

# KROMATOGRAFIJA

---

---

---

---

---

---

---

---

## *Kromatografija*

Področja uporabe:

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

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

---

---

---

---

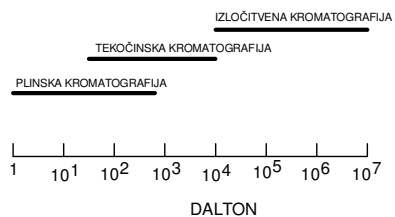
---

---

---

---

## *Kromatografija*



---

---

---

---

---

---

---

---

## Kromatografija

Kromatografska separacija je posledica razlik v hitrosti potovanja posameznih komponent 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  $\text{CaCO}_3$ . Po dodatku rastlinskega ekstrakta je z izpiranjem kolone z organskim topilom ločil več barvnih pasov

---

---

---

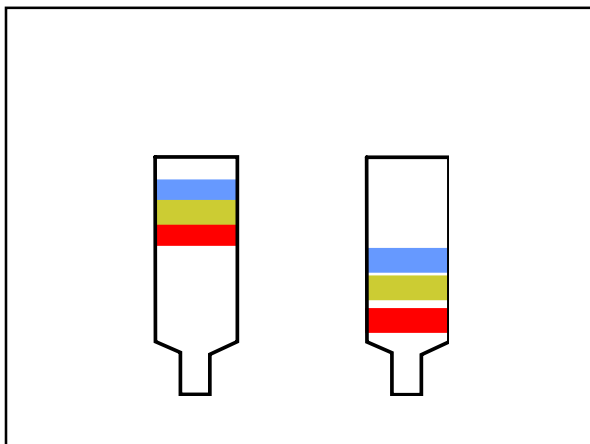
---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---

## Kromatografija

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

Potekajo lahko različni procesi:

Površinska adsorpcija

Raztapljanje

Ionska izmenjava

.....

---

---

---

---

---

---

---

---

## Kromatografija

Vste separacij: Frontna analiza, zamenjava (displacement):

Frontna analiza: Vzorec dodajamo na začetek kolone. Zasedujemo posamezne komponente, ki zapuščajo kolono. Dobimo informacijo o tem, kako se komponente zadržujejo

Primer:

Filtracija skozi aktivno oglje

---

---

---

---

---

---

---

---

## Kromatografija

Zamenjava (displacement):

Komponente v koloni se izmenjujejo s topljencem, ki se močneje veže.

Primer:

ionska izmenjava (mehčanje vode)

---

---

---

---

---

---

---

---

# Kromatografija

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

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

---

---

---

---

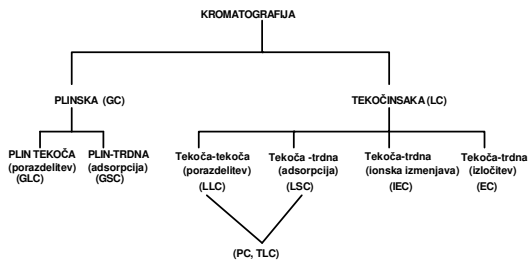
---

---

---

---

## Delitev kromatografskih metod



---

---

---

---

---

---

---

---

## PLINSKA KROMATOGRAFIJA:

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

---

---

---

---

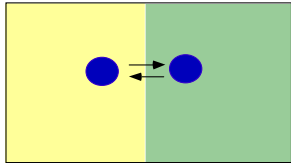
---

---

---

---

### Porazdelitvena kromatografija



---

---

---

---

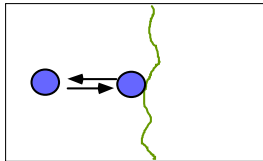
---

---

---

---

### Adsorpcijska kromatografija



---

---

---

---

---

---

---

---

### TEKOČINSKA KROMATOGRFIJA:

- *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)*

---

---

---

---

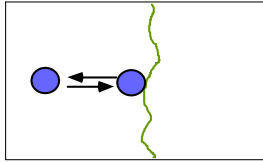
---

---

---

---

### Adsorpcijska kromatografija



---

---

---

---

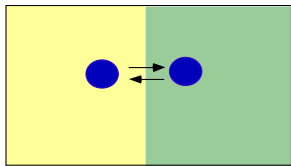
---

---

---

---

### Porazdelitvena kromatografija



---

---

---

---

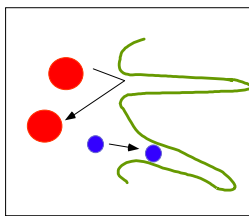
---

---

---

---

### Izločitvena kromatografija



---

---

---

---

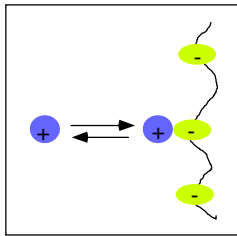
---

---

---

---

## Ionsko izmenjevalna kromatografija



---

---

---

---

---

---

---

---

## Separiranje na koloni

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

---

---

---

---

---

---

---

---

## 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 ( $\alpha$ ).

---

---

---

---

---

---

---

---

## 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 Deempter: 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.

---

---

---

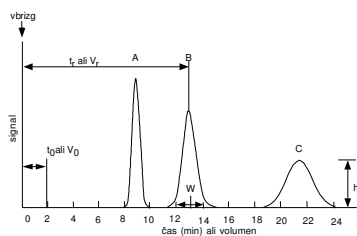
---

---

---

---

---



---

---

---

---

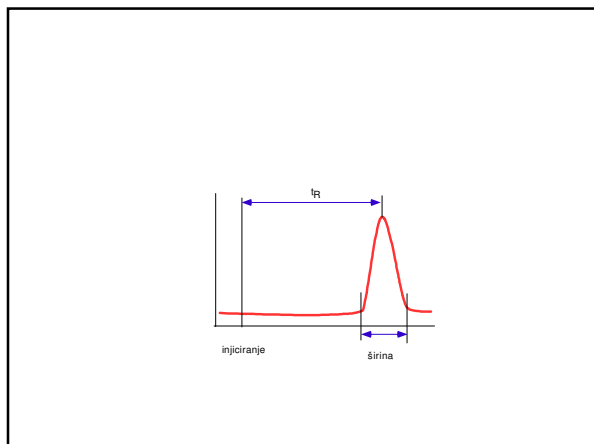
---

---

---

---






---

---

---

---

---

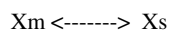
---

---

---

### *Porazdelitveni koeficient (KD)*

Vsaka komponenta X se porazdeli med stacionarno in mobilno fazo



Ravnotežna konstanta-Porazdelitveni (termodinamski) koeficient

$$KD = [X_s]/[X_m]$$

---

---

---

---

---

---

---

---

### *Kapacitivnost kolone - K'*

*Kapacitivnost (porazdelitveno razmerje)*

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

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

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

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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 :

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

---

---

---

---

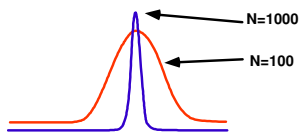
---

---

---

---

### Učinkovitost kolone



---

---

---

---

---

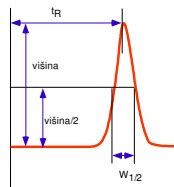
---

---

---

### 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

---

---

---

---

---

---

---

---

## Lastnosti kromatografske kolone

van Dempter- jeva enačba:

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

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

B - vzdolžna difuzija

C - prečna

v - hitrost mobilne faze

Koeficienta B in C sta odvisna od hitrosti mobilne faze

---

---

---

---

---

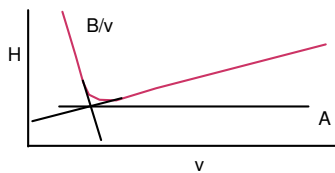
---

---

---

## van Demmter- 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 naponemo kolono, na koeficient A ne moremo več vplivati!

---

---

---

---

---

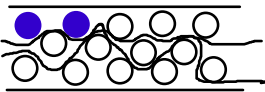
---

---

---

## Širjenje vrhov- naključna difuzija

"Eddy" "difuzion



---

---

---

---

---

---

---

---

## 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!)

---

---

---

---

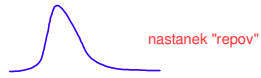
---

---

---

---

## Širjenje vrhov- nastanek repov



---

---

---

---

---

---

---

---

## Van Demmterjevi koeficienti - C

Koeficient C – Prečna difuzija

»Debelejše« in viskoznejše stacionarne faze imajo večji C

Zmanjšanje koeficienta C:

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

---

---

---

---

---

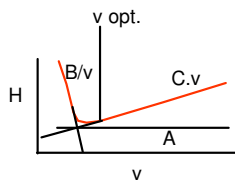
---

---

---

## Optimiranje hitrosti mobilne faze

Optimalno hitrost določimo s pomočjo van Deemterjeve enačbe in eksperimentalnih parametrov



---

---

---

---

---

---

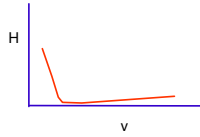
---

---

## 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!

---

---

---

---

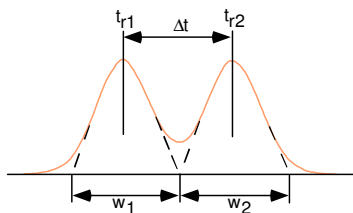
---

---

---

---

## Ločljivost



---

---

---

---

---

---

---

---

### Ločljivost

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

$$R = \frac{t_{r_2} - t_{r_1}}{(w_2 + w_1)/2} = \frac{2 \Delta t}{w_2 + w_1}$$

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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)  $T_r$  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.*

---

---

---

---

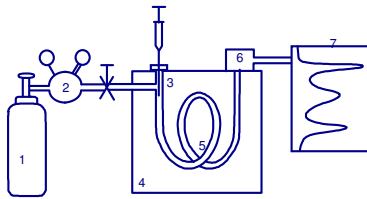
---

---

---

---

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

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.

---

---

---

---

---

---

---

---

### *Kolone v GC*

Vrste kolon

POLNJENE

KAPILARNE



---

---

---

---

---

---

---

---

## Detektorji za GC

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

---

---

---

---

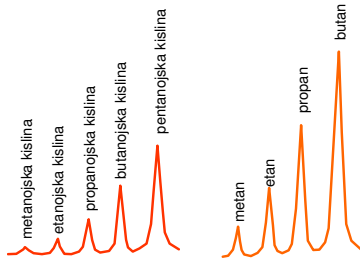
---

---

---

---

## Plamenski ionizacijski detektor



---

---

---

---

---

---

---

---

## TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA

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

Princip:

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

---

---

---

---

---

---

---

---

## TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA

### KOMPONENTE HPLC SISTEMA:

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

---

---

---

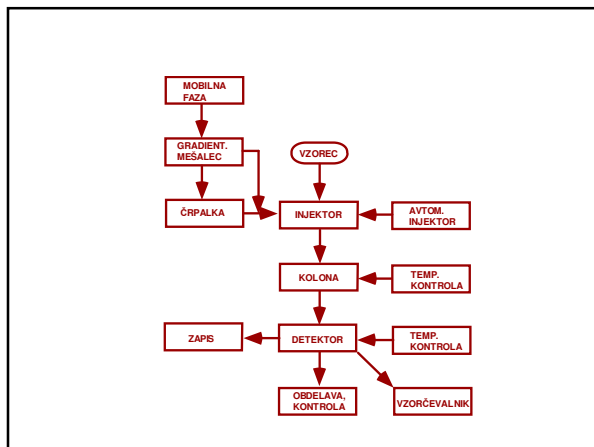
---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---

## 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 KROMATOGRAFIJA: tetrahidrofur, kloroform

---

---

---

---

---

---

---

---

## 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-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  $1 \text{ bar} = 14,4 \text{ Psi}$ .

---

---

---

---

---

---

---

---

## 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)

---

---

---

---

---

---

---

---