

KROMATOGRAFIJA

Marjan Veber-2011

Kromatografija

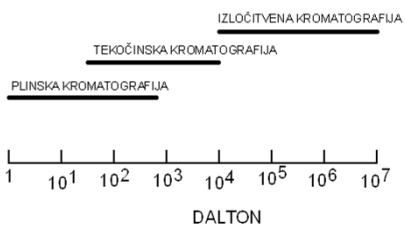
Kromatografija vključuje postopke separiranja in/ali določitve kemijskih spojin (od najmanjših plinskih molekul do bioloških velemolekul)

Področja uporabe:

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

Marjan Veber-2011

Kromatografija



Marjan Veber-2011

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).

Marjan Veber-2011

Kromatografija

Kromatografija

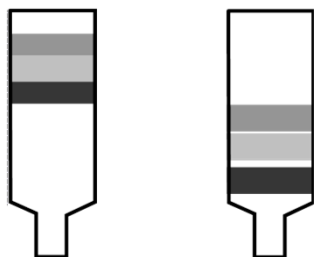
»barva« »zapis«

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.

Marjan Veber-2011

Ločevanje na koloni



Marjan Veber-2011

Kromatografija

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

Potekajo lahko različni procesi:

- Površinska adsorpcija
- Porazdelitev
- Raztapljanje
- Ionska izmenjava

.....

Marjan Veber-2011

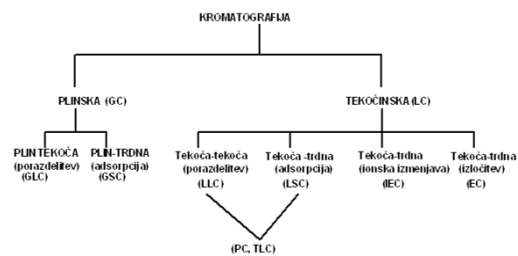
Kromatografija

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

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

Marjan Veber-2011

Delitev kromatografskih metod



Marjan Veber-2011

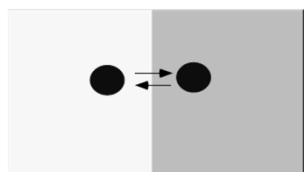
PLINSKA KROMATOGRAFIJA:

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

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

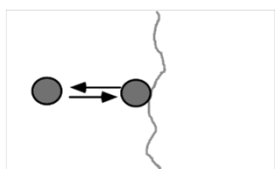
Marjan Veber-2011

Porazdelitvena kromatografija



Marjan Veber-2011

Adsorpcijska kromatografija



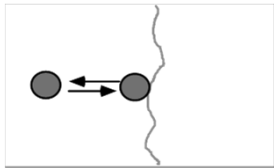
Marjan Veber-2011

Tenkoplastna kromatografija



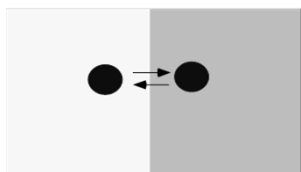
Marjan Veber-2011

Adsorpcijska kromatografija



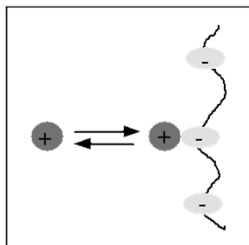
Marjan Veber-2011

Porazdelitvena kromatografija



Marjan Veber-2011

Ionsko izmenjevalna kromatografija



Marjan Veber-2011

Separiranje na koloni

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

Separacija na koloni

Marjan Veber-2011

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 razmerjem kolone (k')
- Selektivnost (α).

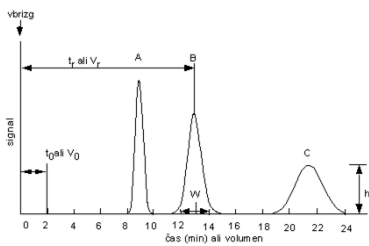
Marjan Veber-2011

Retencijski čas

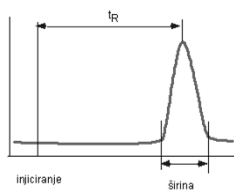
t_R komponente je čas, ki ga le-ta potrebuje za potovanje od injektorja do detektorja skozi kromatografsko kolono in je ob danih kromatografskih pogojih specifičen za posamezno substanco.

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

Marjan Veber-2011

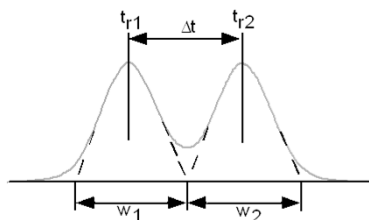


Marjan Veber-2011



Marjan Veber-2011

Ločljivost



Marjan Veber-2011

Ločljivost

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

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

Marjan Veber-2011

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)- t_r je značilen za substance – primerjava s standardnimi substancami!

Pomembna je ponovljivost retencijskih parametrov (eksperimentalni pogoji!)

Marjan Veber-2011

Kromatografija- kvantitativna analiza

Računanje koncentracij

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

Marjan Veber-2011

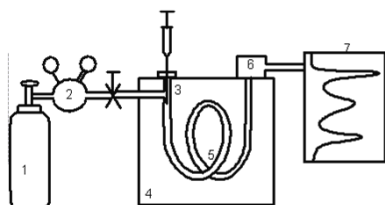
Plinska kromatografija

Plinski kromatograf

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

Marjan Veber-2011

Plinski kromatograf



Marjan Veber-2011

Plinska kromatografija

Kolone v GC

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

Marjan Veber-2011

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.

Marjan Veber-2011

Kolone v GC

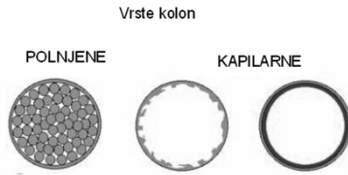
Kapilarne kolone (iz staljenega kvarca ('fused silica')):

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, boljše ponovljivost in visoke vrednosti N (učinkovitost) ter zmanjšano izcejanje ('krvavenje') stacionarne faze.

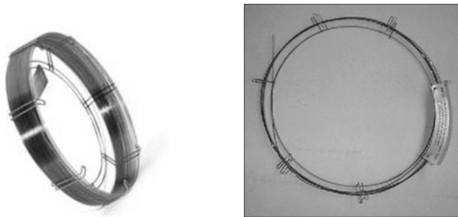
Marjan Veber-2011

Kolone v GC



Marjan Veber-2011

Kapilarne kromatografske kolone



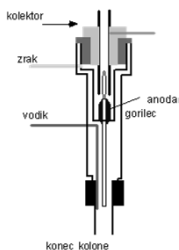
Marjan Veber-2011

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

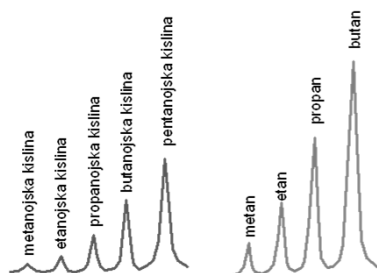
Marjan Veber-2011

Plamenski ionizacijski detektor



Marjan Veber-2011

Plamenski ionizacijski detektor



Marjan Veber-2011

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.

Marjan Veber-2011

TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA

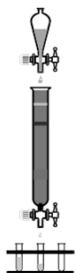
KOMPONENTE HPLC SISTEMA:

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

Marjan Veber-2011

Klasična kolonska kromatografija

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

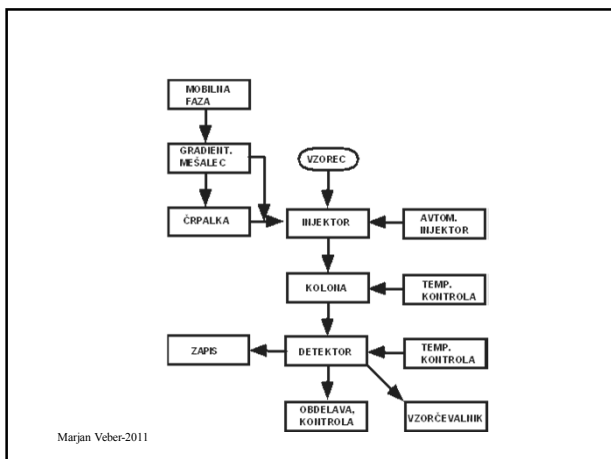


Marjan Veber-2011

HPLC

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

Marjan Veber-2011



Mobilna faza

Značilna topila:
 ADSORPCIJA/PORAZDELITEV: heksan,
 metilenklorid, kloroform, metanol, acetonitril
 REVERZNA FAZA: metanol/voda, acetonitril/voda,
 reagenti z ionskimi pari
 IONSKA IZMENJAVA: vodne puferske raztopine
 IZLOČITVENA KROMATOLOGRAFIJA:
 tetrahidrofur, kloroform

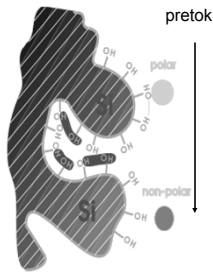
Marjan Veber-2011

Vrste HPLC

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

Marjan Veber-2011

Normalna faza



Marjan Veber-2011

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

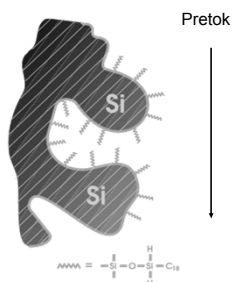
HPLC z normalno fazo

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

Marjan Veber-2011

Reverzna faza

- Napolarna stacionarna faza (n.pr., C_{18} , C_8)
- Polarna mobilna faza., (voda, metanol, acetonitril)
- Ločujemo neparne spojine



Marjan Veber-2011

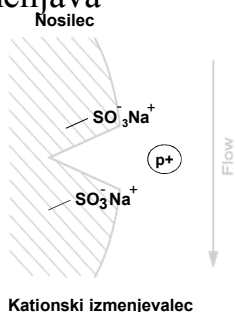
Reverzna faza

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

Marjan Veber-2011

Ionska izmenjava

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



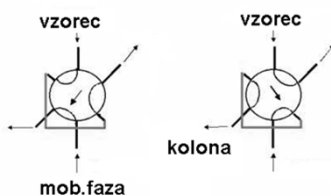
Marjan Veber-2011

Ionska izmenjava

- 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-, NO₂-), polinukleotidov in proteinov

Marjan Veber-2011

HPLC-injektor



Marjan Veber-2011

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.

Marjan Veber-2011

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

Marjan Veber-2011

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.

Marjan Veber-2011

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.

Marjan Veber-2011

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.

Marjan Veber-2011

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!

Marjan Veber-2011

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.

Marjan Veber-2011

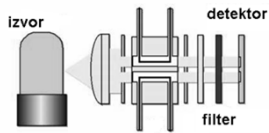
HPLC-Detektorji

Vrste detektorjev:

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

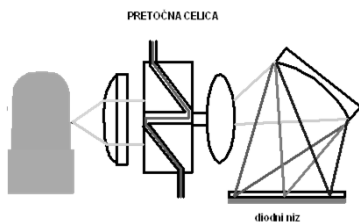
Marjan Veber-2011

HPLC fotometrični detektor



Marjan Veber-2011

HPLC DETEKTOR (Diode array)



Marjan Veber-2011

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

Marjan Veber-2011

HPLC-prednosti

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

Marjan Veber-2011

Identifikacija in kvantitativna analiza pri kromatografiji

Marjan Veber-2011

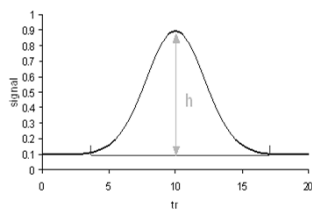
Pravila identifikacije:

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 detekcije.

Marjan Veber-2011

Kvantifikacija na osnovi merjenja višin

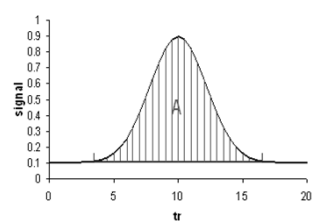


$$n = f(h)$$

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

Marjan Veber-2011

Kvantifikacija na osnovi merjenja površin

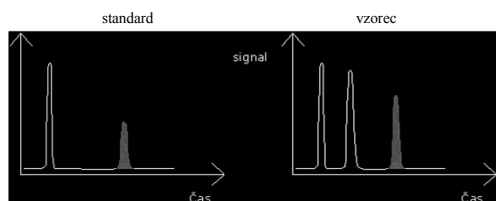


$$n = f(A)$$

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

Marjan Veber-2011

Eksterni standard

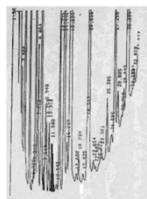
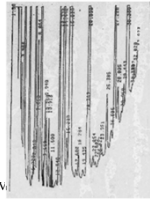
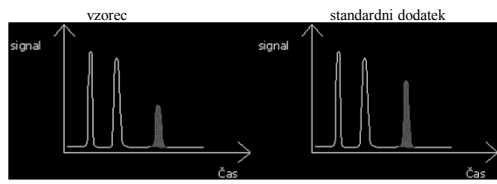


$$m_{st} = k \cdot A_{st} \quad m_{vz} = k \cdot A_{vz}$$

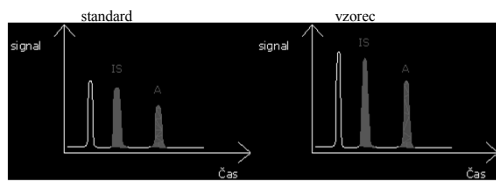
$$m_{vz} = m_{st} \frac{A_{vz}}{A_{st}}$$

Marjan Veber-2011

Standardni dodatek



Interni standard

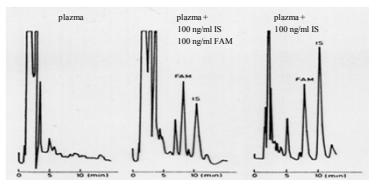


$$m_{A,vz} = \frac{m_{IS,vz} * A_{A,vz} * K_{A/IS}}{A_{IS,vz}}$$

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

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

Primer internega standarda: določevanje famotidina

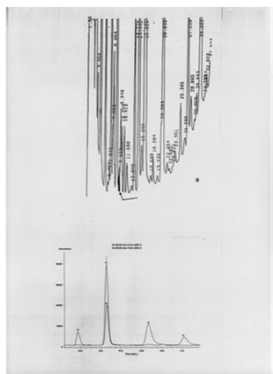


$A_{FAM,st} = 4320$
 $A_{FAM,vz} = 4365$
 $A_{IS,st} = 6015$
 $A_{IS,vz} = 11015$

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

Marjan Veber-2011

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.

Marjan Veber-2011
