

# Seminar

- Opis vzorca, pričakovani koncentracijski nivoji
- Argumentacija izbire analizne tehnike
  - razkroj in priprava vzorcev
  - uporabljena analizna tehnika
- Opis postopka
  - razkroj in priprava vzorcev
  - priprava standardnih raztopin
  - uporabljena analizna tehnika

# 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*

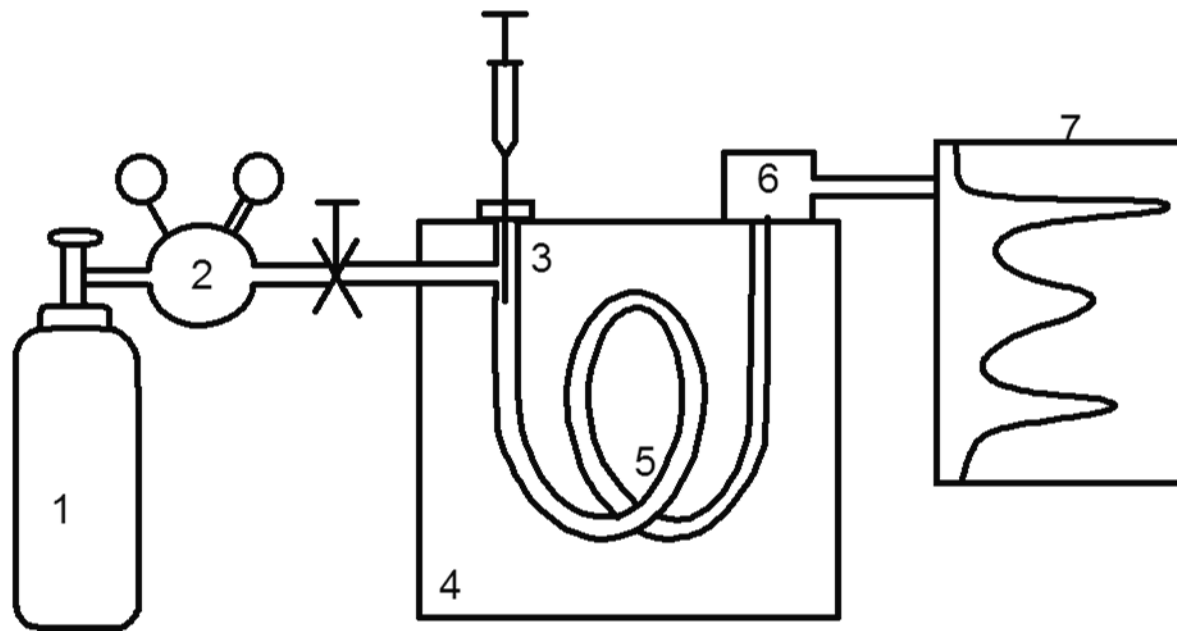
*c) Normalizacija površin vrhov*

# *Plinska kromatografija*

## *Plinski kromatograf*

- *injektor*
- *kromatografska kolona*
- *detektor.*

# *Plinski kromatograf*



# *Plinska kromatografija*

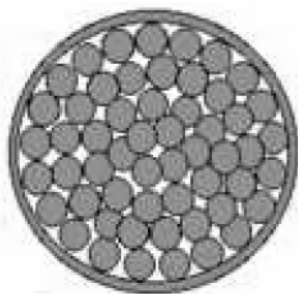
## *Kolone v GC*

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

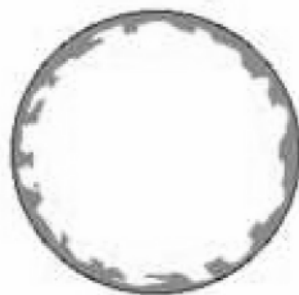
# *Kolone v GC*

Vrste kolon

POLNJENE



KAPILARNE



# *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  $\mu\text{m}$ ).

Notranji premer kolone: vsaj 8-krat večji od premera delcev polnila.



# *Kolone v GC*

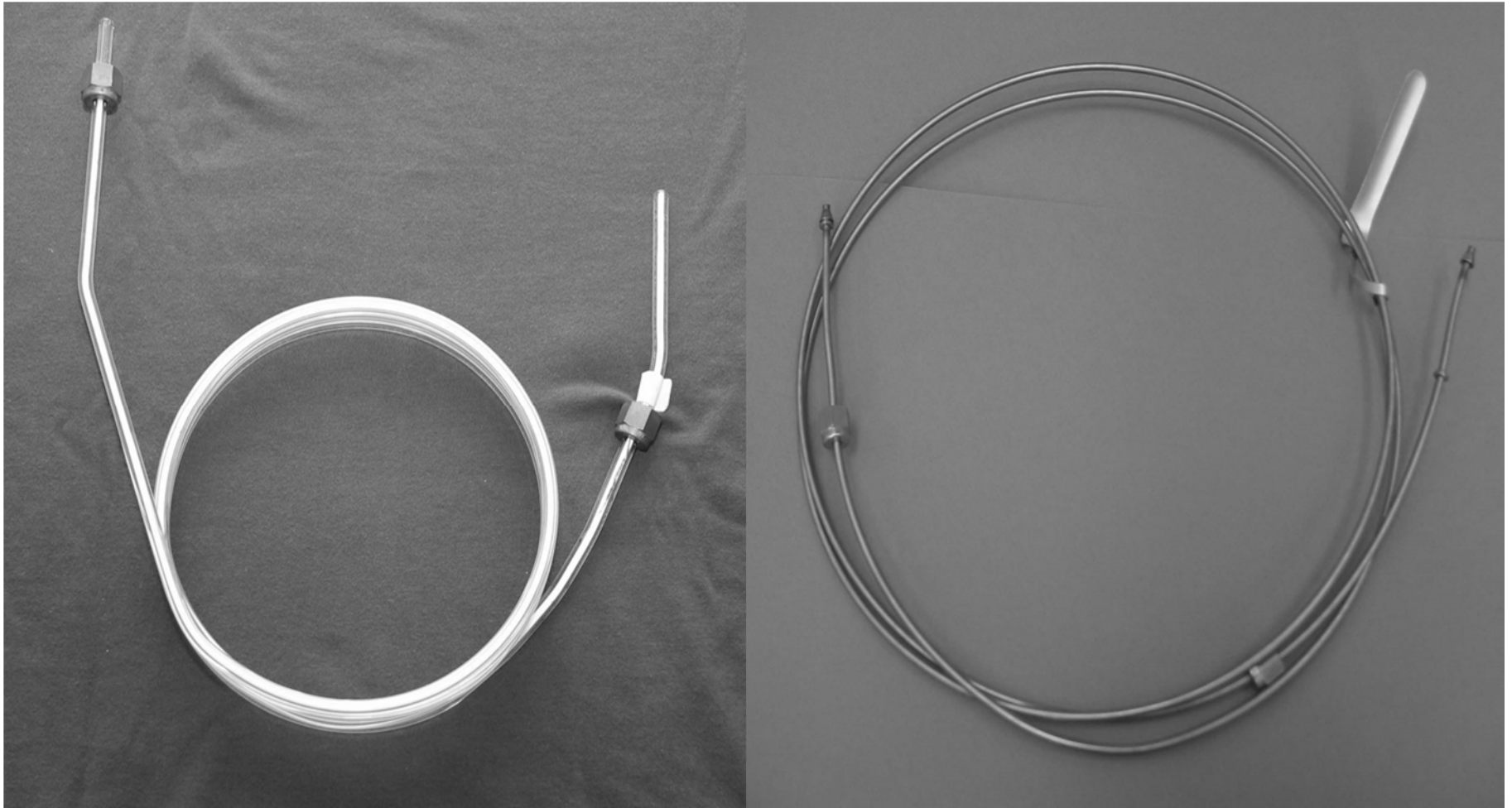
Kapilarne kolone (iz staljenega kvarca - 'fused silica'):

Notranji premer manjši od 1 mm, dolžina do 50 m.

Stene so prevlečene z ustrezno stacionarno fazo (1-2  $\mu\text{m}$ ) - 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.

## Polnjene kolone



# Kapilarne kromatografske kolone



# *Detektorji za GC*

TCD-Thermal Conductivity Detector

FPD-Flame Photometric Detector

PID-Photoionization Detector

NPD-Nitrogen Phosphorus Detector

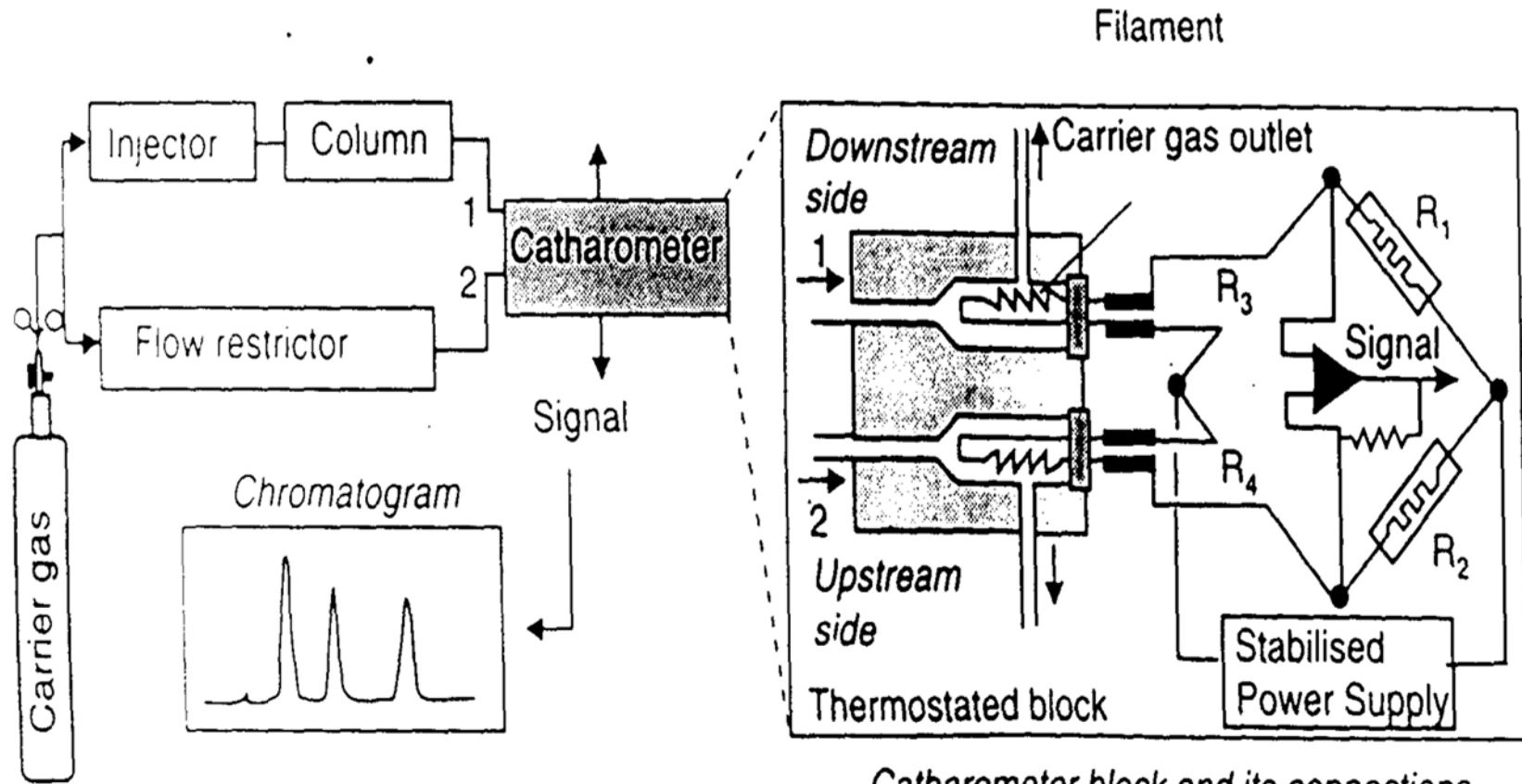
FID-Flame Ionization Detector

ECD Electron Capture Detector

# 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**

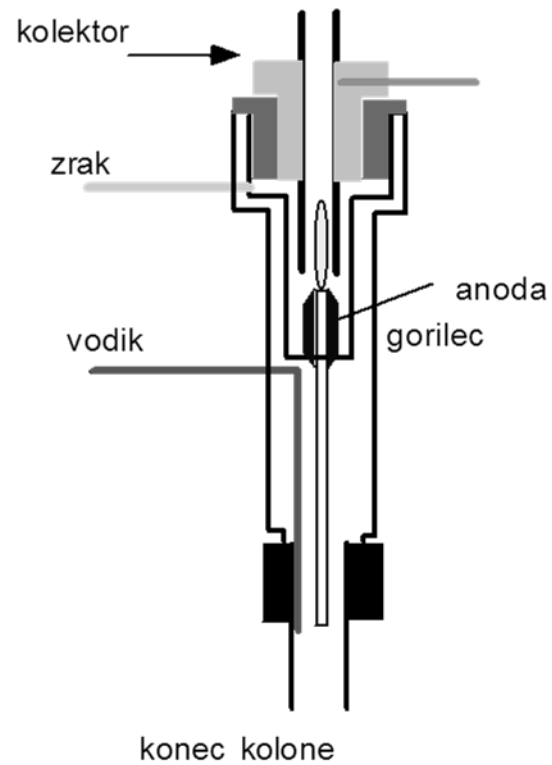
**Izbira nosilnega plina**

**Nedestruktivni - preparativna  
kromatografija**

**Visoka meja zaznave**

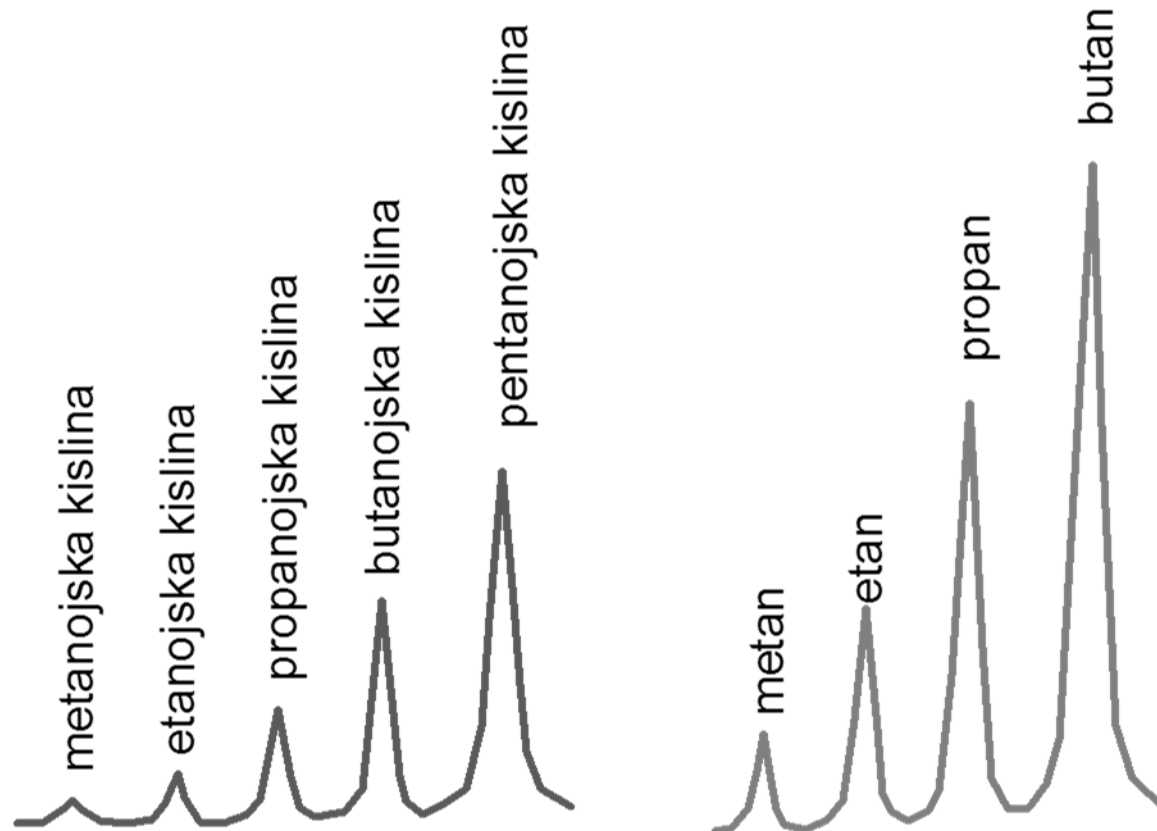
<b>plin</b>	<b>Toplotna prevodnost (W/mst)</b>
<b>argon</b>	<b>147. 10<sup>-4</sup></b>
<b>dušik</b>	<b>251</b>
<b>vodik</b>	<b>1754</b>
<b>helij</b>	<b>1558</b>
<b>metan</b>	<b>300</b>

# Plamenski ionizacijski detektor

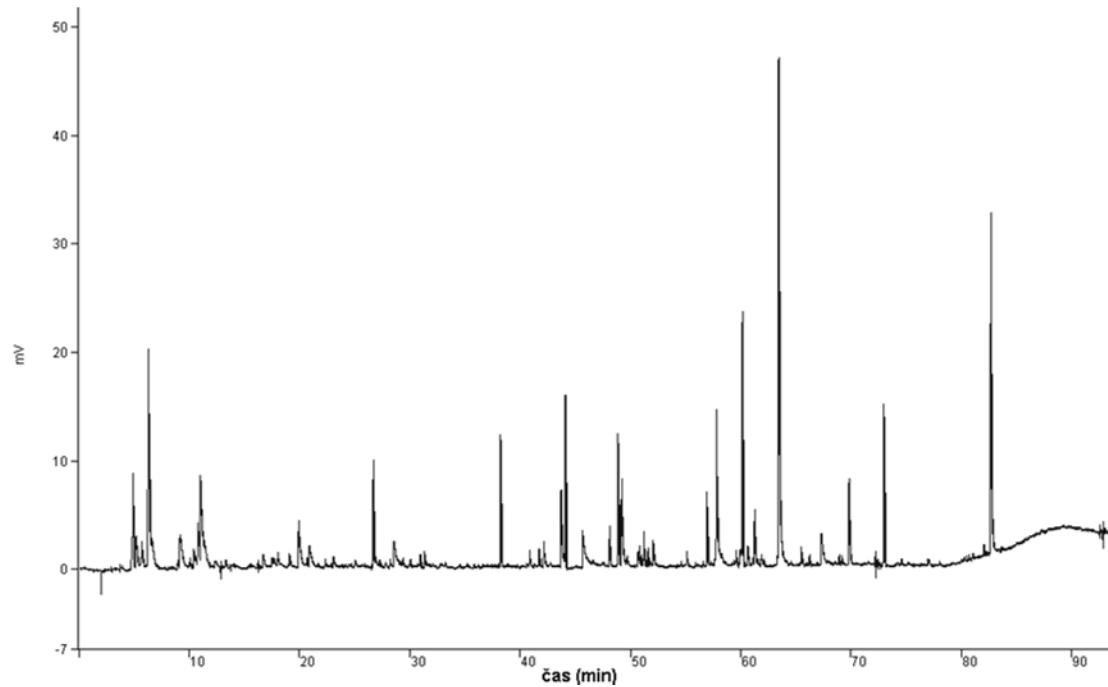




# Plamenski ionizacijski detektor



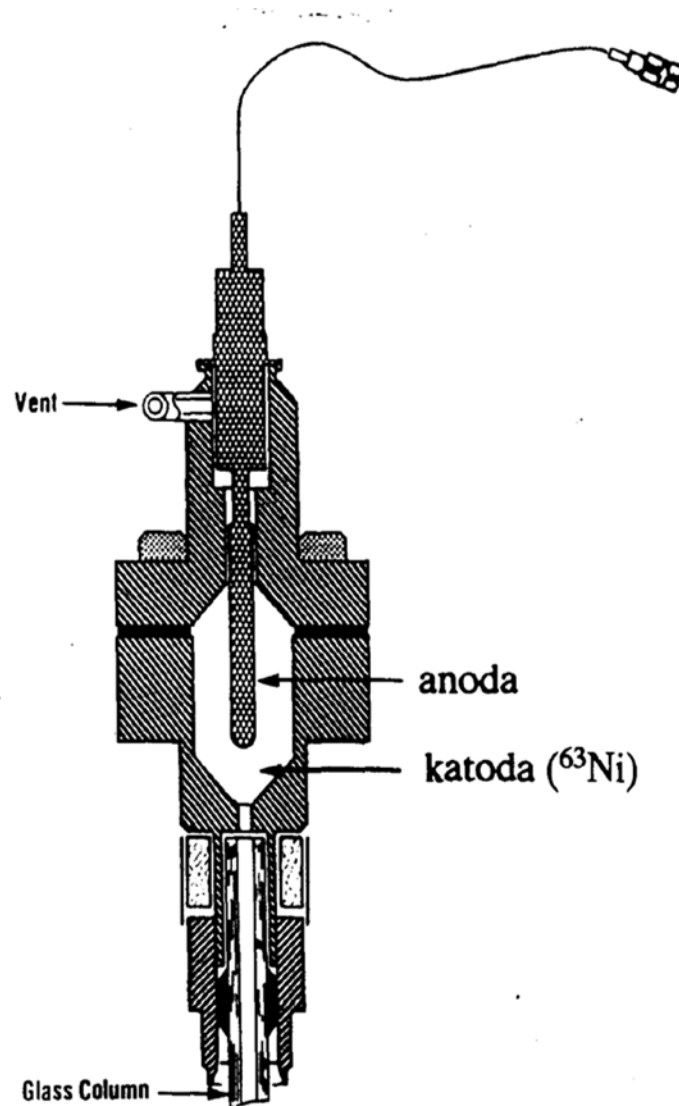
# Posebni primeri kvantitativne analize



Signal je sorazmeren številu C atomov v molekuli.

Faktor občutljivosti na enoto mase ogljikovodikov je konstanten.

# ECD



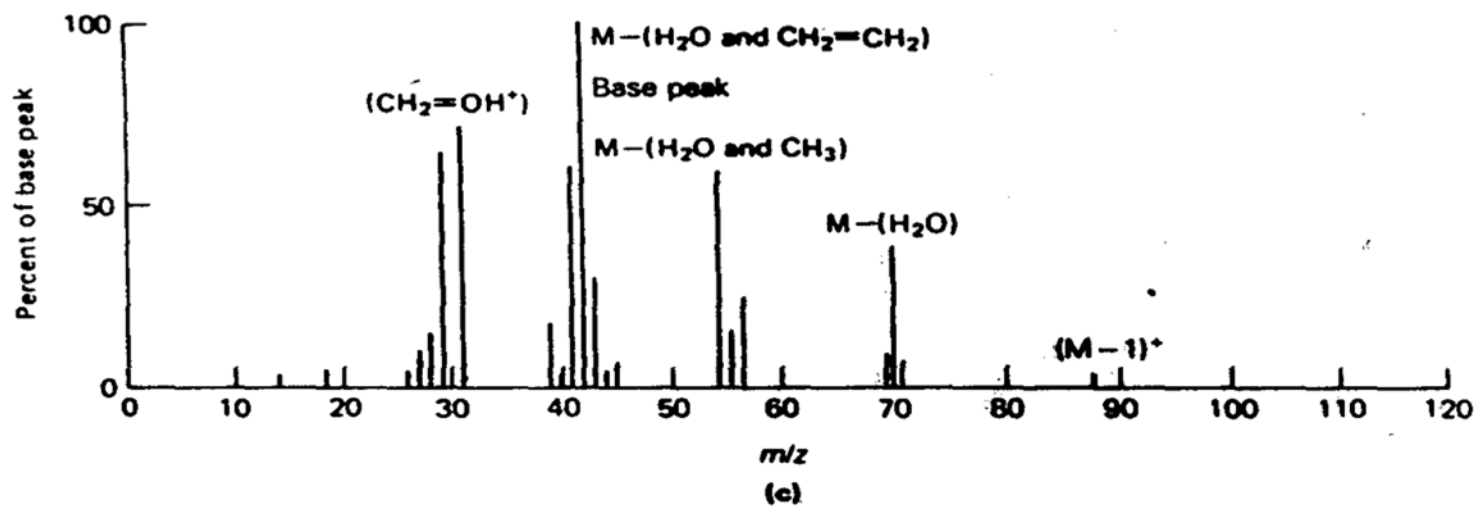
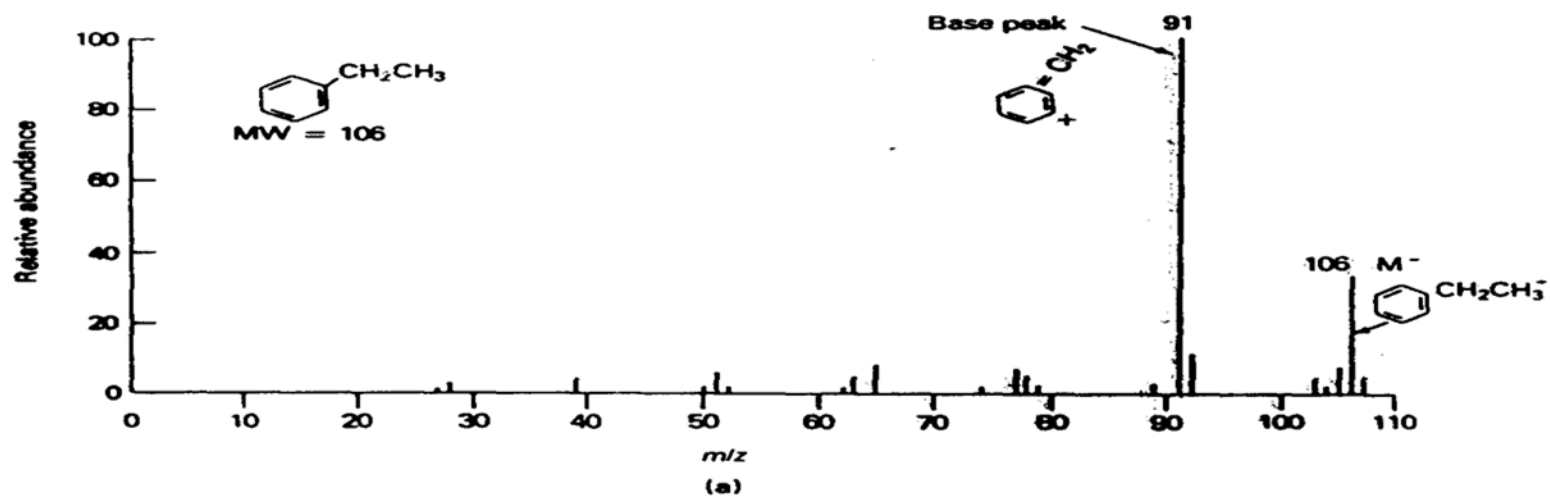
Za spojine, ki vežejo elektrone

Selektivni

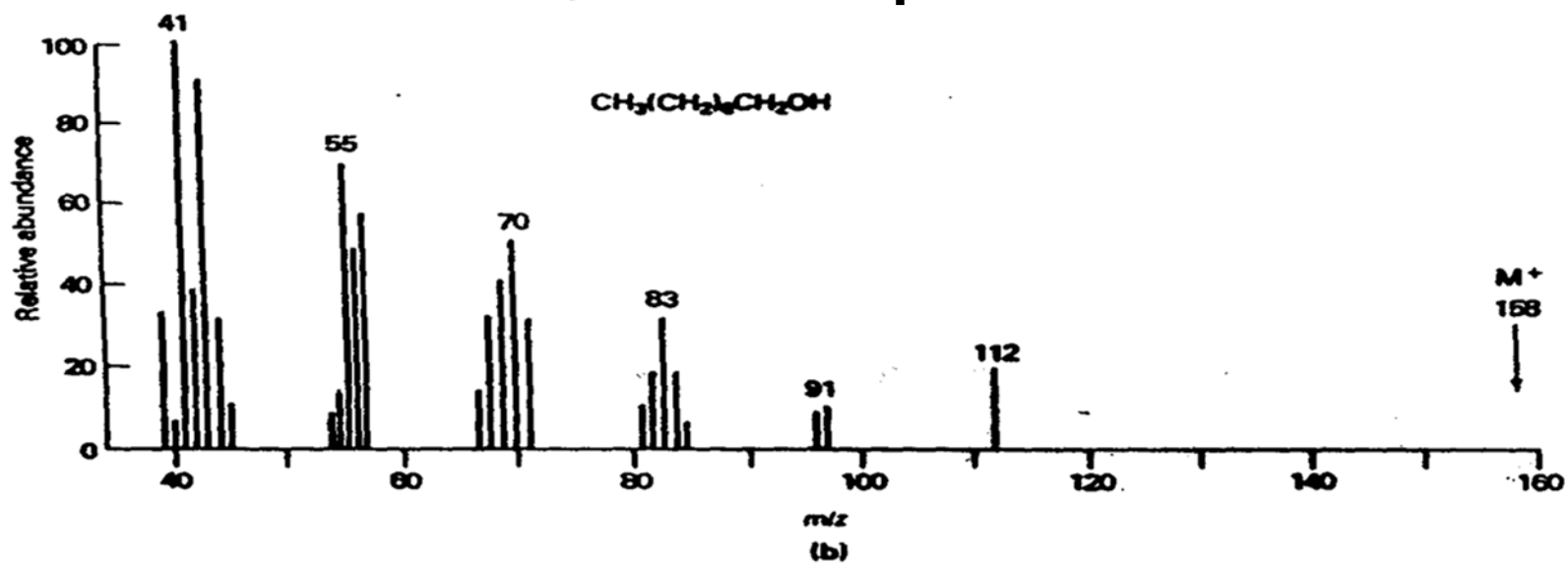
Nizka meja zaznave pg-spojine

Ozko linearno območje

# EI mass spectra



# EI, CI mass spectra



# TEKOČINSKA KROMATOLOGRAFIJA

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.

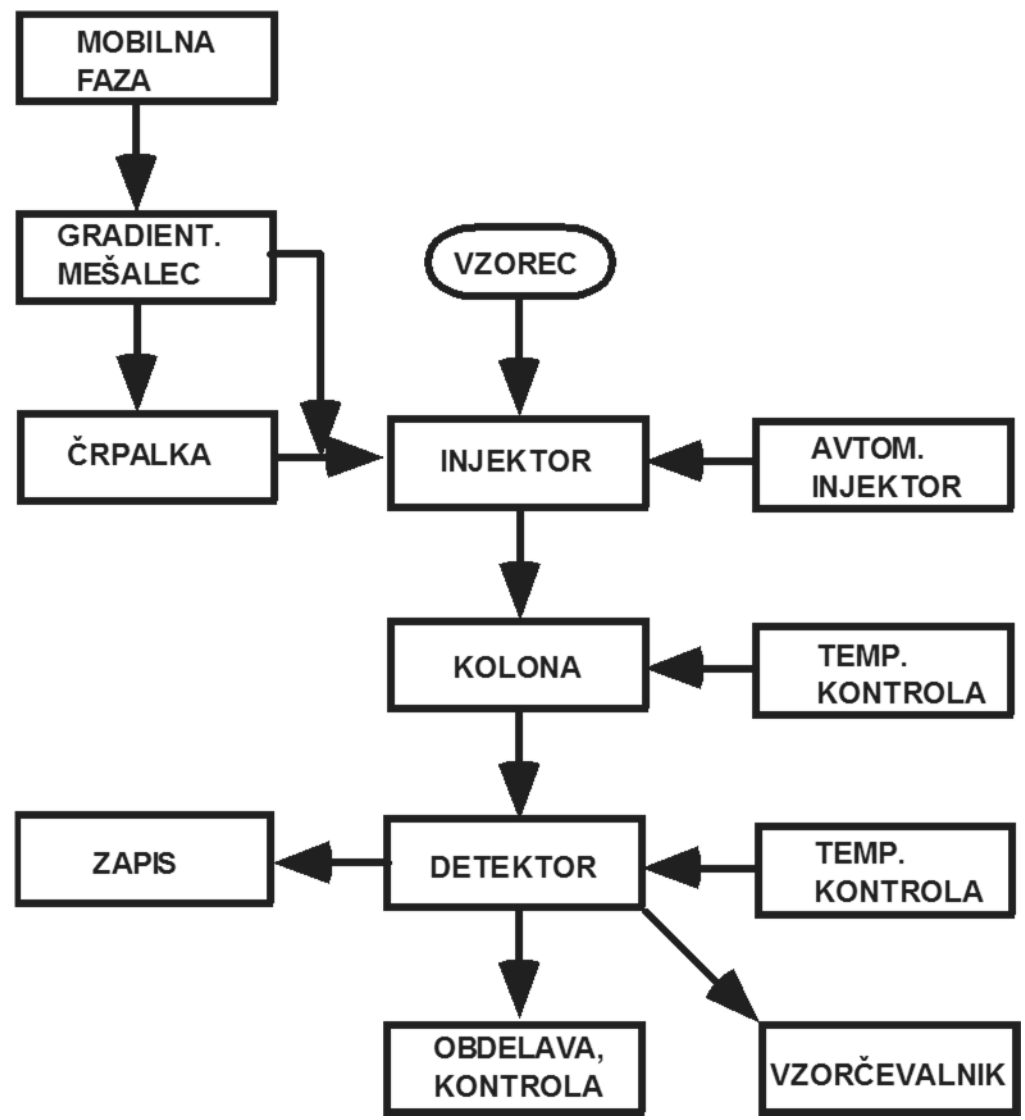
1 bar =  $10^5$  Pa

1 psi = 6894,76 Pa

# TEKOČINSKA KROMATOLOGRAFIJA

## KOMPONENTE HPLC SISTEMA:

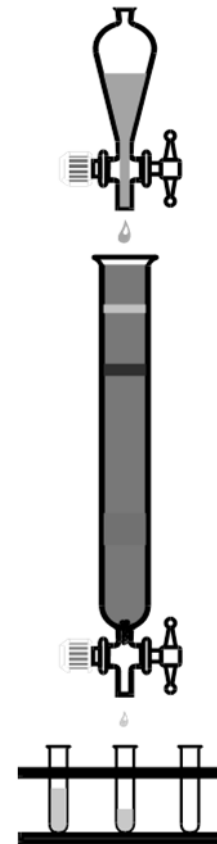
- rezervoar z mobilno fazo,
- črpalka,
- injektor,
- kolona z detektorjem in
- rekorder





# 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

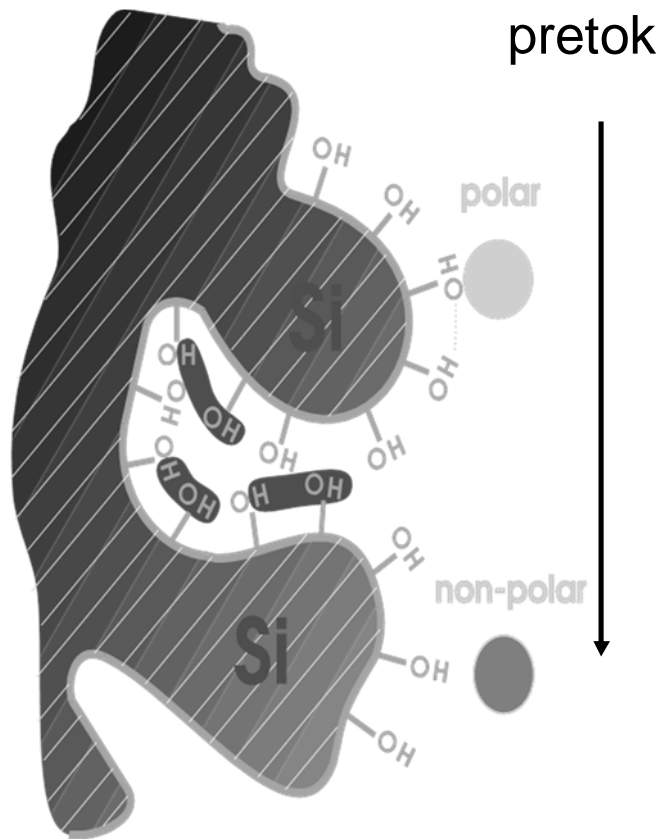
IONSKA IZMENJAVA: vodne pufrske raztopine

IZLOČITVENA KROMATOLOGRAFIJA: tetrahidrofuran,  
kloroform

# Vrste HPLC

- Normalna faza (NP)
- Reverzna faza (RP)
- Ionska izmenjava (IEC)

# Normalna faza



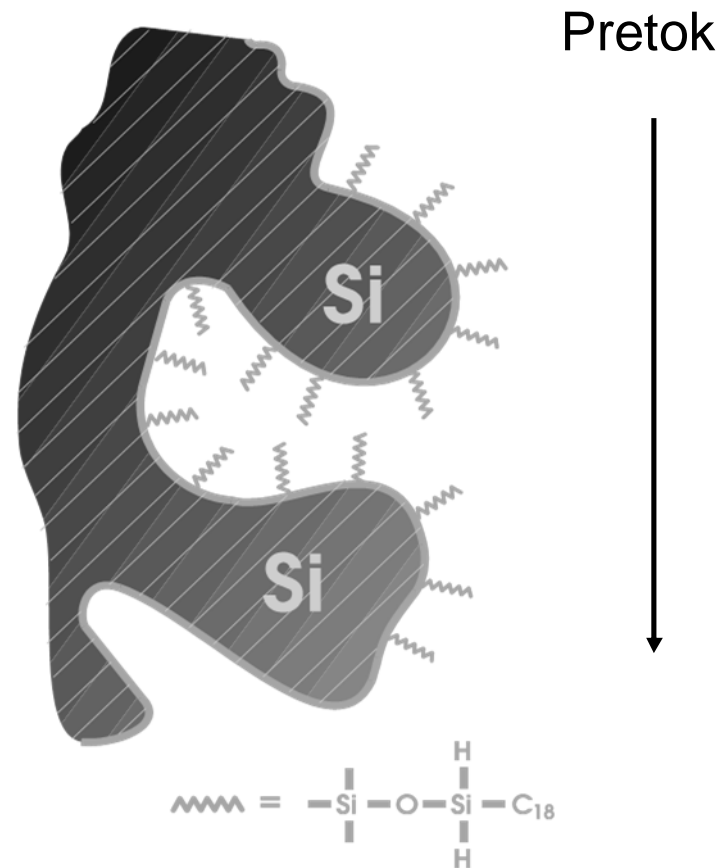
- Polarna stacionarna faza ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ )
- Nepolarna mobilna faza (n.pr., heksan, metilen klorid)
- Ločujemo polarne spojine

# 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

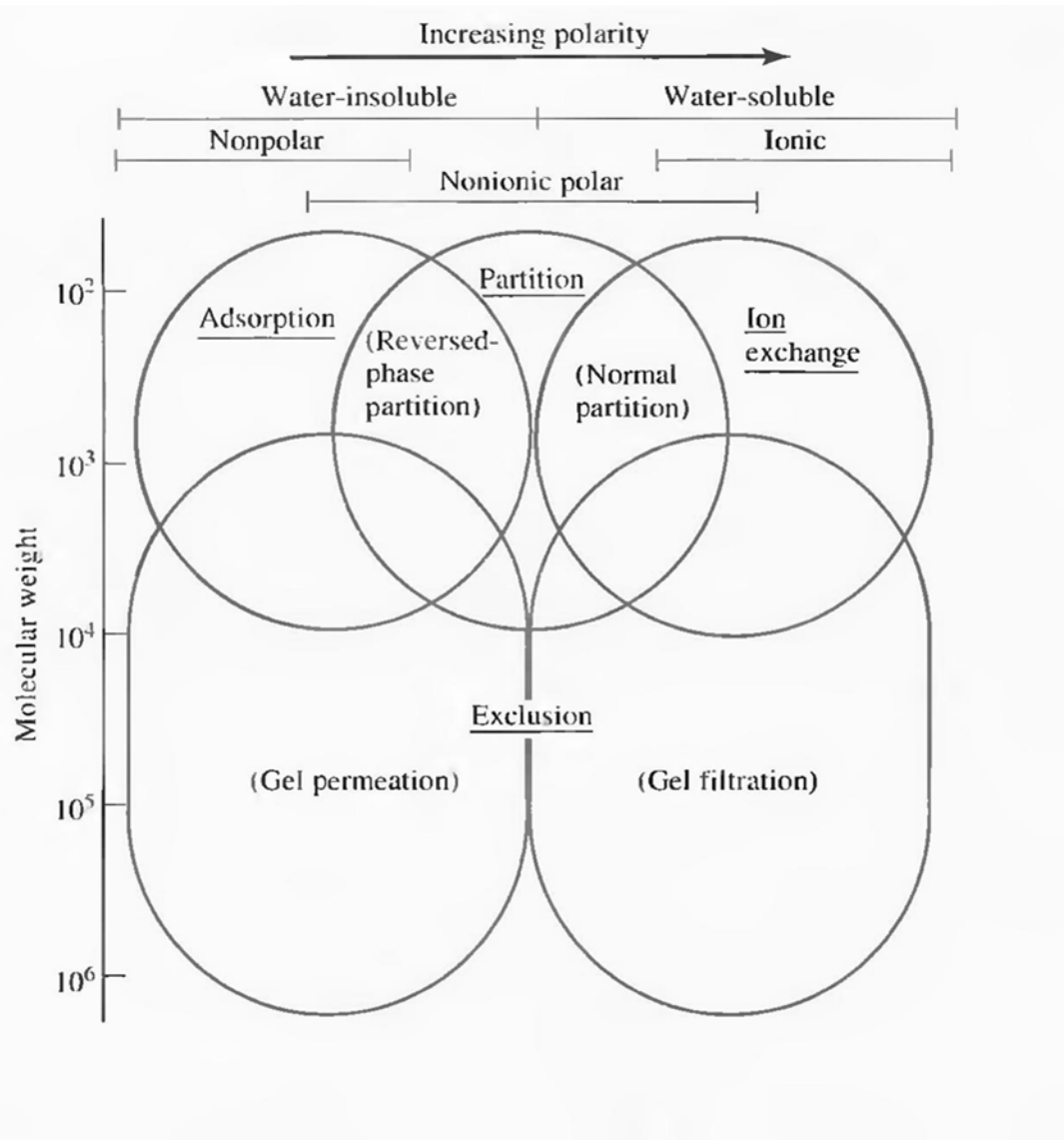
- Nepolarna stacionarna faza (n.pr., C<sub>18</sub>)
- Polarna mobilna faza., (voda, metanol, acetonitril)
- Ločujemo nepolarne spojine



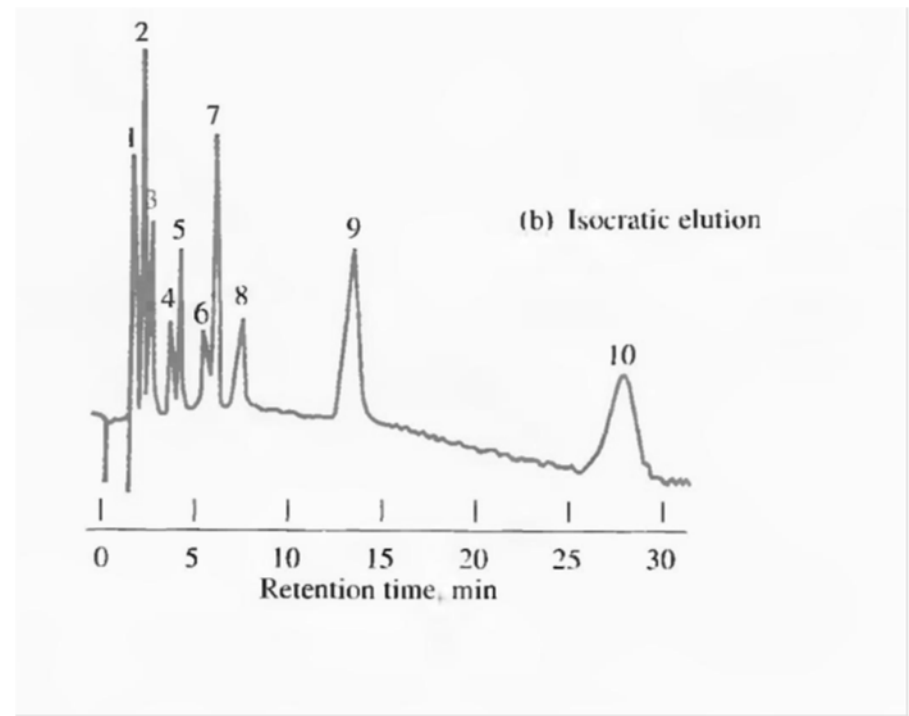
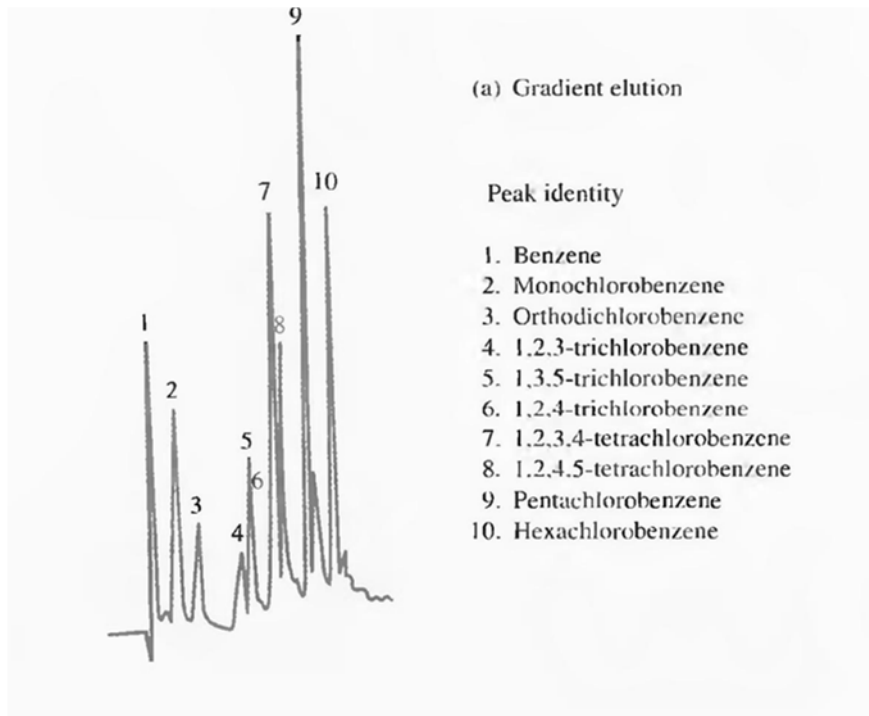
# Reverzna faza

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





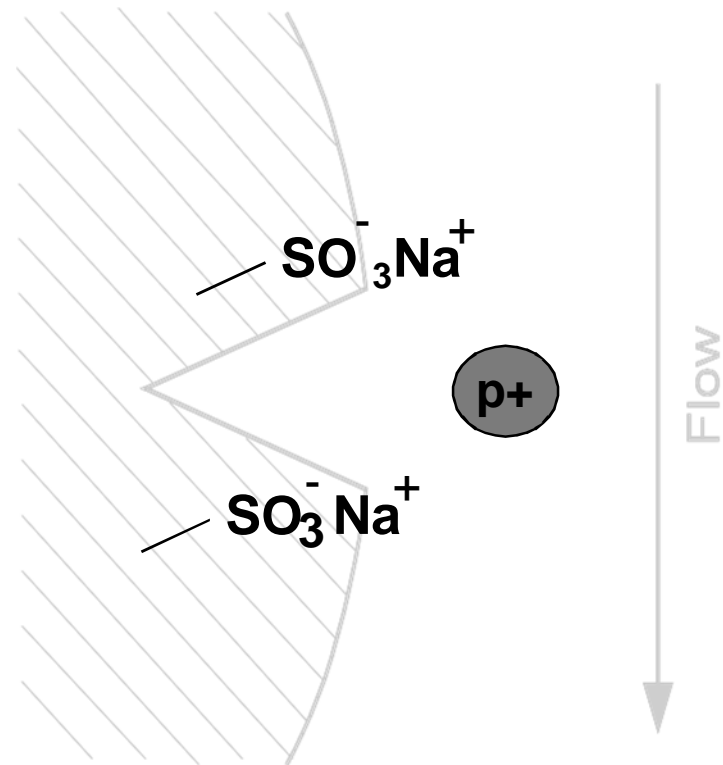
# Izokratska/gradientna elucija



# Ionska kromatografija

Nosilec

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

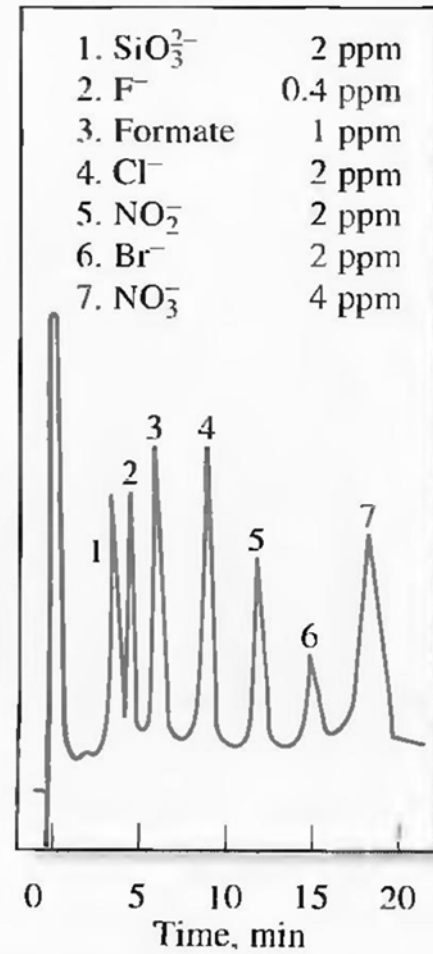
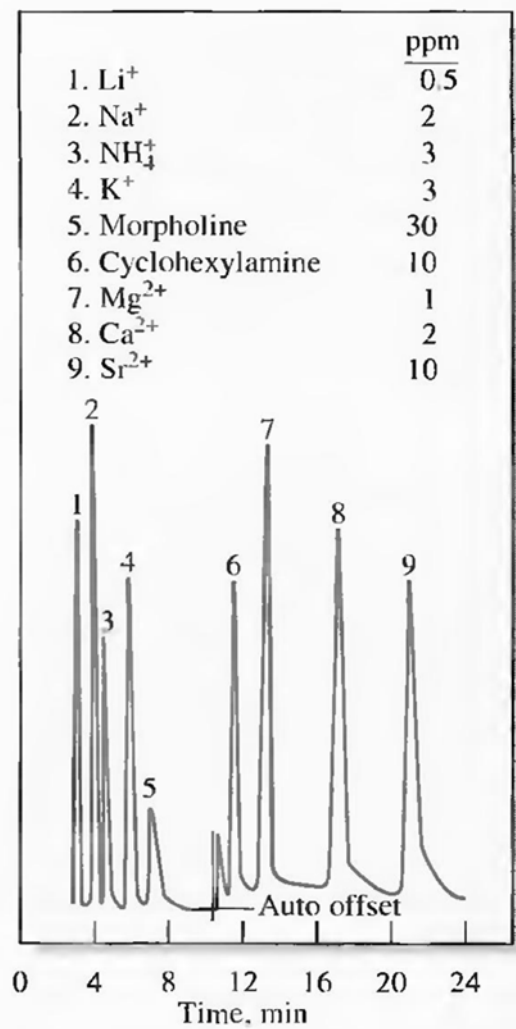


Kationski izmenjevalec

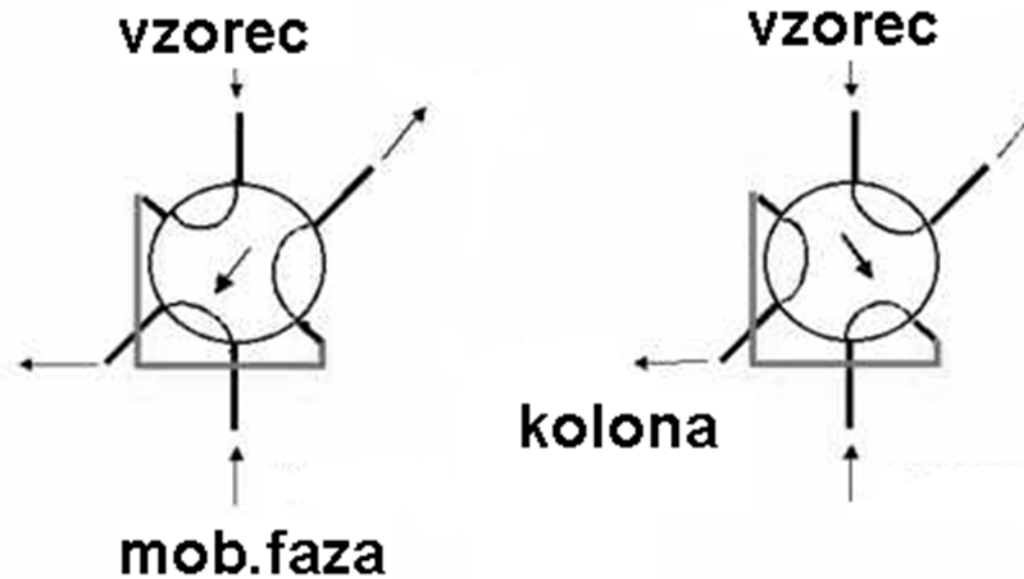
# Ionska kromatografija

- 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, .....

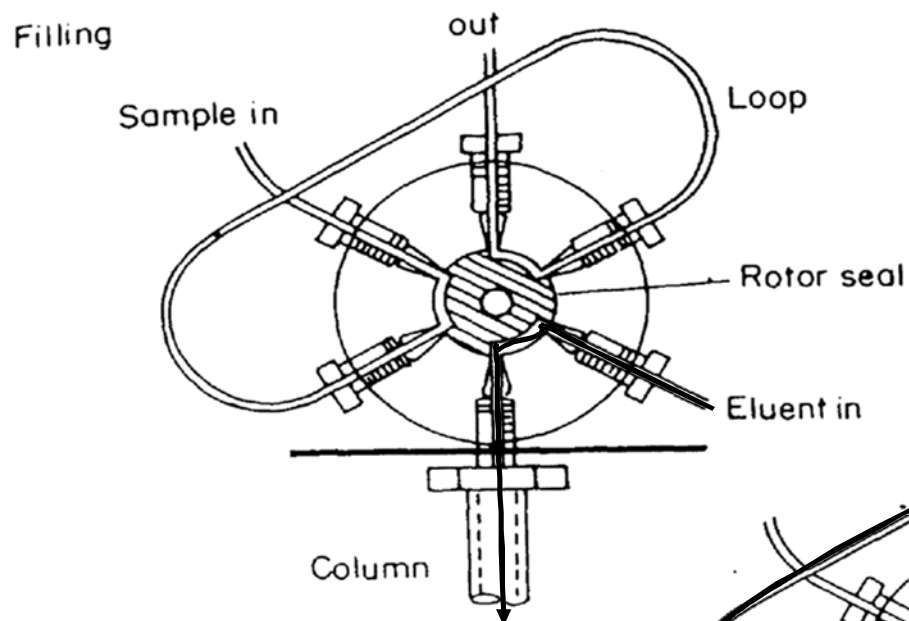
# Ionska kromatografija



# HPLC-injektor

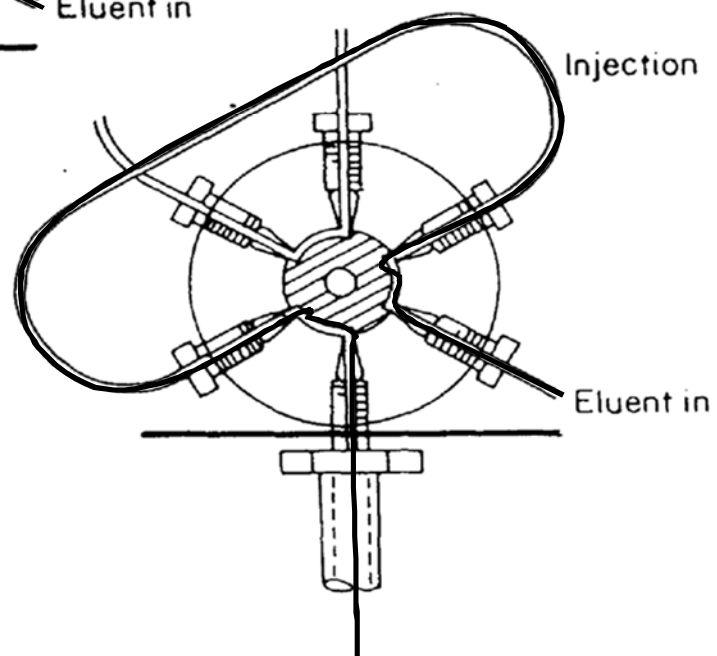


# Injektorji (ročni/avtomatski)

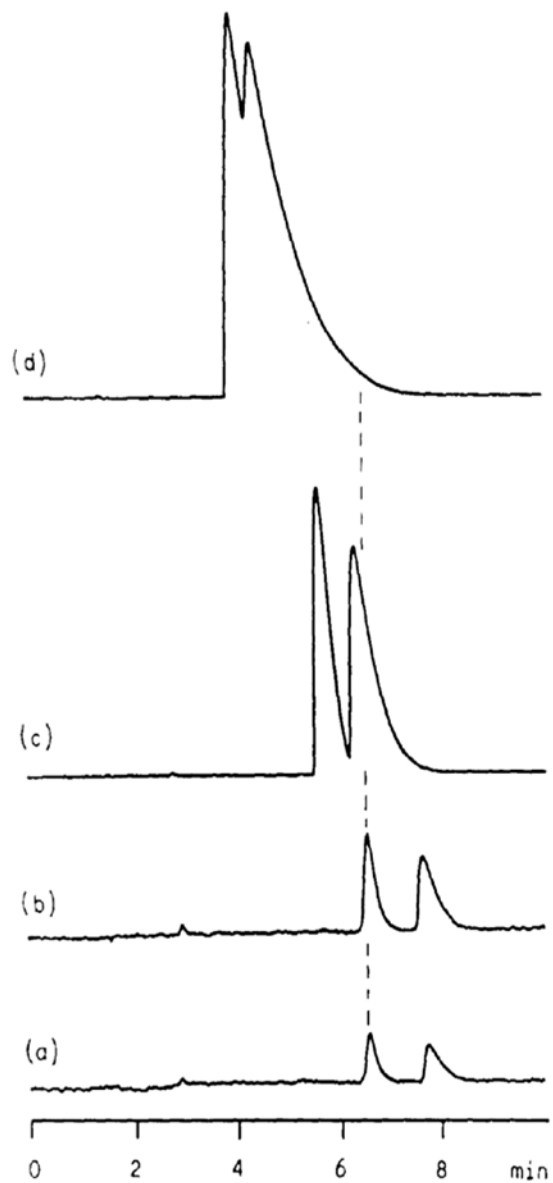


Volumen zanke majhen v primerjavi z  $V_m$

od 1-100 $\mu$ l



# Količina spojin na koloni



2mg

Cikloheksanon,  
Ciklopentanon,  
NP

200 $\mu$ g

10 $\mu$ g

5 $\mu$ g



# 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 kolona

- Dolžina 3-25 cm notranji premer 4,6 mm
- Velikost delcev 3-10  $\mu\text{m}$
- 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  $\mu$ l ali manjše).

Zahteve:

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

# HPLC-Detektorji

Vrste detektorjev:

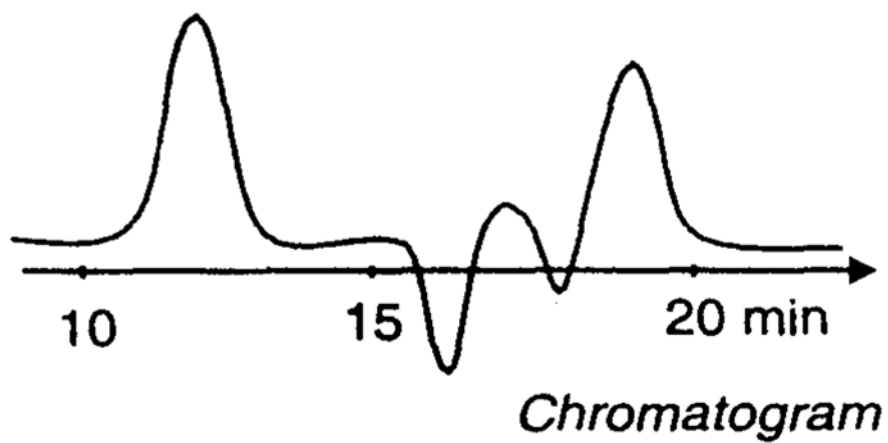
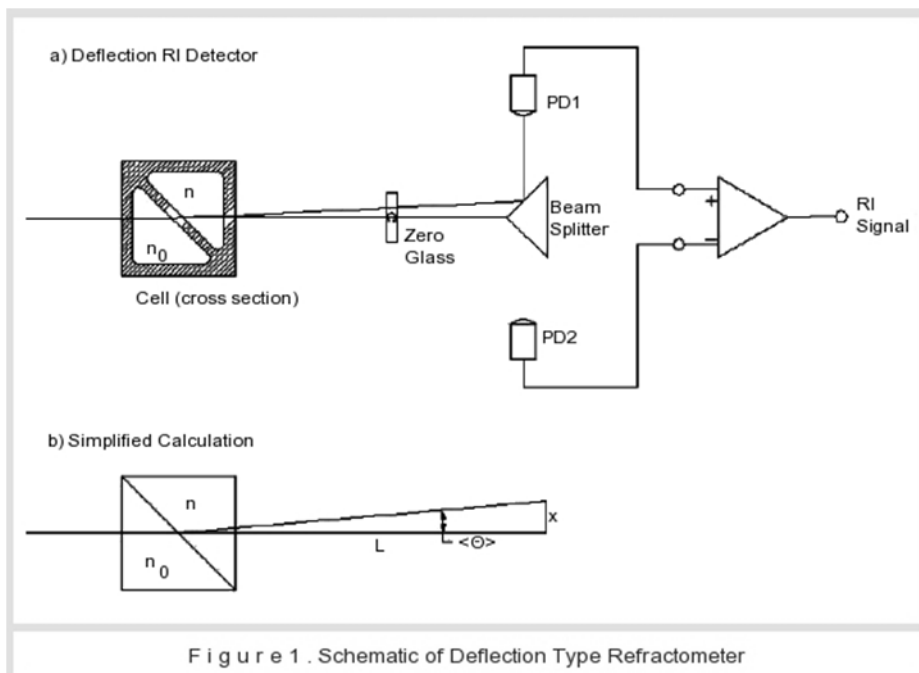
- Spektrofotometrični
- Fluorescenčni
- Elektrokemijski (Voltometrični)
- Lomni količnik (Refraktometrični)



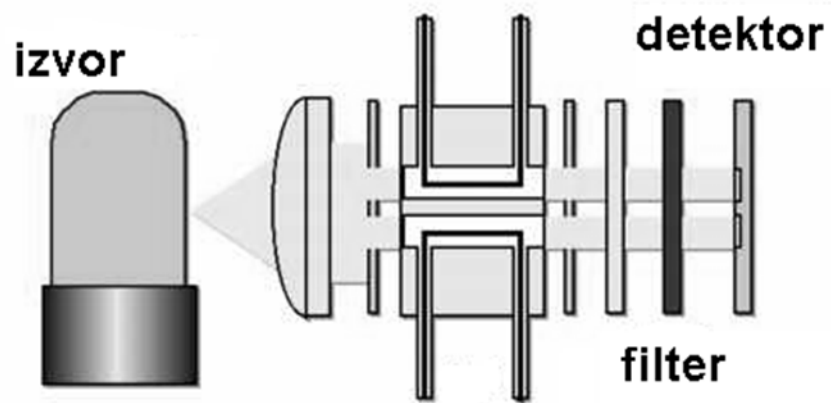
# HPLC- Primerjava detektorjev

Lomni količnik	UV/VIS	Fluorescenca
Univerzalnost	Univerzalnost	Selektivnost
(konc. področje) $\mu\text{g}$	(konc. področje) ng	(konc. področje) ng - 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,....

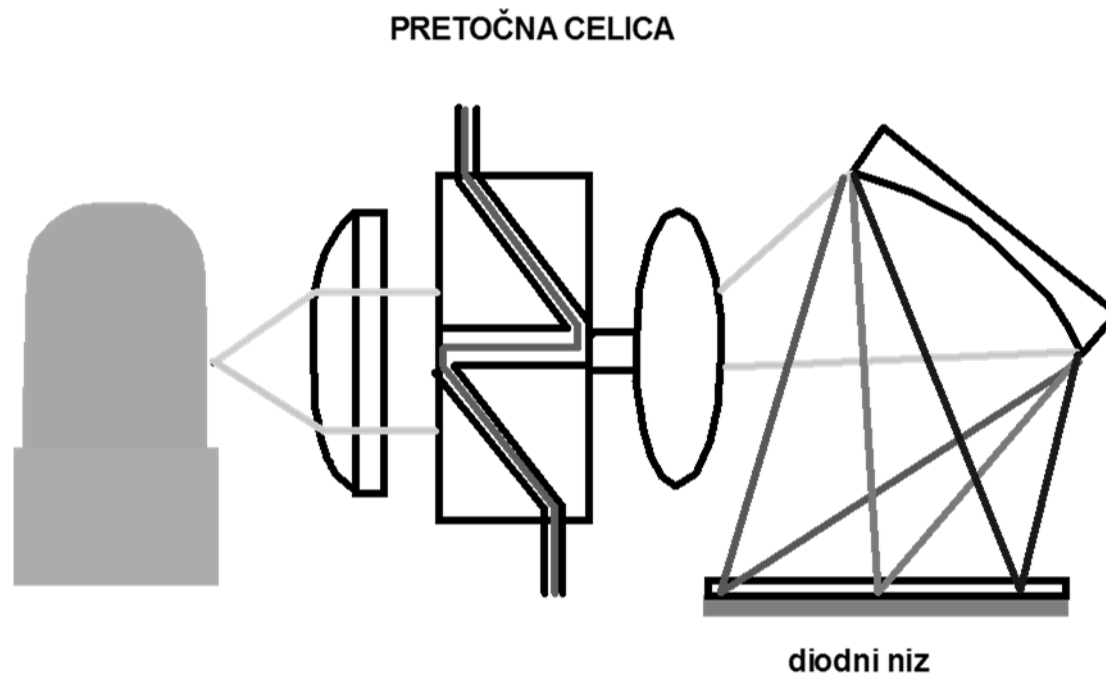
# Refraktometrični detektorji



# HPLC fotometrični detektor



# HPLC DETEKTOR (Diode array)

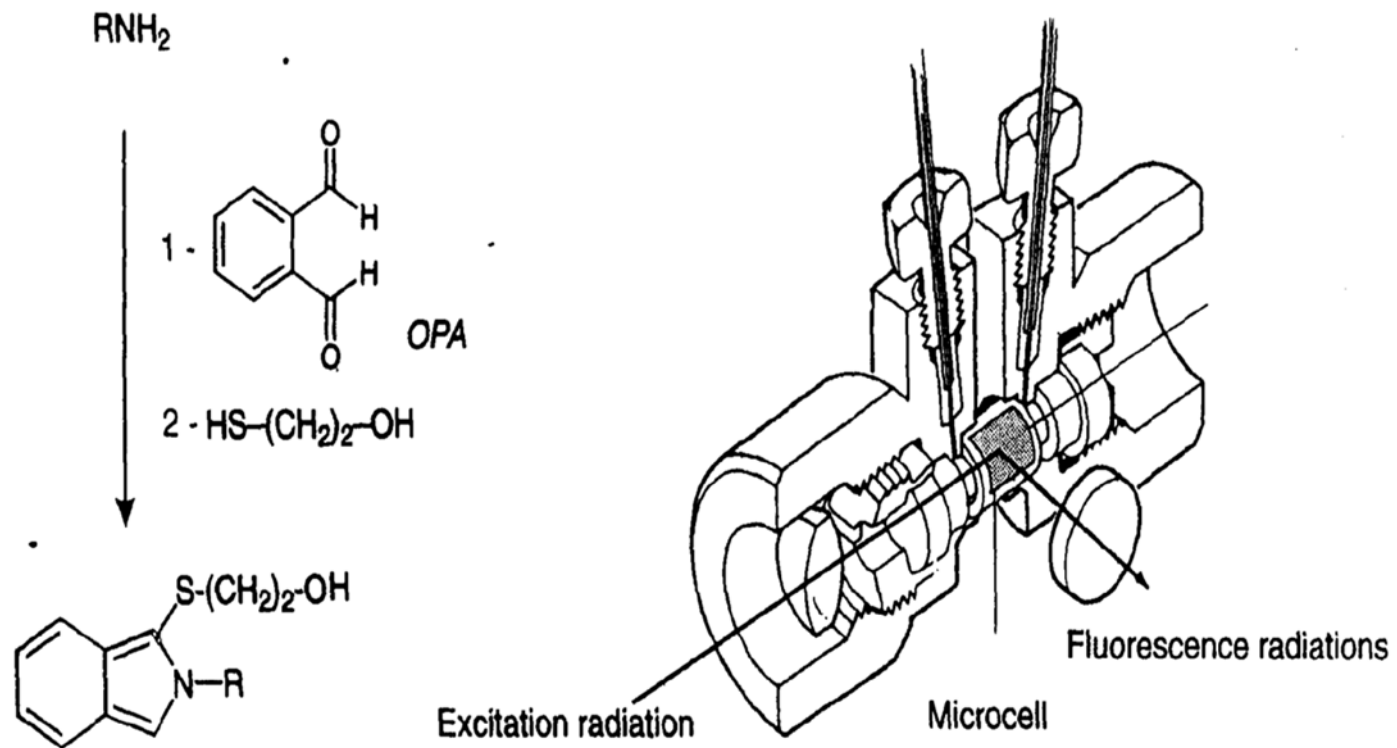




# Fluorescenčni detektorji

- $I_f = I_o k (1 - e^{-\epsilon l c}) \sim k' c$  samo pri nizkih konc.
- Selektivnost (izbira dveh  $\lambda$ )
- Nizka meja zaznave (meritev emitirane svetlobe)
- LOD 20pg za B(a)piren
- Spojine, ki fluorescirajo:
  - Adrenalin
  - Triptofan
  - Aflatoksini
  - Opiati (LSD)
  - PAH
- Priprava derivatov, ki fluorescirajo
  - Primarne aminokisline - OPA (o-ftaldialdehid)
  - Sekundarne aminokisline - FMOC (9-fluorenilmetilkloromravljica kislina)

# Fluorescenčni detektorji



# 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

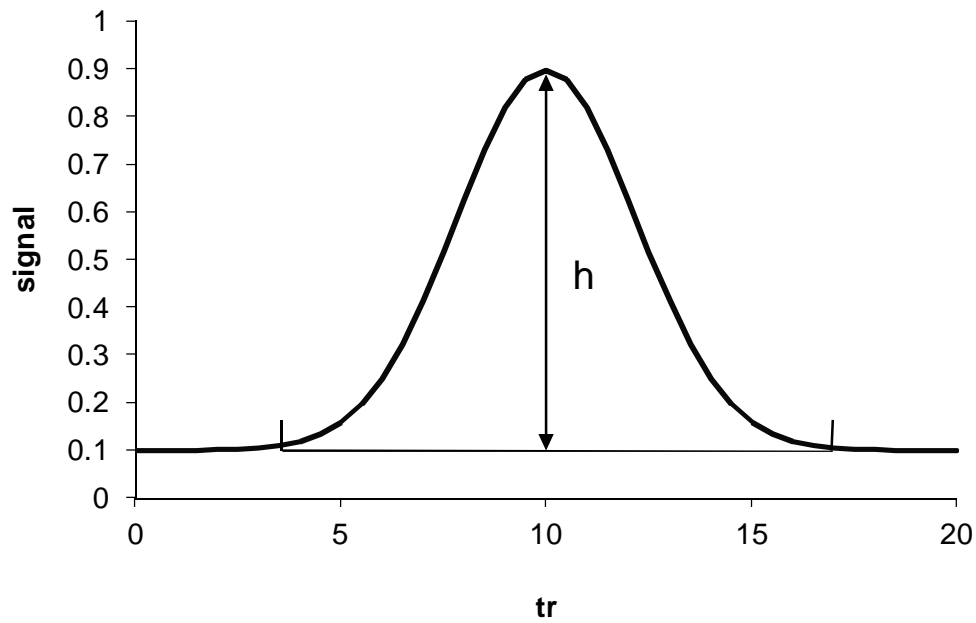
- Velika ločljivost
- Hitrost
- Občutljivost
- Ponovljivost
- Primerja za kvantitativno uporabo
- Možnost avtomatizacije
- Široka možnost uporabe

# 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.

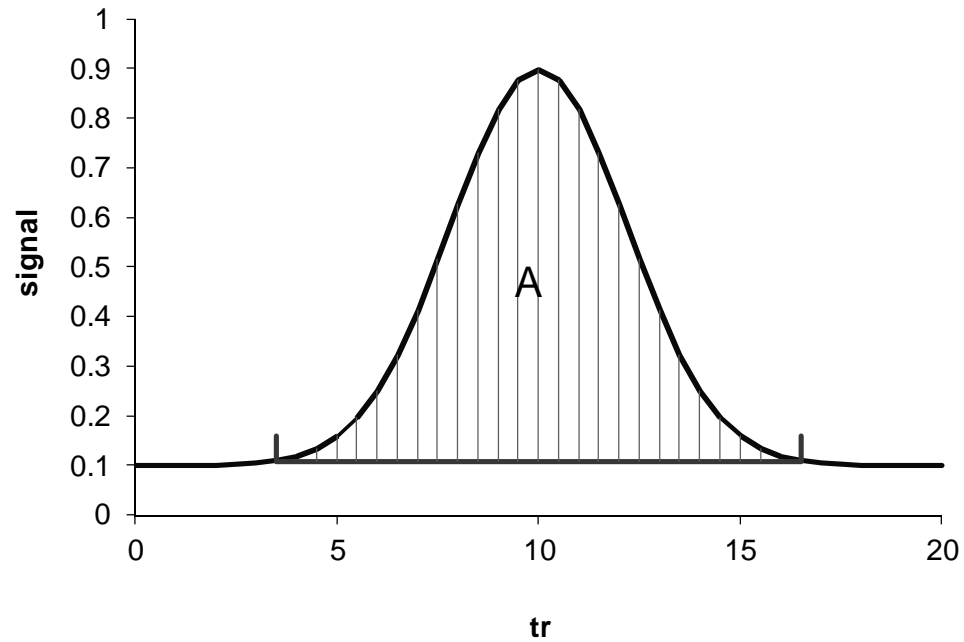
# Kvantifikacija na osnovi merjenja višin



$$n = f(h)$$

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

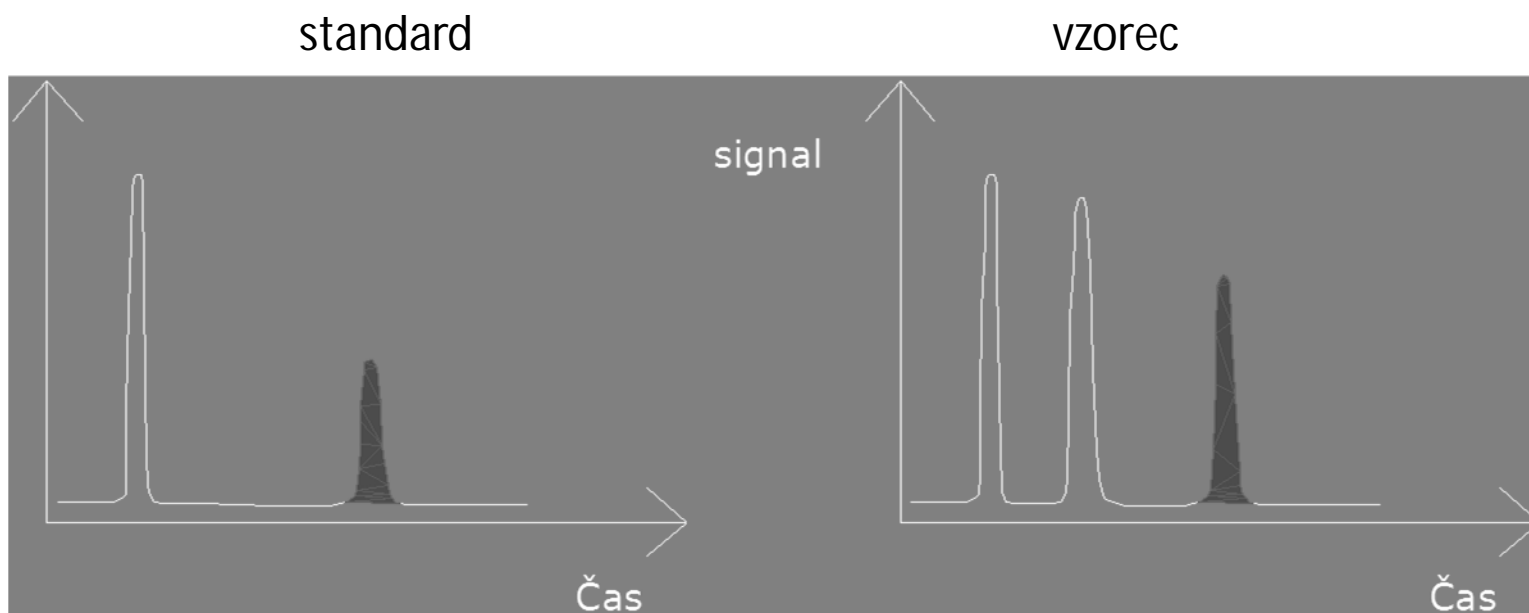
# Kvantifikacija na osnovi merjenja površin



$$n = f(A)$$

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

# Eksterni standard

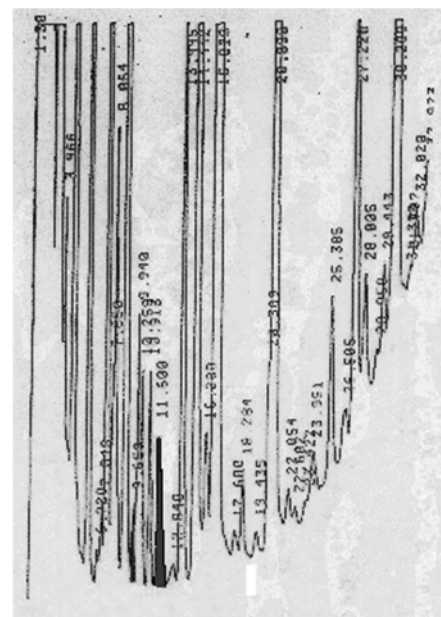
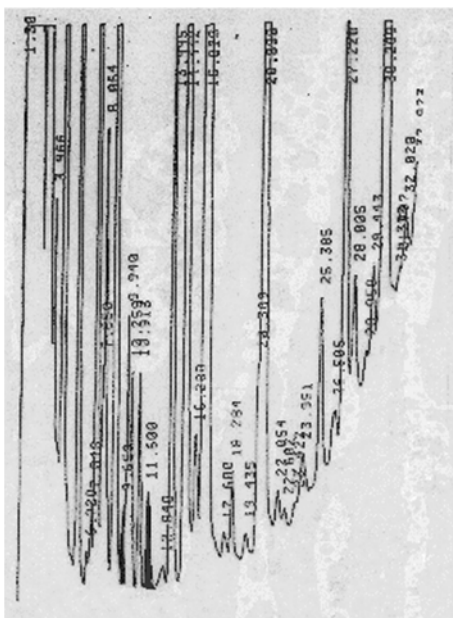
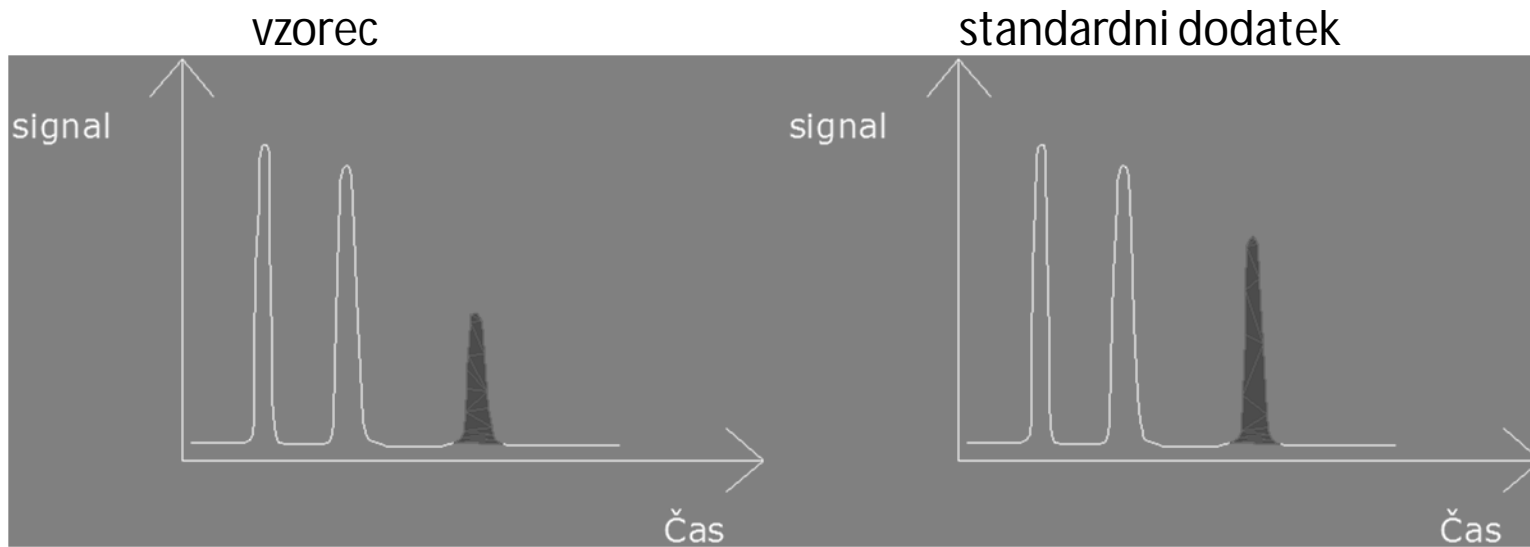


$$m_{st} = k * A_{st}$$

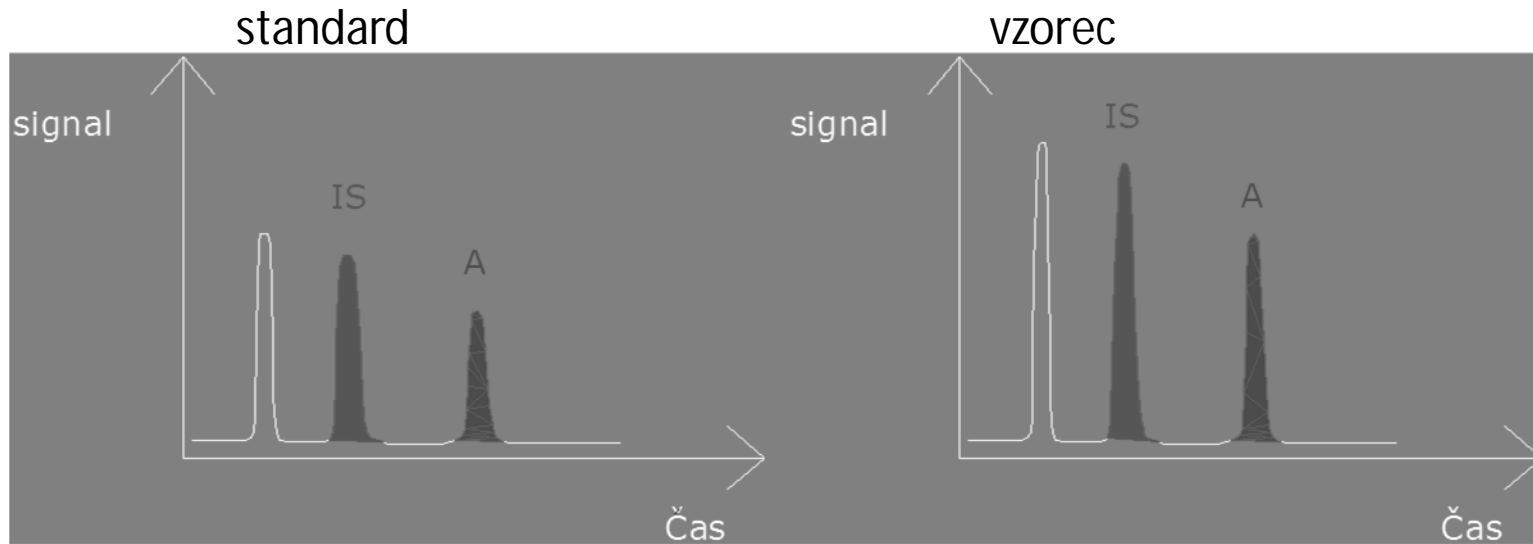
$$m_{vz} = k * A_{vz}$$

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

# Standardni dodatek



# Interni standard



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

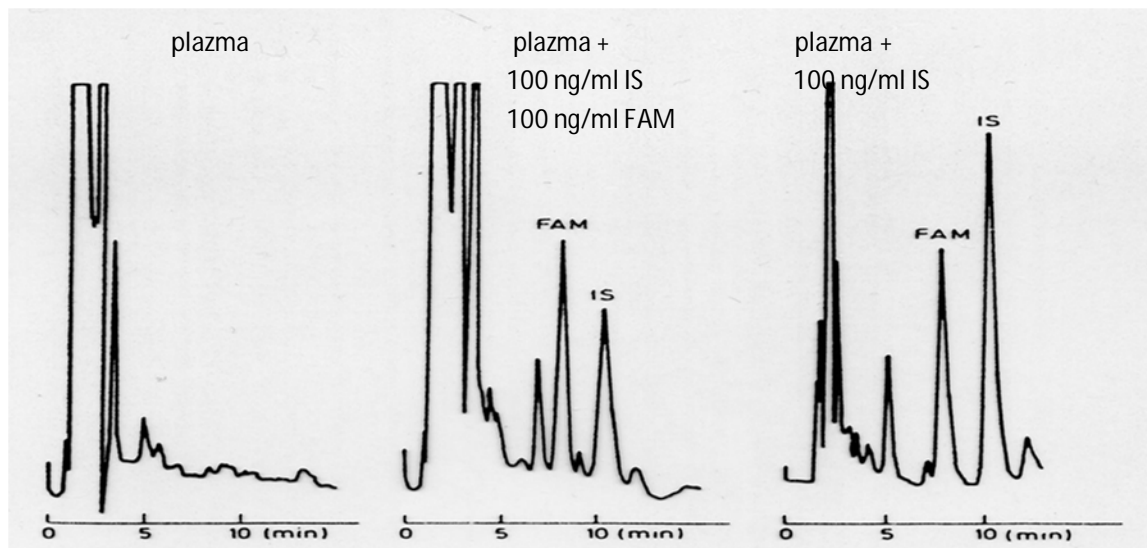
$$K_{A/IS} = \frac{K_{A,st}}{K_{IS,st}} = \frac{m_{A,st} * A_{IS,st}}{m_{IS,st} * A_{A,st}}$$

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

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



# Primer internega standarda: določevanje famotidina



$$A_{FAM,st} = 4320$$

$$A_{FAM,vz} = 4365$$

$$A_{IS,st} = 6015$$

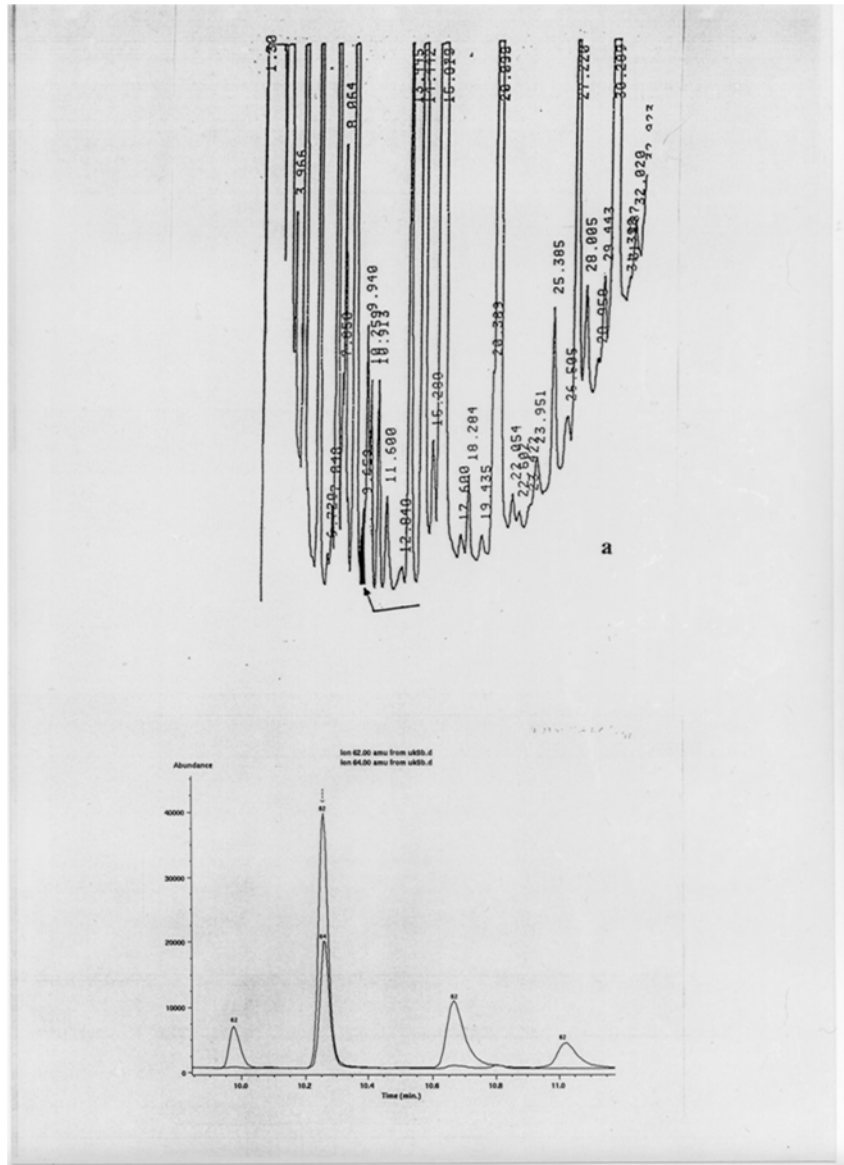
$$A_{IS,vz} = 11015$$

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

# Izotopsko razredčenje

Potrebna je uporaba MS detektorja.

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



# Kvantitativno vrednotenje kromatogramov

- Identifikacija na osnovi retencijskih časov je zadostna tehnika pri ciljani analizi, pri neciljani 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.