-10 μm
- Pretok: 1-2 ml/min
- Tlak: 500-2000 psi
- 1 ng do 1mg vzorca
- 4000-13000 teoretskih podov
- Cena 150-300 \$
- 500-2000 injeciranj

HPLC-Kolone

Kolona je napolnjena z delci polnila (običajno velikost $<10 \mu\text{m}$), ki so prekriti s stacionarno fazo. Z izbiro ustreznih faz in ostalih pogojev, dosežemo separacijo večkomponentne mašanice v nekaj minutah.

HPLC-Kolone

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

HPLC- kolone

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

HPLC-kolone

Izbira stacionarne faze (polnitve kolone) in mobilne faze je najpomembnejši del separacijskega postopka pri HPLC.
Izbira je v veliki meri empirična.

Podatki iz literature!

HPLC-Detektorji

Detektorji
pretočni detektorji - celice z majhnim volumnom (10 μ l ali manjše).

Zahteve:

- visoka občutljivost,
- visoko dinamično območje in
- linearnost v širokem območju.

HPLC-Detektorji

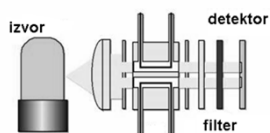
Vrste detektorjev:

- Spektrofotometrični
- Fluorescenčni
- Elektrokemijski (Voltometrični)
- Lomni količnik (Refraktometrični)

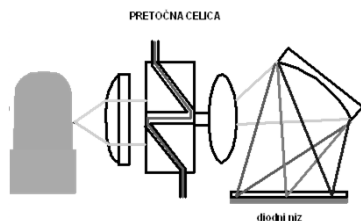
HPLC- Primerjava detektorjev

Lomni količnik	UV/VIS	Fluorescenca
Univerzalnost	Univerzalnost	Selektivnost
(konc. področje) μg	(konc. področje) ng	(konc. področje) $\text{ng} - \text{pg}$
Občutljiv na pretok in temperaturo	Neobčutljiv na pretok in temperaturo	Neobčutljiv na pretok in temperaturo
Snovi, ki ne absorbirajo svetlobe (ogljikovodiki, alifatski amini)	nenasičene aromatske spojine, karbonili...	Konjugirane aromatske spojine, kateholamini, polinukleotidi,....

HPLC fotometrični detektor



HPLC DETEKTOR (Diode array)



HPLC- Ostali detektorji

- ELEKTROKEMIJSKI DETEKTOR
Velika občutljivost, velika selektivnost- analit mora imeti oksidativne ali redukativne funkcionalne skupine; npr. amini, ogljikovihidrati.
- DETEKTOR NA OSNOVI ELEKTRIČNE PREVODNOSTI
Majhna občutljivost
Velika selektivnost (ionske zvrsti!)
Uporaben za ionsko kromatografijo

HPLC-prednosti

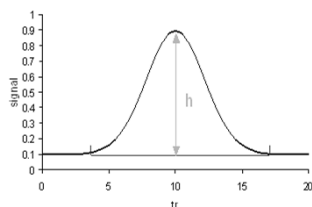
- Velika ločljivost
- Hitrost
- Občutljivost
- Ponovljivost
- Primerja za kvantitativno uporabo
- Možnost avtomatizacije
- Široka možnost uporabe

Identifikacija in kvantitativna analiza pri kromatografiji

Pravila identifikacije: retencijski podatki

1. Če retencijska časa za spojino A in standard nista enaka, potem spojina A ni enaka spojini v standardu.
2. Če je retencijski čas za spojino A enak retencijskemu času za standard, še ne pomeni, da je spojina A enaka spojini v standardu.
3. Če na mestu za spojino A ni kromatografskega vrha, potem se nahaja spojina A v vzorcu pod mejo zaznave.

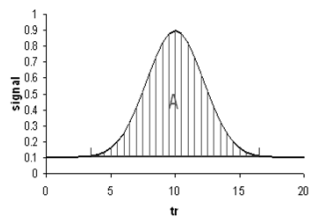
Kvantifikacija na osnovi merjenja višin



$$n = f(h)$$

- napaka 5-10%
- težave pri nizkih in visokih koncentracijah zaradi asimetričnih vrhov

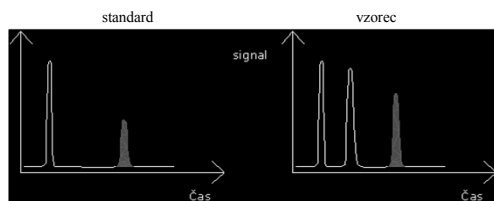
Kvantifikacija na osnovi merjenja površin



$$n = f(A)$$

- napaka 1-2%
- $C = f(A)$ v celotnem koncentracijskem območju

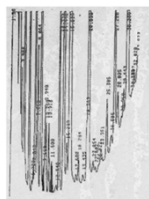
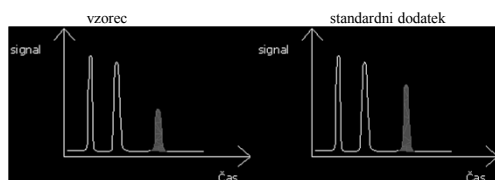
Eksterni standard



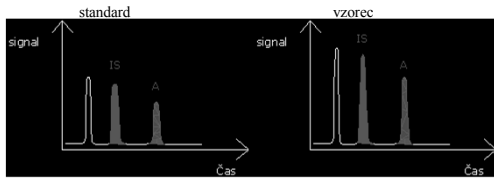
$$m = k \cdot A$$

$$m_{vz} = m_{st} \frac{A_{vz}}{A_{st}}$$

Standardni dodatek



Interni standard



$$m_{A,vz} = K_{A,vz} * A_{A,vz}$$

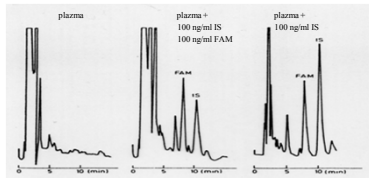
$$m_{IS,vz} = K_{IS,vz} * A_{IS,vz}$$

$$K_{A,vz} = \frac{m_{A,vz}}{A_{A,vz}}$$

$$K_{IS,vz} = \frac{m_{IS,vz}}{A_{IS,vz}}$$

$$m_{A,vz} = \frac{m_{IS,vz} * A_{A,vz} * K_{A/IS}}{A_{IS,vz}} = \frac{m_{A,st} * A_{A,vz} * A_{IS,st}}{A_{A,st} * A_{IS,vz}}$$

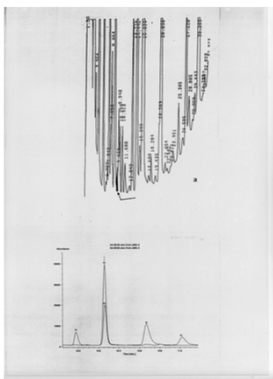
Primer internega standarda: določevanje famotidina



$A_{FAM,st} = 4320$
 $A_{FAM,vz} = 4365$
 $A_{IS,st} = 6015$
 $A_{IS,vz} = 11015$

$$m_{FAM,vz} = \frac{m_{FAM,st} * A_{FAM,vz} * A_{IS,st}}{A_{FAM,st} * A_{IS,vz}} = \frac{100 * 4365 * 6015}{4320 * 11015} = 55.2 \text{ ng / ml}$$

Izotopsko razredčenje



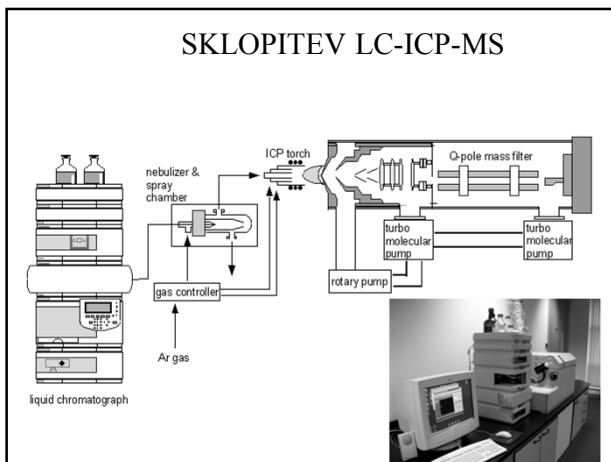
Potrebna je uporaba MS detektorja.

Uporablja se označene spojine s stabilnimi izotopi ^{18}O , ^{13}C , ^{15}N , ^{34}S .

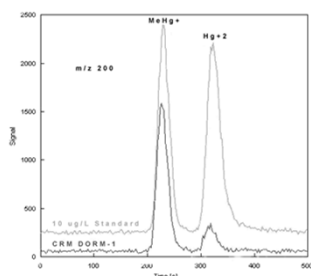
Kvantitativno vrednotenje kromatogramov

- Identifikacija na osnovi retencijskih časov je zadostna tehnika pri ciljni analizi, pri neciljni analizi pa je potrebna sklopitev s strukturno selektivnimi detektorji.
- Pri HPLC tehniki je možno delo z eksternim standardom, pri plinski kromatografiji pa je potrebno uporabiti interni standard zaradi napak pri injiciranem volumnu.
- Pri bolj zahtevnih analiznih postopkih z dolgotrajno pripravo vzorca je uporaba internega standarda nujna.

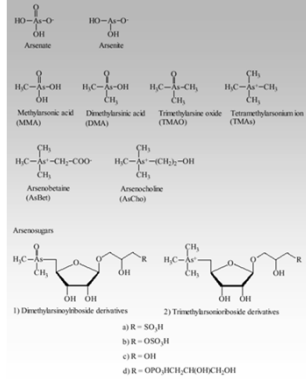
SKLOPITEV LC-ICP-MS



ICP-MS speciacijska analiza: Ločitev metil in elementarnega Hg

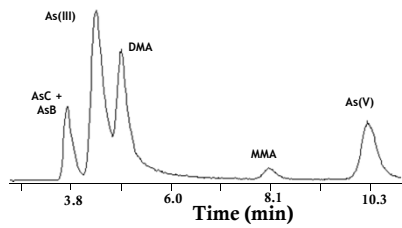


Primer speciacije As zvrsti z LC-ICP-MS

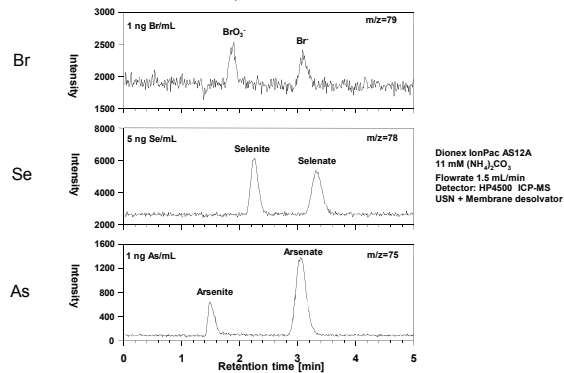


Toksične! Anorganske zvrsti As so večinoma toksične, organske zvrsti pa so človeku neškodljive.
Netoksične
? Potencialna toksičnost arsenoslado rjev še ni dokazana.

ICP-MS speciacijska analiza: Ločitev As zvrsti (sklopitev LC -ICP-MS)



IC-ICP-MS: ločitev P, Se in As zvrsti zvrsti



Courtesy Dr Walter Goessler, U. Graz, Austria
