

KJ2050 Analytisk kjemi, GK

(Analyse ved kromatografisk separasjon)

1. Innledning (og noe terminologi)
2. Noe generell teori
 - A. Retensjonsparametre
 - B. Sonespredning
 - C. Sonespredningsmekanismer
3. Korte innføringer til spesifikke teknikker
 - A. **Væskekromatografi (*Liquid Chromatography*, LC)**
 - a) Innledning
 - b) Instrumentering
 - B. Gasskromatografi (*Gas Chromatography*, GC)
4. Kromatografi i analyser

3. Korte innføringer til spesifikke teknikker

3. A Væskechromatografi -- (HP)LC

3. A. a. Innledning

HPLC står for **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography

-- oppnås i LC ved at små partikler med stasjonær fase brukes.

Fordel – høyere effektivitet: Ulempe - høyere mottrykk

Metode-oversikt
- applikasjonsområder

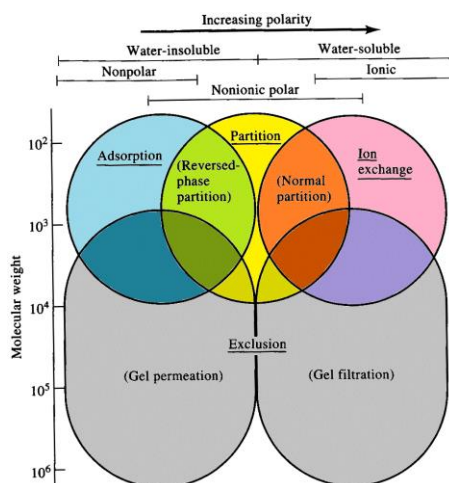


Figure 32-2 Applications of liquid chromatography. Note that the types of chromatography on the right side of the diagram are best suited for polar compounds. Techniques toward the bottom of the diagram are best suited for species of high molecular mass. (From D. L. Saunders, in *Chromatography*, 3rd ed., E. Heftmann, Ed., p. 81. New York: Van Nostrand Reinhold, 1975.)

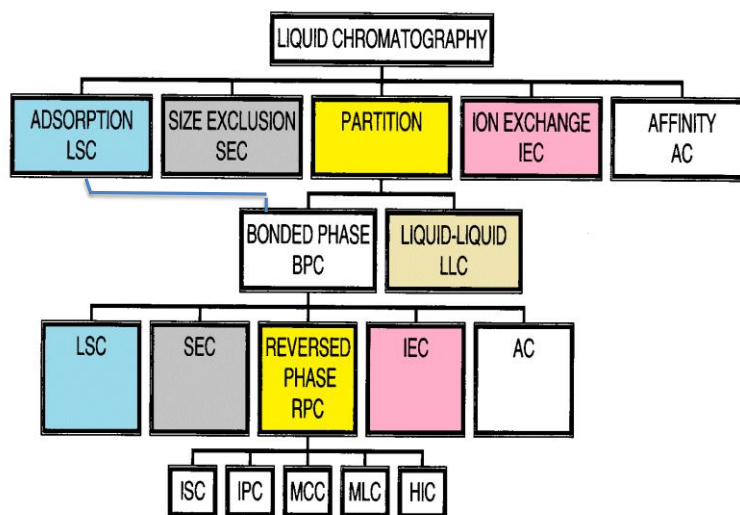
3. Korte innføringer til spesifikke teknikker

3. A Væskeskromatografi -- (HP)LC

3. A. a. Innledning

LC-prinsipper anvendt med (HP)LC

"Family tree of liquid chromatography separation modes":

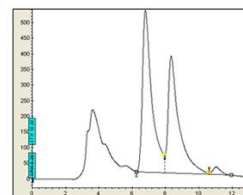


Fra: C.F.Poole, *The Essence of Chromatography*, Elsevier, 2003, Fig.4.1., p. 270

3. Korte innføringer til spesifikke teknikker

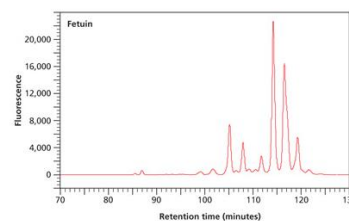
3. A Væskeskromatografi -- (HP)LC

3. A. a. Innledning



HPLC - Fordeler:

- Bred anvendelse - med flere ulike separasjonsmekanismer:
dekker de fleste prøvetyper (polare, høymolekylære)
– er komplementær til GC
- høy oppløsning (men noe dårligere enn HRGC, jfrt. med klassiske LC-søyler)
- kvantifiserbar ned til under pg (men sterkt avhengig av detektor og prøve-type)
- rask metode (jfrt. med klassiske LC-søyler)



A.D.C.Skoog & al. : F.o.An.Ch. 8th: P. 920 – 1003 - Ch. 30E, 31, 32 , 33B.

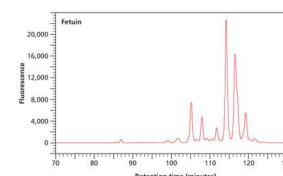
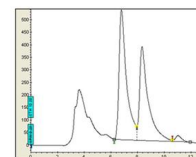
3. Korte innføringer til spesifikke teknikker

3. A Væskeskromatografi -- (HP)LC

3. A. a. Innledning

HPLC - Ulemper:

- Ingen enkel og samtidig universell og følsom detektor (ingen "FID")
- Ingen direkte identifikasjon - "bare t_R " (generelt for kromatografi)
- Rel. dyrt (> 100.000kr., "HPLC = High Price LC")



Apropos det siste (men mer alvorlig) :

HPLC står for **High Performance Liquid Chromatography**

- oppnådd p.g.a. at små partikler med SF brukes (2–10 μ m) .
(Husk: H og H_{eff} minsker med dp^{1-2} ! (A og C-term i v.D.-l.))
- gir høyt mottrykk - lite permeabilitet (gjennomstrømbar-het) for MF
$$\Delta p = (\text{const. } u_{MF} \eta L) / (d_p^2 r^2 \pi)$$
- MF-trykket må derfor økes - for å få rimelig høy MF-gjennomstrømming (rimelig korte retensjonstider)
($\rightarrow$ **High Pressure LC**).

A.D.C.Skoog & al. : F.o.An.Ch. 8th: P. 920 – 1003 - Ch. 30E, 31, 32 , 33B.

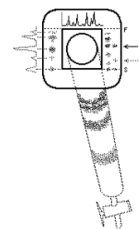
3. Korte innføringer til spesifikke teknikker

3. A Væskekromatografi -- (HP)LC

3. A. a. Innledning

Viktig (repetisjon av) definisjon:

- NP : Normal fase (Normal Phase):
SF = polar - MF = upolar (tidligere mest brukt, historisk normal)
- RP : Omvendt fase (Reversed-Phase):
SF = upolar - MF = polar (i dag mest brukt)



Kontakten med stasjonærfasen (= SF)
er ved
Fordeling, gjennom ABSorpsjon



Absorption

Ved adsorpsjon gjennom ADSorpsjon



ADsorption

Fra:
James M. Miller "Chromatography,
Concepts & Contrasts" , Wiley (2005)

Figure 1. The difference between absorption and adsorption.

3. Korte innføringer til spesifikke teknikker

3. A Væskeskromatografi -- (HP)LC

3. A. a. Innledning

Viktig repetisjon:

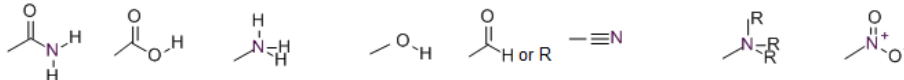
- Polaritet: Strukturer / funksjonelle grupper som har (delvis) ladnings-separasjon:
 - Dipoler, helst usymmetrisk fordelt i strukturen – polare bindinger
 - Hydrogenatomer bundet til på heteroatomer → med evne til å inngå i H-bindinger
 - Heteroatomer med ensomme elektronpar som kan inngå H-bindinger
- Hydrofob: Strukturer som mangler polare bindinger.
 - Typisk "rene" hydrokarboner eller strukturer med hydrokarbon-dekkede overflater (også fluorokarbon(er) (i enda større grad).

Viktig her : Likt løser likt !

Noen organiske funksjonelle grupper – etter Polaritet:

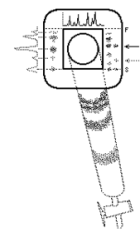
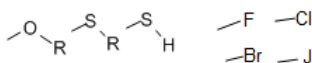
Polare:

Amid > karboksyl > amin (prim.) > hydroksy > Keto/aldehyd/ester/nitril > amin (tert.) > nitro > ...



Lite polare / upolare

... eter/thiol/sulfid > halogen > aromatisk HK > alifatisk HK > fluorokarbon

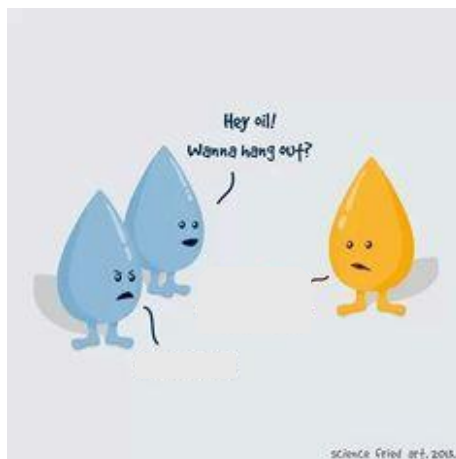
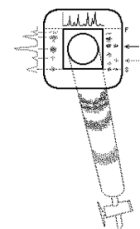


3. Korte innføringer til spesifikke teknikker

3. A Væskekromatografi -- (HP)LC

3. A. a. Innledning

Apropos hydrofob:



Viktig også her : Likt løser likt !

3. Korte innføringer til spesifikke teknikker

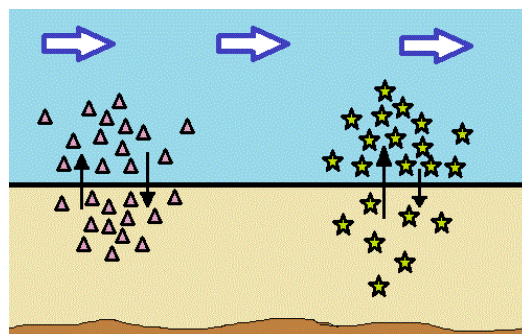
3. A Væskekromatografi -- (HP)LC

3. A. a. Innledning

Flere ulike LC metoder er tilgjengelige - med varierte (hoved-) separasjonsmekanismer aktivt.

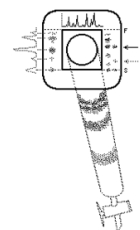
Fordeling/'Partisjon' (Ch. 32.B)

Væske (or væske-lignende) sjikt av SF i tett kontakt med MF-væske. Normalt er SF-væsken "immobilisert" på et fast bærematerial,



F.eks. porøse, inerte partikler, fylt med SF-væske i porene, pakket i en kolonne med ikke-blandbar MF-væske mellom partiklene (= "*interstitial space*").

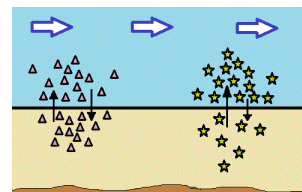
N.B.: Ofte finnes det ikke en gang en veldefinert fasegrense mellom SF og MF, men bare en konsentrasjonsgradient fra bærematerialoverflaten mot og inn i "bulk"-MFen (f.eks. papirkromatografi, HILIC, "Hydrofil Interaksjons-kro.").



3. Korte innføringer til spesifikke teknikker

3. A Væske-kromatografi -- (HP)LC

3. A. a. Innledning



Flere ulike LC metoder er tilgjengelige - med varierte (hoved-) separasjonsmekanismer aktivt.

Partisjon/Fordeling (Ch. 32.B)

Væske (or væske-lignende) sjikt av SF i tett kontakt med MF-væske.

Normalt er SF-væsken "immobilisert" på et fast bærematerial,

Eksempel:

Det historisk første Væske-væske-kromatografi-eksperiment (~ 1941-43) ved Martin and Synge

for separasjonen av **acetylerede aminosyrer**

på en kolonne med silikagel partikler fylt / impregnert med vann (vann = SF) og eluert med (f.eks.) kloroform (med litt butanol i) = MF

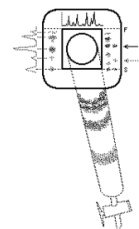
(som var del av grunnlag for deres *Nobelpris i kjemi* i 1952, ... "for their invention of Partition Chromatography")

3. Korte innføringer til spesifikke teknikker

3. A Væskeskromatografi -- (HP)LC

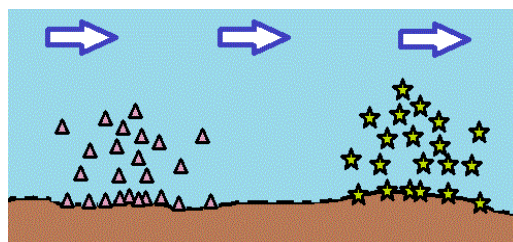
3. A. a. Innledning

Flere ulike LC metoder er tilgjengelige - med varierte (hoved-) separasjonsmekanismer aktivt.

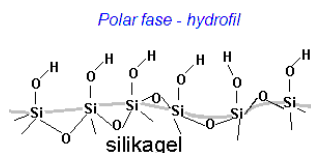


Adsorpsjon (Ch. 32.C)

Den historiske Normalfase- (NP) teknikken (på uorganiske oksider, f.eks. silika; se Tvet's historiske, første kromatografi-eksperimentene).



Eksempel av en
polar ads.-middel-overflate:
silikagel

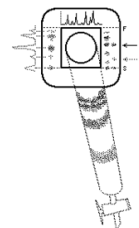


Også brukt i RP-modus (f.eks. i HIC, "Hydrofobisk interaksjons-kro." for protein og peptid-separasjoner).

3. Korte innføringer til spesifikke teknikker

3. A Væskeskromatografi -- (HP)LC

3. A. a. Innledning



Flere ulike LC metoder er tilgjengelige - med varierte (hoved-) separasjonsmekanismer aktivt.

Ionebytting (Ch. 32.D)

Separasjon av ioniske (eller ioniserbare) analytter gjennom deres ulike elektrostatiske tiltrekning til de faste ionene (immobilisert) av motsatt ladning på ionebytter-partiklene (= SF).

Ulik rask eluering av forskjellige (ulikt tiltrukne) ioner, når de elueres med en elektrolytt-løsning ("buffer", inneholdende konkurrerende ioner i MF).

Eksempel: 'Ionekromatografi' av anioner (gradient-eluering på anionbytter-kolonne).

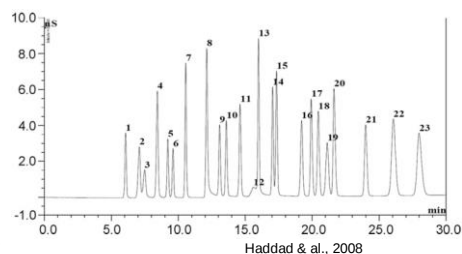
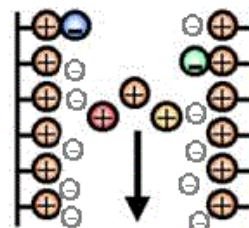


Fig. 6. Separation of anions using a multi-step elution profile comprising isocratic and gradient steps. Dionex IonPac AS20 (4 mm) column. Elution profile: potassium hydroxide: 5 mM from 0 to 5 min; 5–30 mM from 5 to 10 min; 30–55 mM from 15 to 30 min. Flow-rate: 1 mL/min. Temperature: 30 °C. 1, fluoride; 2, acetate; 3, butyrate; 4, formate; 5, chlorite; 6, bromate; 7, chloride; 8, nitrite; 9, chlorate; 10, bromate; 11, nitrate; 12, carbonate; 13, sulfate; 14, selenate; 15, oxalate; 16, phthalate; 17, phosphate; 18, chromate; 19, iodide; 20, arsenate; 21, citrate; 22, thiocyanate; 23, perchlorate. Reproduced with permission from [60].

3. Korte innføringer til spesifikke teknikker

3. A Væskekromatografi -- (HP)LC

3. A. a. Innledning

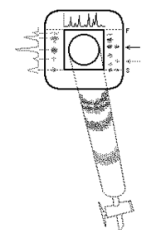
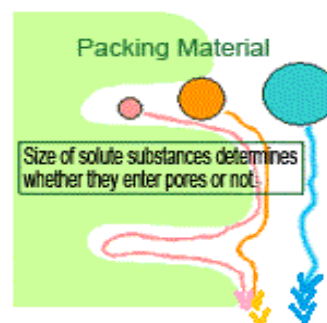
Flere ulike LC metoder er tilgjengelige - med varierte (hoved-) separasjonsmekanismer aktivt.

Sterisk eksklusjon (Ch. 32.E)

Separasjon basert på molekylstørrelse.

Som SF fungerer væske som har sterisk hindret tilgang - er inne i (mikro-)porer (som er på størrelse med analyttene).

- Små molekyler har lett adgang til SF inne i porene (stor retensjon),
- store molekyler har mindre tilgang til SF (lavere retensjon).

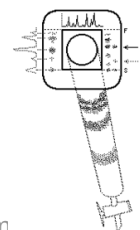


3. Korte innføringer til spesifikke teknikker

3. A Væskeskromatografi -- (HP)LC

3. A. a. Innledning

Flere ulike LC metoder er tilgjengelige - med varierte (hoved-) separasjons-mekanismer, aktivt.



N.B.:

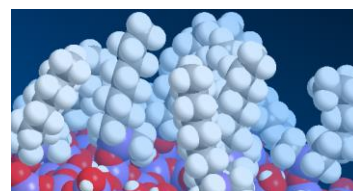
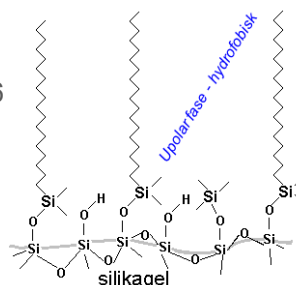
Noen teknikker er vanskelige å "kategorisere" - Blant disse er den viktigste

Omvendt fase-kromatografi ("*Reversed-fase*", med bundne ligandgrupper)

Oppførselen er mellom adsorpsjon og fordeling/partisjon.

... kommer tilbake til dette seinere: 3.A.b.6

"Hovedsakelig brukes derivatisert silika med upolare organiske substituenten bundet til silika-silanol-gruppene ..."



A.D.C.Skoog & al. : F.o.An.Ch. 8th: P. 920 – 1003 - Ch. 30E, 31, 32 , 33B.

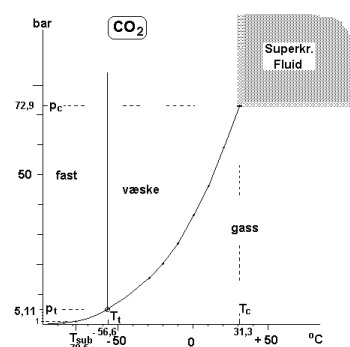
3. Korte innføringer til spesifikke teknikker

3. A Væsekromatografi -- (HP)LC

3. A. a. Innledning

Spesiell "*Limiting case*" (~'grensetilfelle'):

Superkritisk fluid-kromatografi (*Supercritical Fluid Chromatography*, SFC, (Ch. 33.A))



Kromatografiske egenskaper ("justerbare" (?)) mellom GC og LC (-lignende).

Nokså begrenset utvalg av egnede fluider, mest populær er CO₂ - men tilpassbar ved tilsetning av co-eluent (f.eks. metanol).

Et stoff er i **superkritisk** tilstand ...

... når både trykk og temperatur er høyere enn trykk og temperatur ved det "kritiske punkt" ($T > T_c$ og $p > p_c$),

... når både trykk og temperatur er over de "kritiske verdiene":

→ Det finnes da ikke noe synlig fasegrense mellom en gass- og en væskefase, bare den superkritiske fasen, det superkritiske fluid.

Dette fluidet er noe som ligner en ekstra-tett gass eller en "overopphetet" væske.

Det superkritiske fluid er litt begge deler, av gass og væske:

- tett nok til å ha "*solvasiserende*" egenskaper, (stabilisere analyttmolekyler i fluidet)
- har såpass høy kinetisk energi for dens molekyler at deres intermolekylære krefter (koherensen) ikke greier å holde væskemolekylene samlet som væske-fase/-dråper.

Det ... kan ha høy tetthet og kan dermed stabilisere analytter i fluidet (solvasisering) (væske-lik egenskap),

.. har *lav viskositet* (gass-lignende),

.. har *høy diffusivitet* (diffusjonskonstant) for analytter (midt mellom gass og væske).

A.D.C.Skoog & al. : F.o.An.Ch. 8th: P. 920 – 1003 - Ch. 30E, 31, 32, 33B.