

KROMATOGRAFIJA

Separacijske metode v kemijski analizi

Sočasno določanje več spojin

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

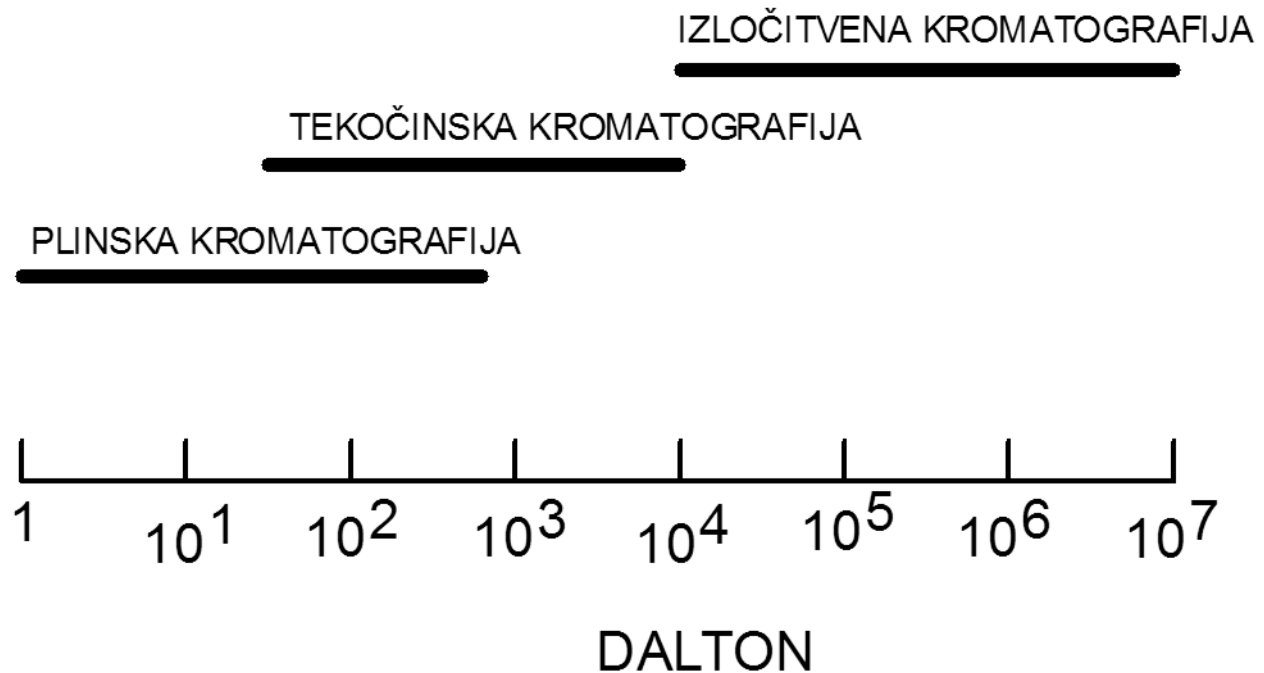
Kromatografija

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

Področja uporabe:

- Kemija naravnih spojin
- Biokemija
- 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

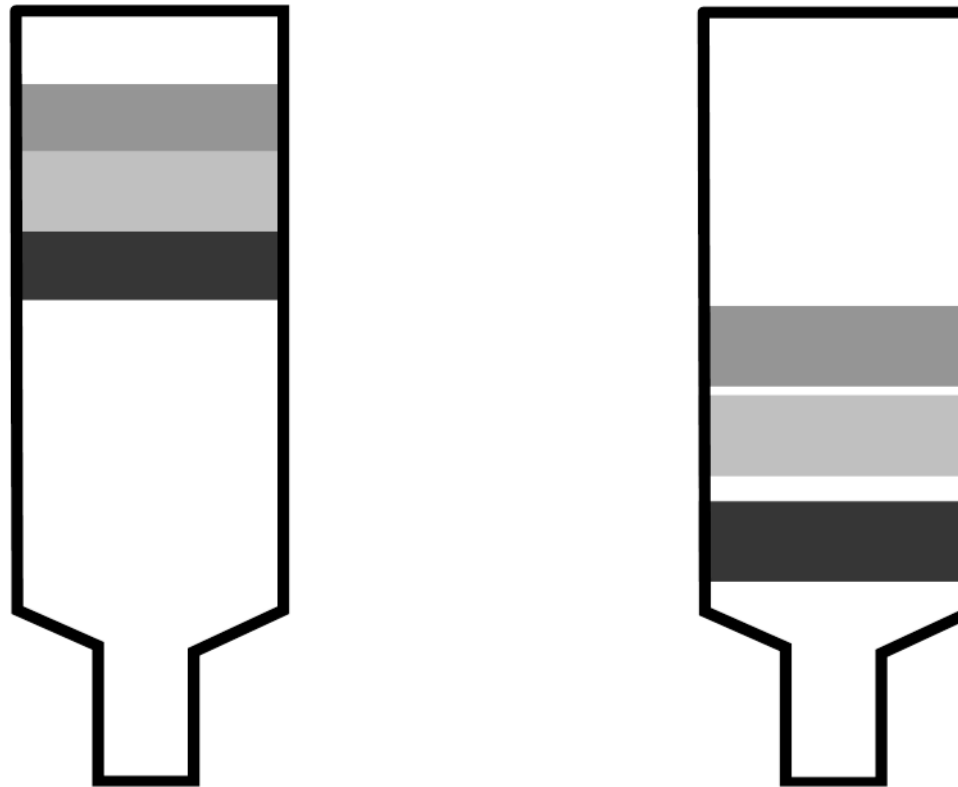
Kromatografija

»barva« »zapis«

Cvet 1906:

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

Ločevanje na koloni



Princip kromatografskih separacij

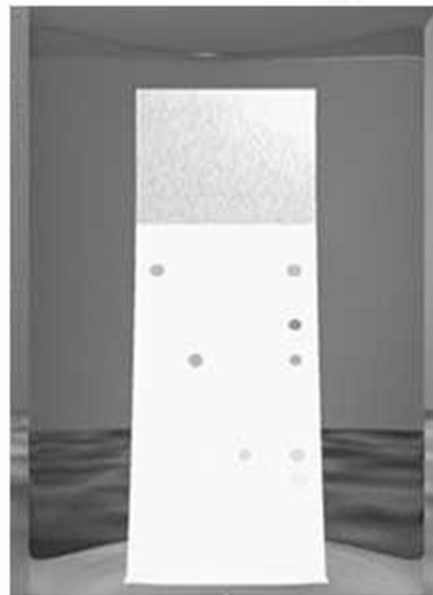
- **Porazdelitvena kromatografija**
- **Adsorptivna kromatografija**
- **Velikostno izključitvena kromatografija**
- **Ionska izmenjava**
- **Kolonska kromatografija, tenkoplastna kromatografija**

Kromatografija

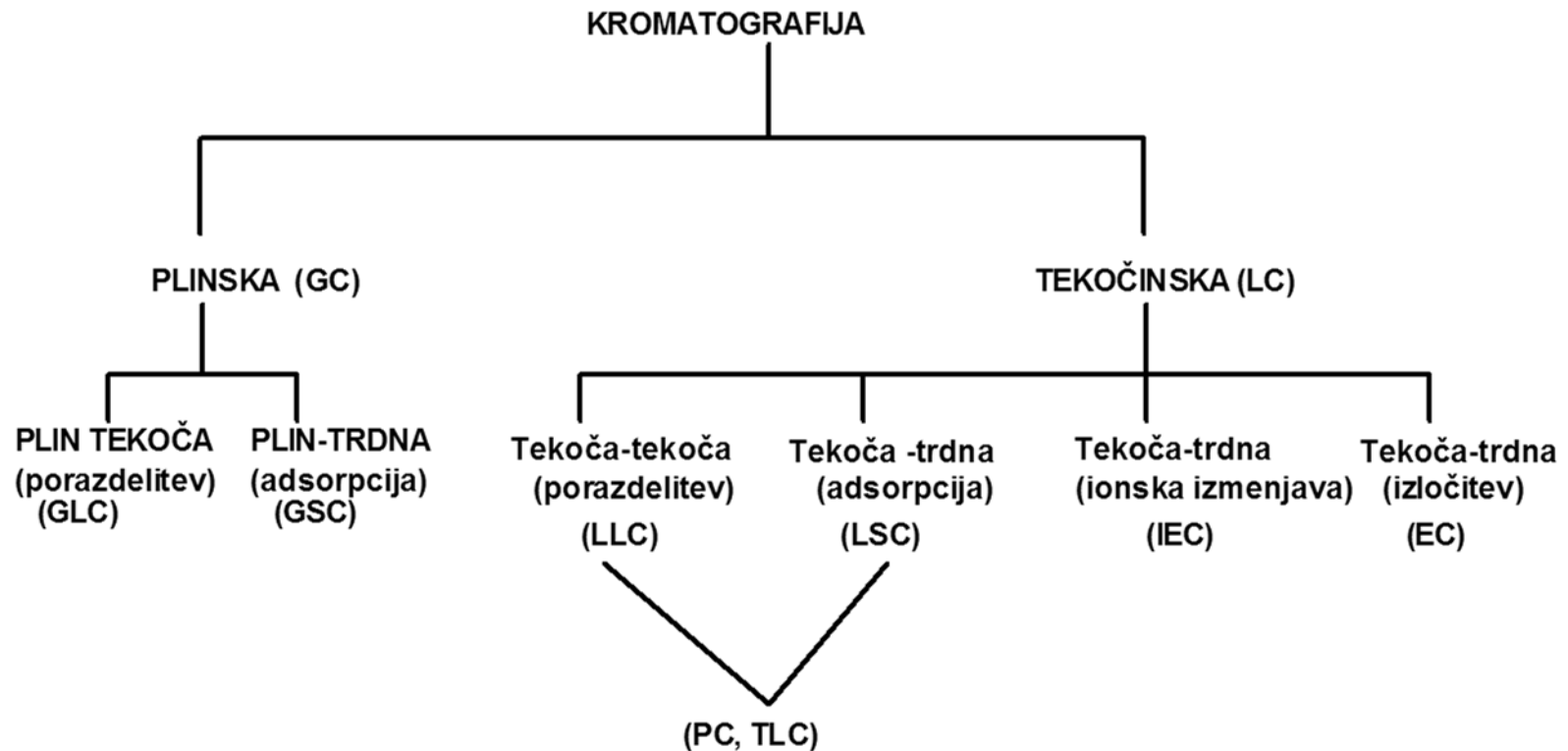
DELITEV KROMATOGRAFSKIH METOD
(glede na stacionarne in mobilne faze):

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

Tenkoplastna kromatografija



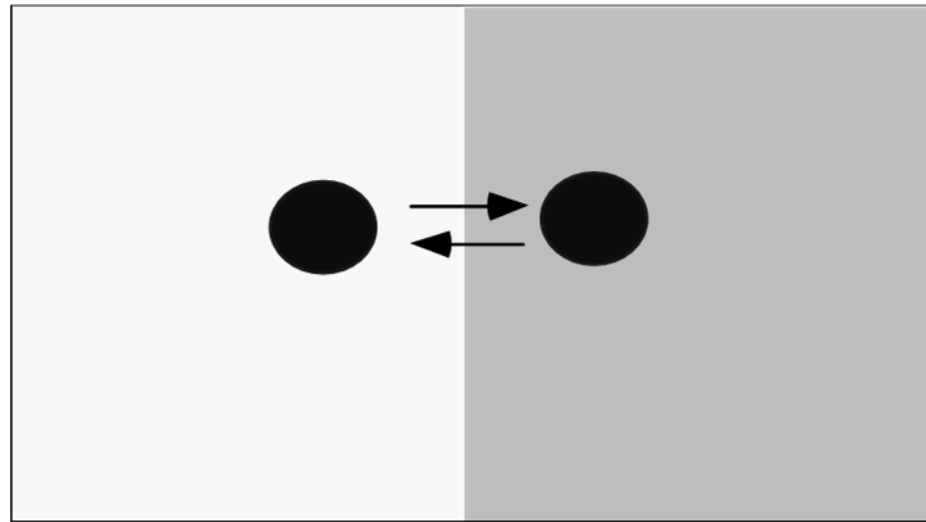
Delitev kromatografskih metod



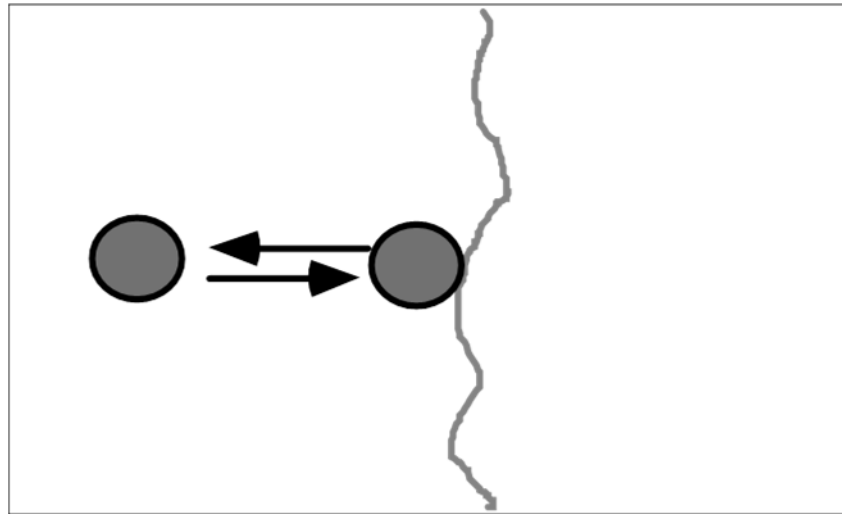
PLINSKA KROMATOLOGRAFIJA:

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

Porazdelitvena kromatografija



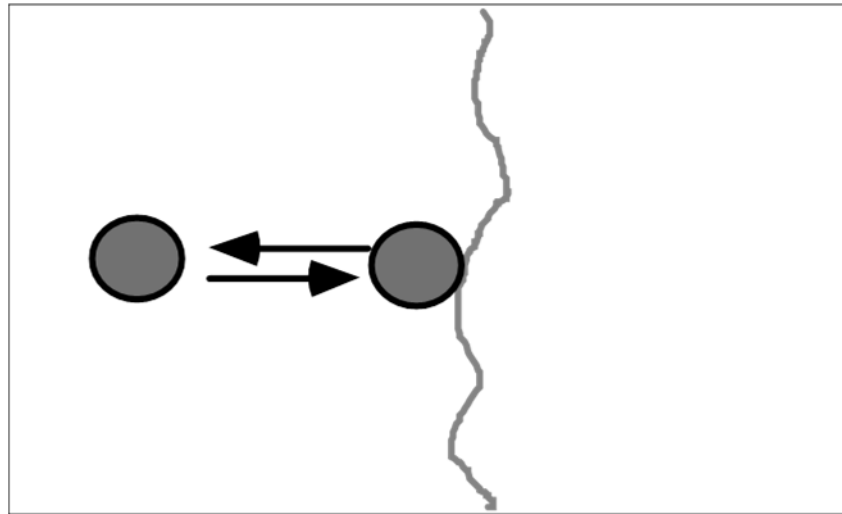
Adsorpcijska kromatografija



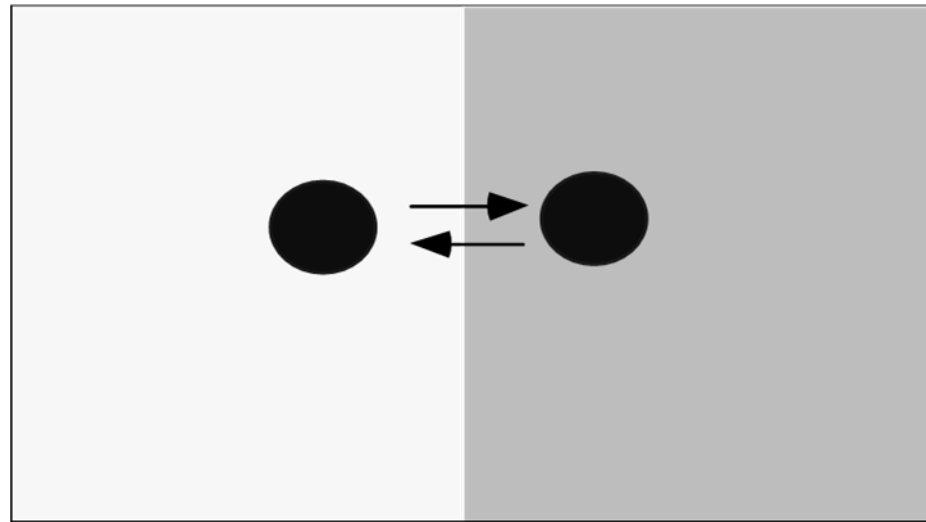
TEKOČINSKA KROMATOLOGRAFIJA:

- *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)*

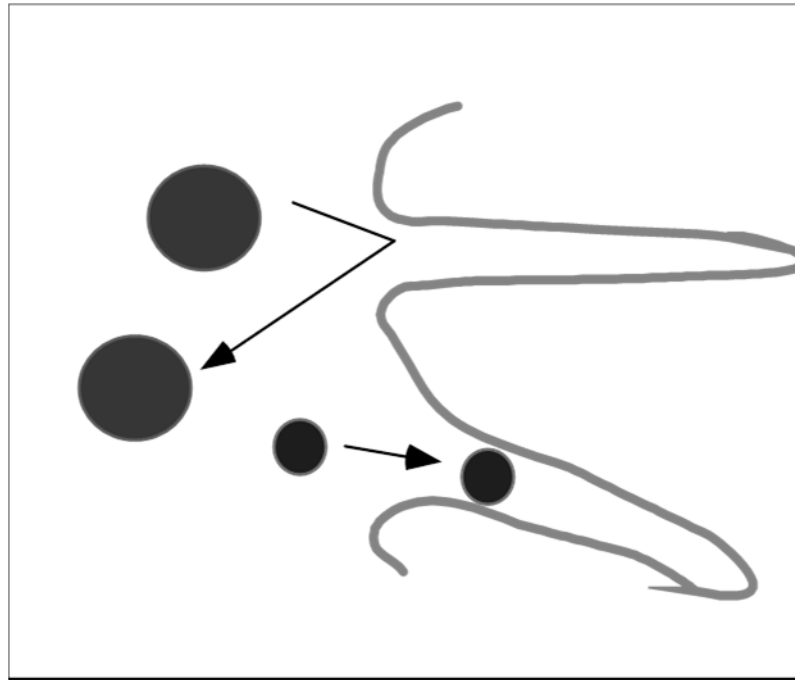
Adsorpcijska kromatografija



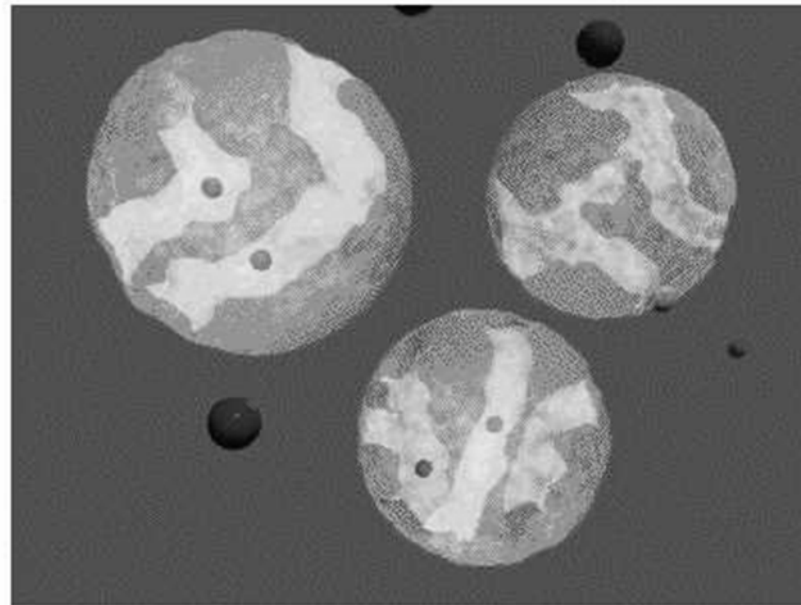
Porazdelitvena kromatografija



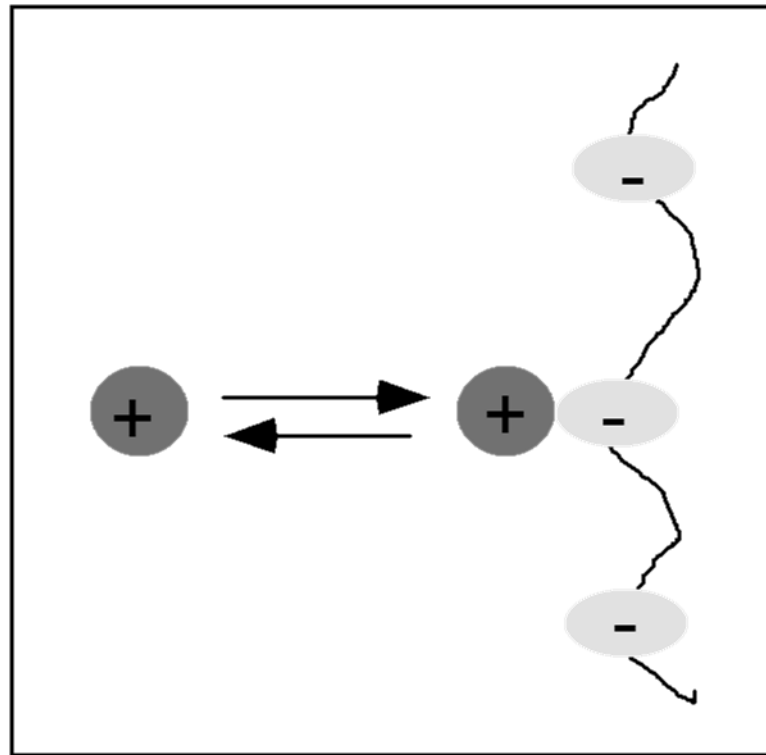
Izločitvena kromatografija



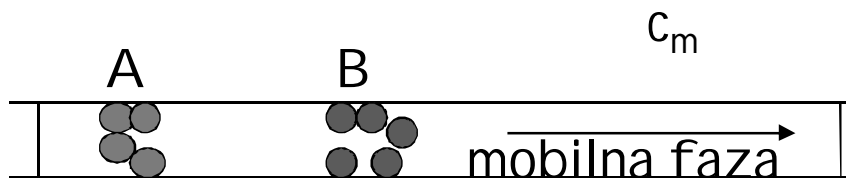
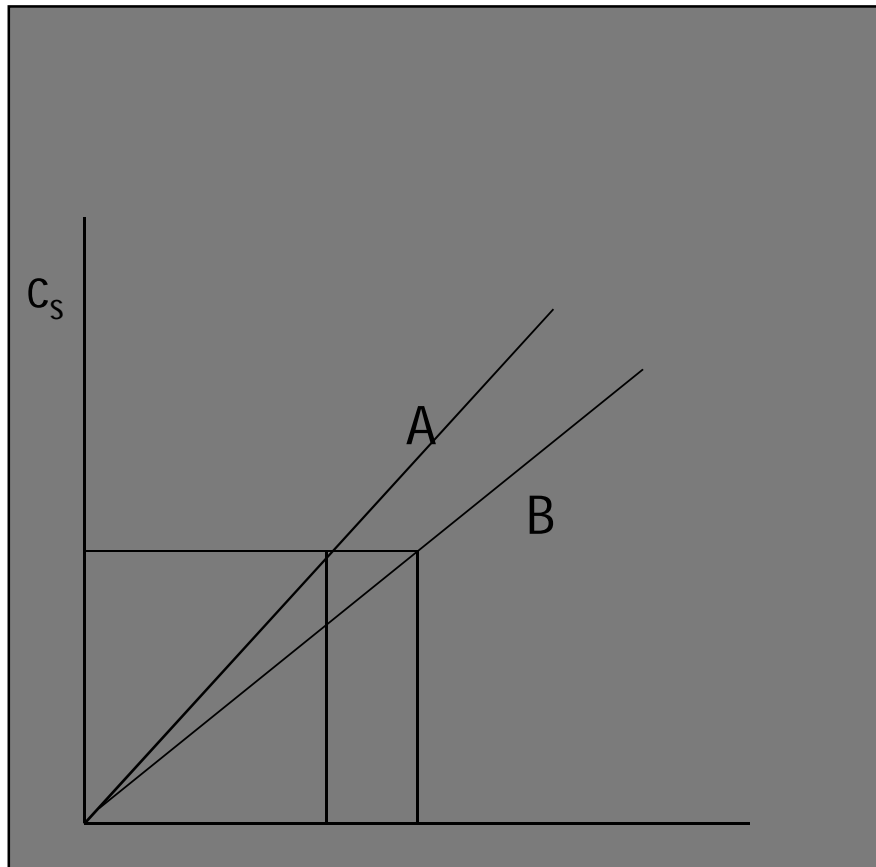
Izključitvena kromatografija



Ionsko izmenjevalna 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)

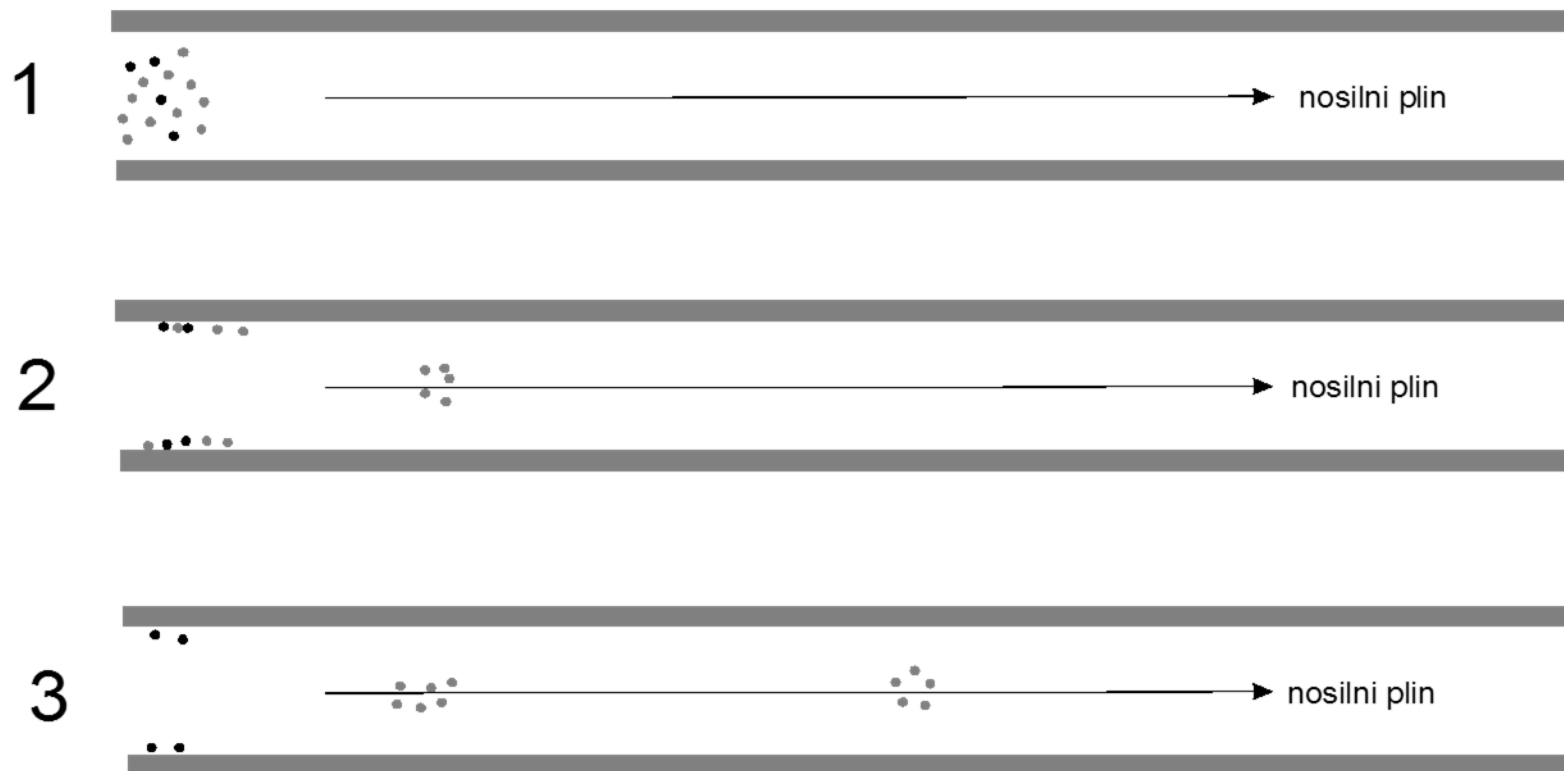
Linearno

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

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 (selektivnost) - α
- Višina teoretskega poda - H
- Število teoretskih podov - N -preverjanje kvalitete kolone!
- Ločljivost - R

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).

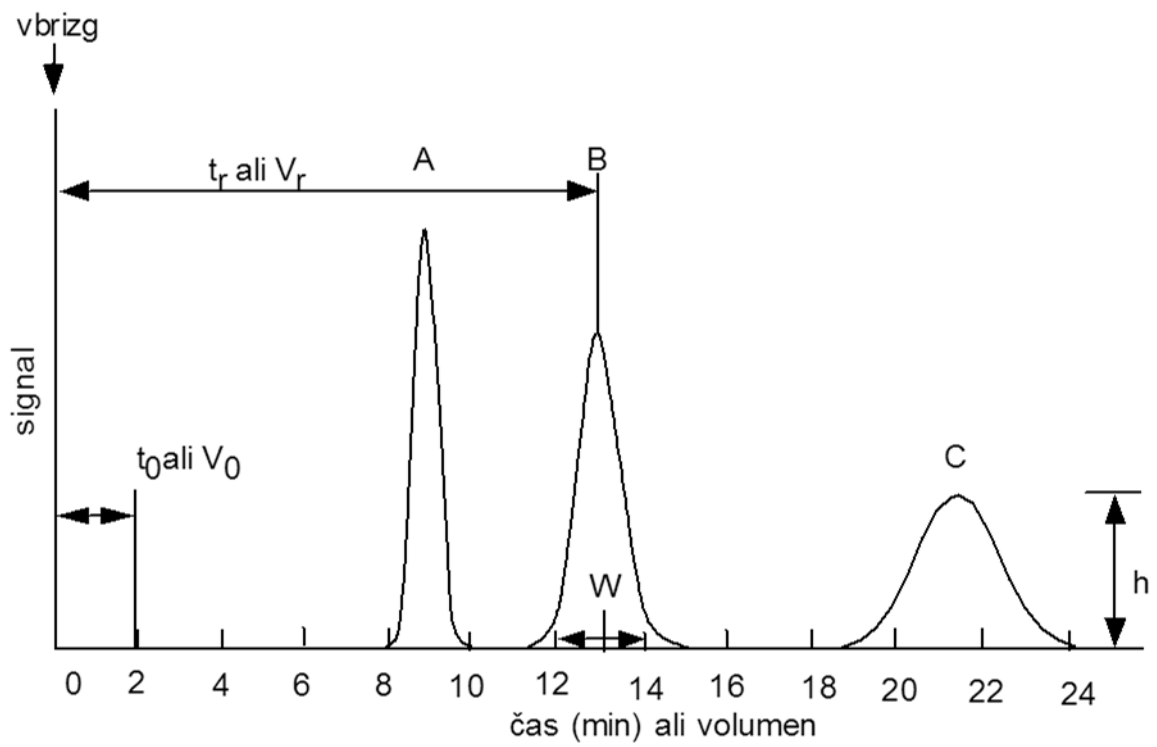
Rate theory:

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)

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

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

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

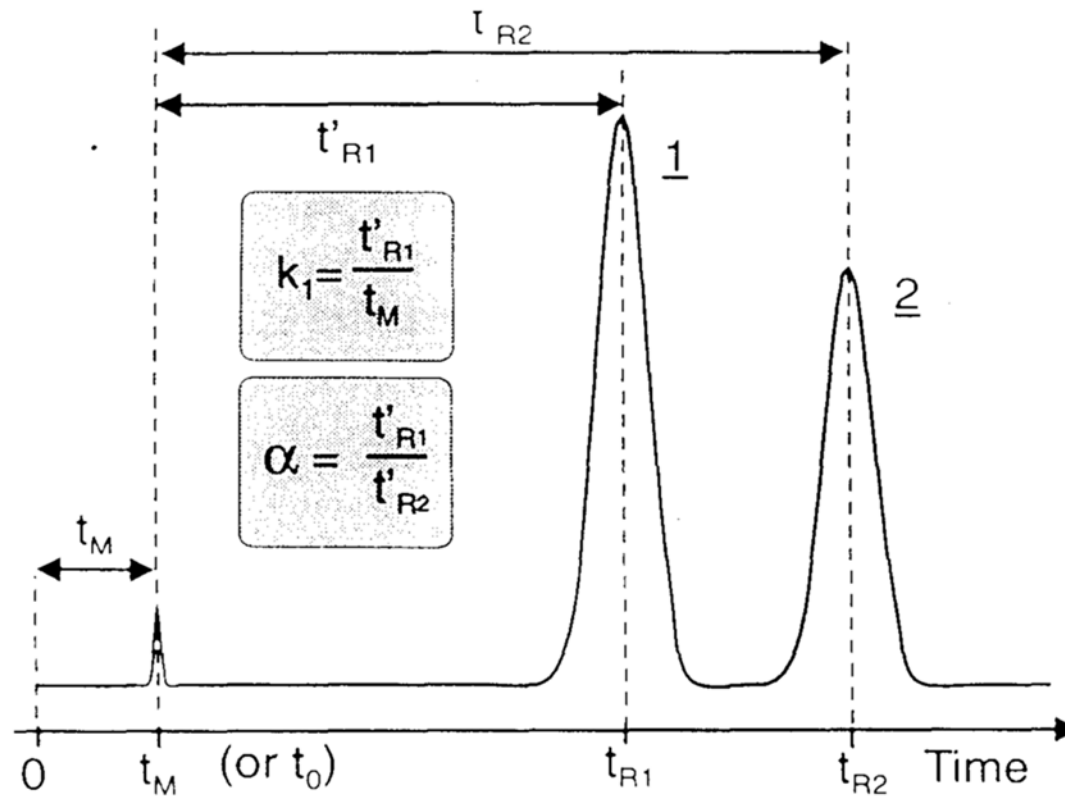
V_Rretencijski volumen komponente

V_mmrtvi volumen

Kromatografski parametri

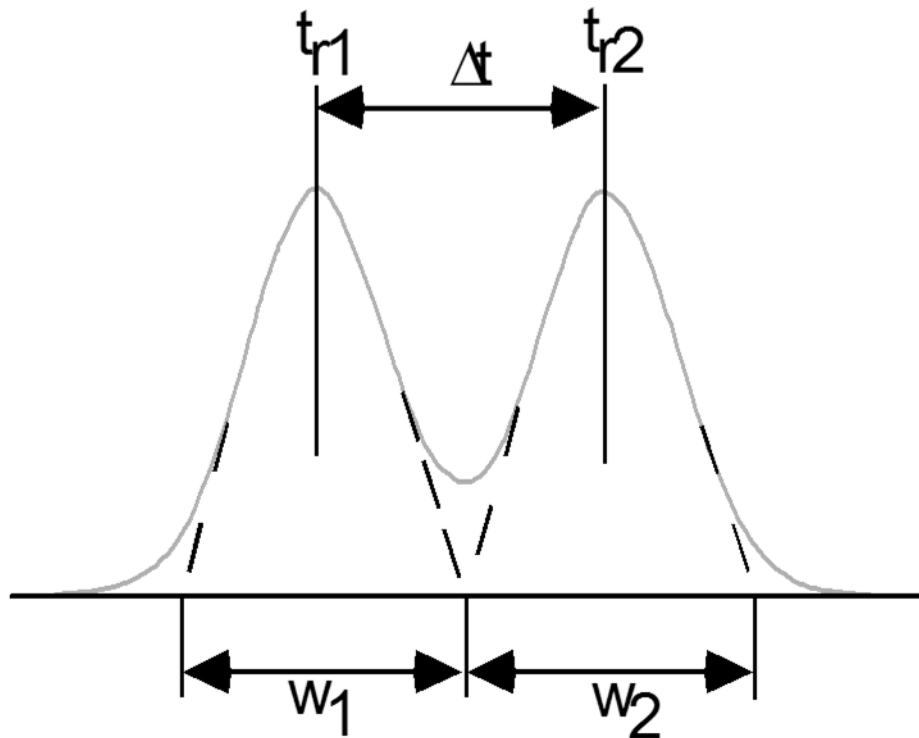
Selektivnost α se nanaša na zmožnost kolone, da loči dve komponenti - separacijski faktor

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



Ločljivost

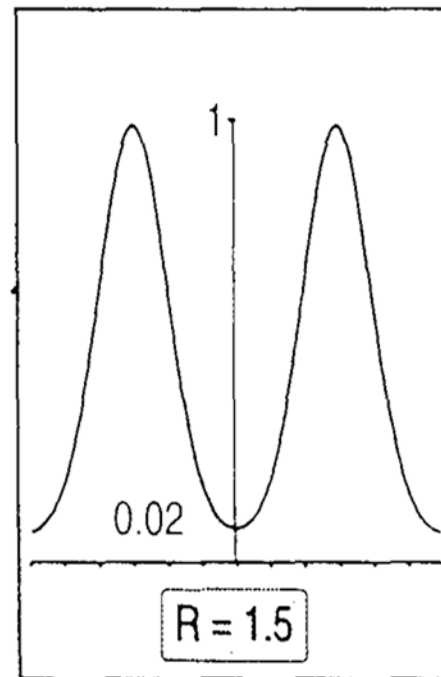
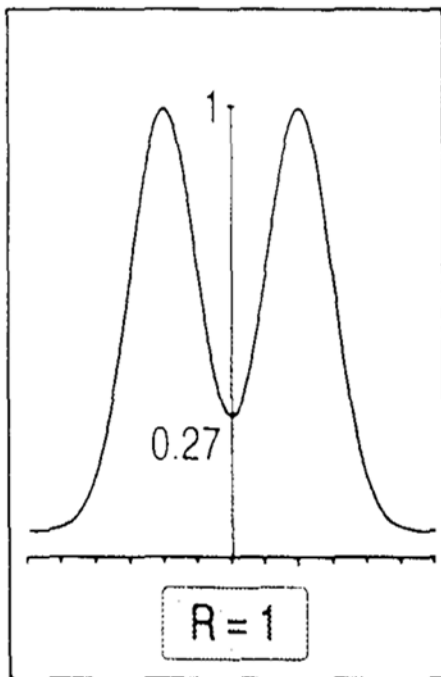
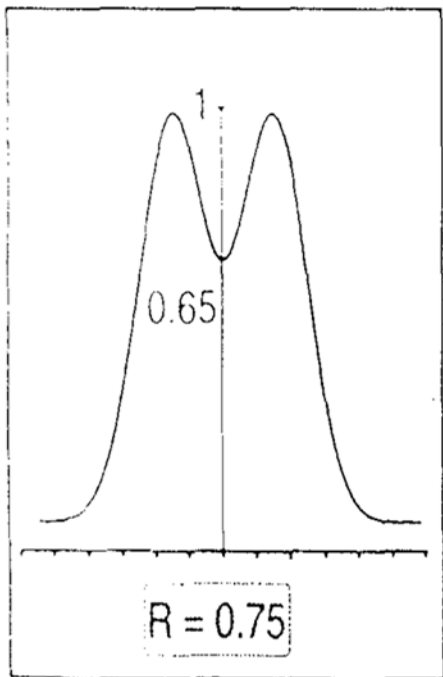
$$R = 2\Delta t_r / (w_1 + w_2)$$



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

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

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

Učinkovitost kolone ('column efficiency') - razširitev pasov

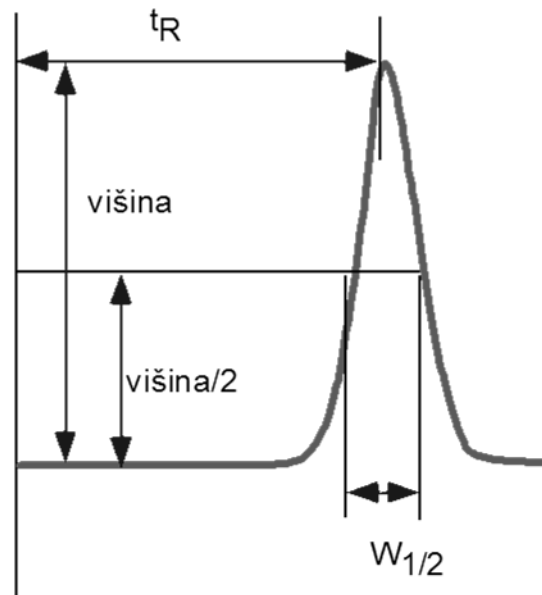
Učinkovitost kolone kvantitativno izrazimo s številom teoretskih podov N ('Theoretical Plates').

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

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

Učinkovitost kolone-izračun N

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



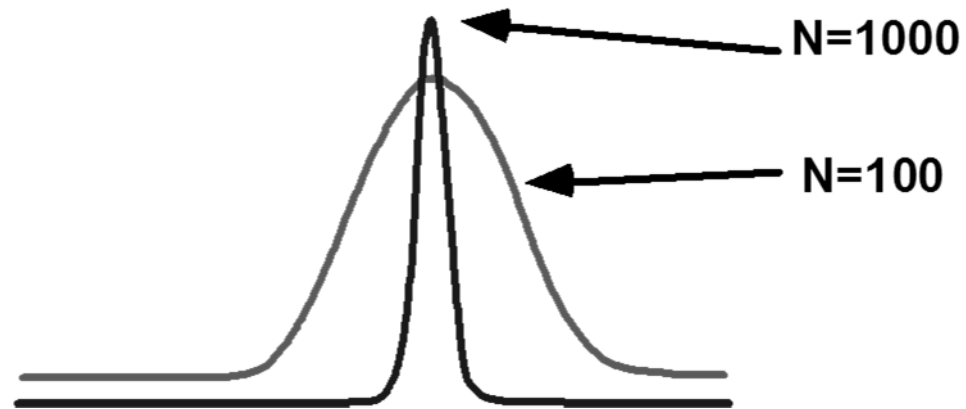
Teoretska višina poda - H

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« difusion)

B - vzdolžna difuzija

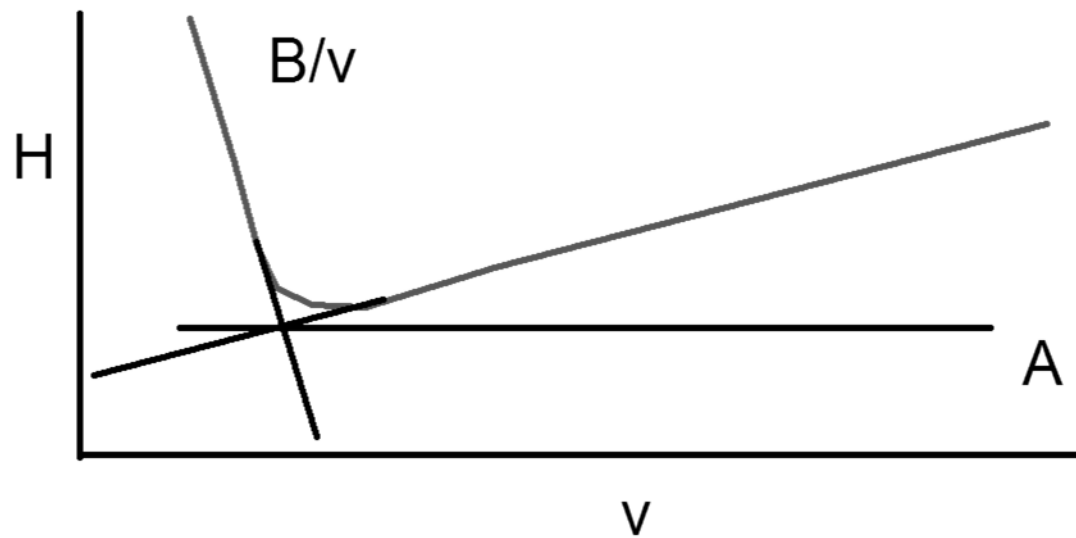
C - masni prenos med fazami

v - hitrost mobilne faze

Koeficienta B in C sta odvisna od hitrosti mobilne faze

van Deemter-jeva enačba

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



Van Demmterjevi koeficienti A

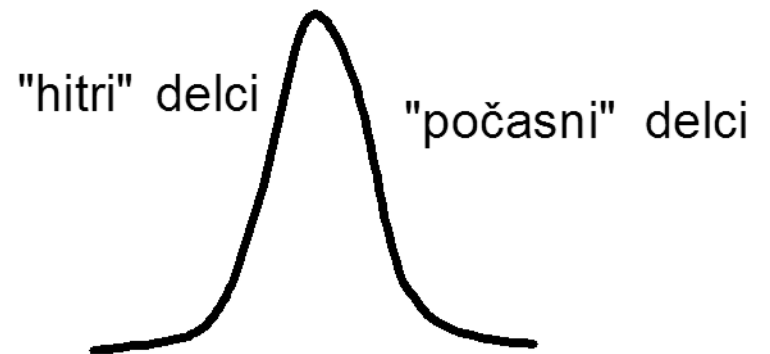
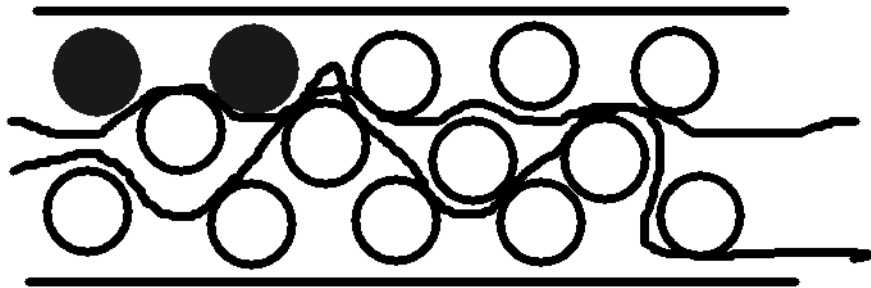
Koeficient A je predvsem odvisen od načina polnjenja kolone

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)

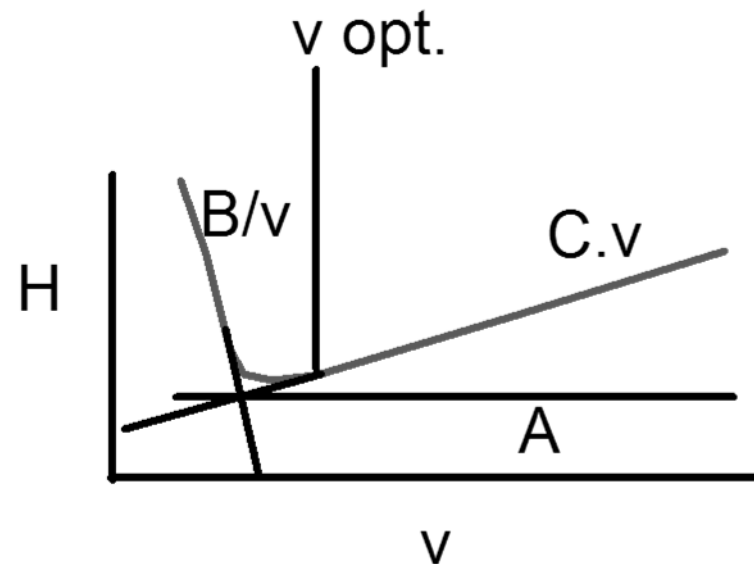
»Debelejše« in viskoznejše stacionarne faze imajo večji C

Zmanjšanje koeficienta C:

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

Optimiranje hitrosti mobilne faze

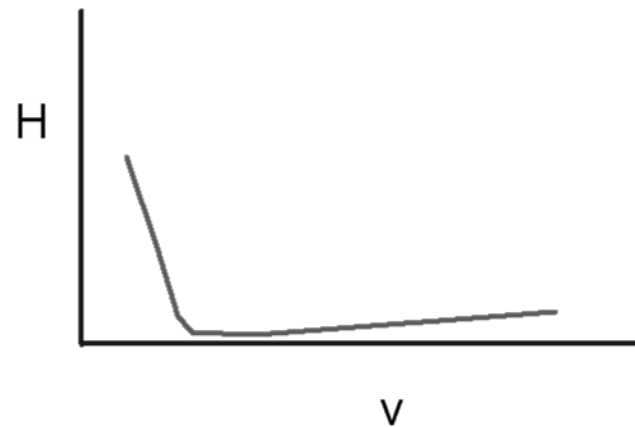
Optimalno hitrost določimo s pomočjo van Deemterjeve enačbe in eksperimentalnih parametrov



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!