

Separacijske metode v kemijski analizi

Literatura:

**D.C.Harris: QUANTITATIVE CHEMICAL ANALYSIS,
Freeman 1998**

**D.A.Skoog, J.J.Leary: INSTRUMENTAL ANALYSIS,
Saunders College Publishing 1992**

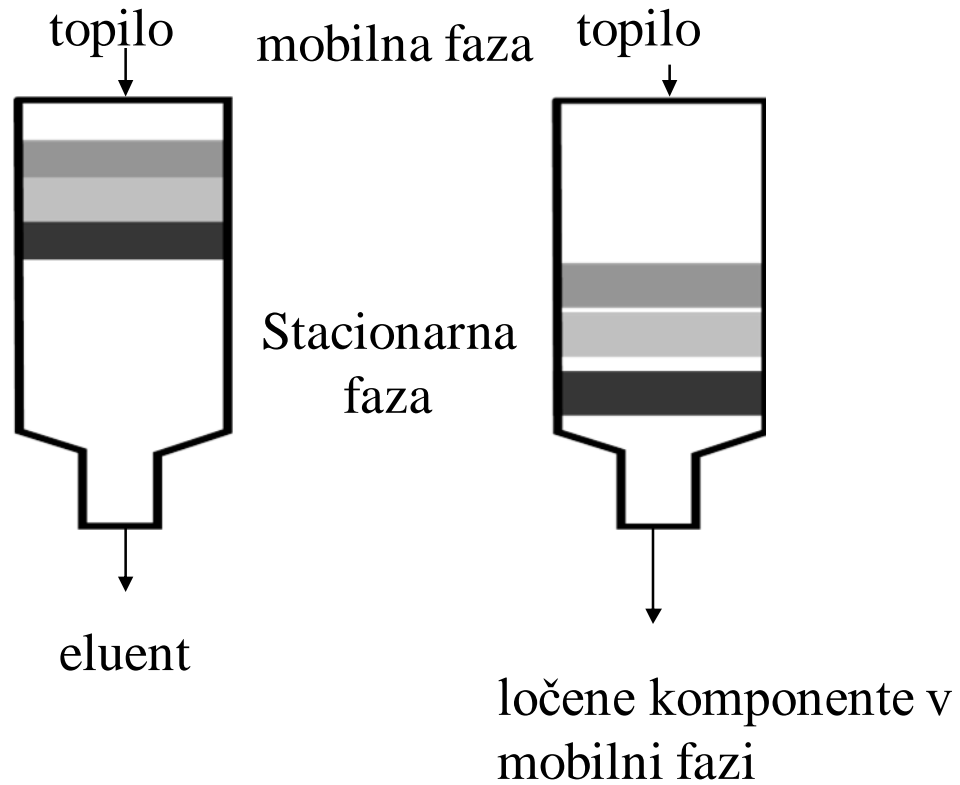
Separacijske metode v kemijski analizi

Sočasno določanje več spojin

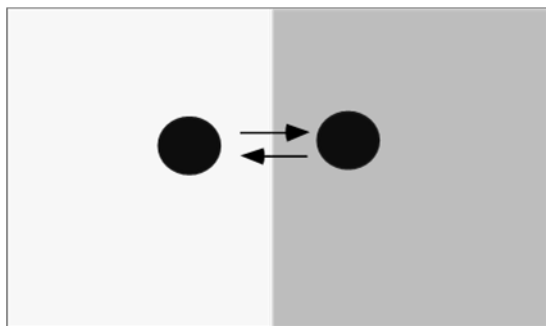
- Kromatografija: separacija
identifikacija
kvantifikacija
- Spektroskopske metode (določevanje posameznih spojin):
 - molekulske
 - atomske
 - masna spektrometrija
 - infrardeča
 - NMR

Kromatografija

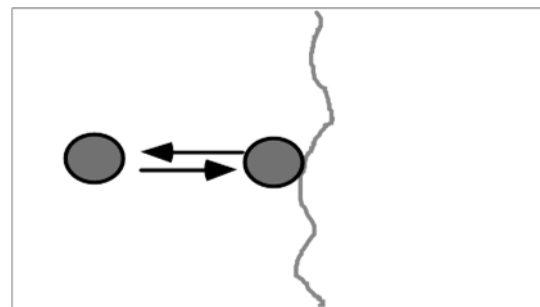
Interakcija med molekulami topljenca in stacionarno fazo



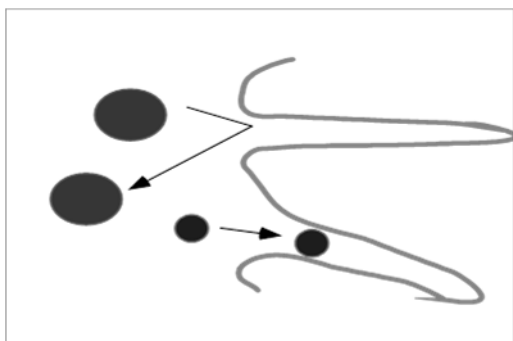
Princip kromatografskih separacij



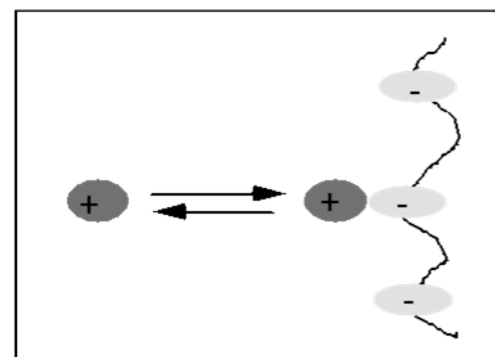
porazdelitev



adsorpcija



izključitev

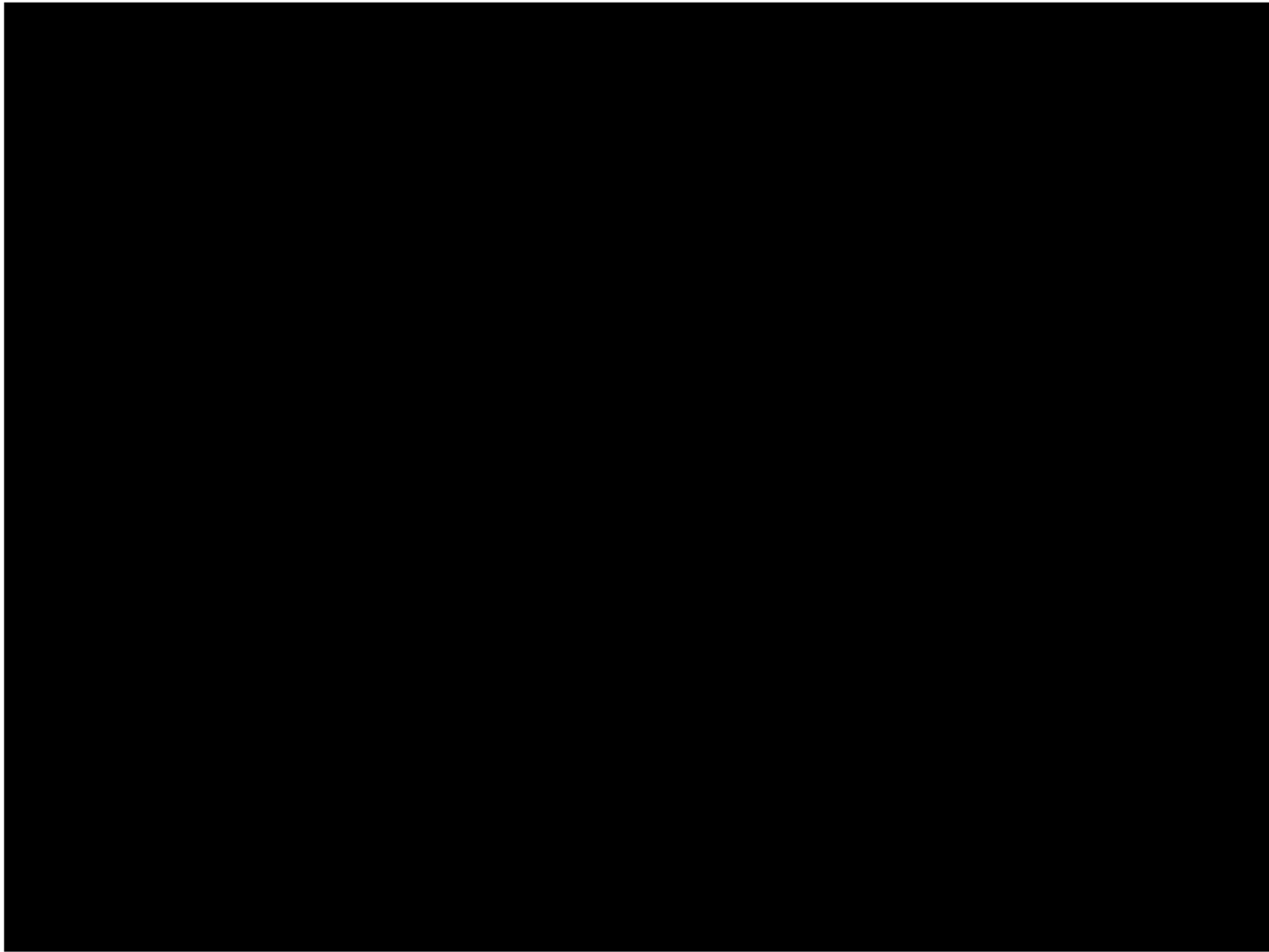


ionska izmenjava

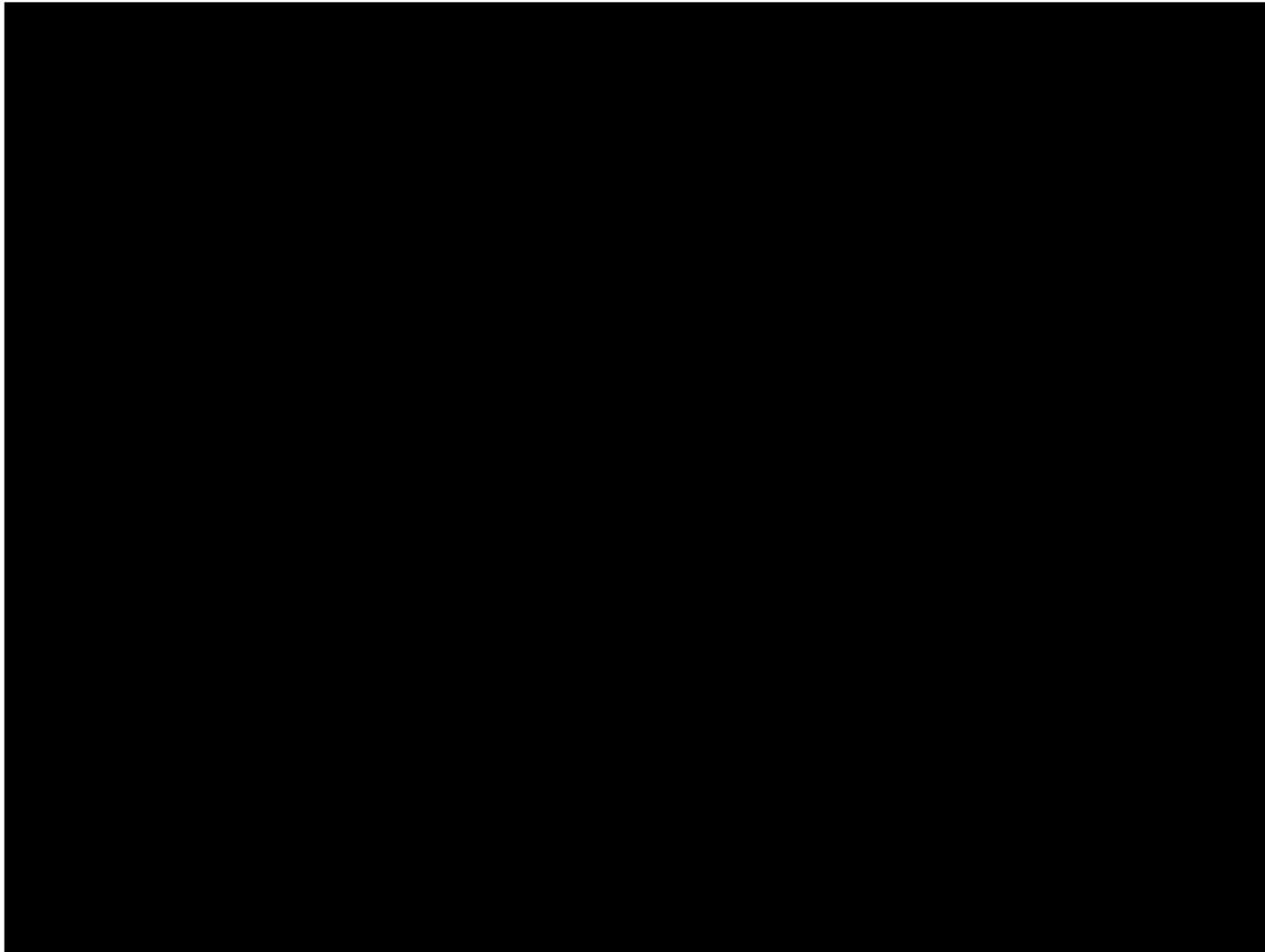
Princip kromatografskih separacij

- **Porazdelitvena kromatografija**
- **Adsorptivna kromatografija**
- **Velikostno izključitvena kromatografija**
- **Ionska izmenjava**
- **Kolonska kromatografija, tenkoplastna kromatografija**

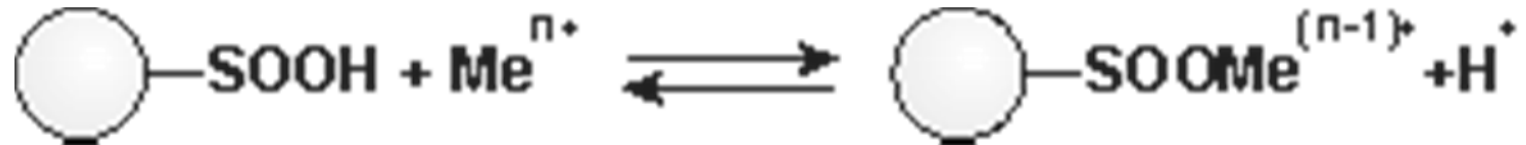
Porazdelitvena kromatografija



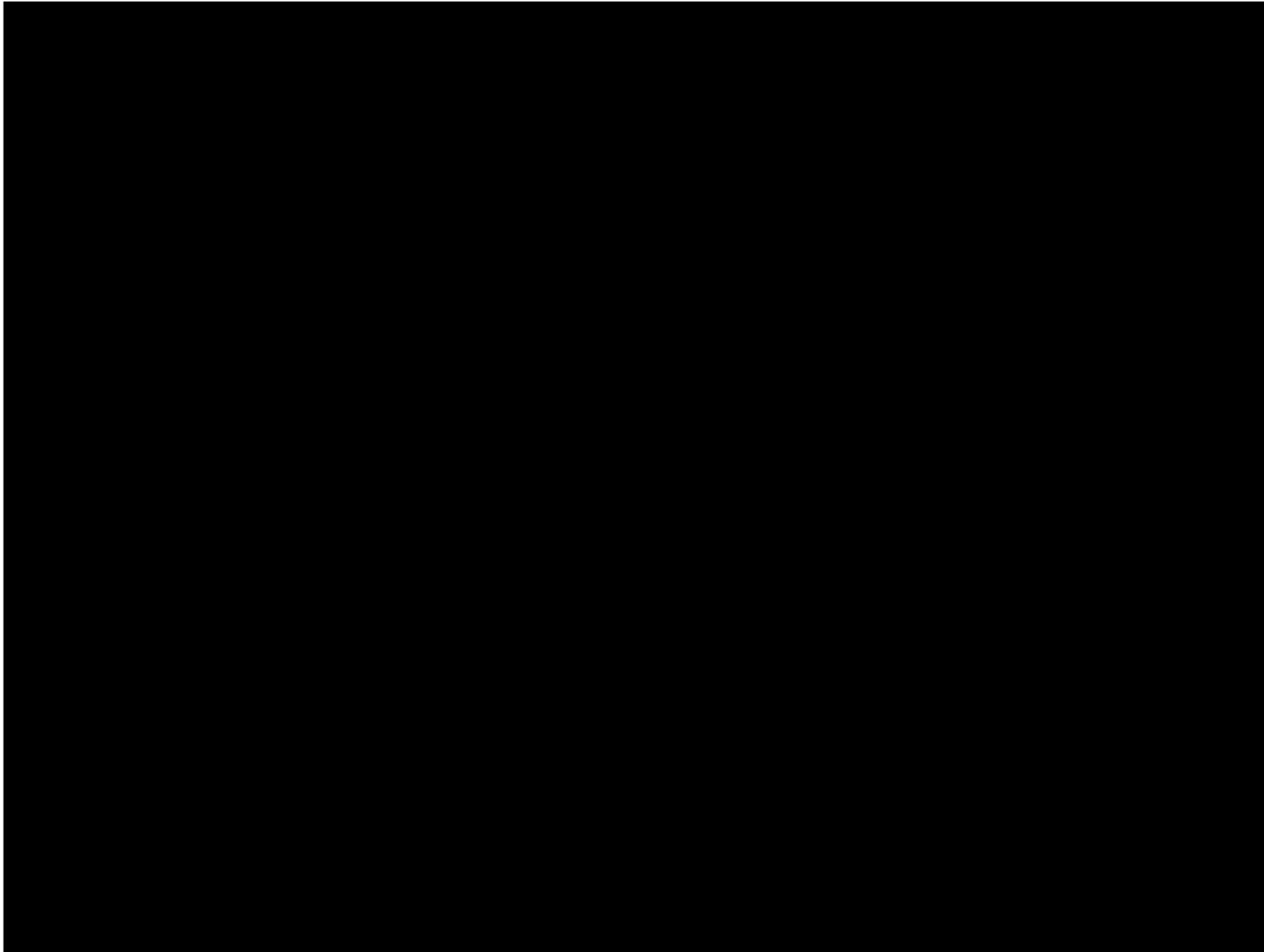
Adsorpcijska kromatografija



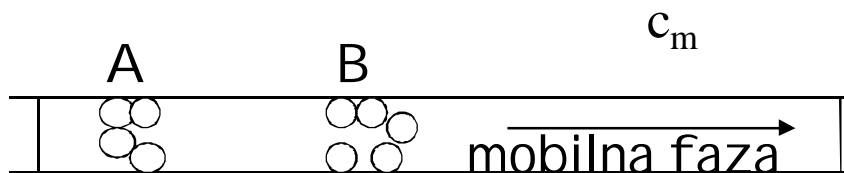
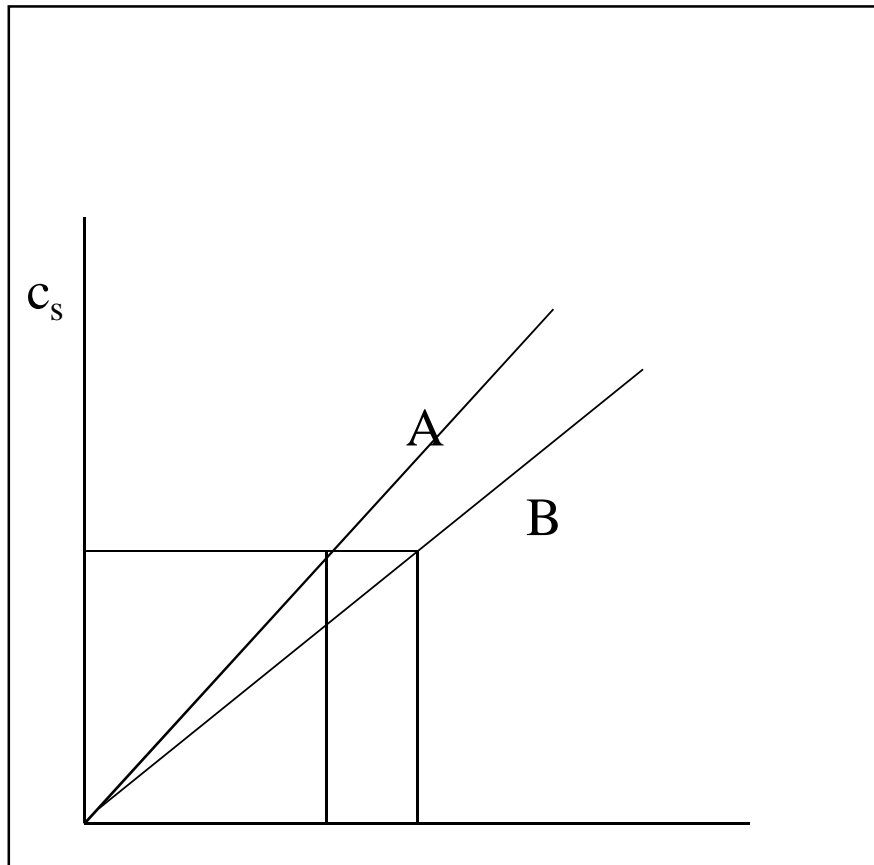
Ionska kromatografija



Izključitvena kromatografija



Porazdelitvene/adsorpcijske izoterme



Štart kromatografska pot konec

Spojine se različno porazdeljujejo med dve fazi zaradi različnih K

$K = c_s/c_m$ (porazdelitveni ali adsorpcijski koeficient)

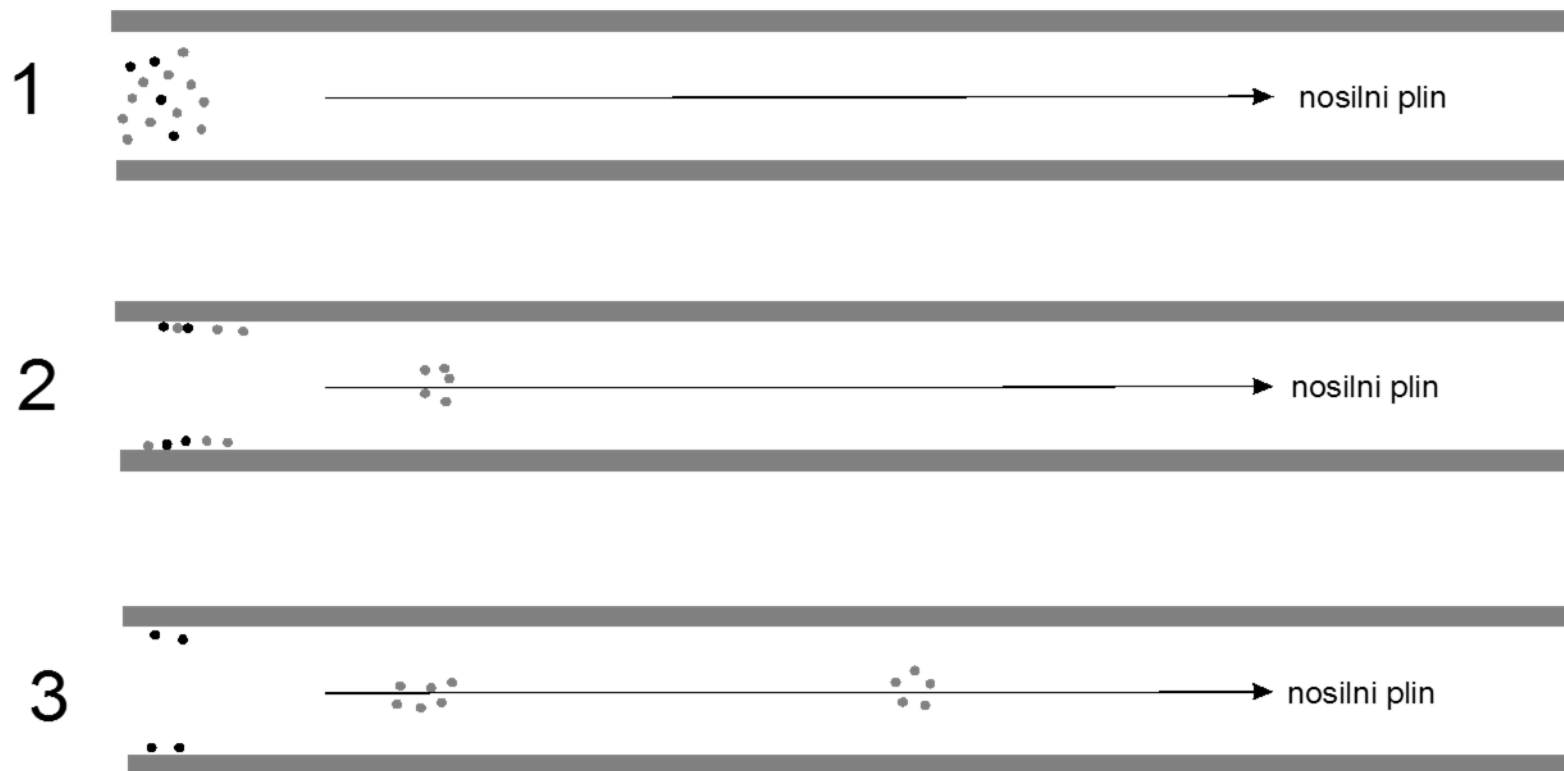
Linearno

Nelinearno področje izoterm

Vpliv na K ?

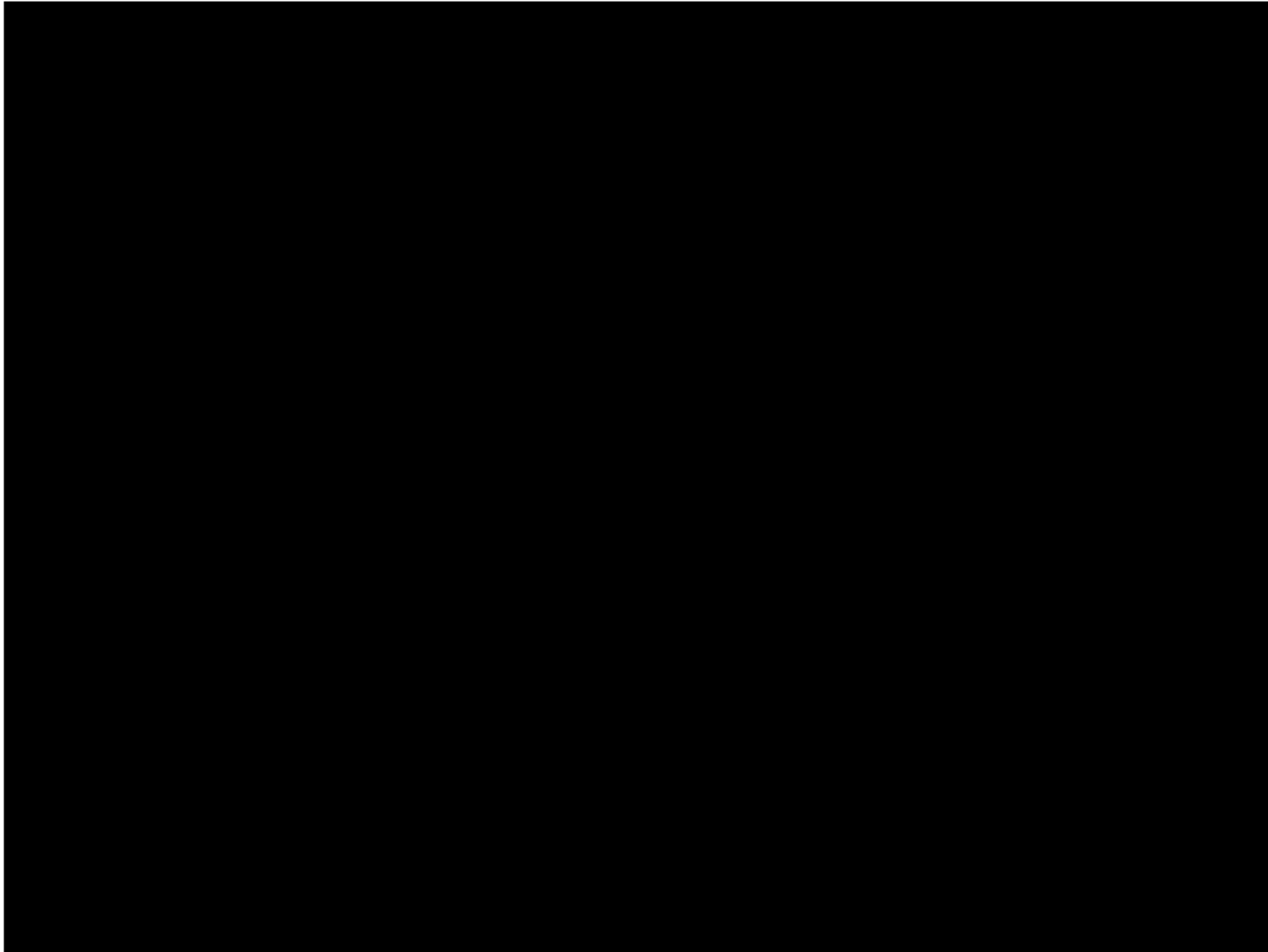
Večja interakcija s stacionarno/mobilno fazo

Kako se spojine ločujejo na kromatografski koloni?

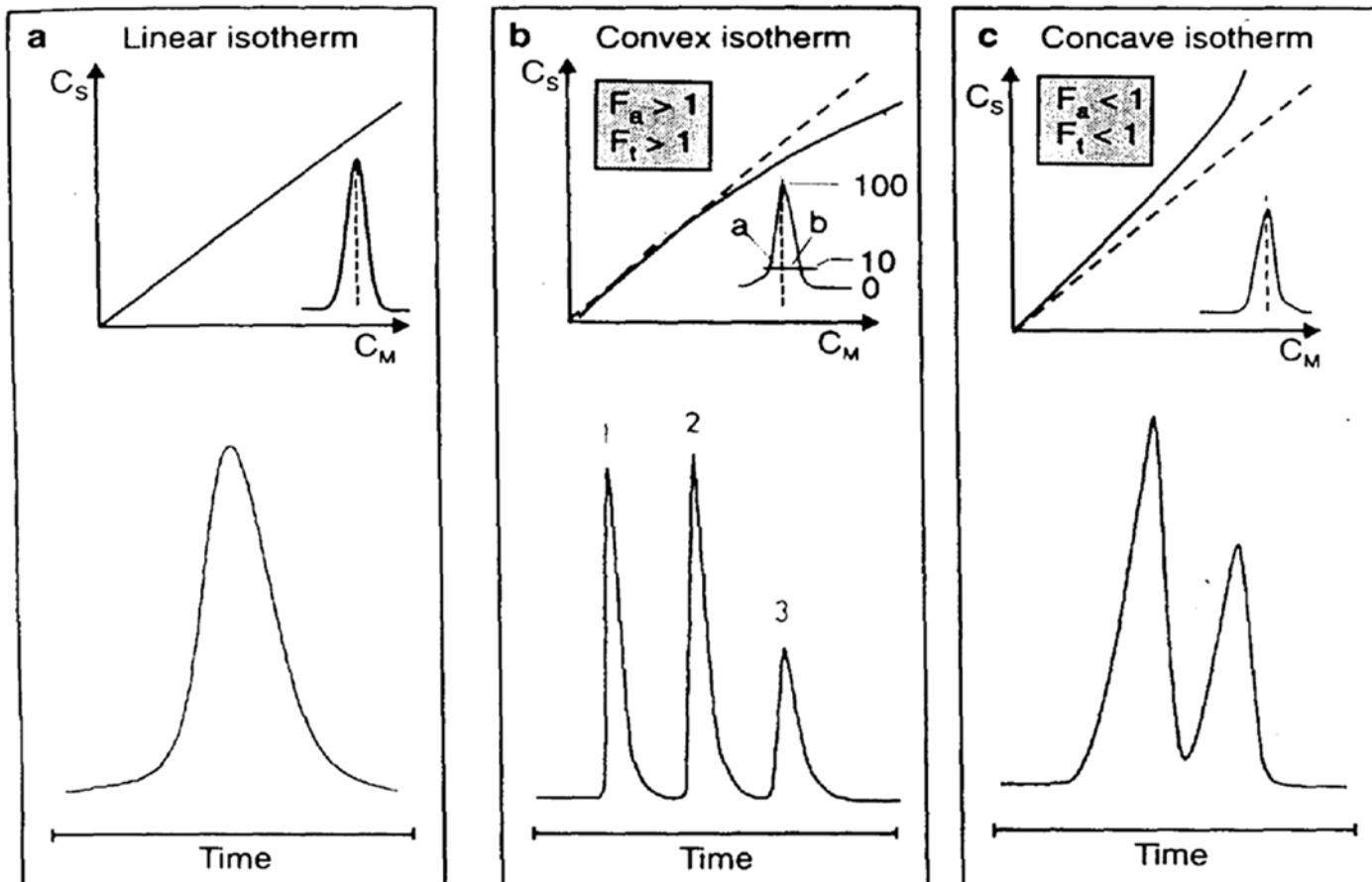


Proces izmenjave se vzdolž kolone N-krat ponovi

Mehanizem separacije



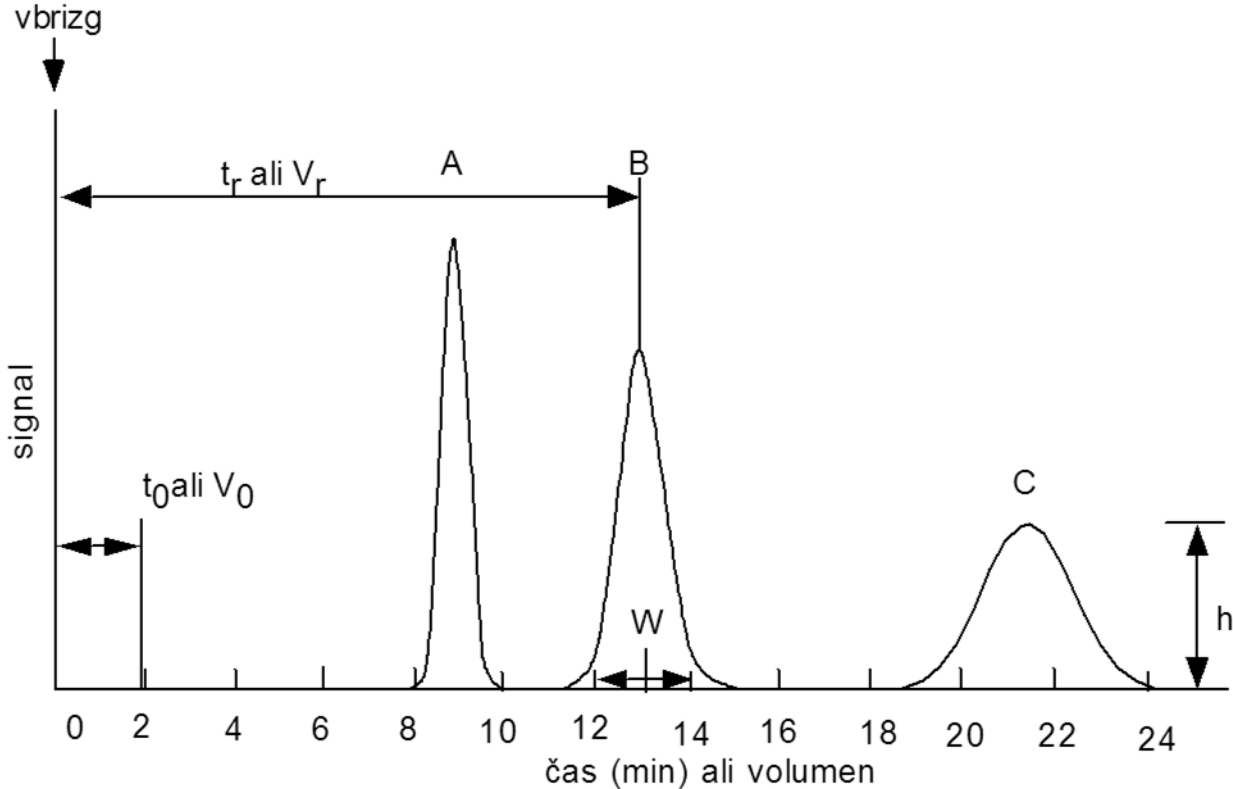
Porazdelitvene/adsorpcijske izoterme vpliv na obliko kromatografskega vrha



Neidealni kromatografski vrhovi

- nelinearno področje porazdelitvenih izoterm
- nepravilna izbira stacionarne/mobilne faze
- napake v injektorskem delu
- napake v detektorskem delu

Kromatogram



Kromatografski parametri -kromatogram

- Retencijski čas - t_r
- Mrtvi čas - t_m **določanje !**
- Korigiran retencijski čas - t_r'
- Mrtvi volumen - V_m
Retencijski volumen - V_r
- Porazdelitveni koeficient K_D
- Kapacitivni faktor - k'
- Relativna retencija - α
- Višina teoretskega poda - H
- Število teoretskih podov - N -preverjanje kvalitete kolone!
- Ločljivost - R

Kromatografski parametri

Porazdelitveni (termodinamski) koeficient K_D



$$V_r = \rho t_r \quad \rho - \text{pretok (mL/min)} \quad V_m = \rho t_m$$

$$V_r [X_m] = V_m [X_m] + V_s [X_s]$$

$$K_D = [X_s]/[X_m] = k' V_m / V_s$$

Kromatografski parametri

Kapacitivni faktor (kapacitivnost) k'

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

$$k' = V_s \cdot [X]_s / V_m \cdot [X]_m = K_D \cdot V_s / V_m \quad V_m / V_s = \beta$$

β -fazno razmerje

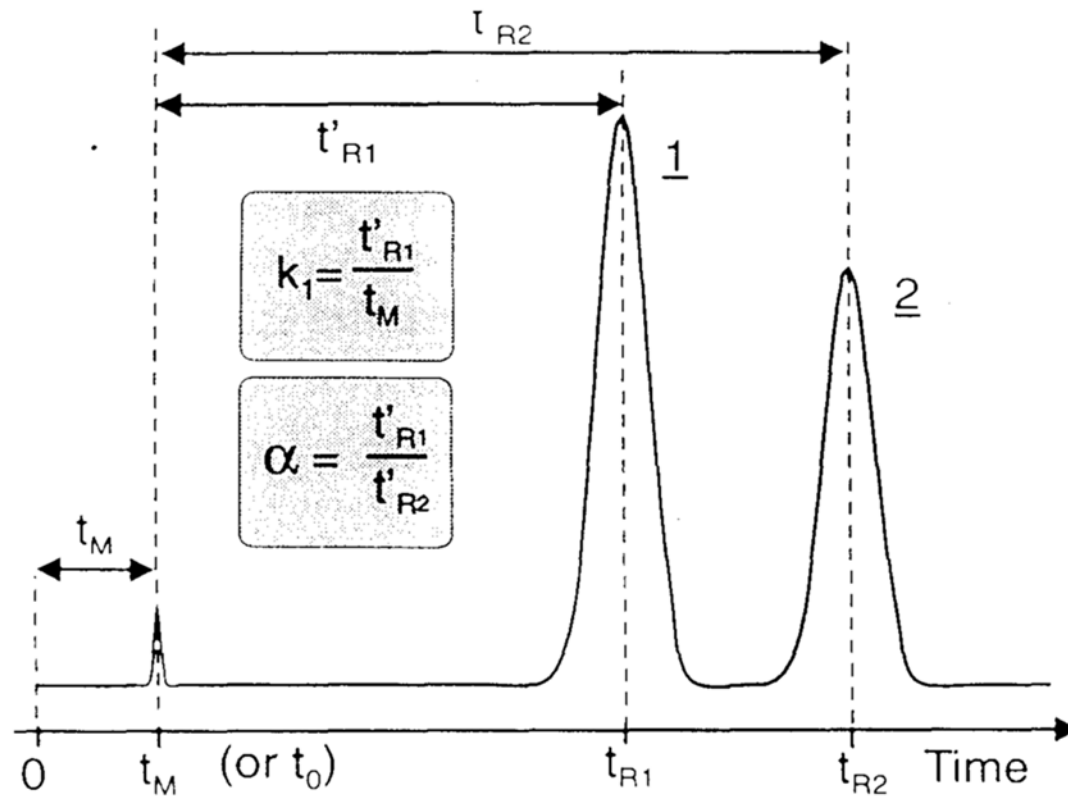
$$k' = (t_r - t_m) / t_m = (V_r - V_m) / V_m$$

$t_r - t_m = t_r'$ - čas zadrževanja snovi v stacionarni fazi

Kromatografski parametri

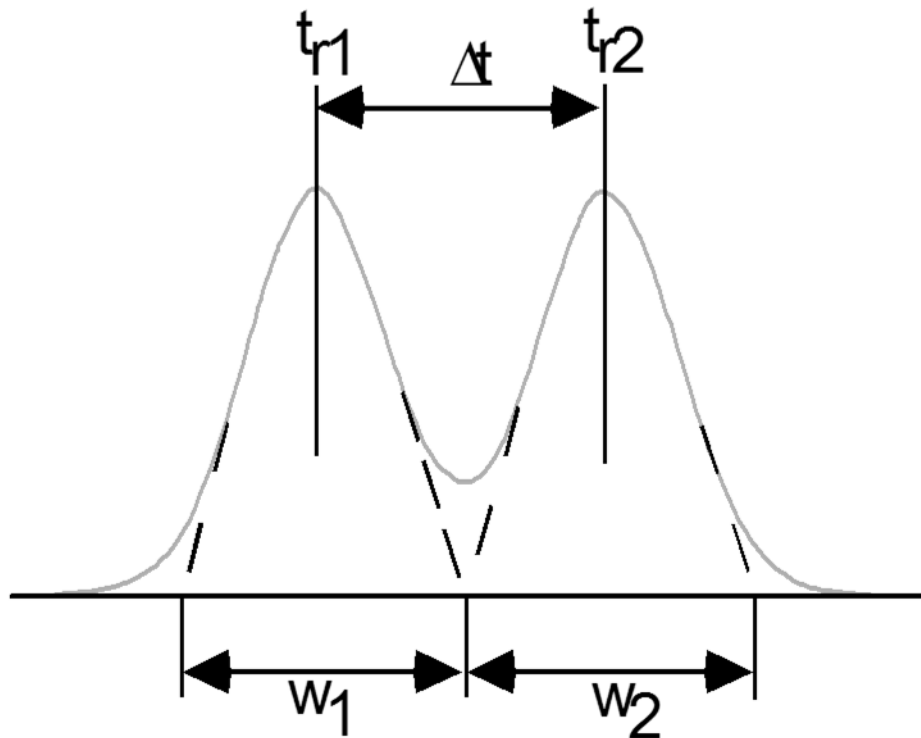
Selektivnost α se nanaša na zmožnost kolone, da loči dve komponenti - separacijski faktor

$$\alpha = (t_{rB} - t_0) / (t_{rA} - t_0) = k'_B / k'_A = K_{D(B)} / K_{D(A)} \quad \alpha > 1$$



Ločljivost

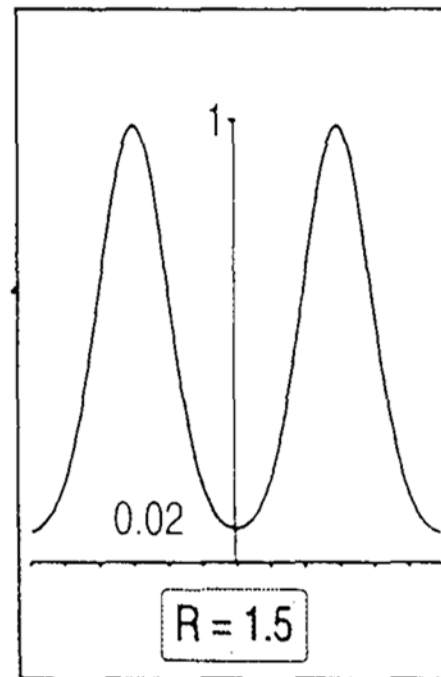
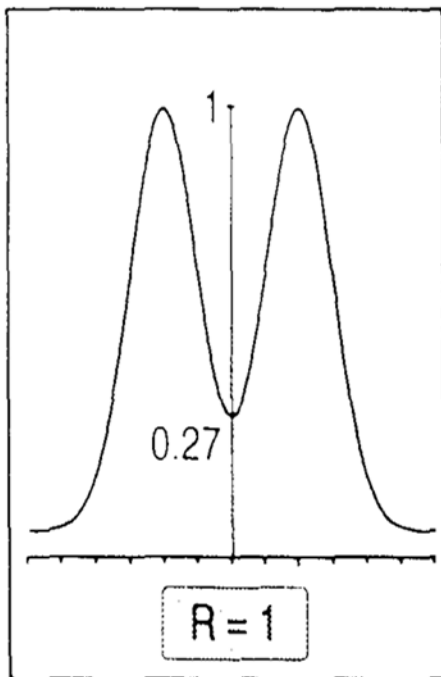
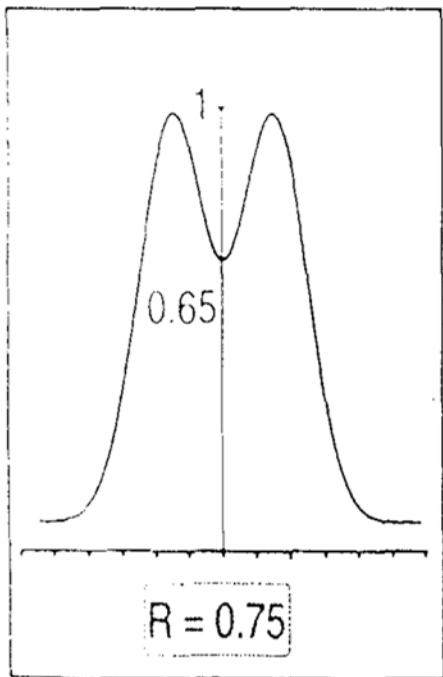
$$R = 2\Delta t_r / (w_1 + w_2)$$



$$R = \frac{N^{1/2} (\alpha - 1) k'_2}{4 \alpha (1 + \bar{k}')}$$

$$N = L/H = 16 (t_r/w)^2 = 5,55 (t_r/w_{1/2})^2$$

Ločljivost



Kvaliteta kromatografske separacije

GC H 0,1 - 1mm

HPLC H 10 μ m

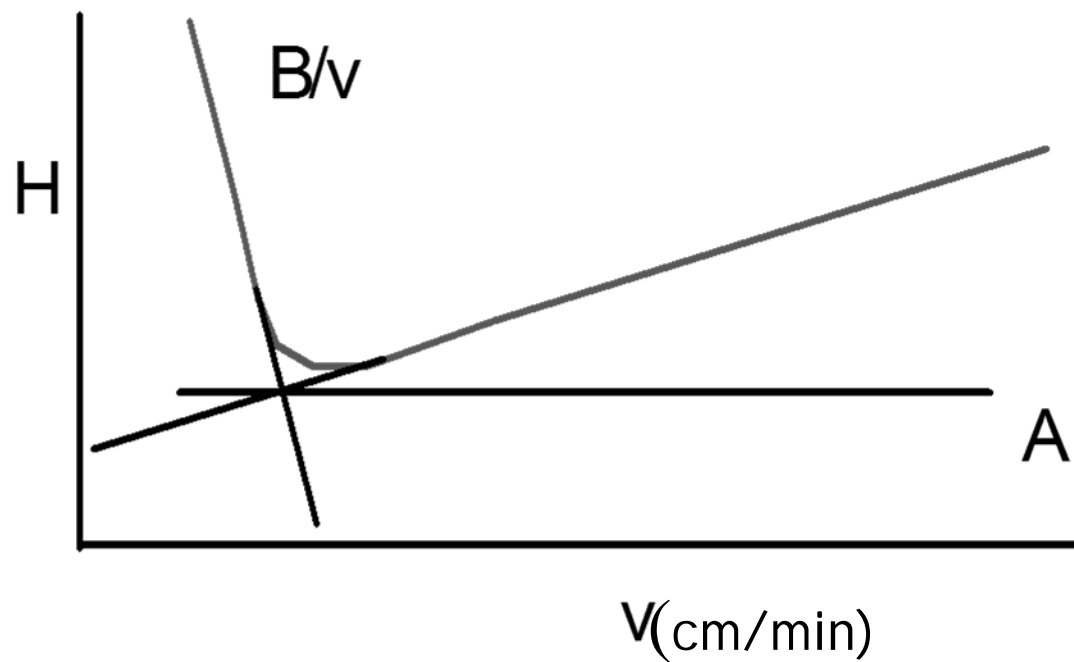
CE H <1 μ m

Karakteristika kolone in spojine - testiranje kolone

Širjenje kromatografskih vrhov

Uporaba mobilne faze pri optimalni hitrosti

$$H = A + B/v + C.v$$



Razširitev kromatografskih vrhov

$$H = A + B/v + Cv \quad (\text{van Deemter})$$

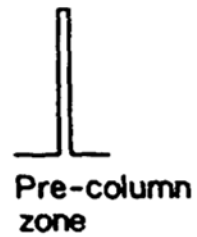
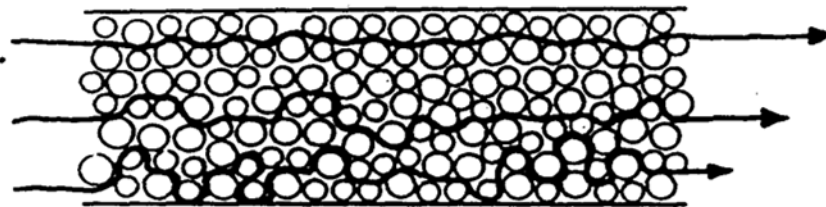
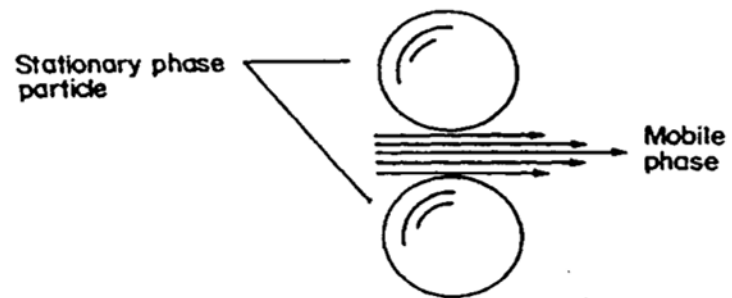
A - naključna difuzija med delci stacionarne faze(»Eddy« difusion)-lastnosti polnila

B - vzdolžna difuzija

C - prečna difuzija
(tanki filmi stacionarne faze)

v - hitrost mobilne faze (cm/min)

Vpliv polnila na H - monolitske kolone



Razširitev kromatografskih vrhov pri GC

A - uporaba kapilarnih kolon

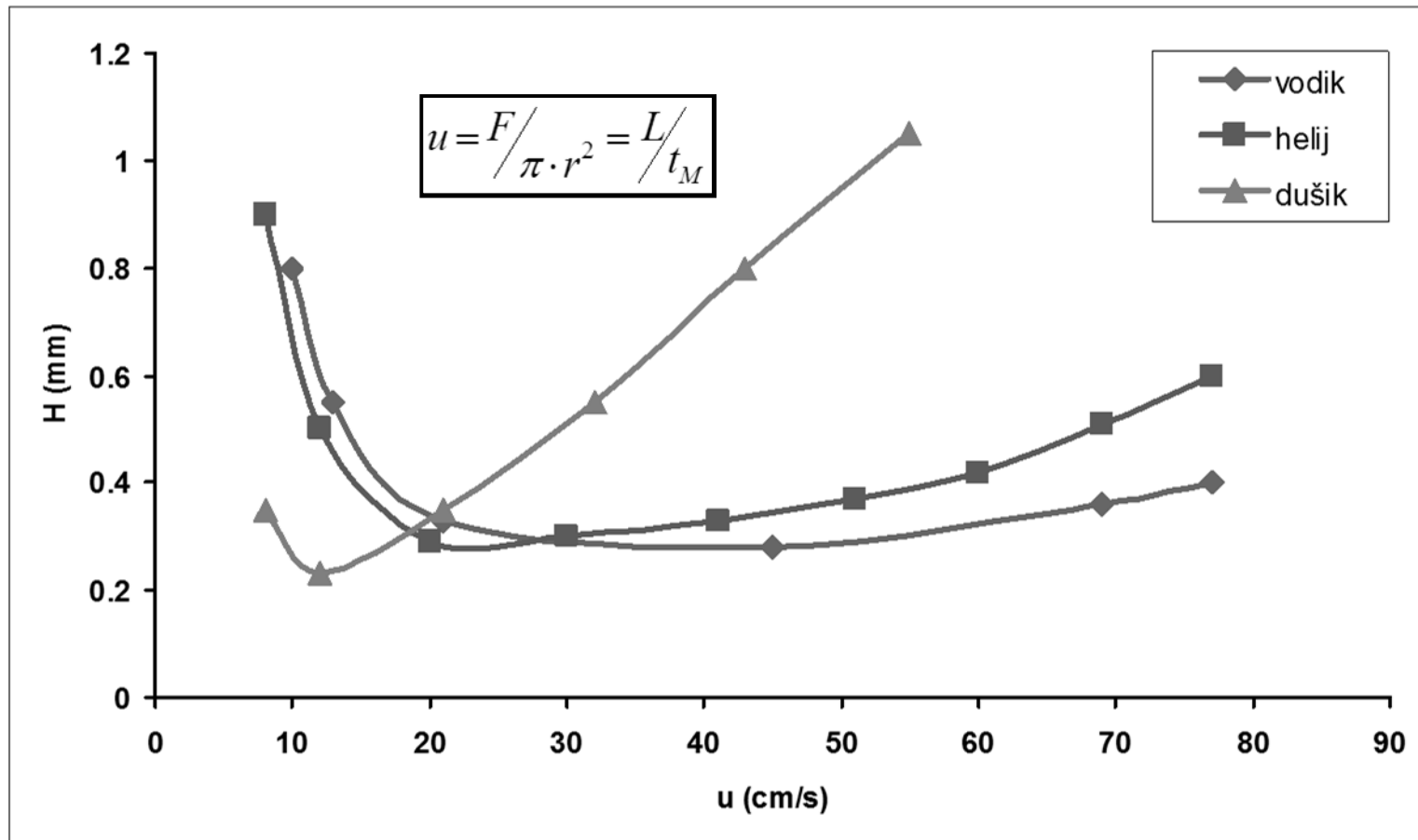
$$\begin{aligned} B &\sim 2D_g & D_g &\sim M^{-1} (0,01-1\text{cm}^2/\text{s}) \\ v &= 20\text{cm/s} = 200\text{mm/s} \\ B/v &= 2 \times 1,0\text{mm}^2/200\text{mm} = 0,01\text{mm} \end{aligned}$$

$$C = C_g + C_l \quad C_l < C_g, \text{ ker stacionarna faza v tankem filmu;}$$

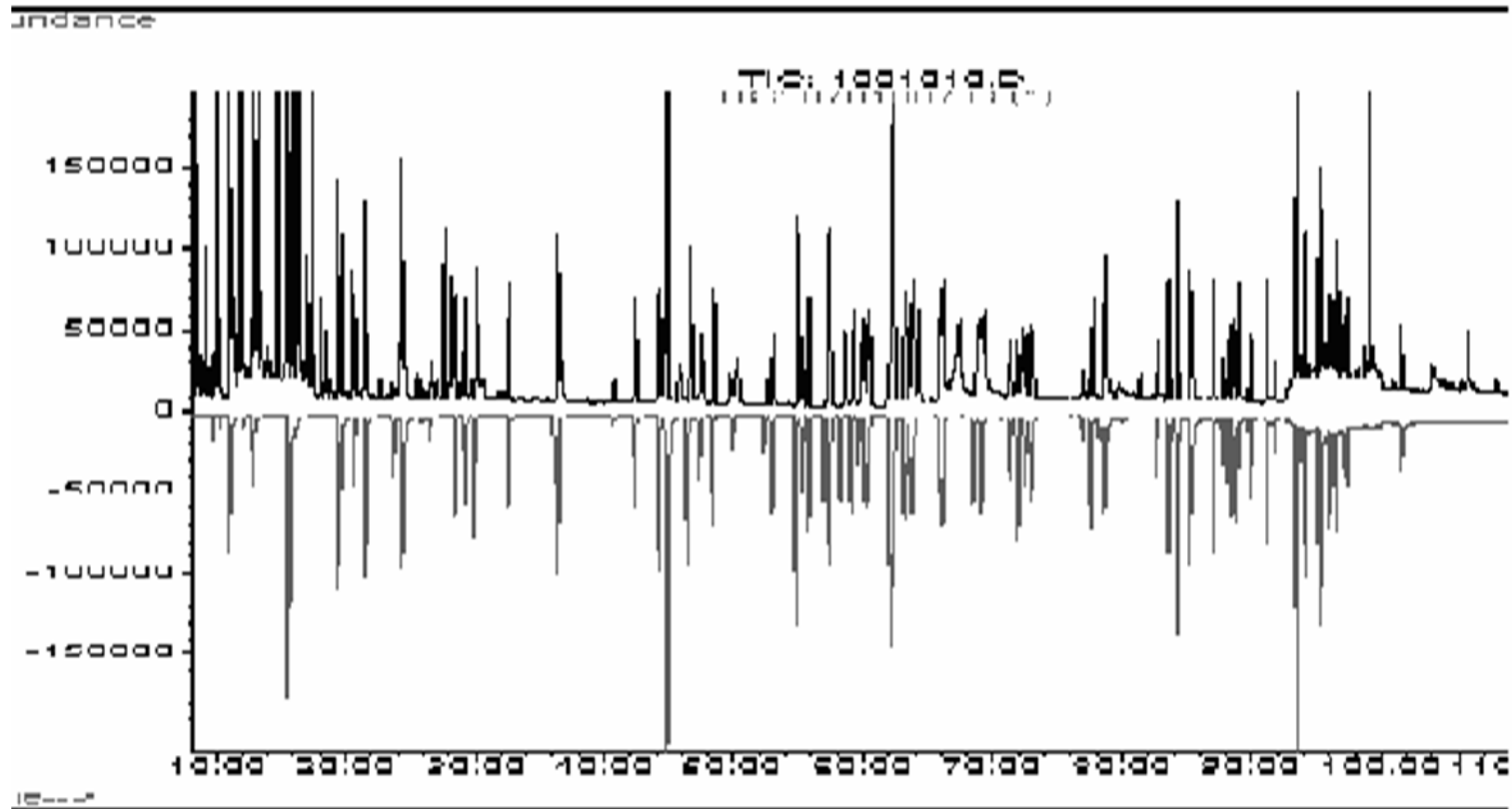
$$C_g \sim 1/D_g \sim M$$

$$H = B/v + C_g v$$

Vpliv nosilnega plina na H, R



Določanje veliko analitov v mešanici

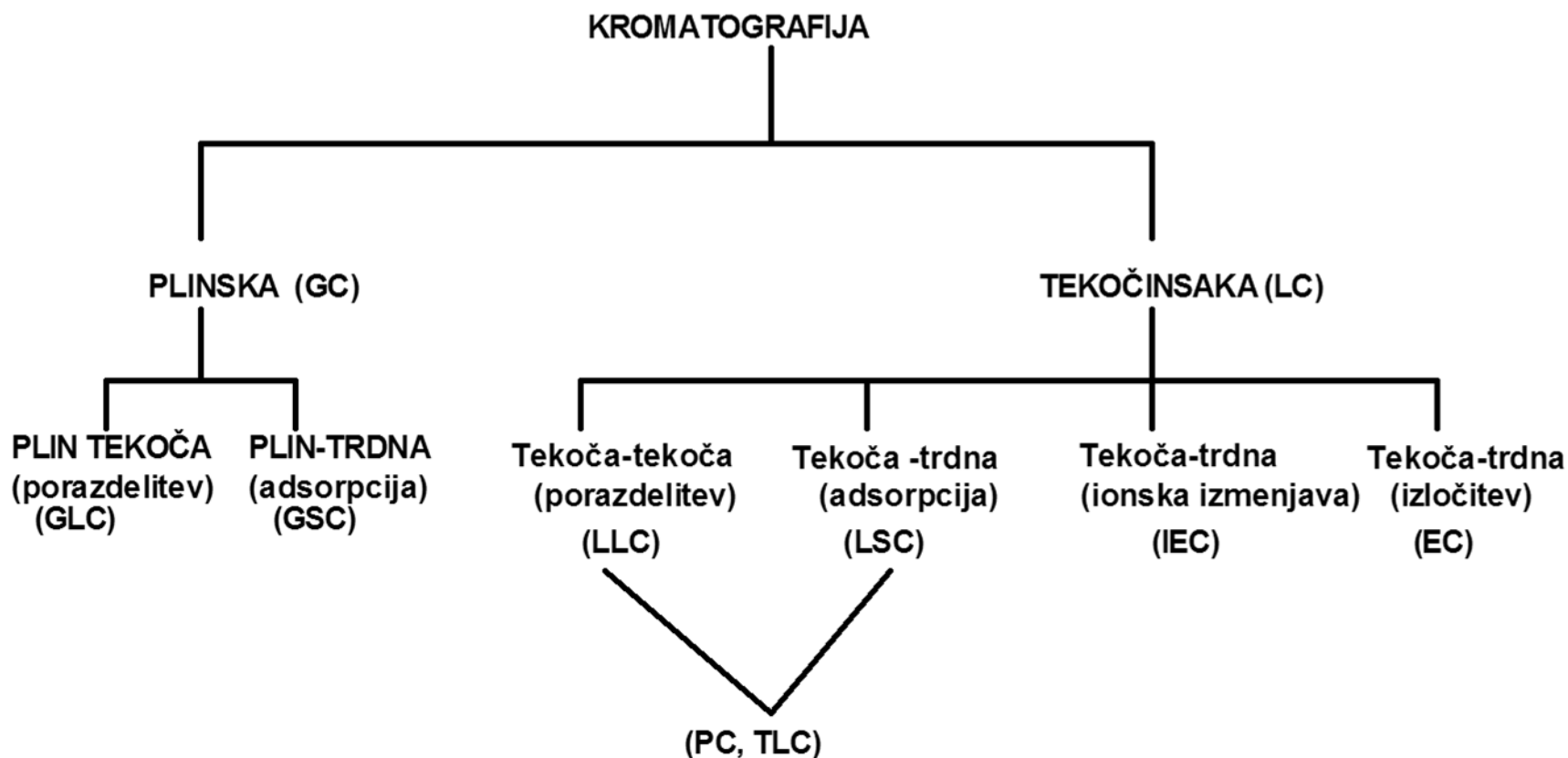


SIM kromatograma ekstrakta mandarin (0,20 mg/kg) po koncentriranju na LiChrolut EN koloni z dodatkom šibkih anionskih izmenjalcev (DEA) (zgoraj) in ustrezne standardne raztopine v acetonu (spodaj)

Delitev kromatografskih tehnik

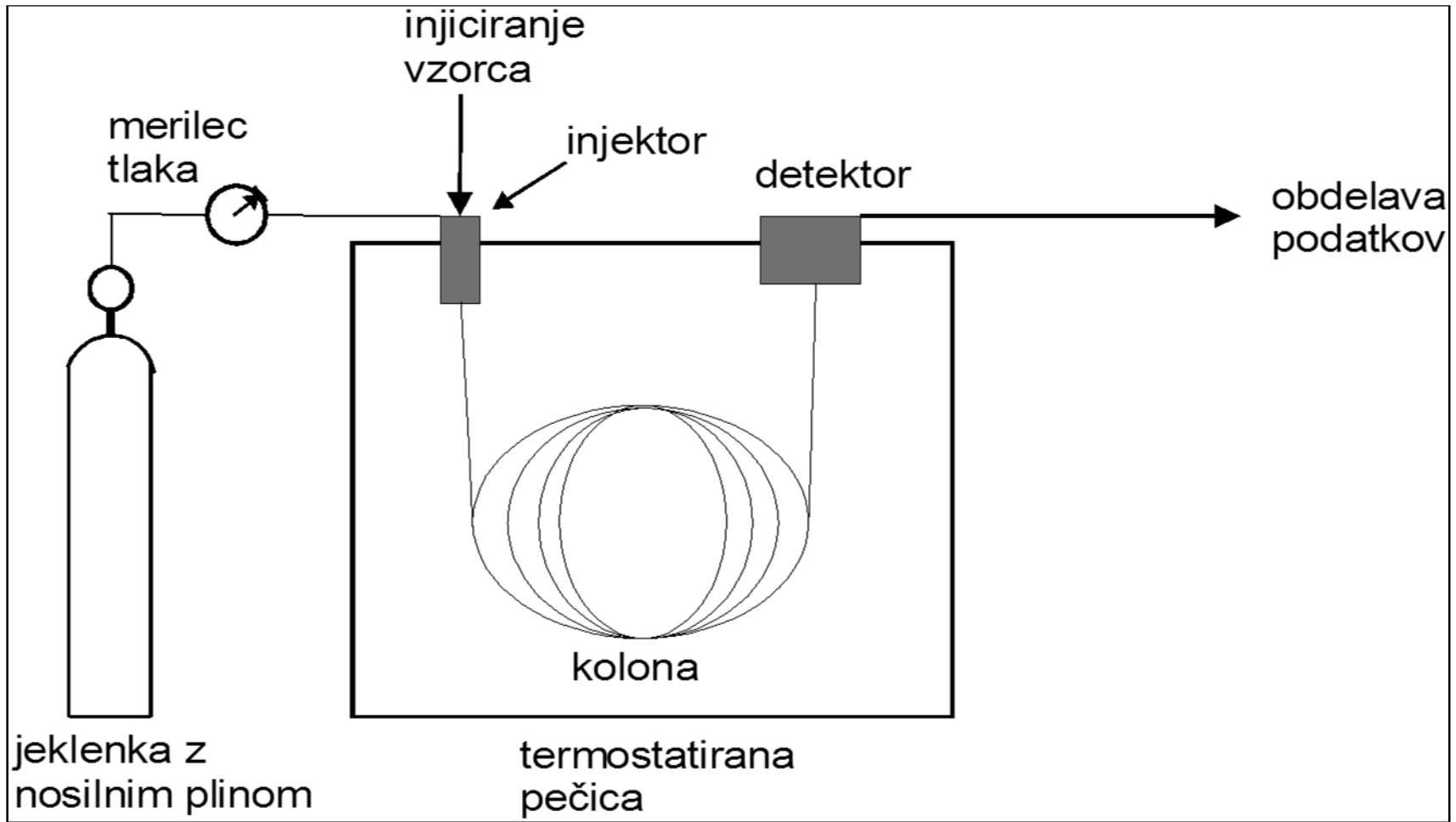
GC → PC/TLC (HPLC) → SEC

molska masa narašča



Plinska kromatografija

Plinska kromatografija

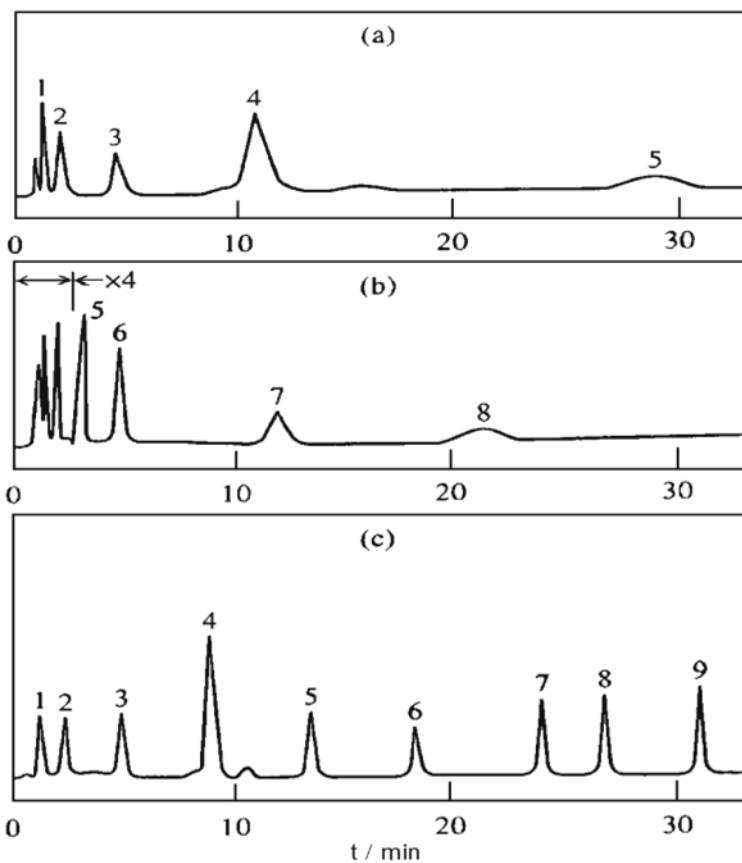


Plinska kromatografija

Gas

Chromatography

Temperaturno programirana analiza



a) izotermno, nizka T

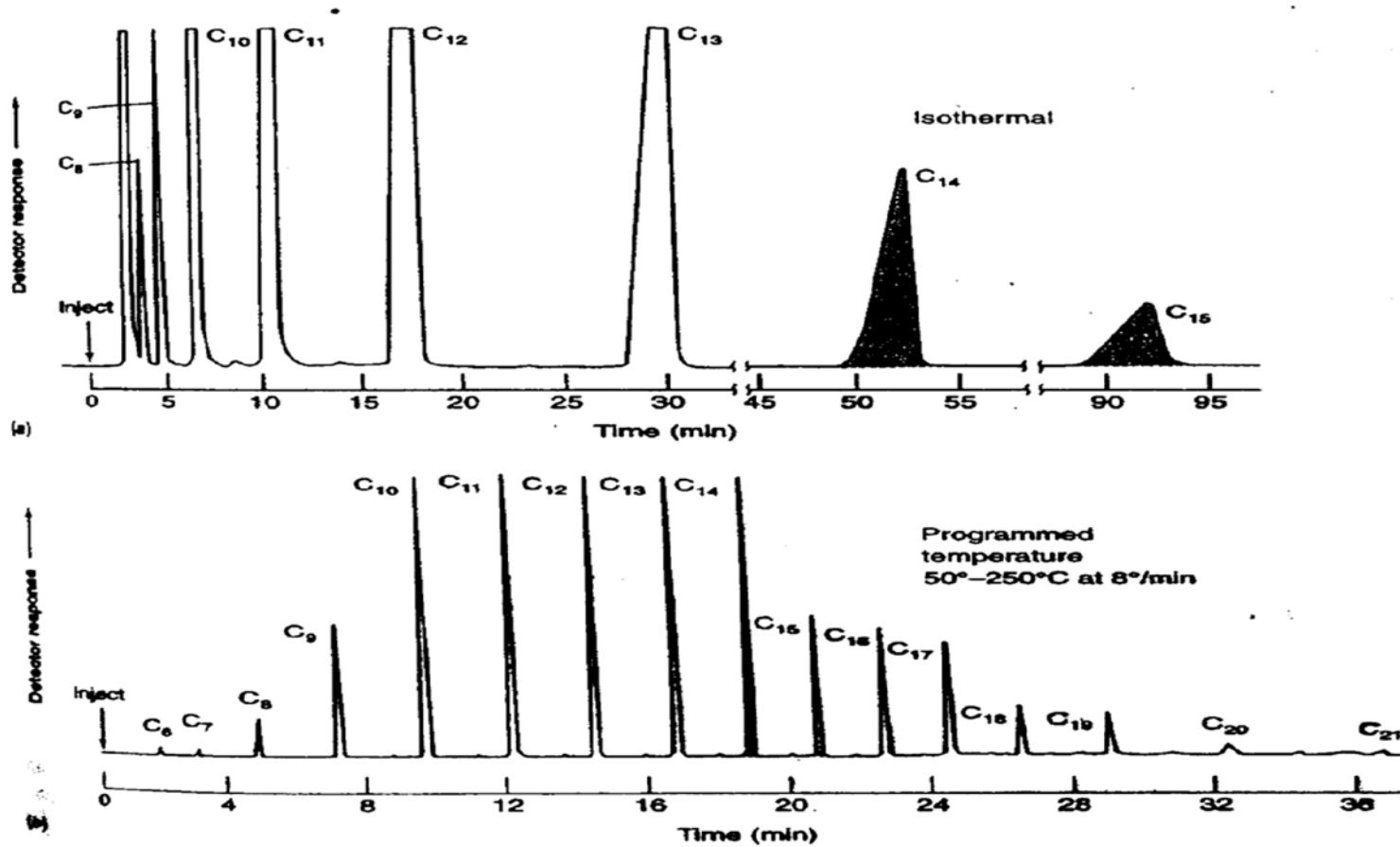
b) izotermno, visoka T

c) temperaturno programiranje-
nevarnosti

$$H = A + B/T + CT$$

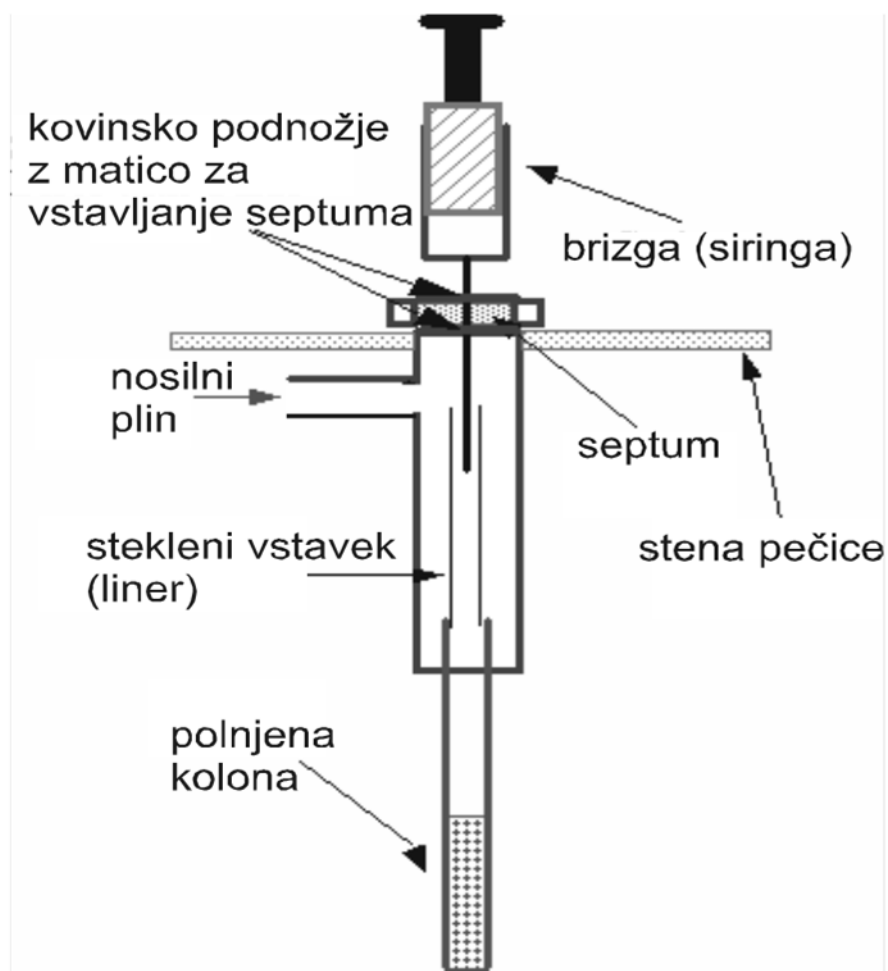
Vplivamo na topnost v
stacionarni fazi

Izotermna-temperaturno programirana analiza



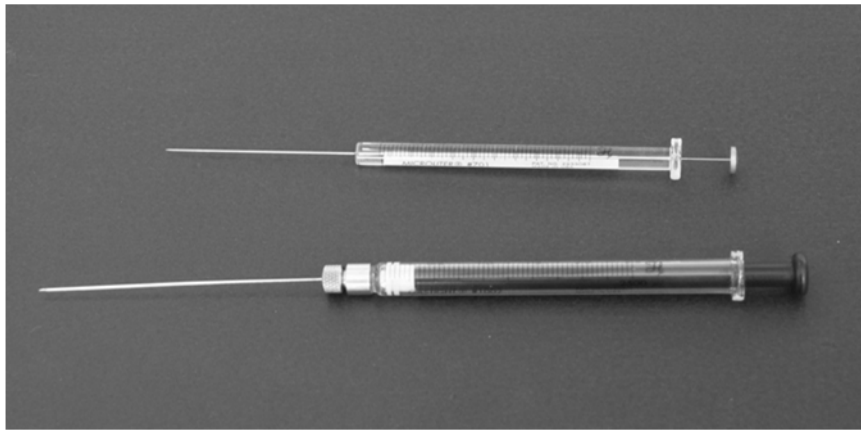
Temperaturno programirana separacija

Nanašanje vzorca v polnjene kolone



Načini injiciranja

ročno z brizgo (siringo)



desorpcija s pasti ipd.

s plinsko brizgo iz
plinske faze nad
vzorcem (angl. *headspace*)

avtomatski vzorčevalnik

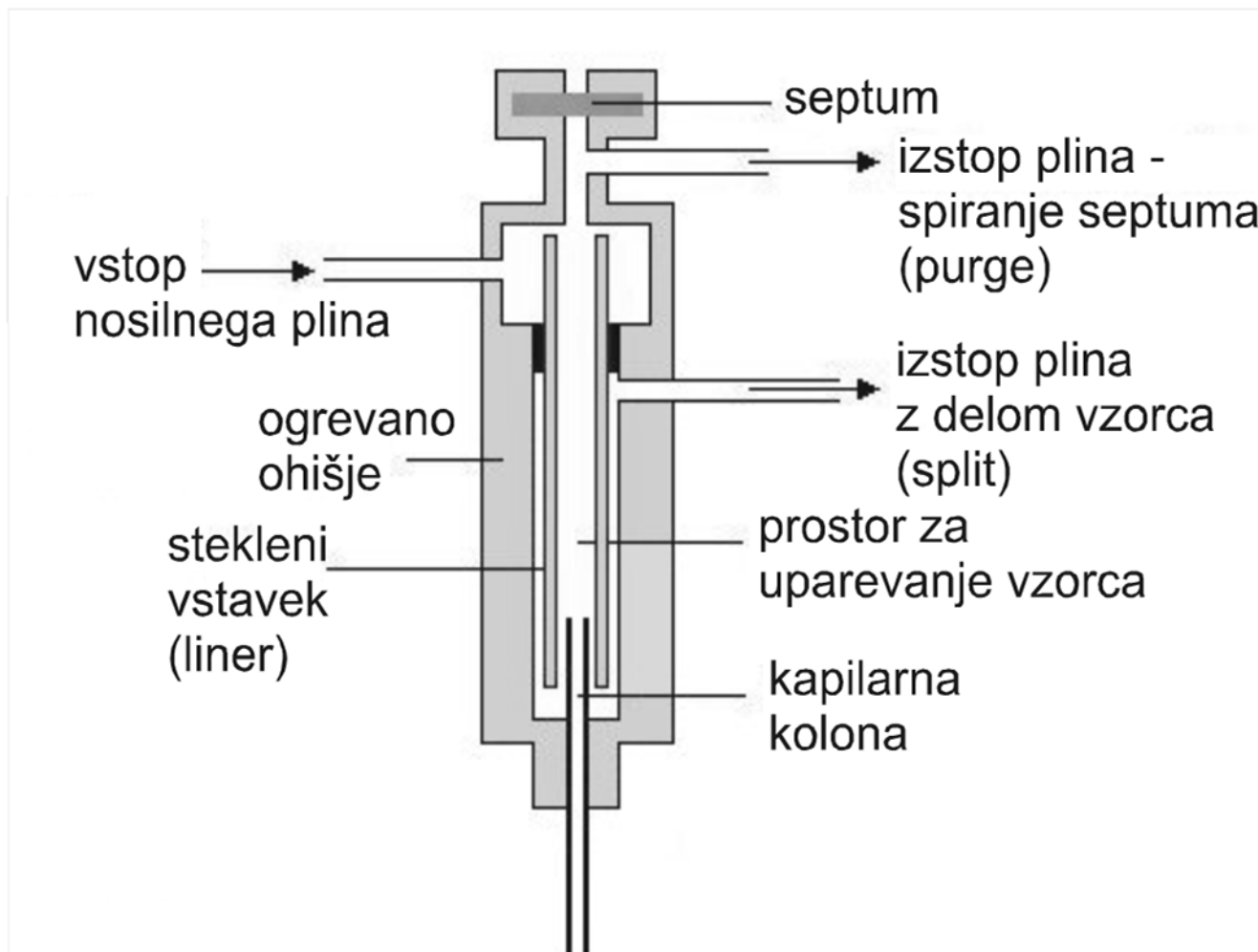


Količina spojin na kapilarni koloni

- $1\mu\text{L}$ vzorca \rightarrow 1mg večkomponentne mešanice
- Kapaciteta kapilarnih kolon \rightarrow nekaj μg \rightarrow linearni del porazdelitvenih izoterm
- Vzorec razdelimo in analiziramo alikvot - "split" način vnašanja

- Nevarnosti - napake
- Diskriminacija sestavin vzorca
- Problematična kvantifikacija-uporaba internega standarda

Shema "split/splitless" injektorja

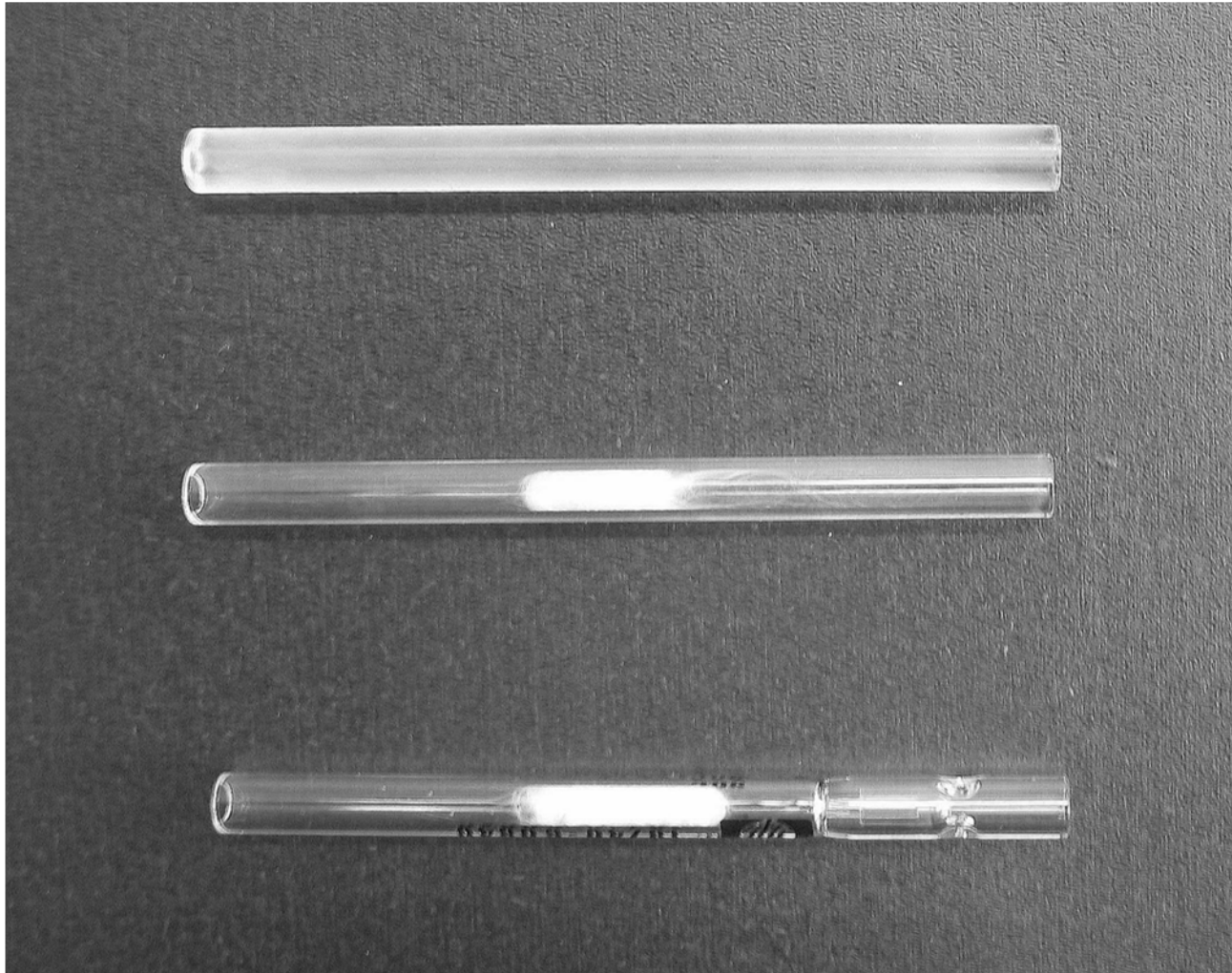


Split/splitless injeciranje



**Split/Splitless
Injection**

Stekleni vstavki - "liner"-ji



Stekleni vstavki - "liner"

- **Vloga**
- **Učinkovito izparevanje**
- **Mešanje vzorca-homogenost**
- **Preprečimo vstop nehlapnih spojin na kolono**

- **Vzdrževanje čistote vstavkov**
- **Nevarnost za kemijske reakcije**

- **nastanek oglja v vstavku**

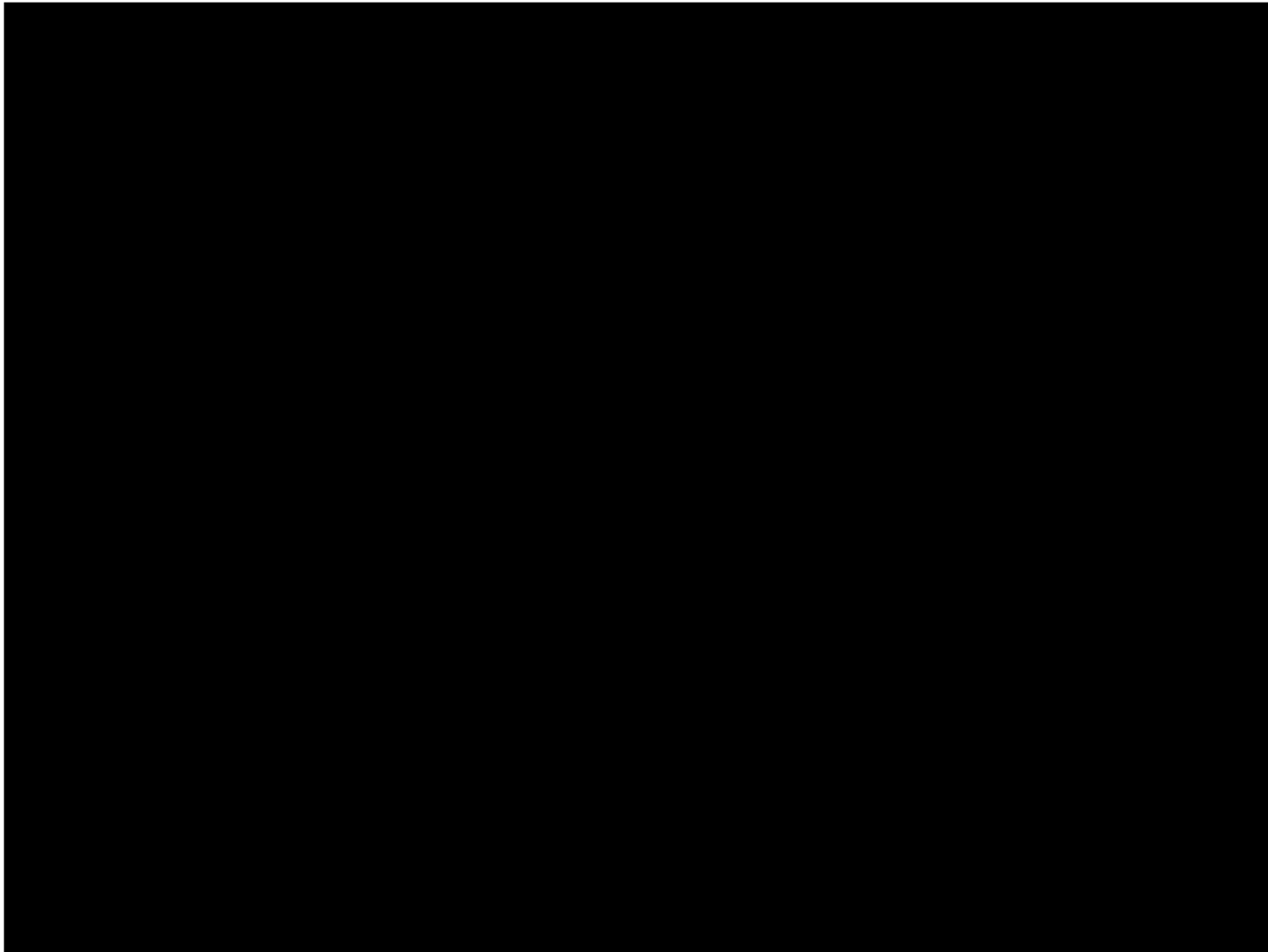
Analiza alikvotnega dela

- **Injektor pri višji temperaturi**
- **Izbira steklenih vstavkov za izboljšanje ponovljivosti vbrizgavanja - polnjeni vstavki**
- **S pravilno izbiro vstavka se ponovljivost vbrizgavanja izboljša**
- **(RSD < 5%)**
- **Nujna uporaba internega standarda za kvantifikacijo**

Vbrizgavanje brez razdeljevanja "splitless"

- **1 μ L raztopine(topila) \rightarrow 1mL plinske faze, ki zapolni kolono**
- **Odporevanje - odstranjevanje dela topila**
- **Injektor pri nižji temperaturi; kolona še bistveno nižje**
- **Koncentriranje spojin v hladnem delu kolone**
- **Koncentriranje spojin v topilu v koloni**
- **Večina topila v odpad ("purge time-on")**

Fokusiranje v topilu



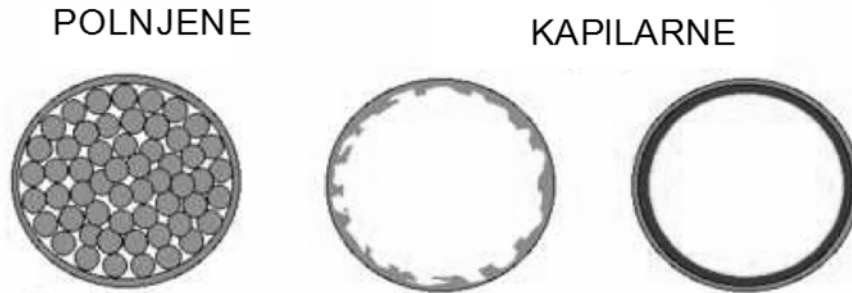
Kolone in polnila

Polnjena: iz stekla, kovine;
polnilo: adsorbenti, silikagel, diatomejske zemlje...
(kot nosilci tekoče SF)

Kapilarna: (ali: odprta; angl. *open tubular, OT*):
adsorpcijska SF: PLOT (angl. *porous layer OT*),
tekoča SF na nosilcu: SCOT (angl. *support-coated OT*),
tekoča SF na steni: WCOT (angl. *wall-coated OT*),
iz kremenčevega stekla: FSOT (angl. *fused-silica OT*).

Važno še: dolžina, notranji premer, debelina SF.

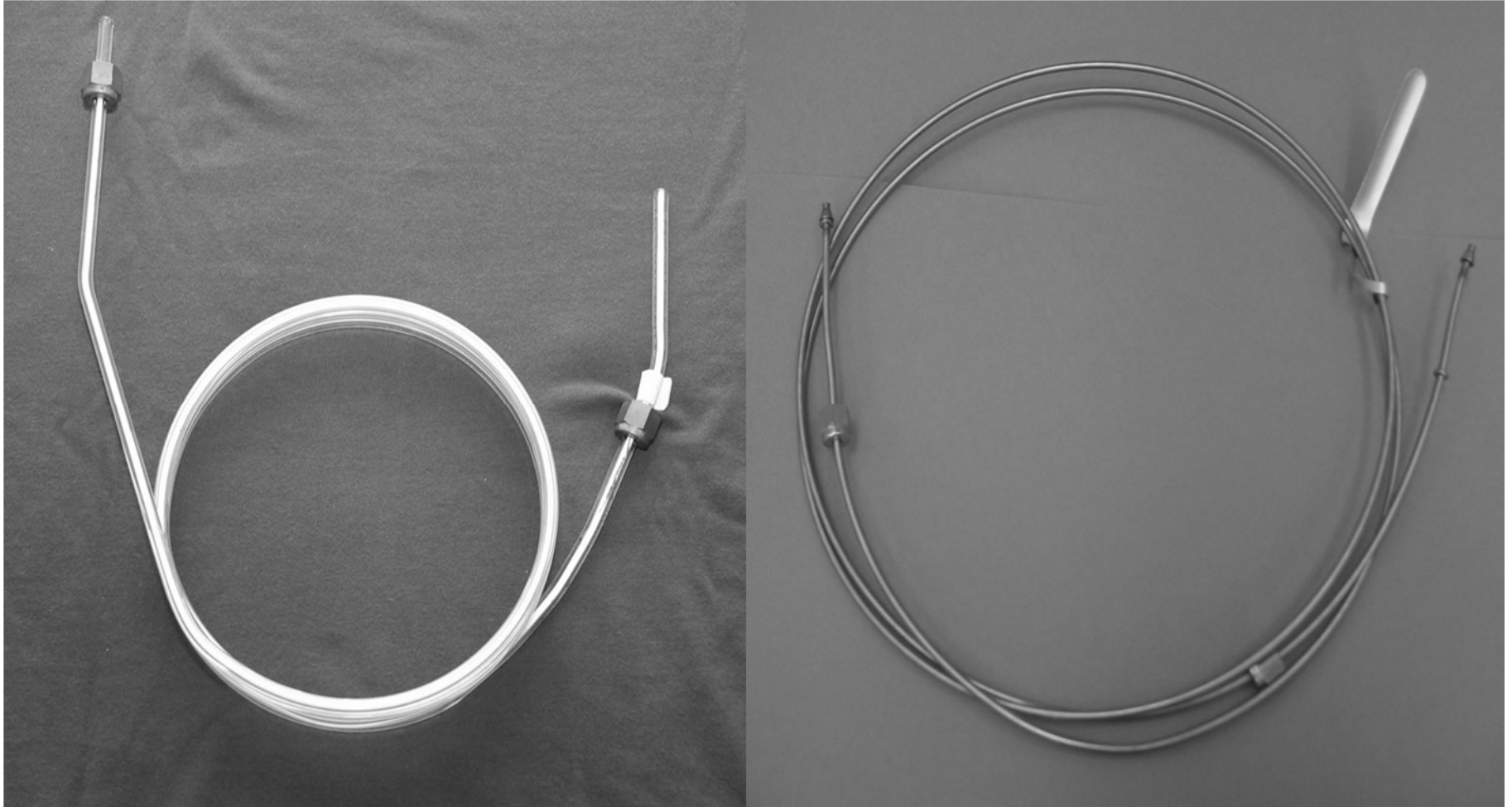
Vrste kolon



WCOT, SCOT -večja kapaciteta, t_r

PLOT-adsorcijska GC- ZA ZELO
HLAPNE SPOJINE-PLINE!

Polnjene kolone



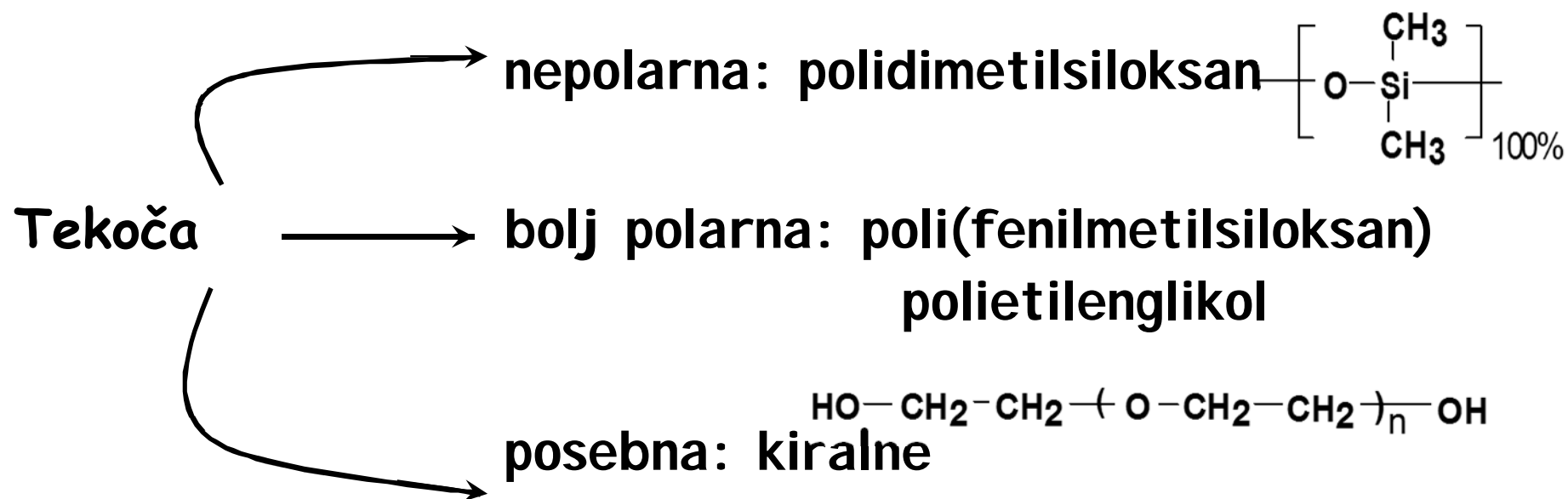
Kapilarna kolona



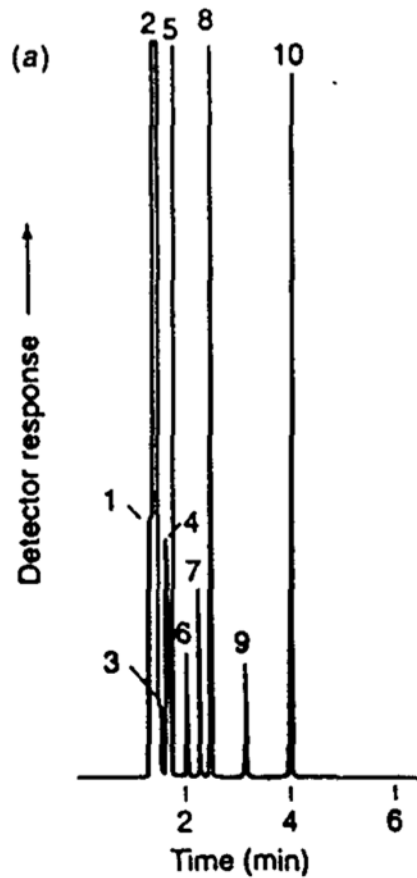
Stacionarna faza (SF)

Zahteve: nizko hlapna, termično stabilna, kemično inertna.

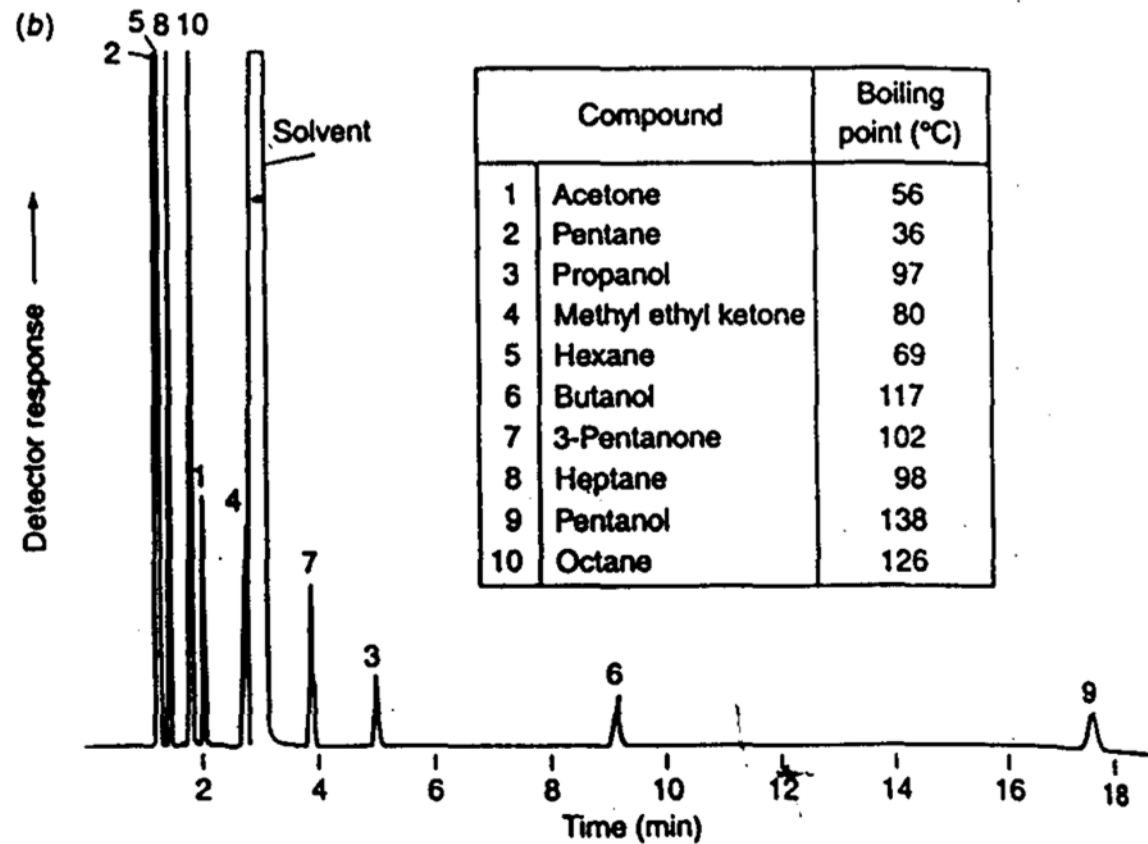
Trdna: Al_2O_3 , grafitiziran ogljik, polimeri, molekularna sita...



Uporaba nepolarnih-polarnih stacionarnih faz

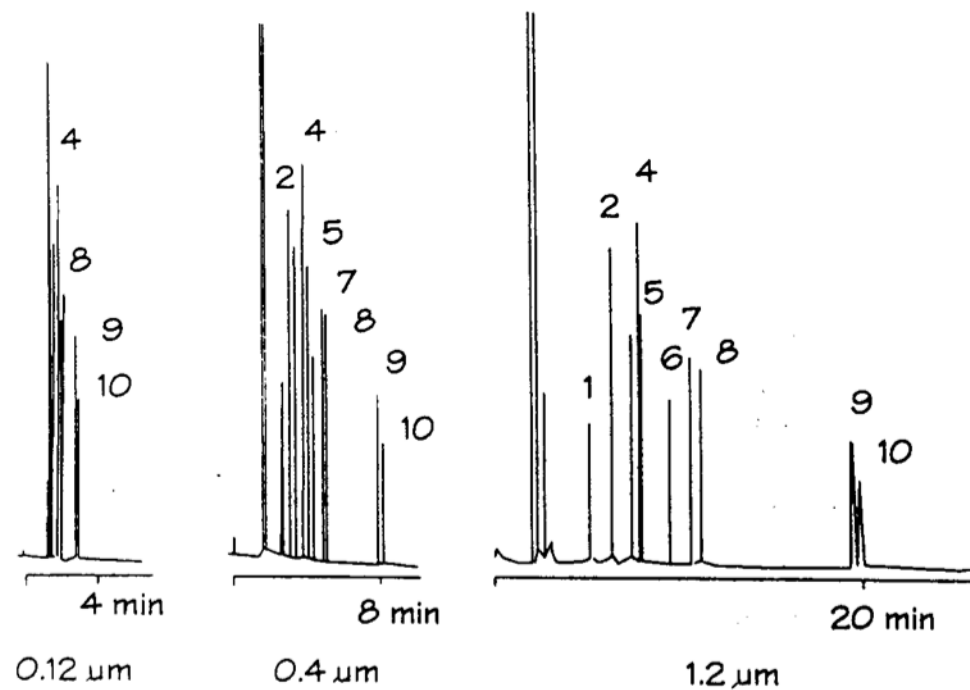


a) nepolarna SF



b) polarna SF

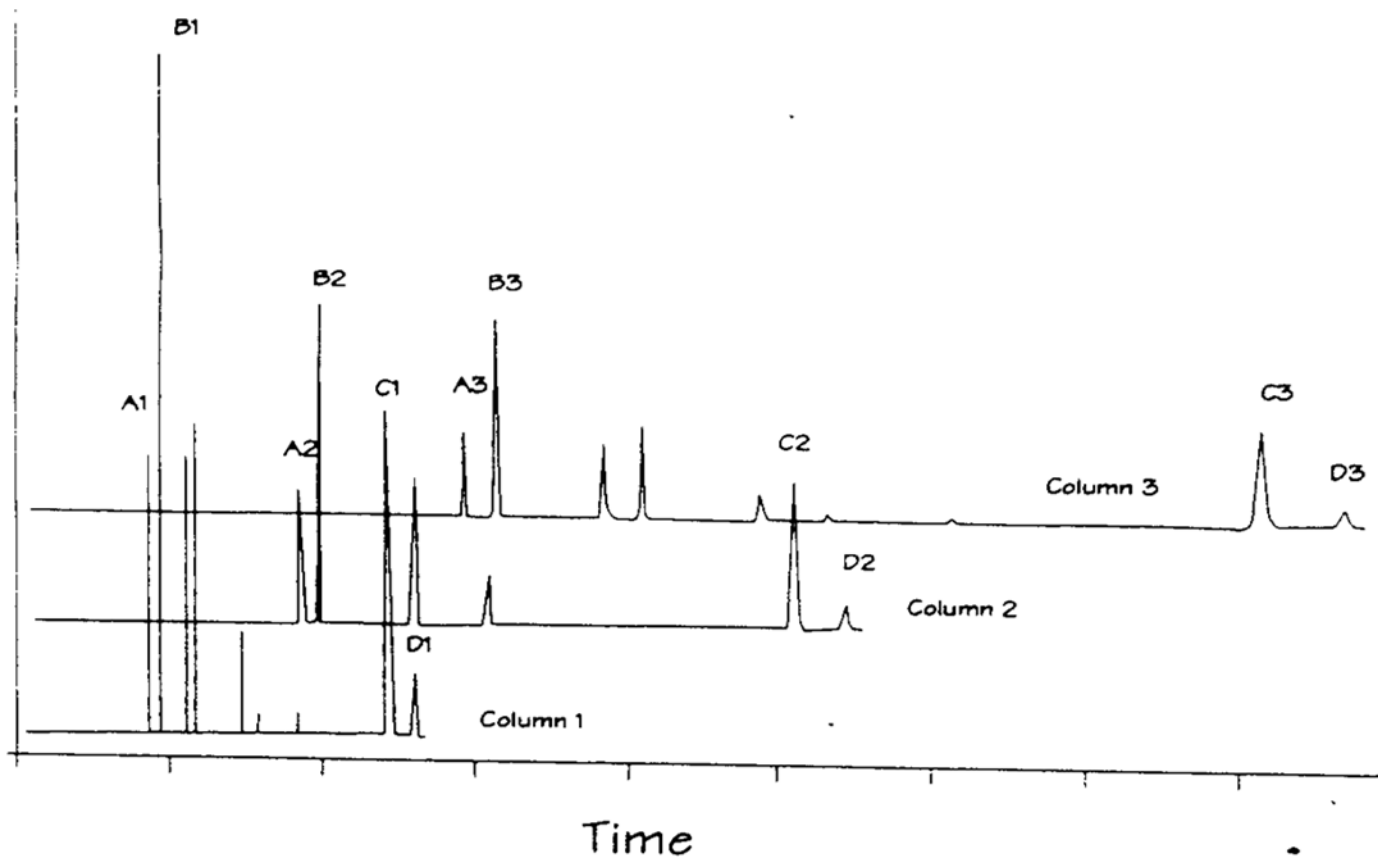
Vpliv debeline filma na retencijski čas (k)



Vpliv dimenzij kolone na R in čas analize

Kolona 1 10mx0,15mm; kolona 2 16mx0,25mm; kolona 3 21mx0,32mm

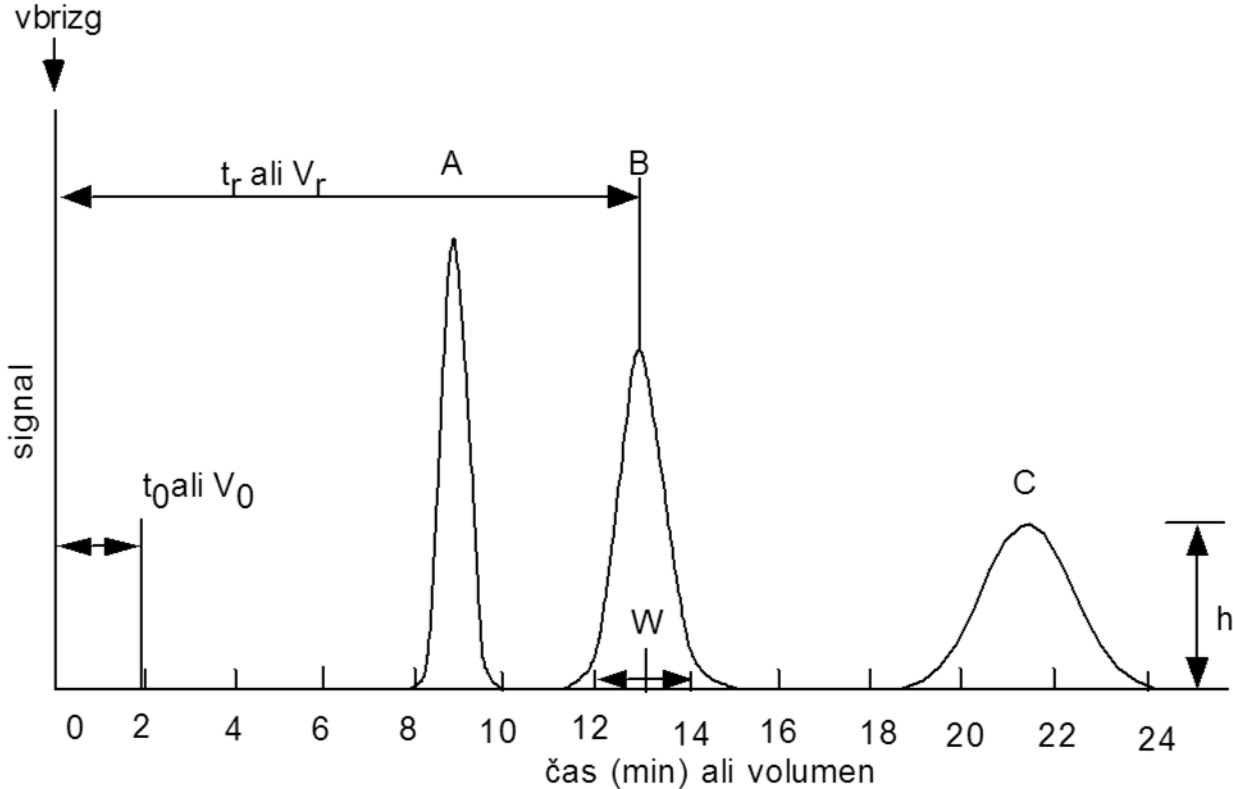
N enak, manjši premer manjši H



Uporaba GC

- **Adsorbenti: Porapak, XAD, molekularna sita (plini) oglje za zelo hlapne spojine-arome**
- **Hlapne spojine: T_v nad 100°C (GLC)**
- **Nehlapne spojine: priprava hlapnih derivatov
metilni derivati (reagent diazometan)-maščobnokislinska sestava
trimetilsililni derivati (reagent trimetilsililimidazol)
trifluoroacetil izopropil estri - aminokislina**

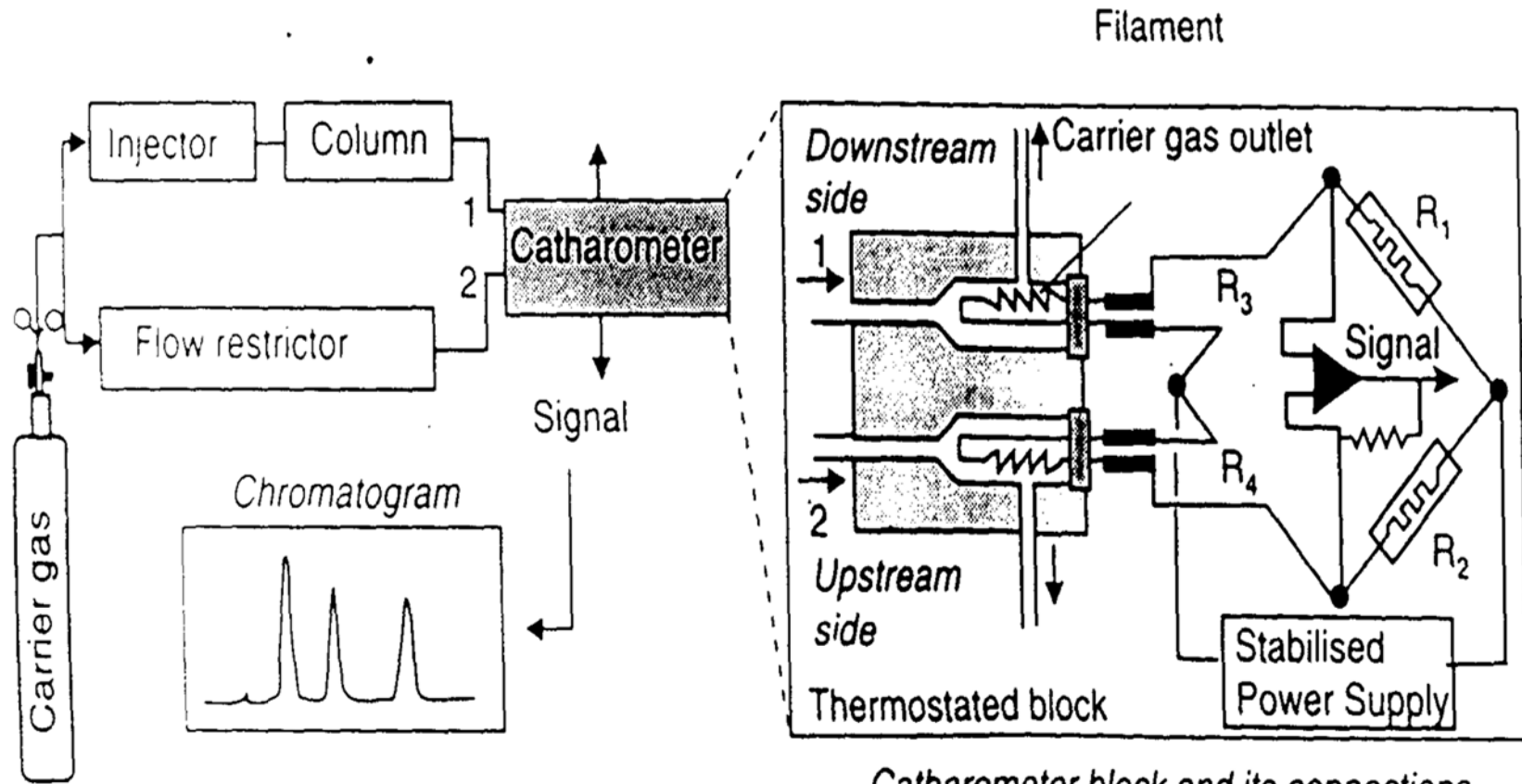
Kromatogram



Detektorji

- **Pretočne majhne celice (volumen $\sim 1/20$ volumna nosilnega plina s spojino)**
- **Uporaba "make up"plina**
- **hiter odziv**
- **Nizka meja zaznave (specifika detektorja in spojine)**
- **Linearno območje**
- **Destruktivni in nedestruktivni detektorji (porušni detektor)**

TCD-HCD



TCD-HCD

Analiza plinov

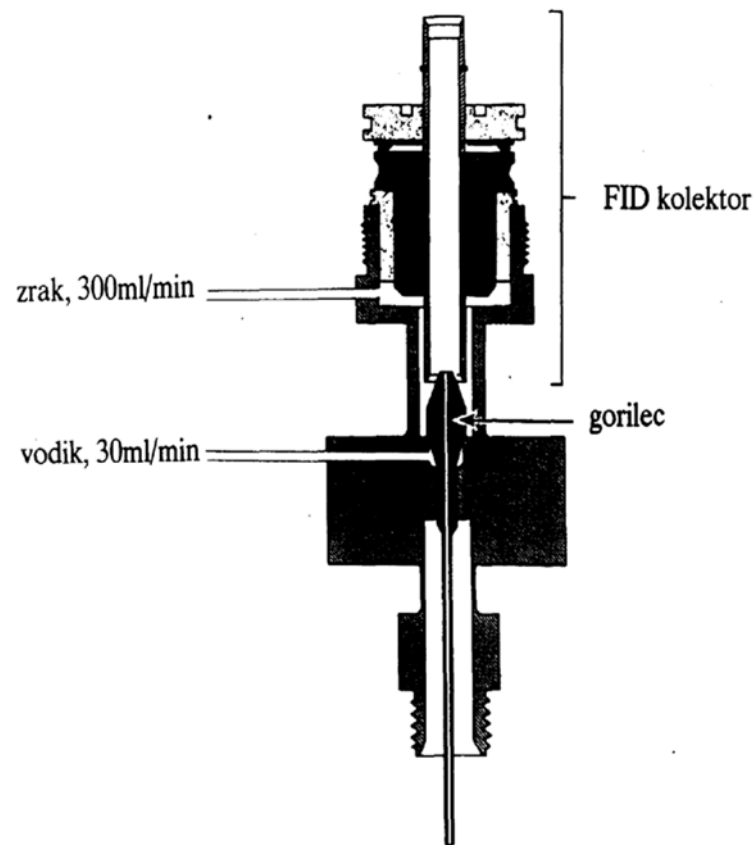
Izbira nosilnega plina

**Nedestruktivni - preparativna
kromatografija**

Visoka meja zaznave

plin	Toplotna prevodnost (W/mst)
argon	147. 10^{-4}
dušik	251
vodik	1754
helij	1558
metan	300

FID



Univerzalni za organske spojine

Meja zaznave odvisna od števila C-atomov

(Določanje maščobnokislinske sestave)

(nekaj ng spojine)

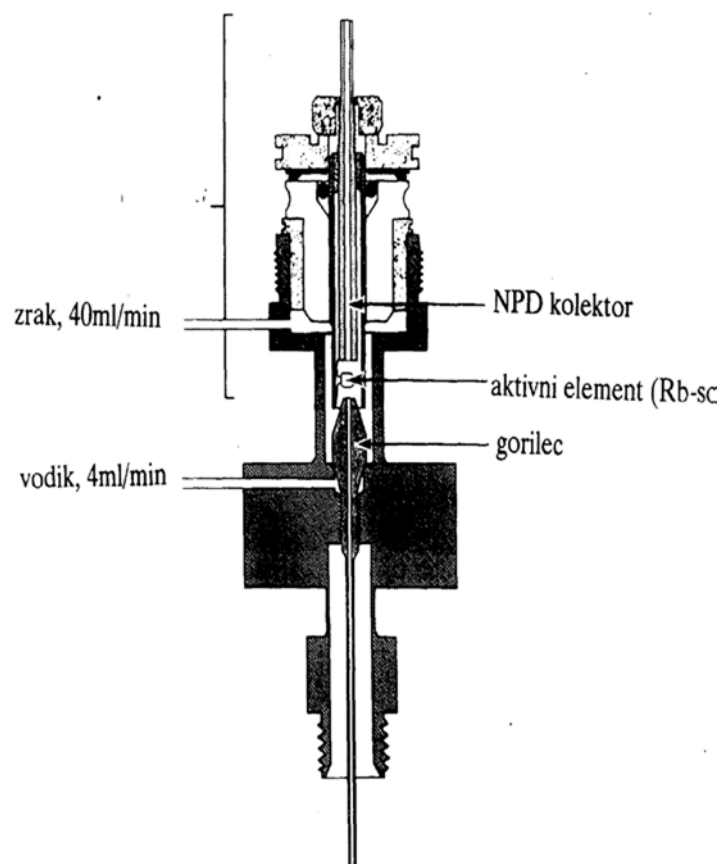
Široko linearno območje

Destruktivni detektor

FID

The Flame Ionization Detector

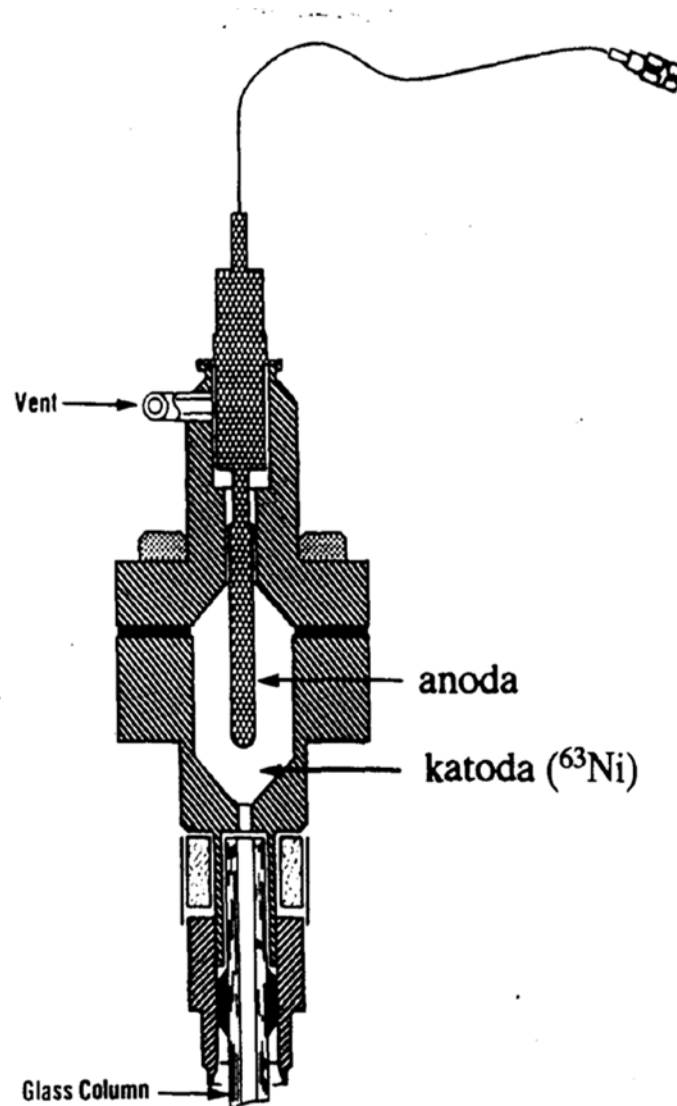
N-P detektor



**Selektivni detektor
- pesticidi**

**Meja zaznave nižja
do 1000x**

ECD



Za spojine, ki vežejo elektrone

Selektivni

Nizka meja zaznave pg-spojine

Ozko linearno območje

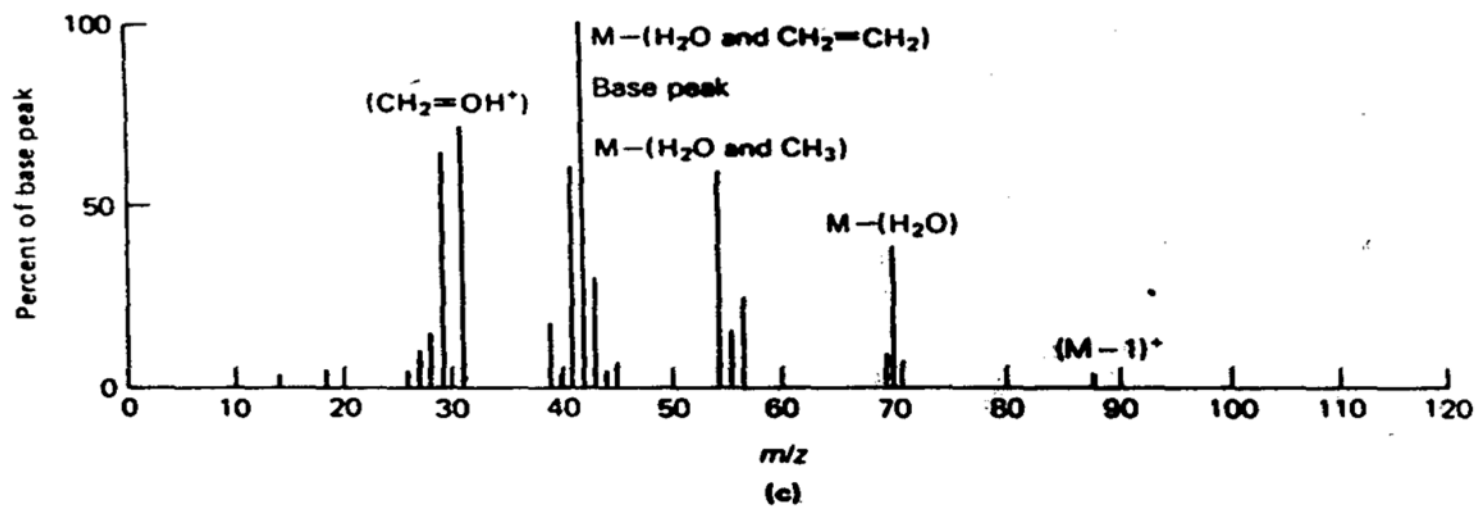
PID

**Gas
Chromatography
Photoionization
Detector**

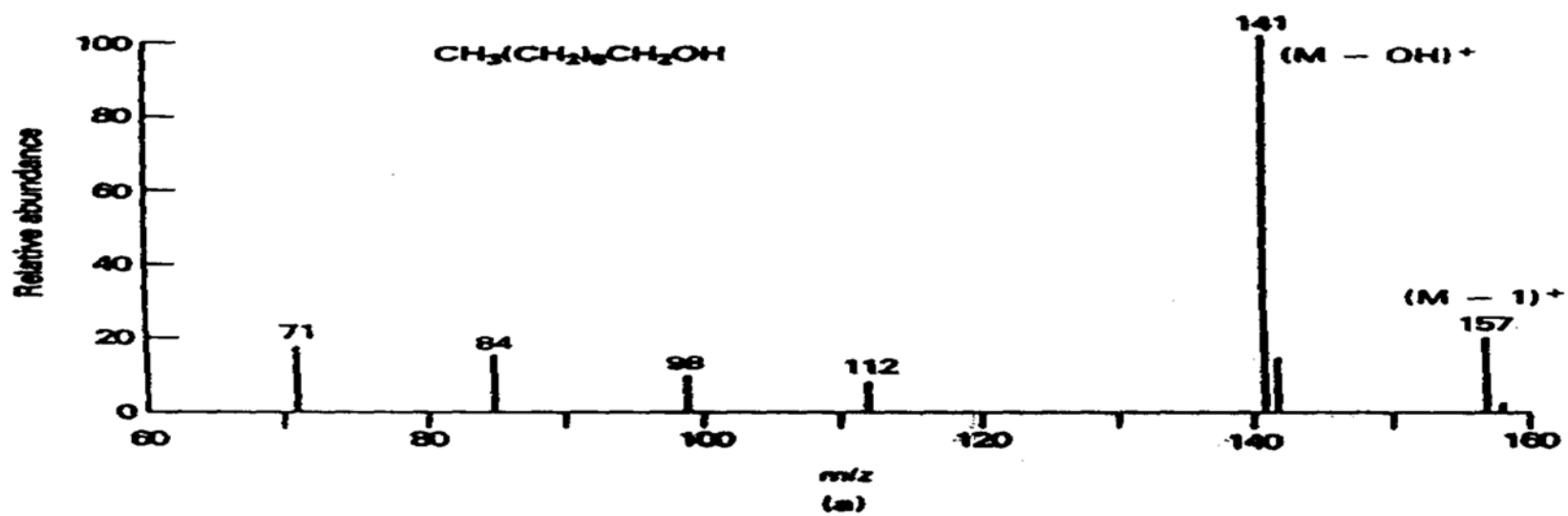
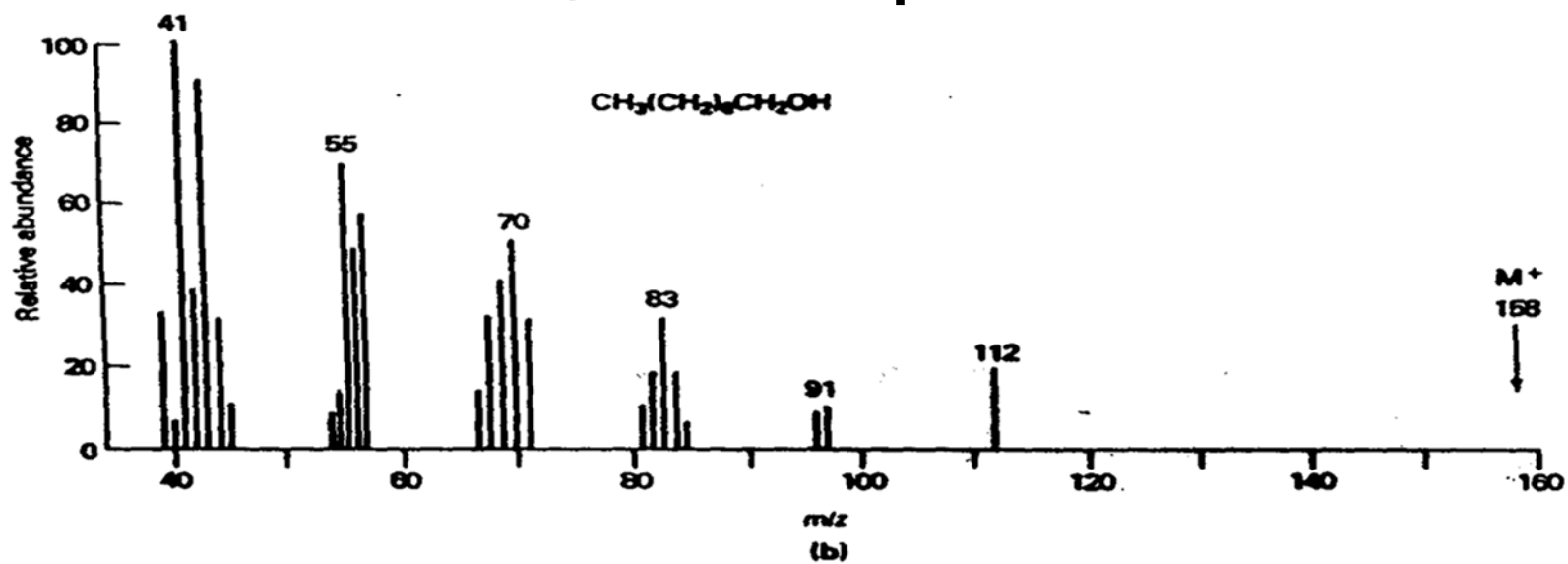
Detektorji

- FID, TCD, ECD - določanje PCN, PCB...,
NPD - triazini
- MS - nizki LOD za vse spojine (1ng spojine)
- MS - specifični detektor na m/z osnovi
- Ionizacija spojin
- EI (70eV) - fragmentacija ; lahko izgubimo molekularni ion
- CI - soft ionization - tudi za kvantitativno analizo

EI mass spectra



EI, CI mass spectra



I dentifikacija ,kvantifikacija z GC-MS

- **MSD- TIC (SIM)**
- **(EI , CI) masni spekri - identifikacija**
- **SIM (Selective Ion Monitoring) - kvantitativna analiza**

NI ŽJA LOD !

