

Скрипта из “Хроматографије и сепарационих метода”

(Други део: хроматографија)

Мирослав Ристић

Факултет за физичку хемију

Београд

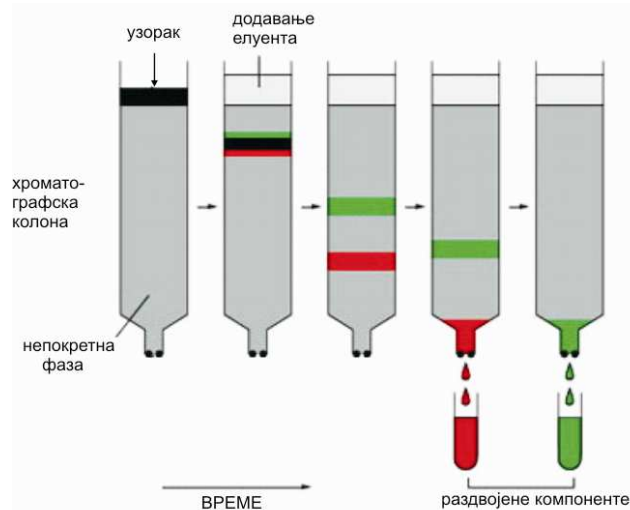
2019.

1. Опште о хроматографији

1.1. Увод

Хроматографија је једна од техника за раздвајање компоненти смеша, а у комбинацији са одговарајућим детекторима и за њихову анализу. Заснована је принципу да различите компоненте неке смеше различито интерагују са једном истом супстанцом са којом се доводе у контакт. Узорак који се испитује се прво раствори у неком растварачу, а затим се овај раствор (који се назива **покретна фаза** или **мобилна фаза** или **ефлуент**[†]) преводи преко **непокретне** (или **стационарне**) **фазе**. У додиру са непокретном фазом свака компонента смеше ће засебно интераговати са њом, при чему су најчешћи видови интеракције растварање у непокретној фази, адсорпција на њу или хемијска реакција са њом. Као последица ове интеракције, компоненте узорка ће просторно да се раздвоје (слика 1) јер ће оне које слабо интерагују са непокретном фазом да се крећу брзином скоро једнаком брзини струјања покретне фазе, док ће оне које јаче интерагују са непокретном фазом да заостају.

Простор у коме се дешава интеракција између покретне и непокретне фазе зове се **хроматографска колона**. Хроматографска колона може бити потпуно испуњена непокретном фазом или може имати непокретну фазу једино на својим зидовима, па у том смислу разликујемо **пуњене** и **капиларне** колоне (видети слику 4). Растварач којим се узорак спира са колоне назива се **елуент**, а поступак његовог увођења у хроматографску колону зове се **елуирање**. Елуент може бити гас или течност, док непокретна фаза може бити чврста или течна. Ако је течна, онда је заправо у питању танак слој течности фиксиран за неку чврсту фазу, која се у том случају зове **носач**.

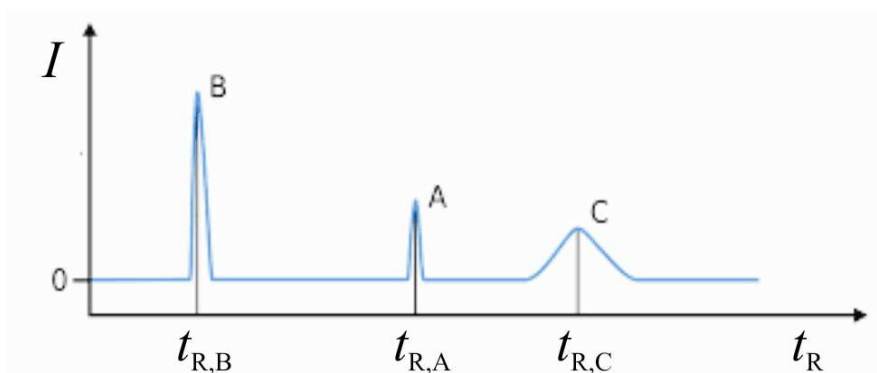


Слика 1. Узорак од две компоненте уводи се на врх хроматографске колоне. Сталним додавањем елуента услед интеракције са непокретном фазом долази до раздвајања компоненти, па оне на крај колоне долазе у различитим временима. У оваквој једној колони напуњеној са CaCO_3 је први пут руски научник Михаил Цвет, 1903. године, раздвојио смешу биљних пигмената користећи петрол-етар као елуент (први званични хроматографски експеримент).

[†] Покретној фази се постепено мења састав при кретању кроз колону. Ефлуент је оно што излази на крају хроматографске колоне.

Време које је потребно некој компоненти смеше да прође кроз хроматографску колону при одређеним условима (одређена температура, притисак, елуент, брзина елуирања и врста непокретне фазе) зове се **ретенционо време**, t_R . Ретенционо време неке компоненте зависи од њених физичких и хемијских особина у датим условима и представља карактеристику дате компоненте помоћу које се врши њена идентификација. Ако нека компонента смеше уопште не интерагује са непокретном фазом, онда је њено време проласка најкраће за дате услове (и једнако времену проласка елуента) и назива се **мртво време**, t_0 . Уколико такве компоненте нема у смеси, потребно је да је додамо.

Компоненте смеше које излазе из хроматографске колоне само се у неким простим случајевима могу видети оком, а у општем случају детектују се детекторима, којих има много врста. Сигнал који даје детектор сразмеран је концентрацији компоненте. Графички приказ сигнала са детектора у зависности од времена проласка кроз колону је **хроматограм**. На слици 2. приказан је општи изглед хроматограма на коме се налазе сигнали од три компоненте.



Слика 2. Хроматограм.

Сигнали који се виде на хроматограму зову се **хроматографски пикови** (или траке). Пошто свака компонента не излази из колоне одједном, пикови нису вертикалне линије већ су то линије мање или више налик Гаусовој функцији расподеле. Ретенциона времена су онда апсцисе максимума ових пикова и она квалитативно карактеришу компоненте. Површина испод пика мерило је количине одређене компоненте и служи за квантитативну карактеризацију. Ипак простим посматрањем пикова не може се у општем случају рећи које компоненте има више, јер одзив детектора у општем случају није исти за све компоненте. Тако на пример, посматрајући хроматограм са слике 2. немамо аргументе да закључимо да компоненте В има више од А само зато што је њен пик већи.

Уколико се хроматографски поступак користи за делимично или потпуно раздвајање компоненти смеше, онда је то **препаративна хроматографија**, а уколико се користи за квалитативну и квантитативну анализу узорка онда је то **аналитичка хроматографија**. Циљ препаративне хроматографије је прикупљање једне или више компоненти смеше у чистом стању за разне потребе: утврђивање хемијске формуле

једињења и његову идентификацију (за шта је потребно неколико mg), припрема референтних стандарда (неколико g) или производња на индустријском нивоу (kg). Уређај помоћу кога се врши хроматографски експеримент зове се **хроматограф**.

1.2. Врсте интеракција са непокретном фазом и врсте хроматографских техника

1. Растварање

Уколико је непокретна фаза течна (на неком чврстом носачу), онда молекули из покретне фазе могу да се растварају у њој. Степен растварања за неку компоненту одређен је коефицијентом расподеле, који се дефинише као однос концентрације (или у општем случају, активности) те компоненте у непокретној и покретној фази при одређеном притиску и температури:

$$K = (C_n/C_p)_{T,P}$$

Што се нека компонента боље раствара у непокретној фази, имаће већи коефицијент расподеле, спорије ће тећи кроз колону и имаће веће ретенционо време. По овом принципу функционише **подеона хроматографија**, и веома је сродна екстракцији. Овде можемо условно[†] рећи да је хроматографија заправо против-струјна екстракција или да се хроматографија према екстракцији односи као фракциона дестилација према дестилацији.

2. Адсорпција

Уколико је непокретна фаза чврста, молекули из покретне фазе могу да се адсорбују на њу и десорбују са ње. Молекули који имају израженији афинитет према непокретној фази спорије ће се кретати кроз колону и имаће веће ретенционо време, што је принцип функционисања **адсорпционе хроматографије**.

3. Измена јона

Постоје непокретне фазе на које су ковалентним везама везане јонске функционалне групе. Уколико су и саме компоненте узорка у облику јона, онда оне могу да се везују за јонске групе непокретне фазе. Компоненте узорка имају различит афинитет према овом везивању и на том принципу заснована је **јоноизмењивачка хроматографија**.

4. Раздвајање према величини честица

Када се молекули компоненте узорка разликују по величини, онда ће се и различитом брзином кретати кроз порозну непокрету фазу, при чему нема адсорпције

[†] Условно, јер не постоји потпуна равнотежа између покретне и непокретне фазе. Видети слику 5. и пратећи текст.

нити хемијског везивања са непокретном фазом. Непокретна фаза овде има улогу сита за молекуле. Ово је принцип **ексклузивне хроматографије**. Она се најчешће примењује за раздвајање протеина и синтетичких полимера, то јест као препаративна хроматографија.

5. Специфичне интеракције

Ово су интеракције које су карактеристичне за билошке молекуле. Интеракције са непокретном фазом су у овом случају веома специфичне, као на пример интеракција антиген-антитело или ензим-супстрат. Ова врста хроматографије зове се **афинитетна хроматографија**.

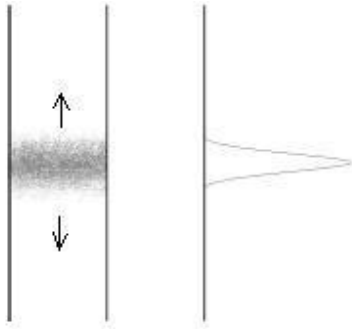
Табела 1. Подела хроматографских техника према врсти интеракције са непокретном фазом

| Врста интеракције са непокретном фазом | Хроматографска техника |
|--|------------------------|
| Растварање | Подеона |
| Адсорпција | Адсорпциона |
| Измена јона | Јоноизмењивачка |
| Раздвајање по величини честица | Ексклузивна |
| Специфичне интеракције | Афинитетна |

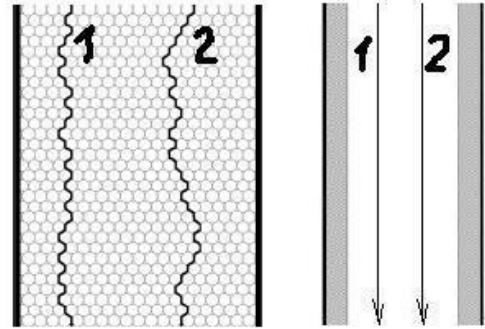
1.3. Ширење хроматографских пикова

На путу до детектора молекули сваке компоненте узорка пролазе кроз низ процеса који за последицу имају њихово просторно расипање и ширење одговарајућег пика на хроматограму. Што је расипање веће, пик постаје шири и мање висине, што умањује осетљивост одређивања и резолуцију. Три главна разлога због којих се пик шири унутар хроматографске колоне су:

1. **Уздужна (лонгитудинална) дифузија.** Молекули теже да дифундују у област мање концентрације, како у покретној тако и у непокретној фази. Што је брзина мобилне фазе већа у једној колони, ширење услед дифузије биће мање јер ће мање времена бити за дифузију да се одиграва. Ако је мобилна фаза гас, дифузија је бржа него у течности и ширење ове врсте је веће.
2. **Различитост путева који молекули прелазе.** За сваки од мноштва молекула неке компоненте постоји посебан пут који он прелази, према законима статистике. Ово је изражено једино код пуњених колона, не и код капиларних. Брзина покретне фазе не утиче на овај вид ширења. Што су честице непокретне фазе ситније ширење ове врсте ће бити мање изражено.

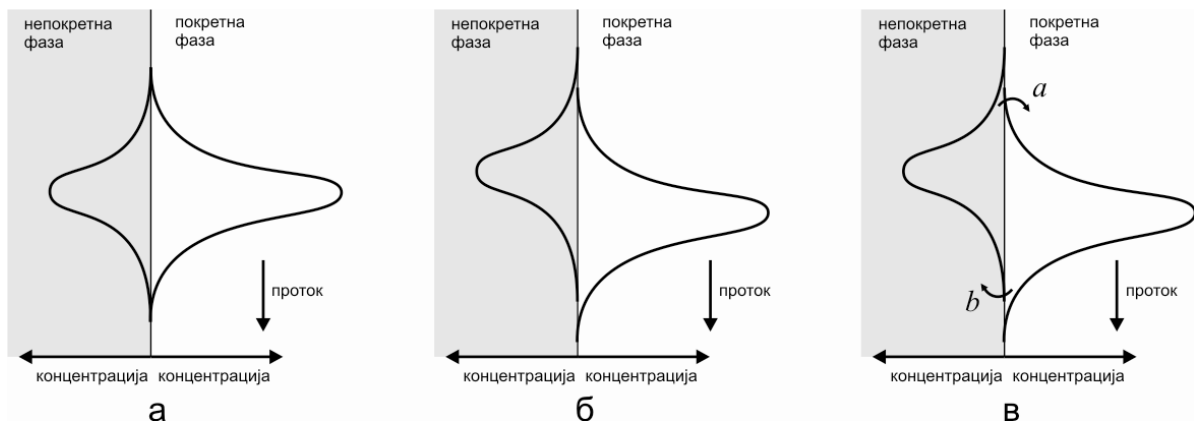


Слика 3. Утицај уздужне дифузије на ширину пика.



Слика 4. Различити путеви (1 и 2) у пакованој хроматографској колони (слика лево) и скоро исти у капиларној (слика десно).

3. **Непотпуна равнотежа компоненти** између непокретне и покретне фазе. Замислимо да је у једном тренутку (слика 5.а) успостављена равнотежа неке компоненте између покретне и непокретне фазе. На слици је приказана компонента која има већи афинитет према покретној фази. У првом наредном тренутку, компонента у покретној фази, ношена протоком, измиче се у односу на непокретну фазу (слика 5.б) и тада се губи равнотежа. Систем покушава да је поново успостави (слика 5.в) тако што компоненту враћа из непокретне фазе у покретну на зачељу (стрелица *a*) и из покретне у непокретну на челу пика (стрелица *b*). Коначна последица овог сталног покушаја успостављања равнотеже је симетрично ширење пика. Ширење је веће што је брзина протока покретне фазе већа.

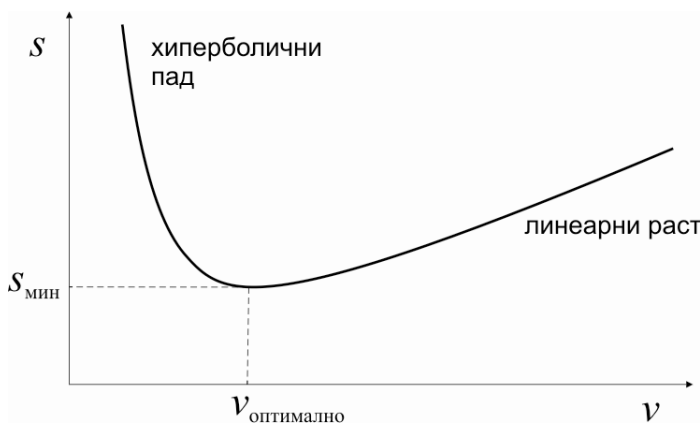


Слика 5. а) Компонента у равнотежи између покретне и непокретне фазе, б) тренутак касније, равнотежа се нарушава јер се компонента у покретној фази измиче у смеру протока, в) још један тренутак касније, покушај система да успостави равнотежу резултује ширењем траке.

Имајући сва три наведена ефекта у виду, ширина пика (s) (која је у сразмери са висином теоријског пода о коме ће бити речи у следећем поглављу) може се приказати у зависности од брзине протока (v) на следећи начин:

$$s = A + B / v + C v$$

где су A , B и C константе. Ова једначина позната је као **ван Демтерова једначина**. Други члан одражава ширење услед уздужне дифузије, а трећи услед непотпуне равнотеже. Графички приказ ове зависности дат је на слици 6, одакле се може приметити да постоји оптимална брзина протока при којој су хроматографски пикови најужи.



Што се геометријских фактора колоне тиче, генерално је за добијање ужих пикова увек боље имати кратку и уску колону. Осим ширења у колони, пик може да се прошири и због ефеката ван колоне, али овде то неће бити разматрано.

1.4. Величине битне у хроматографији

Ретенциони фактор за неку компоненту A , је дефинисан преко њеног ретенционог времена у колони чије је мртво време t_o , као количник:

$$k_A = (t_{RA} - t_o) / t_o$$

и представља афинитет компоненте према непокретној фази. Пожељно је да његова вредност буде између 1 и 5, док вредности веће од 20 имплицирају да хроматографски поступак траје дуго и нису пожељне.

Сепарациони фактор дефинише се за две компоненте смеше A и B као однос њихових коефицијената расподеле тако да се увек дели већи коефицијент са мањим:

$$Z_{AB} = K_A / K_B = (t_{RA} - t_0) / (t_{RB} - t_0) \geq 1$$

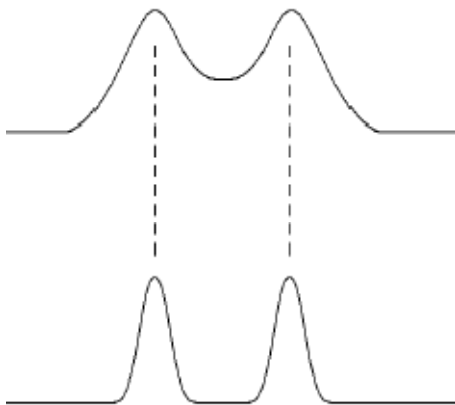
и представља могућност раздвајања две компоненте у датој колони.

Уколико посматрамо хроматографију као континуалну екстракцију, онда можемо да кажемо да је нека компонента била прерасподељена између покретне и непокретне фазе након изласка из колоне као да је обављено N узастопних појединачних екстракција. За број N се тада каже да је **број теоријских подова** које има дата колони за посматрану компоненту. Што је већи овај број за неке две компоненте смеше, то ће бити веће њихово раздвајање и колони, тако да је пожељно да N буде што веће. Количник дужине колоне (L) и броја теоријских подова зове се **висина теоријског пода**:

$$H = L / N$$

и може се хипотетички схватити као она дужина колоне која је еквивалентна једној екстракцији за дату компоненту.

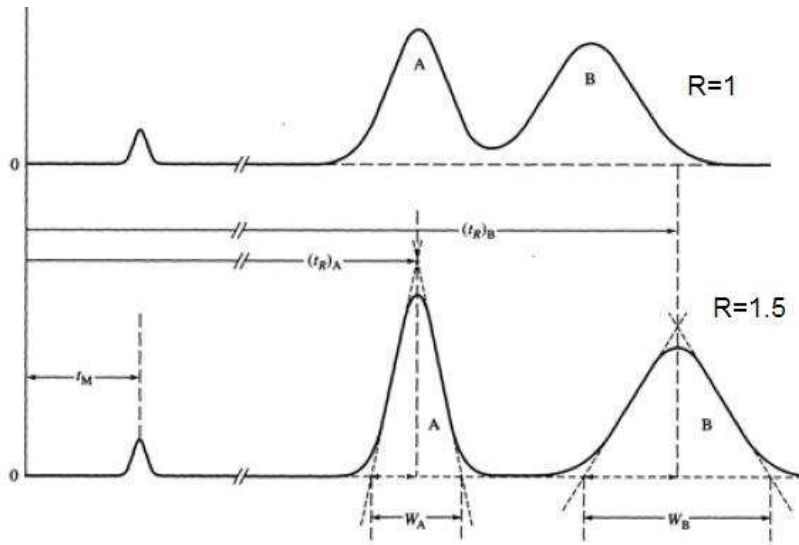
Слика 7. Хроматограм снимљен помоћу колоне са мањим бројем теоријских подова (горе) и са већим (доле).



Способност хроматографске колоне да раздвоји сигнале две компоненте блиских ретенционих времена назива се **резолюција** и дефинисана је следећом једначином:

$$R = 2 (t_{RB} - t_{RA}) / (W_A + W_B)$$

где су t_{RB} и t_{RA} ретенциона времена компоненти, а W_B и W_A ширине основа њихових пикова. На слици 8. приказани су пикови са мањом и већом резолуцијом.



Слика 8. Хроматограм са резолуцијом 1 (горе) и са резолуцијом 1,5 (доле) између пикова А и В.

2. Гасна хроматографија

2.1. Опште о гасној хроматографији

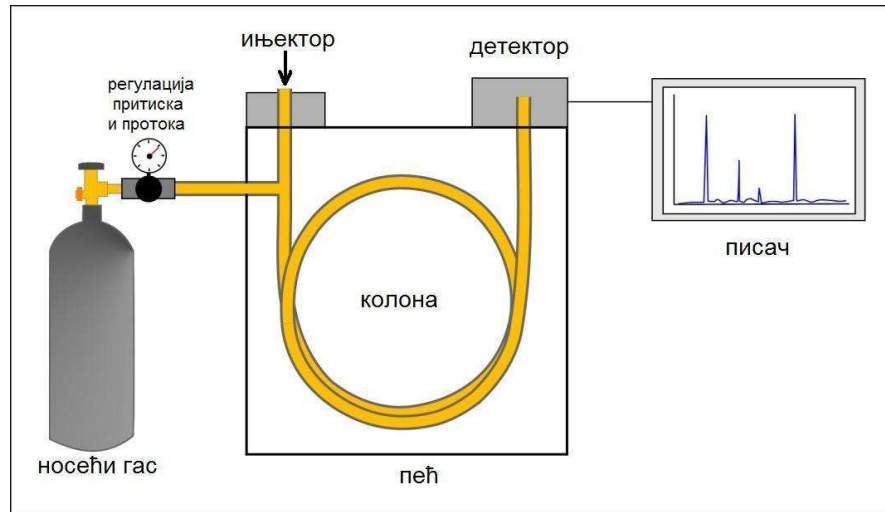
Гасна хроматографија је свака хроматографска техника код које је покретна фаза гас. За носећи гас бира се гас који је хемијски инертан према свим компонентама узорка и према непокретној фази. Непокретна фаза може бити чврста или течна. Ако је непокретна фаза чврста, хроматографске колоне су пуњене гранулисаном чврстом фазом и компоненте узорка се адсорбују на њу, а техника се тада зове **гасно-чврста адсорпциона хроматографија**. Уколико је непокретна фаза течна, онда је она нанета на чврст носач, колоне могу бити или пуњене или капиларне и компоненте узорка се растварају у тој течности, а назив ове технике је **гасно-течна подеона хроматографија**.

Гасном хроматографијом може да се врши квалитативна и квантитативна анализа гасних или течних узорака (уколико имају ниже тачке кључања) јер се хроматографска колона у гасној хроматографији може загревати на температуре до 400 °C. Могу се анализирати и термички нестабилна или теже испарљива једињења уколико се претходно хемијском реакцијом преведу у стабилнија или испарљивија једињења. Овај поступак зове се **дериватизација**. Дериватизација треба да буде квантитативна, брза и пажљиво осмишљена тако да не доводи до других промена у узорку. Дериватизација се најчешће састоји у модификацији функционалних група молекула, при чему главнина молекулске структуре остаје неизмењена. Осим у аналитичке и препаративне сврхе, гасна хроматографија користи се и за физичкохемијску карактеризацију система гас-течно и гас-чврсто (на пример, може се анализирати адсорпциона изотерма неког система или се могу одредити његове термодинамичке функције).

2.2. Опис инструмента

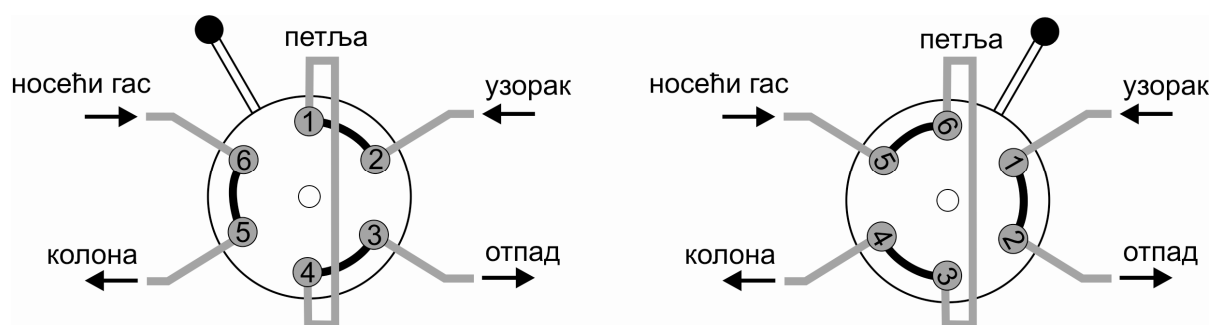
Шема инструмента приказана је на слици 9. Из **боце са носећим гасом** (који је најчешће хелијум, водоник или азот) преко **регулатора притиска и протока** гас се уводи у **колону**. На уласку у колону, налази се **инјектор** помоћу кога се узорак уноси на пут носећег гаса.

Уколико је узорак течан, инјектор га претходно загрева да би он брзо испарио (иначе ће пикови бити широки). Течни узорци се убацују посебним шприцевима (микро-шприцевима), којима је могуће прецизно одмерити врло мале запремине узорка, око 1 μl . Гасни узорци се убацују посебним гасним славинама, а запремина узорка износи око 1 ml. Принцип рада шестокраке гасне славине скициран је на слици 10.



Слика 9. Шема гасног хроматографа.

Цела хроматографска колона смештена је у **пећ**. Температура пећи може да буде стална у току хроматографске анализе (ово се зове **изотермска анализа**), али може и да се мења по одређеном програму тако да се постигне оптимални однос између трајања анализе и степена раздвајања компоненти узорка (ово се зове **температурска градијентна анализа**). Што је температура виша компоненте ће брже да прођу кроз колону, али ће слабије да интерагују са непокретном фазом па ће и њихово међусобно раздвајање бити слабије. Најчешће се температура држи на некој нижој вредности у почетку анализе, а након што се утврди да је постигнут жељени степен раздвајања температура се подиже одређеном брзином да би се скратило време анализе. Подизање температуре колоне често доводи до испаравања течне непокретне фазе што се може видети на хроматограму као подизање базне линије.



Слика 10. Принцип рада шестокраке славине за инјектирање узорака. Лево: Носећи гас улази у славину у отвор број 6, тече ка отвору број 5 и иде у колону. Узорак се уводи у отвор 2, тече ка отвору 1 одакле иде кроз петљу тачно познате запремине коју желимо да инјектујемо у отвор 4, па кроз отвор 3 у отпад. Десно: Након што је петља испуњена узорком, ручно (или неким актуатором) се обрне славина за 60° , тако да се петља са узорком сада налази на путу носећег гаса који одводи узорак у колону.

На крају колоне постављен је **детектор**, који је такође загрејан на температуру блиску температури пећи како не би дошло до нежељене кондензације компоненти смеше на њему. Сигнал са детектора приказује се на писачу или се упућује на рачунар.

Данашњи комерцијално доступни гасни хроматографи (слика 11) су у потпуности рачунарски управљани, због чега се помоћу њих може извршити велики број анализа за кратко време. Постоје роботски уређаји за аутоматско sukcesивно уношење узорака у колону који одмеђују експериментатора (аутосемплери). Температурски програм пећи такође је контролисан рачунаром, као и рад детектора.



Слика 11. Спољашњи изглед гасног хроматографа:

- 1 – аутосемплер,
- 2 – инјектор,
- 3 – пећ,
- 4 – програматор,
- 5 – рачунар.

2.2.1. Врсте колоне за гасну хроматографију

Колоне за гасну хроматографију могу бити пуњене или капиларне (слика 12).

Пуњене колоне за аналитичку гасну хроматографију су најчешће челичне цеви (могу бити и од бакра или стакла) унутрашњег пречника од 2 до 4 mm, дужине од 2 до 4 m, које су умотане у котур пречника око 20 cm, или ређе у неки други облик. Носач течне стационарне фазе у партиционој гасној хроматографији је неки хемијски инертан и што равномерније уситњен чврст материјал (на пример, дијатомејска земља), на који је одговарајућим технолошким поступком нанета течност. Та течност је најчешће хемијски инертан полимер са ниским напоном паре, а нанета је на носач у танком слоју дебљине од 0,1 до 5 μm . Уколико се ради адсорпциона хроматографија, колоне се пуни чврстом супстанцијом велике специфичне површине (и до 1000 m^2/g) и велике адсорпционе моћи. Најчешћа пуњена у овом случају су активни угаљ, тефлонски прах, силика-гел[†] и зеолити.

[†] Силика-гел је синтетички SiO_2 , који има облик чврстих, провидних и порозних гранула са израженим адсорпционим способностима.

Капиларне колоне су тање од пуњених, унутрашњи пречник им је испод 1 mm, а дужина им је од пар десетина метара до преко 100 m. Такође су умотане у котур. На њиховим унутрашњим зидовима налази се непокретна фаза, док гас струји кроз њихову средину. Непокретна фаза је такође хемијски инертан полимер са ниским напоном паре.



Слика 12. Пуњена (лево) и капиларна колоне (десно).

У поређењу са пуњеним колонама, капиларне имају већу ефикасност раздвајања односно имају више теоријских подова по јединици дужине, притом су и дуже од пуњених тако да производе бољу раздвојеност пикова на хроматограму. Пуњене колоне у односу на капиларне имају и до 1000 пута већи капацитет. Колоне за препаративну гасну хроматографију су већег пречника, од 5 mm до неколико центиметара.

У сврху бољег раздвајања компоненти узорка, различите колоне се могу везивати једна на другу. Колоне су наменски прављене за анализу одређених типова узорака и према томе се бирају у експерименту. Колоне у гасној су дуже него у течној хроматографији због ниже вискозности гаса и веће брзине протока покретне фазе.

2.2.2. Детектори у гасној хроматографији

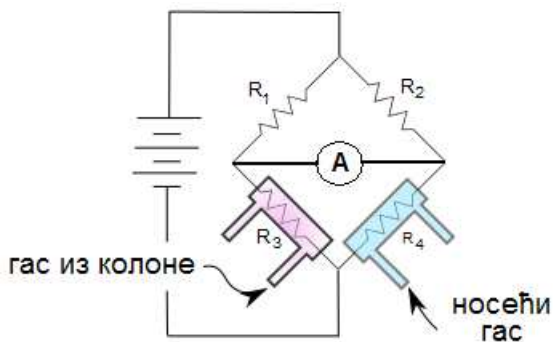
Постоји неколико врста детектора који се користе у гасној хроматографији. Сврха детектора је да реагује на присуство одређене компоненте тако што производи сигнал (најчешће струјни или напонски) који је сразмеран њеној количини.

У зависности од тога да ли у поступку детектовања компонента бива хемијски измењена или не, детектори се деле на **деструктивне** и **недеструктивне**, редом. Према томе да ли детектују одређену класу једињења или детектују сва једињења, детектори се деле на **специфичне** и **неспецифичне**, редом. Детектор је **линеаран** у одређеном опсегу концентрација неке компоненте уколико производи сигнал који је у том опсегу концентрација линеарно сразмеран количини те компоненте. Линеарност детектора је пожељна због лакшег одређивања концентрације, али не и неопходна јер се увек може

извршити калибрација детектора, што посебно у случају рачунарски управљаних система није велик проблем. **Граница детекције** детектора је најмања концентрација компоненте коју детектор може да детектује са одређеним степеном поузданости.

Карактеристике детектора за аналитичку и препаративну хроматографију се разликују. За детекторе у аналитичкој хроматографији пожељно је да буду линеарни и да имају што нижу границу детекције, док није важно да ли су деструктивни или нису. Са друге стране, детектори у препаративној хроматографији не смеју бити деструктивни, док линеарност и граница детекције нису важни параметри (последњи је чак пожељно да није много низак).

Три најчешће коришћене врсте детектора у гасној хроматографији су детектор топлотне проводљивости, пламено-јонизујући детектор и детектор захвата електрона.



Слика 13. Детектор топлотне проводљивости.

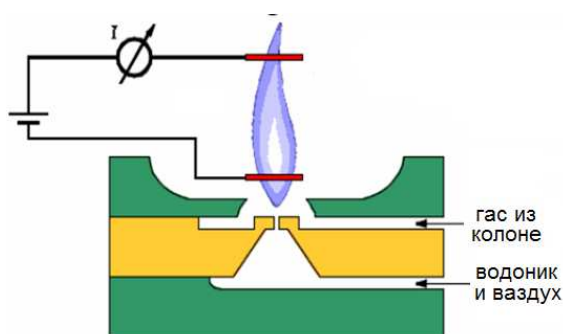
Рад **детектора топлотне проводљивости** (познатог и као **катарометар**) заснован је на чињеници да различите компоненте гасне смеше у општем случају имају различите топлотне проводљивости од носећег гаса. Шема детектора приказана је на слици 13. Два идентична проводника (од платине или волфрама најчешће) чији електрични отпор зависи од температуре, везана су у две гране Витстоновог моста. Преко једног проводника увек струји носећи гас, а преко другог ефлуент. Кад преко оба проводника струји само носећи гас, режим њиховог хлађења је исти, исти су им електрични отпори (R_3 и R_4 на слици 13) и мерни мост се тада може довести у равнотежу подешавањем отпора R_1 и R_2 на такве вредности да је испуњен услов:

$$R_1 R_4 = R_2 R_3$$

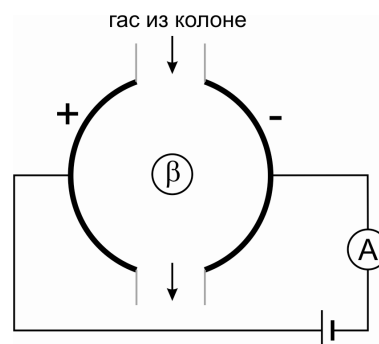
Кад је мост у равнотежи, кроз амперметар на слици 13. не протиче струја. Ако на проводник преко кога струји ефлуент наиђе нека компонента узорка, режим његовог хлађења се мења уколико компонента има другачију топлотну проводљивост од носећег гаса и отпорник се греје или хлади. При томе се мења електрични отпор R_3 што избацује

мост из равнотеже. Кроз амперметар тада креће да протиче струја сразмерна концентрацији компоненте. Та струја се појачава (на пример, операционим појачалом) и представља мерни сигнал овог детектора.

Изузетно уколико нека компонента има исту топлотну проводљивост као и носећи гас, овај детектор је неће детектовати. Осетљивост детектора топлотне проводљивости је већа уколико носећи гас има већу топлотну проводљивост. У том смислу за постизање највеће осетљивости најбоље је користити H_2 или He који имају највеће топлотне проводљивости. Тиме се избегава и појава промене знака струје са детектора. Детектори топлотне проводљивости су недеструктивни и неспецифични, врло осетљиви, линеарни у широком опсегу концентрација и стандардно присутни у многим гасним хроматографима. Посебно широку употребу имају у препаративној гасној хроматографији. У том случају се компоненте које напуштају катарометар кондензују у течну фазу и тако прикупљају.



Слика 14. Пламено-јонизујући детектор.



Слика 15. Детектор захвата електрона.

Пламено-јонизујући детектори раде на следећем принципу: гас са краја колоне уводи се у водонични пламен, где компоненте узорка подлежу јонизацији. Пламен тада стиче већу електричну проводљивост. Пошто је пламен постављен тако да уједно буде део електричног кола (видети слику 14) онда кроз то коло протиче већа струја. Јачина струје зависиће од степена јонизације компоненте узорка и од њене концентрације, а показано је и да је сразмерна броју угљеникових атома у једињењу. Врсте насталих јона могу бити многобројне[†], а механизми јонизације су сложени. Ова врста детектора користи се углавном за органска једињења, што је сврстава у групу специфичних детектора. Такође, пошто се јонизацијом хемијски мења компонента узорка, ово је деструктиван тип детектора. Линеаран је у широком опсегу концентрација.

[†] Илустрације ради, у пламену бензена (C_6H_6) идентификоване су следеће јонске врсте: C_6H_6^+ , C_6H_5^+ , C_6H_4^+ , C_6H_3^+ , C_6H_2^+ , C_6H^+ , C_6^+ , C_5H_3^+ , C_5H_2^+ , C_5H^+ , C_5^+ , C_4H_4^+ , C_4H_3^+ , C_4H_2^+ , C_4H^+ , C_4^+ , C_2H_4^+ , C_2H_3^+ , C_2H_2^+ , C_2H^+ , C_2^+ , CH_3^+ , CH_2^+ , CH^+ , C^+ , H_2^+ , H^+ , $\text{C}_6\text{H}_6^{+2}$, $\text{C}_6\text{H}_5^{+2}$, $\text{C}_6\text{H}_3^{+2}$ и C_4H^{+2} .

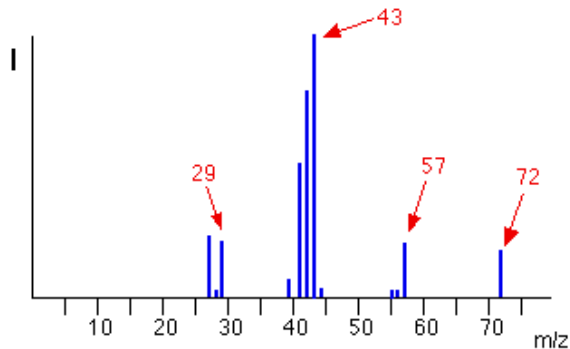
Детектор захвата електрона у принципу је сличан пламено-јонизујућем детектору. У електричном колу са слике 15, проводљивост обезбеђују електрони које емитује извор - погодан радиоактивни емитер β зрачења (на пример ^{63}Ni). Молекул из колоне који захвати електрон постаје јон који, будући много тежи од електрона, спорије путује од њега и тако изазива смањење проводљивости електричног кола. То се опажа на амперметру као пад струје у колу. Склоност ка захвату електрона имају молекули са електронегативним атомима или групама, као што су халогени, фосфор, сумпор, кисеоник или нитро групе, па је ова врста детектора осетљива само на такве молекуле. Поступком дериватизације могу се детектовати и друга једињења, најчешће тако што се изврши њихово халогеновање. Зато је овај детектор специфичан. Такође је деструктиван. Опсег линеарности мањи му је од пламено-јонизујућег детектора и детектора топлотне проводљивости.

Поред поменутих врста детектора, постоје детектори који раде на бази гасног пражњења (како једносмерног тако и радио-фреквентног), као и детектори који раде на спектроскопском принципу (пламено фотометријски, атомски емисиони детектор и инфрацрвени детектор). Пошто је катарометар недеструктиван могуће је серијски га везати испред других типова детектора ради њихове упоредне анализе.

2.2.3. Гасна хроматографија са масеном спектрометријом

Уколико се на излаз из колоне гасног хроматографа повеже масени спектрометар као детектор добија се хибридни уређај са изузетним аналитичким могућностима који је скоро незаменљив у анализи трагова у загађивању животне средине, криминалистици и медицини. Ова техника позната је као **гасна хроматографија са масеном спектрометријом**. Масени спектрометар је уређај који просторно (или временски) раздваја јоне са различитим односима масе и наелектрисања. Након изласка из хроматографске колоне, ефлуент се најпре преводи на нижи притисак. У хроматографској колони притисак гаса износи преко 1 bar, док је у масеном спектрометру неопходно да притисак буде око 10^{-5} mbar (тада је средњи слободни пут честица око 10 m) како међусобни судари не би ометали путање честица. Затим се његови молекули јонизују (ударом електрона или неком другом техником).

Након тога настали јони уводе се у простор који се назива анализатор маса, где се дејством електричног или магнетног поља раздвајају у простору (или времену у техници времена прелета) и упућују на детектор. Код сложенијих молекула у поступку јонизације долази до карактеристичног распадања молекула на више јонова (што се зове фрагментација) и масени спектар молекула у том случају представља њему својствен отисак прста.

Слика 16. Масени спектар *n*-пентана, C₅H₁₂.

Приказом интензитета струје јонских врста у функцији од њиховог односа масе и наелектрисања (m/z) добија се масени спектар (слика 16). Масеним спектрометром се у овој поставци врши идентификација компоненти према специфичном начину фрагментације њених молекула. Зато није неопходно познавати ретенциона времена компоненти. Приказивањем укупне јонске струје на детектору у зависности од времена добија се и хроматограм.

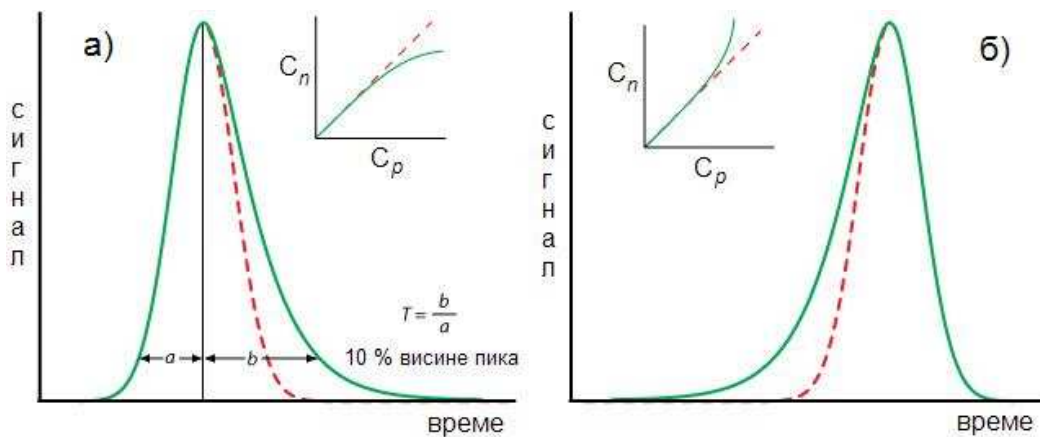
Код већине једињења у масеном спектру може се уочити једна или више линија које су за то једињење карактеристичне (јављају се само код њега на одређеним вредностима m/z). Појављивање карактеристичних линија у спектру једнозначно указује на присуство одређеног једињења, чак и ако се у току хроматографског поступка оно није раздвојило довољно од осталих компоненти узорка. Масени спектрометар се може подесити да врши аквизицију јонске струје само на пробраним m/z вредностима. Такав режим рада зове се скенирајући и он омогућава постизање високе осетљивости анализе према компонентама које су на тај начин праћене.

Гасна хроматографија је брза аналитичка техника. Време трајања анализе је између 10 и 60 минута. Њоме се може постићи висок степен осетљивости, у неким случајевима и до 10^{-15} g/l што је чини погодном за анализу трагова компоненти. Широку употребу гасна хроматографија има у анализи: етарских уља, пестицида, полихлорованих бифенила, полиароматичних угљоводоника, алкохола и многих других узорака.

2.2.4. Облик пикова у гасној хроматографији

Идеалан хроматографски пик има облик Гаусове функције расподеле. Што је пут кроз колону дужи, хроматографски пик се све више шири у основи и пада по висини, задржавајући своју симетричност. Ипак, уколико коефицијент расподеле (или адсорпционо-десорпционе равнотеже) за неку компоненту зависи од њене концентрације, онда долази до појаве асиметричности хроматографских пикова.

На слици 17. приказано је како облик пикова зависи од функције концентрације компоненте у непокретној фази од њене концентрације у покретној фази. Нагиб ове линије једнак је коефицијенту расподеле, $K = (dC_n / dC_p)$, и уколико је он исти за све концентрације пик ће бити симетричан. Ако коефицијент расподеле постаје све мањи са порастом концентрације (слика 17.а) то значи да ниже концентрације компоненте имају већи афинитет ка непокретној фази и путују спорије од већих концентрација. Зато ће добијени пик имати реп ка већим ретенционим временима, то јест имаће шире десно крило.



Слика 17. Узроци асиметрије пикова.

Ако је коефицијент расподеле већи на вишим концентрацијама (слика 17.б), онда оне путују спорије, док ниже концентрације путују брже и добијени пик има реп ка нижим ретенционим временима односно шире лево крило. Квантитативно мерило асиметрије пика је однос ширине једног и другог крила пика на 10 % његове висине (слика 17.а).

Све поменуто важи и за случај адсорпционе хроматографије, када је непокретна фаза чврста и када уместо коефицијента расподеле посматрамо коефицијент адсорпционо-десорпционе равнотеже. У том случају може се вршити одређивање адсорпционе изотерме неке компоненте анализом облика њеног хроматографског пика.

Овакви облици пикова срећу се и у течној хроматографији, али у гасној су приметнији јер су сами пикови у гасној хроматографији шири од оних у течној због много израженије уздужне дифузије у гасу у поређењу са течношћу. Асиметрија пикова може да потиче и од преконцентрованости узорка, која такође може бити узрок и појави прешироких пикова. У том случају разблажење узорка ће решити проблем.

3. Течна хроматографија

3.1. Опште о течној хроматографији

Течна хроматографија је свака хроматографска техника код које је покретна фаза течност. На слици 1. (страна 1) приказан је класични и први званични експеримент течне хроматографије у коме се елуирање вршило под дејством силе гравитације. Такве поставке брзо су напуштене јер елуирање траје дуго, а раздвајање у таквој колони је слабо (хроматографски пикови су прешироки). Да би се смањило време елуирања и постигла потребна ефикасност повећавана је разлика притисака на крајевима колоне посебним пумпама. Данашњи уређаји за течну хроматографију раде под разликама притисака на крајевима колоне и до 1000 атмосфера. Оваква течна хроматографија назива се **течна хроматографија под високим притиском** или **високо-перформансна течна хроматографија**.

Непокретна фаза може бити чврста или течна. Ако је непокретна фаза чврста, хроматографске колоне су пуњене гранулисаном чврстом фазом и компоненте узорка се адсорбују на њу, а техника се тада зове **течна адсорпциона хроматографија**. Уколико је непокретна фаза течна, онда је она нанета на чврст носач и компоненте узорка се растварају у тој течности, а назив ове технике је **течна подеона хроматографија**.

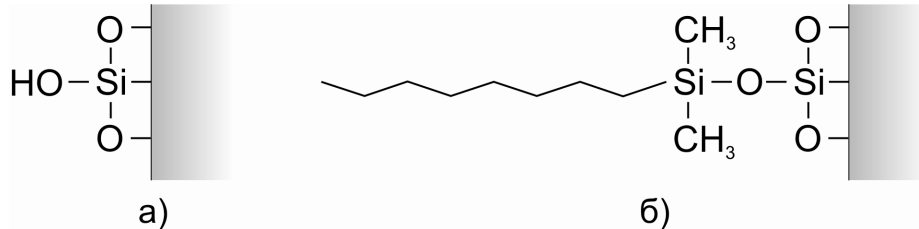
Ако током целог хроматографског експеримента састав елуента остаје исти такво елуирање се зове **изократско**. Ако се састав елуента мења у току експеримента елуирање се зове **градијентно**. У градијентном елуирању састав елуента може да се мења по унапред одређеном програму у циљу добијања бољег раздвајања хроматографских пикова и смањења времена анализе. Најчешће се састав елуента мења линеарно са временом.

3.2. Типови течне хроматографије

Постоји неколико типова течне хроматографије: хроматографија нормалних и обрнутих фаза, јоноизмењивачка, ексклузивна и афинитетна хроматографија. Поред њих, у течну хроматографију спадају и неколонски (планарни) облици хроматографије: танкослојна хроматографија и хроматографија на папиру.

Хроматографија нормалних фаза је прва развијена техника течне хроматографије. То је назив за оне технике код којих је непокретна фаза поларна, док је покретна фаза неполарна (на пример, хлороформ) и у њој се може растворити узорак. Степен интеракције са поларном непокретном фазом већи је што је већа поларност компоненте узорка. Сама непокретна фаза је најчешће силика-гел, који је површински модификован тако да садржи поларне -ОН (или -NO₂) групе као на слици 18.а. Овај тип

хроматографије постепено је напуштен због слабе репетабилности, која је последица везивања воде и других поларних компоненти из узорка на непокретну фазу. Зато се у поновљеном експерименту са већ коришћеном колоном не добијају иста ретенциона времена за компоненте једног истог узорка.



Слика 18. Површинске модификације непокретне фазе код хроматографије:
а) нормалних фаза и б) обрнутих фаза.

Хроматографија обрнутих (реверзних) фаза назив је за оне технике код којих је покретна фаза поларна (најчешће водена), а непокретна неполарна. Непокретну фазу сачињава силика-гел који је површински модификован тако да садржи дугачке ланце алкил група, на пример $-C_8H_{17}$, као на слици 18.б. Поларнији молекули брже напуштају овакву колону, а неполарни се дуже задржавају у њој услед хидрофобних[†] интеракција са алкилним ланцима. Ове интеракције су јаче за компоненте чији молекули имају већу хидрофобну површину, а самим тим су им већа и ретенциона времена. Такође хидрофобне интеракције биће јаче ако се употребе непокретне фазе модификоване са већим алкил групама (на пример $-C_{18}H_{37}$) услед чега ће и ретенциона времена бити већа. За раздвајање ароматичних једињења у узорку постоје модификације непокретне фазе за фенил групом ($-C_6H_5$).

Ретенциона времена су сразмерна и површинском напону елуента, тако да се могу смањити уколико се у воду дода нека супстанција са нижим површинским напоном (метанол или ацетонитрил). Тако се повећањем удела метанола у елуенту током времена (при градијентном елуирању) смањују ретенциона времена компоненти и добијају се оштрији и ужи пикови, који би у неким случајевима у изократском елуирању били прешироки и једва приметни. Уколико се у воду као елуент додају неорганске соли површински напон и ретенциона времена се повећавају. Колоне за хроматографију обрнутих фаза су много дуготрајније и поузданије у поређењу са колонама за хроматографију нормалних фаза.

Компоненте једне исте смеше имаће обрнут редослед изласка из колоне обрнутих фаза у односу на онај који би имале у хроматографији нормалних фаза.

[†] Хидрофобне интеракције углавном се објашњавају као појава такве просторне реорганизације поларних молекула и молекула воде, која доводи до тога да се неполарни молекули скупљају у агрегате што мање површине према води. У таквом распореду ови агрегати најмање могуће ометају молекуле воде да међусобно успостављају водоничне везе.

Јоноизмењивачка хроматографија користи се за анализу узорака код којих су компоненте присутне у виду јона. Користи се за анализу неорганских јона (на пример у анализи и пречишћавању воде) али и за раздвајање других наелектрисаних молекула (на пример аминокиселина и протеина). Колоне за јоноизмењивачку хроматографију испуњене су јоноизмењивачким смолама, које се састоје од инертне подлоге (неког синтетичког полимера) за коју су ковалентним везама везане јонске функционалне групе способне да везују и отпуштају друге јоне. Јоноизмењивачке смоле могу бити катјонске (садрже киселе групе које везују катјоне), анјонске (садрже базне групе које везују анјоне) и амфотерне (садрже и киселе и базне функционалне групе које везују и катјоне и анјоне у зависности од рН вредности). За функционалне групе у јоноизмењивачкој смоли важан параметар је њихова константа дисоцијације. Као елуент у катјонској хроматографији користи се HCl, а у анјонској KOH.

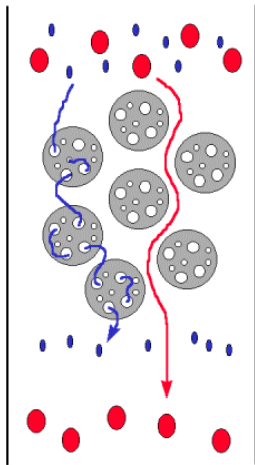
У јоноизмењивачкој хроматографији јонске компоненте узорка се раздвајају услед различитог афинитета према измени јона са непокретном фазом. Разлика у афинитету према измени јона потиче од димензија и наелектрисања јона, који условљавају и њихов степен солватисаности у покретној фази. Што су јони већи и више наелектрисани, имаће већи афинитет према непокретној фази. На излазу из јоноизмењивачке колоне ефлуент се уводи у посебан простор у коме се врши издвајање јона елуента из њега и који се зове **супресор**. Ово се ради да јони елуента не би ометали детекцију јона узорка, која се најчешће заснива на неком електрохемијском методу.

Ексклузиона (или гел) хроматографија је техника течне хроматографије у којој се компоненте узорка раздвајају према величини честица. Ово раздвајање постиже се проласком узорка кроз паковану колону чије грануле имају поре различитих величина. Поре на молекуле узорка делују као сито, само са супротним ефектом (слика 19). Ако су молекули већи од пора, будући да не могу да уђу у њих, заобилазе грануле и брже излазе из колоне. Молекули мањи од пора улазе у њих, извесно време проводе у гранулама и зато спорије теку кроз колону. Ова техника се користи за раздвајање протеина и органских полимера према величини молекула.

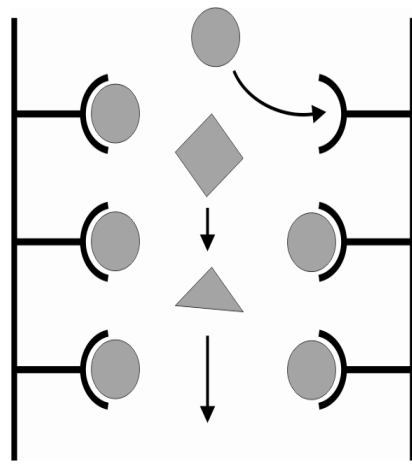
Афинитетна хроматографија користи се за раздвајање великих биолошких молекула при чему се оно постиже великом специфичношћу њихових интеракција са посебно припремљеном непокретном фазом. Интеракције могу бити типа антиген-антитело или ензим-супстрат[†] и оне су условљене погодним геометријским везивањем два протеина по принципу “кључ - брава” (слика 20). Смеша протеина прво се доведе у колону чија непокретна фаза има посебна активна места за везивање одређеног протеина. Само та врста протеина ће се везати за непокретну фазу, док ће остале проћи кроз колону. Пошто

[†] Интеракције антигена и антитела су биолошки важне интеракције на којима је утемељен принцип функционисања стеченог имунитета код организама. Ензими су катализатори биохемијских реакција у којима учествују супстрати.

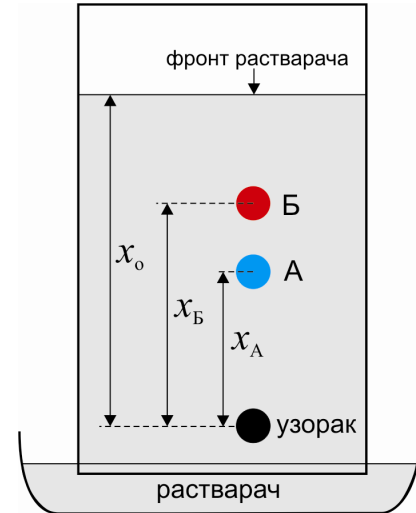
је везивање реверзибилно, може се елуирањем непокретне фазе погодним пуфером изоловати жељени протеин.



Слика 19. Ексклузиона хроматографија.



Слика 20. Афинитетна хроматографија.



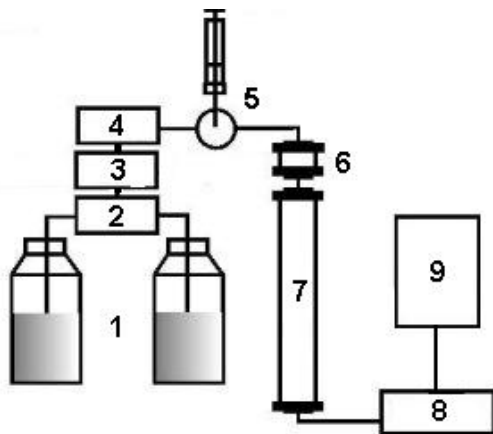
Слика 21. Хроматографија на папиру и танком слоју.

Хроматографија на папиру и **танкослојна хроматографија** су планарне (неколонске) хроматографске технике за раздвајање обојених и неиспарљивих течних узорака. Код хроматографије на папиру непокретна фаза је комад папира, а елуент се креће преко папира заједно са узорком ношен капиларним силама. Постоје поставке у којима се растварач пење уз папир и у којима силази низ папир, према чему се разликују узлазна и силазна хроматографија на папиру. Узорак се наноси у виду тачке на папир у близини растварача, а временом се његове компоненте раздвајају (А и Б, слика 21). Уместо ретенционих времена у овом типу хроматографије дефинишу се **ретенциони фактори** компоненти (R_f вредности) као растојања које је прешао центар трага неке компоненте подељена са растојањем које је прешао фронт растварача за исто време (на слици 21, $R_{f,A} = x_A / x_0$).

Приметимо да се у колонским облицима хроматографије компоненте раздвајају према различитом времену које им је потребно да пређу исти пут (ретенционо време), док се код неколонске раздвајају према различитом путу који пређу за исто време (ретенциони фактор). Хроматографија на танком слоју слична је хроматографији на папиру, али је непокретна фаза адсорбенс (најчешће силика-гел или алуминијум оксид) који је нанесен на стаклену или пластичну плочицу. Танкослојна хроматографија се одвија много брже од оне на папиру.

3.3. Опис инструмента

Шема инструмента приказана је на слици 22.



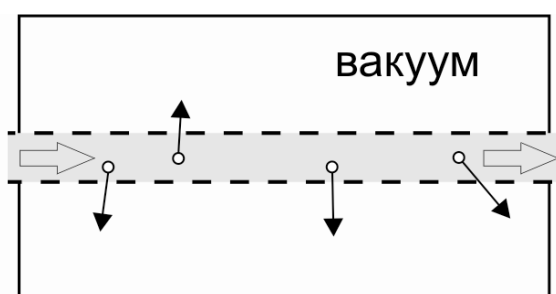
Слика 22. Шема течног хроматографа:
 1 – растварачи, 2 – мешалица, 3 – дегасер,
 4 – пумпа са пригушницом, 5 – инјектор,
 6 – предколоне, 7 – колоне, 8 – детектор,
 9 – рачунар/писач.

Из **резервоара са растварачима** уређај преузима раствараче високе чистоће и меша их **мешалицом** у унапред одређеном односу који може да варира у времену. Затим се тако припремљен елуент уводи у **уређај за дегасирање** у коме се елуент ослобађа мехурића гаса који су у њему настали, углавном услед процеса мешања. Мехурићи гаса могу да ометају правилан проток елуента кроз колону и да узрокују неправилне пикове у хроматограму, као и да ометају рад пумпе. Најчешће се дегасирање елуента врши тако што се он проводи кроз цев порозних зидова иза којих је вакуум, тако да мехурићи гаса могу да прођу кроз зидове цеви кроз које елуент не може (вакуумско дегасирање, слика 23). Ако нема уређаја за дегасирање, елуент се може дегасирати третирањем у ултразвучној кади. Дегасирани елуент се затим уводи у **пумпу** која служи да га под високим притиском унесе у колону.

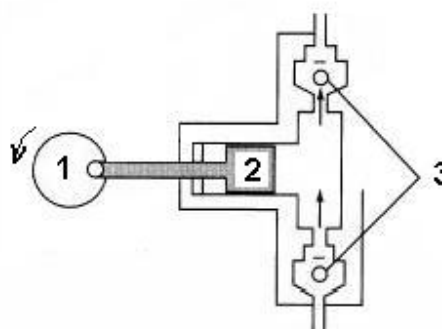
Пумпе у течној хроматографији развијају притиске од 50 до 1000 атмосфера. Високи притисци су потребни да би проток елуента био бржи јер у поређењу са гасом течност има већу вискозност, а колоне су гушће пуњене. Потребно је да пумпа има стабилан рад са варијацијама у притиску испод 1 %. Брзине протока су неколико милилитара у минути. Пумпе за градијентно елуирање су још сложеније и конструисане су тако да могу по утврђеном програму да мењају састав елуента током експеримента. Могу бити бинарне, тернерне или кватернарне, зависно да ли се мешају две, три или четири компоненте.

Најчешће пумпе су клипне пумпе, чија је конструкција приказана на слици 24. Радилица покреће клип лево-десно и тако повећава и смањује запремину цилиндра. Када се запремина повећава, из доњег неповратног вентила се преузима ефлуент, док је горњи вентил затворен. Кад клип сабија запремину цилиндра, доњи вентил је затворен, док се

горњи (ка колони) отвара при одређеној вредности притиска. Због свог начина рада клипне пумпе производе пулсне варијације притиска. Зато се често уз пумпу поставља и **пригушница** у виду дијафрагме, која служи да умањи варијације у притиску које настају радом саме пумпе, или се две клипњаче повежу тако да раде у супротним фазама.



Слика 23. Вакуумски дегасер.



Слика 24. Клипњача: 1 – радилица, 2 – клип, 3 – неповратни вентили.

Инјектор служи да уведе узорак на пут елуента пред улазак у колону. Количине узорка за анализу крећу се од 5-20 μl . Инјектор мора бити конструисан тако да поднесе висок притисак пумпе коме је у тренутку уношења узорка изложен. Инјектирање узорка може да се обавља ручно микро-шприцевима или преко посебних обртних славина сличних оној приказаној на слици 10. Аутоматско инјектирање обавља роботизован уређај (аутосемплер) коме није потребан надзор експериментатора.

Након инјектирања елуент са узорком доводи се у **предколону**, која служи да очисти покретну фазу од компоненти које би се иреверзибилно везивале за непокретну фазу у хроматографској колони и тиме скраћивале њен радни век. Дужина предколоне износи неколико центиметара. Након изласка из предколоне, елуент са узорком уводи се у **колону**. Ефлуент из колоне долази на **детектор**, где се детектују компоненте узорка. Рад течних хроматографа данас је потпуно рачунарски управљан.

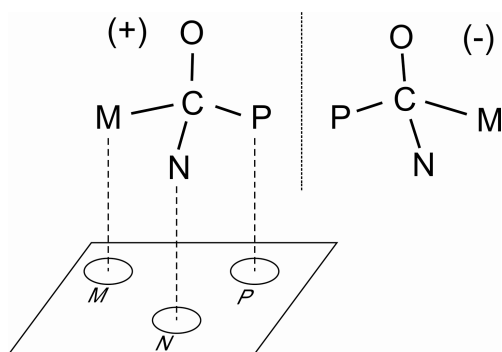
3.3.1. Колоне за течну хроматографију

Хроматографске колоне у течној хроматографији су густо пуњене честицама непокретне фазе. Честице непокретне фазе су малих димензија од 3 до 5 μm у пречнику, и велике специфичне површине што побољшава раздвајање компонената. Дужине колоне за аналитичку течну хроматографију су око 20 cm, а унутрашњи пречник им је од 2 до 4 mm. Због густог пуњења отпор протицању ефлуента кроз колону је велики па је неопходна велика разлика притисака на крајевима колоне коју обезбеђује пумпа, као што је већ поменуто. Колоне су најчешће направљене од челика како би издржале висок притисак, док пуњења могу бити од силика-гела, полиетилена, или полиметакрилата. Број

теоријских подова за колоне у течној хроматографији је веома висок и најчешће износи око 50 000 по метру дужине колоне. Иако утицај температуре на резултате експеримента у течној хроматографији није толико изражен као у гасној, колоне се често термостатирају да би се избегле варијације у хроматограму које су последица малих температурских разлика.

Недавно су развијене и капиларне колоне за течну хроматографију. Њихов унутрашњи пречник је мањи од 1 mm и у рутинској пракси се ретко срећу. Користе се у научним истраживањима где је потребна висока ефикасност раздвајања, јер могу имати и милион теоријских подова.

Постоје и посебне колоне којима је могуће раздвојити оптичке изомере. Оне се зову колоне са хиралном непокретном фазом. Њихов развој везан је углавном за фармацеутске и медицинске сврхе, посебно након што је уочено да физиолошка активност енантиомера може драстично да се разликује[†]. Колоне са хиралном непокретном фазом праве се тако што се на подлогу од силика-гела нанесе само један оптички изомер неке погодне хиралне компоненте, најчешће целулозе или циклодекстрина. Када два оптичка изомера интерагују са оваквом непокретном фазом, један од њих може да се везује за њу на три места, док други може само на два, па се на том принципу врши раздвајање оптичких изомера (слика 25).



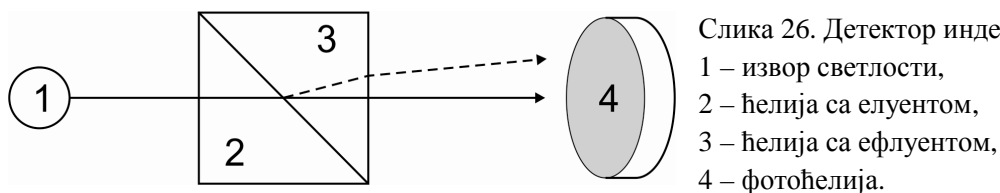
Слика 25. Принцип раздвајања оптичких изомера. Непокретна фаза има по три активна центра за везивање хиралних молекула. Ако (+) изомер може да се веже за њу на сва три активна центра, онда из геометријских разлога (-) изомер може да се веже највише за два места, па услед слабије интеракције са непокретном фазом брже напушта хиралну колону.

Колоне за препаративну течну хроматографију су већег унутрашњег пречника (преко 5 mm) и имају мању ефикасност раздвајања, а већи капацитет. Колоне у хроматографском експерименту бирају се према карактеристикама узорка, како би се постигло жељено раздвајање компоненти узорка.

[†] Познат је пример лека под називом *Талидомид*, који је 1957. године избачен на тржиште Западне Немачке као лек против гастритиса и мучнине за труднице. Лек је био рацемска смеша оптичких изомера, али се није знало да је само (+) изомер активан као лек, док је (-) изомер отров који ремети развој фетуса. Око 10 000 деце је тада рођено са тешким поремећајима екстремитета, очију и срца, од чега је 50 % њих брзо умрло.

3.3.2. Детектори у течној хроматографији

Принцип рада **детектора индекса преламања** приказан је на слици 26. Зрак светлости из сијалице или светлосне диоде усмерава се на две оптичке ћелије (које имају облик тростране призме) при чему кроз једну протиче елуент, а кроз другу ефлуент са краја хроматографске колоне. Након проласка кроз оптичке ћелије, зрак се фокусира сочивом и упућује се на фотоћелију. Фотоћелија је полупроводнички елемент чији је електрични отпор обрнуто сразмеран интензитету њеног осветљења. При наиласку на разне компоненте узорка, зрак у оптичкој ћелији са ефлуентом мења правац (у складу са законом преламања), бива скренут са путање и мења се режим осветљења фотоћелије. Мења се и струја у електричном колу са фотоћелијом и та промена је мерни сигнал овог детектора.

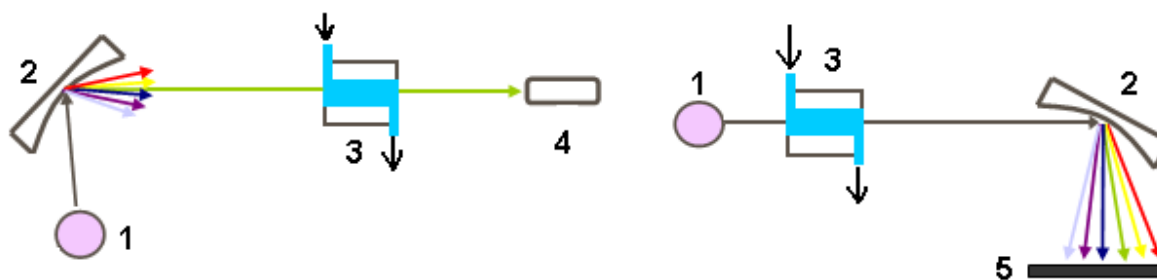


Ова врста детектора је недеструктивна, неспецифична и нема велику осетљивост (граница детекције је око 10^{-3} g/l). Пошто индекс преламања зависи од температуре, ћелије морају бити прецизно термостатиране. Детектори индекса преламања нису погодни за градијентно елуирање као ни за детекцију компоненти које апсорбују у УЉ области и које подлежу флуоресценцији, док су врло погодни за детекцију шећера.

УЉ-ВИД детектори су група детектора који се користе за детекцију супстанција које апсорбују у ултра-љубичастој и видљивој области. У њих спадају ароматична једињења и једињења са хромофорама у виду двоструких веза између С, N, O и S атома. Ови детектори раде на принципу мерења апсорбанције, према Ламбер-Беровом закону. Прве варијанте ових детектора користиле су монохроматски извор светлости (на пример, живину лампу) и оне се махом користе за препаративну хроматографију. Погоднији за аналитичке сврхе су детектори који имају полихроматске изворе (деутеријумска и волфрамска лампа) и који се могу подесити да врше детекцију на таласној дужини маскимума апсорпције неке компоненте, где је и осетљивост највећа.

УЉ детектори који раде на више таласних дужина могу бити са дисперзним елементом или са фотодиодним низом (слика 27). Код УЉ детектора са дисперзним елементом, дисперзија светлости врши се пре него што светлост уђе у оптичку ћелију са узорком, док се након проласка кроз њу детекција врши фотоћелијом. Код детектора са фотодиодним низом дисперзија светлости се врши након што светлост изађе из оптичке ћелије, а детекција се врши низом фотоћелија. Битна разлика у овим поставкама је што у

првом случају у једном тренутку времена имамо сигнал са једне фотоћелије и само од једне таласне дужине, док у другом имамо истовремено сигнал са више фотоћелија, то јест са више таласних дужина. Уколико имамо потребу да снимамо спектар неке компоненте, детектор са фотодиодним низом нам омогућава да то урадимо тренутно и без прекидања протока кроз оптичку ћелију. Код детектора са дисперзним елементом, за снимање спектра неопходно је прекинути проток док се механичким померањем дисперзног елемента не изврши скенирање по жељеном опсегу таласних дужина и њихова детекција.

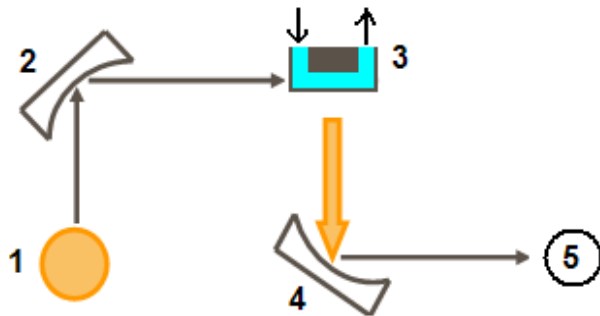


Слика 27. УЛ-ВИД детектор са дисперзним елементом (лево) и са фотодиодним низом (десно): 1 – извор полихроматске светлости, 2 – дифракциона решетка, 3 – проточна оптичка ћелија, 4 – фотоћелија, 5 – низ фотоћелија.

Граница детекције УЛ детектора износи око 10^{-4} g/l, имају широк опсег линеарности, недеструктивни су и (мање или више) специфични.

Флуоресцентни детектор користи се за детекцију једињења која показују флуоресценцију. Флуоресценција је појава да побуђени атом или молекула емитује зрачење ниже енергије (веће таласне дужине) од оне која га је побудила. Емисија зрачења наступа само неколико наносекунди од побуде (док је код фосфоресценције овај период дужи). Конструкција флуоресцентног детектора приказана је на слици 28.

Из ксенонске лампе светлост се упућује на дисперзни елемент (дифракциону решетку) којим се одабира жељена побудна таласна дужина и упућује се на проточну оптичку ћелију. Молекули који флуоресцирају у оптичкој ћелији емитују зрачење у свим правцима. Нормално на правац првобитног зрака, постављен је још један дисперзни елемент којим се одабира таласна дужина флуоресцентног зрачења и упућује се на фотоћелију. Како различити молекули имају различите вредности побудног и емитованог зрачења, присуство монохроматора омогућава да се детектор подеси за детекцију тачно одређене компоненте. Постоје и варијанте флуоресцентних детектора код којих се уместо дисперзних елемената налазе оптички филтери.



Слика 28. Флуоресцентни детектор:
 1 – извор полихроматске светлости,
 2 – дифракциона решетка за побудно зрачење, 3 – проточна оптичка ћелија,
 4 – дифракциона решетка за флуоресцентно зрачење, 5 - фотоћелија.

Флуоресценцију у природи не показује велики број једињења, тако да је флуоресцентни детектор специфичан. Молекули који садрже коњуговане π електроне, поготово ароматична једињења, показују најинтензивнију флуоресценцију. Нека једињења (на пример, афлатоксини) која не показују флуоресценцију могу се дериватизацијом модификовати како бисмо их посматрали помоћу овог детектора. Граница детекције флуоресцентног детектора је око 10^{-6} g/l и он је недеструктиван.

Поред поменутих детектора, у течној хроматографији постоје и електрохемијски детектори (користе се у јоноизмењивачкој хроматографији), спектроскопски инфра-црвени детектори, детектори оптичке активности (користе се заједно са хиралним колонама) и други. Као и код гасне хроматографије, и код течне је могуће серијски везати масени спектрометар на излаз колоне, у ком случају се добија **течна хроматографија са масеном спектрометријом**. То је техника којом се може постићи изузетна осетљивост при одређивању концентрације узорака.

Примена течне хроматографије је врло широка и обухвата анализу и препаративну лекова, анализу хране, индустријске анализе, анализе у форензици и животној околини. Стандардно се помоћу ње врше анализе афлатоксина, пестицида, вештачких боја и других једињења.

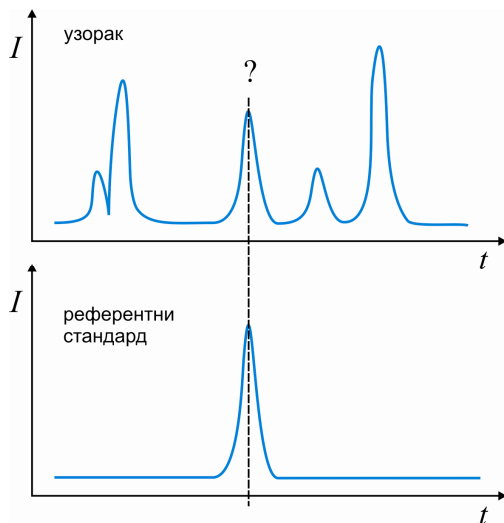
4. Квалитативна и квантитативна анализа у хроматографији

4.1. Квалитативна анализа

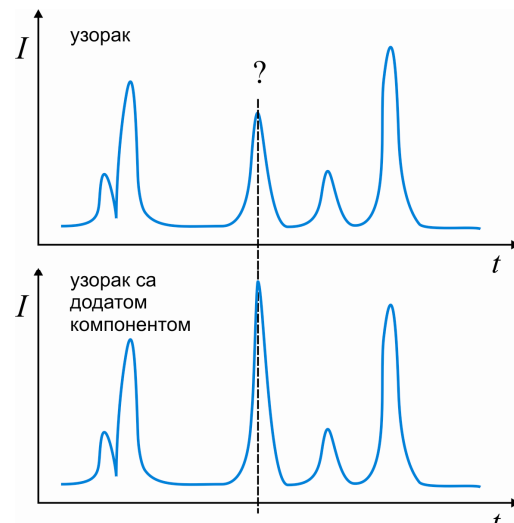
Квалитативна анализа је идентификација свих пикова у хроматограму, то јест утврђивање који пик потиче од ког једињења. У квалитативној анализи разликујемо два главна случаја:

1. Анализа узорак чији састав нам је познат.
2. Анализа узорак чији састав нам није потпуно познат.

У првом случају потребно је само корелисати сваки хроматограмски пик са одговарајућим једињењем, док је у другом неопходно идентификовати непознате компоненте узорка. То се постиже или детекторима који могу да помогну у идентификацији (какав је на пример масени спекрометар) или се непозната компонента сакупља на крају колоне да би се анализирала другим структурним методима (инфра-црвена спектроскопија, нуклеарна магнетна резонанција и друге).



Слика 29. Метод референтног стандарда.



Слика 30. Метод коинјектирања.

Придруживање хроматограмског пика једињењу може се извести на неколико начина. Први начин, познат као **метод референтног стандарда**, састоји се у томе да се под истим аналитичким условима и на истој колони сниме хроматограм стандардног раствора компоненте на коју сумњамо. Потребно је да концентрације испитиване компоненте у узорку и стандардном раствору буду блиске (колико је то могуће) како се не би јавили ефекти асиметрије пикова. Поређењем ретенционих времена може се посматраном пику придружити једињење (слика 29).

Метод коинјектирања састоји се у томе да се узорку сними хроматограм, а затим му се дода нека компонента на коју сумњамо и поново се сними хроматограм. Уколико се деси да неки пик у хроматограму порасте (слика 30), онда то значи да је тај пик од компоненте коју смо додали и на тај начин смо извршили придруживање пика једињењу. При поновном снимању хроматограма радни услови не морају бити строго исти као код метода референтног стандарда, јер посматра се само релативни пораст одређеног пика и незнатна промена његовог ретенционог времена неће представљати проблем.

Поред поменутих техника које се заснивају на анализи хроматограмских пикова, квалитативна анализа може да се изврши и уколико се сними спектар једињења (УЛ спектар или масени спектар), а затим се на основу поређења са базама спектра, уколико се добије подударане, утврди које једињење је у питању.

4.2. Квантитативна анализа

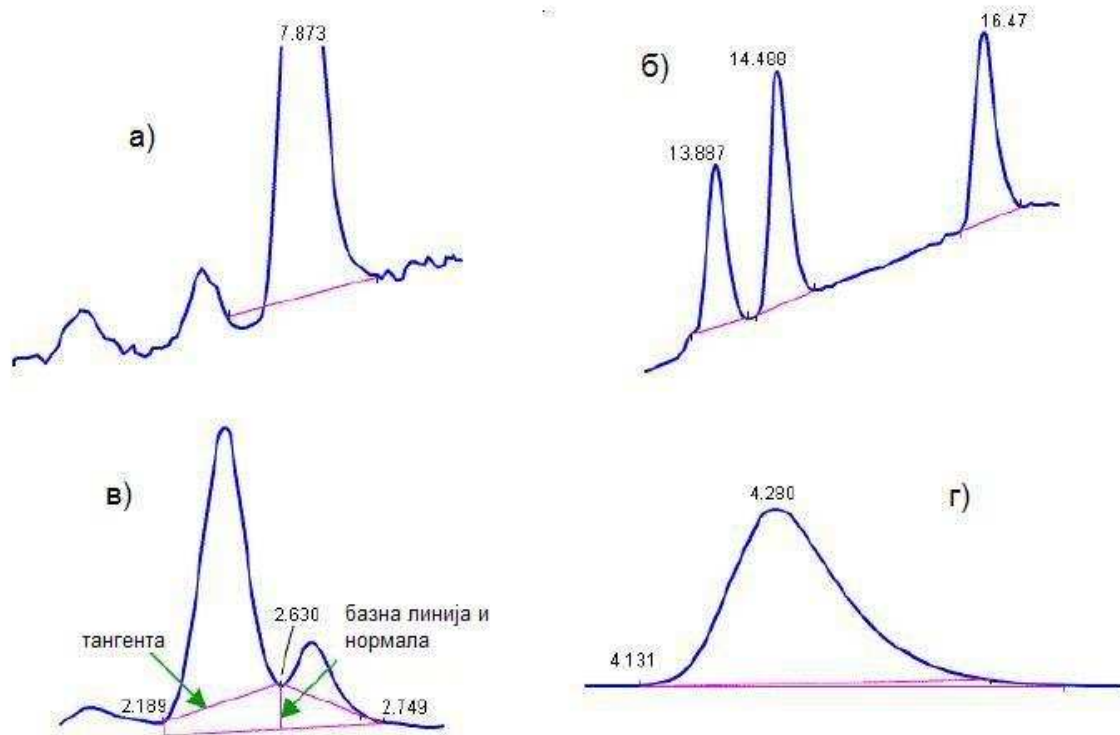
Квантитативна анализа је утврђивање количине компоненти у узорку. Да би се што тачније извршила квантитативна анализа, потребно је да услови рада на хроматографу буду стабилни, пре свих раздвајање у колони, инјекција узорка, температура и начин детекције. Пожељно је и да је потпуна квалитативна анализа узорка спроведена, што је испуњено у већини практичних случајева. Од пресудне важности за тачност квантитативне анализе је и резолуција пикова у хроматограму; ако су пикови добро међусобно раздвојени, то ће олакшати поступак одређивања површине испод пикова, што је срж квантитативне анализе. Површина испод пика одређује се најчешће нумеричком интеграцијом. Ако је базна линија хроматограма равна и без много шума, то такође омогућава тачнију анализу. Пиковима који се преклапају, или су изражене асиметрије, или су насађени на проблематичну базну линију врло је тешко правилно одредити површину. Неколико проблематичних ситуација у том смислу приказано је на слици 31.

Постоји више техника квантитативне анализе. Метод **нормализације** састоји се у томе да се пиковима на снимљеном хроматограму одреде површине и да се сразмерно површинама пикова прогласе удели компонената у узорку. Овај метод је доста груб, јер подразумева да је одговор детектора на све компоненте узорка исти.

Метод спољашњег стандарда врши се тако што се сними хроматограм узорка и раствора тачно познате концентрације у коме се налази нека компонента из узорка. Снимање ова два хроматограма је неопходно вршити под истим аналитичким условима, а инјектоване запремине стандардног раствора и узорка морају бити исте. Онда се одреде површине пикова посматране компоненте у хроматограму узорка и стандардног раствора. Уз претпоставку да детектор даје линеаран одзив, концентрација компоненте у узорку је:

$$C_x = C_o (P_x / P_o)$$

где је C_o – концентрација стандардног раствора, P_x – површина пика компоненте на хроматограму узорка, P_o - површина пика компоненте на хроматограму стандардног раствора. За постизање бољих резултата, пожељно је припремити више стандардних раствора различитих концентрација, сваком од њих снимити хроматограм и одредити површину испод пика. Графички приказ површине испод пика неке компоненте у зависности од њене концентрације зове се **калибрациони дијаграм**. Помоћу њега се метод спољашњег стандарда може поузданије користити у ширем опсегу концентрација, чак и онда када не постоји линеарност у одзиву детектора.



Слика 31. Неки проблеми при интеграцији пикова: а) много шума на базној линији, б) нагнута базна линија, в) преклапање пикова и г) асиметрија пика.

Метод унутрашњег стандарда омогућава још тачнију квантитативну анализу, јер је њиме могуће компензовати разне варијације у радним условима. Процедура је слична као код метода спољашњег стандарда, с том битном разликом што се и у узорак и у стандардни раствор додаје иста количина (иста концентрација) једне компоненте, назване **унутрашњи стандард**. Унутрашњи стандард треба да је сличан по хемијским особинама испитиваној компоненти и да има њој блиско ретенционо време, али да је јасно раздвојен од ње у хроматограму. За унутрашњи стандард се бира компонента које нема у узорку и која је инертна према свим компонентама у узорку.

Потребно је да се сниме хроматограми узорка и стандардног раствора (са унутрашњим стандардом, слика 32) и да се одреде површине пикова унутрашњег стандарда и компоненте од интереса. **Фактор одзива** (за неки пар унутрашњи стандард - компонента) одређује се као величина:

$$I = (P_{uo}/C_u) / (P_o/C_o) = (P_{uo} C_o) / (P_o C_u)$$

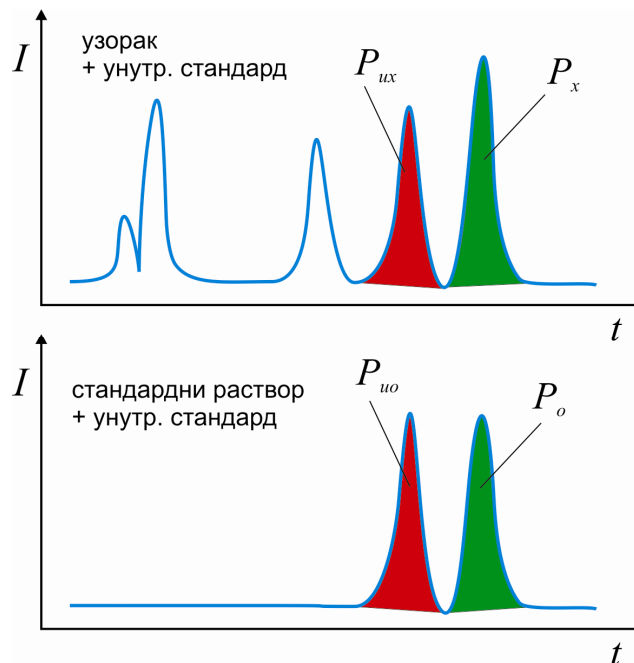
где су P_{uo} и P_o површине пикова унутрашњег стандарда и компоненте у стандардном раствору, а C_u и C_o концентрације унутрашњег стандарда и стандардног раствора. Непозната концентрација у узорку може се одредити из једначине:

$$C_x = (C_u P_x / P_{ux}) I = (C_u P_x / P_{ux}) * (P_{uo} C_o / P_o C_u)$$

где су P_{ux} и P_x површине пикова унутрашњег стандарда и компоненте у узорку. Преуређен, горњи израз гласи:

$$C_x = C_o (P_x / P_o) * (P_{uo} / P_{ux})$$

што је израз који се разликује од оног за метод спољашњег стандарда за корекциони фактор (P_{uo} / P_{ux}) који одражава евентуалне варијације у радним параметрима.



Слика 32. Метод унутрашњег стандарда: црвени (леви) пик је од унутрашњег стандарда, а зелени (десни) од испитиване компоненте.

У случајевима када се анализе обављају гасном или течном хроматографијом са масеном спектрометријом, као унутрашњи стандард за неко једињење може се користити његов изотополог: једињење истог хемијског, али различитог изотопског састава. У тим случајевима, унутрашњи стандард је најчешће деутерисани аналит (неколико водоника ^1H аналита замењени су деутеријумом ^2D), који ће имати већу масу од аналита. У скенирајућем моду снимања масеног спектрометра, одаберу се карактеристична m/z вредност аналита и очекивана карактеристична m/z вредност унутрашњег стандарда. Ако су, примера ради, три протијума замењена деутеријумом, снимање се врши на карактеристичној m/z вредности аналита и на вредности $m/z + 3$. Иако се хроматографски пикови аналита и унутрашњег стандарда скоро потпуно преклапају (блиска су им ретенциона времена), у скенирајућем моду ће сигнали њихових јонских струја бити регистровани одвојено и они се уносе уместо површина пикова у већ поменућу формулу за C_x . У случајевима када се за неки узорак не може наћи погодан класични унутрашњи стандард, изотопски измењен аналит је добро решење јер је то вештачки створен молекул који се практично не може наћи у природи.

Додатак

Неке скраћенице и енглески називи везани за хроматографију који могу бити од користи за претраживање стране литературе:

| скраћеница | енглески назив | Српски назив |
|------------|---|--|
| GC | <i>Gas chromatography</i> | Гасна хроматографија |
| GC-MS | <i>Gas chromatography mass spectrometry</i> | Гасна хроматографија-масена спектрометрија |
| TCD | <i>Thermal conductivity detector</i> | Детектор топлотне проводљивости |
| FID | <i>Flame ionization detector</i> | Пламено-јонизујући детектор |
| ECD | <i>Electron capture detector</i> | Детектор захвата електрона |
| HETP | <i>Height equivalent theoretical plate</i> | Висина теоријског платоа |
| HPLC | <i>High performance liquid chromatography</i> | Течна хроматографија високих перформанси |
| NP-HPLC | <i>Normal phase HPLC</i> | Течна хроматографија нормалних фаза |
| RP-HPLC | <i>Reversed phase HPLC</i> | Течна хроматографија обрнутих фаза |
| TLC | <i>Thin layer chromatography</i> | Танкослојна хроматографија |
| RID | <i>Refractive index detector</i> | Детектор индекса преламања |
| PDA | <i>Photo diode array</i> | Фотодиодни низ |
| FLD | <i>Fluorescence detector</i> | Флуоресцентни детектор |
| ESTD | <i>External standard method</i> | Метод спољашњег стандарда |
| ISTD | <i>Internal standard method</i> | Метод унутрашњег стандарда |