

Ово дело је заштићено лиценцом Креативне заједнице Ауторство – некомерцијално – без прерада<sup>1</sup>.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.



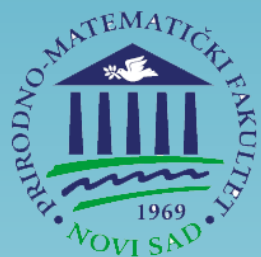
---

<sup>1</sup> Опис лиценци Креативне заједнице доступан је на адреси [creativecommons.org.rs/?page\\_id=74](https://creativecommons.org.rs/?page_id=74).

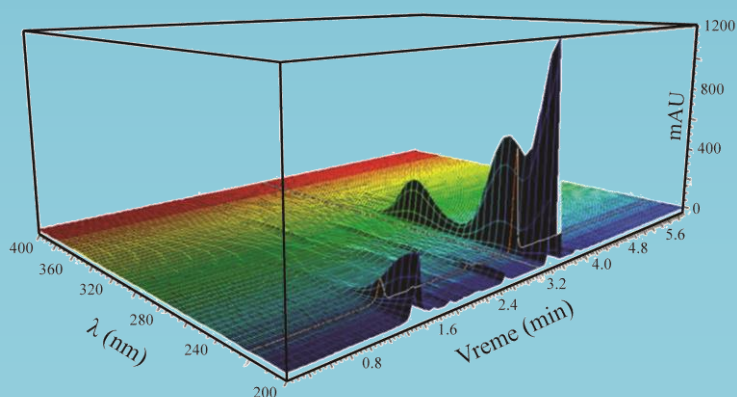
*"Сва права задржава издавач. Забрањена је свака употреба или трансформација електронског документа осим оних који су експлицитно дозвољени Creative Commons лиценцом која је наведена на почетку публикације."*

*"Sva prava zadržava izdavač. Zabranjena je svaka upotreba ili transformacija elektronskog dokumenta osim onih koji su eksplicitno dozvoljeni Creative Commons licencom koja je navedena na početku publikacije."*

---



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



# HROMATOGRFSKE METODE ANALIZE

---

Daniela Šojić Merkulov  
Sanja Armaković

Biljana Abramović  
Nina Finčur

Novi Sad, 2021.



Univerzitet u Novom Sadu  
Prirodno-matematički fakultet  
Departman za hemiju, biohemiju i  
zaštitu životne sredine



Daniela Šojić Merkulov  
Sanja Armaković

Biljana Abramović  
Nina Finčur

## Hromatografske metode analize

Novi Sad, april 2021.



Naziv udžbenika:	Hromatografske metode analize
Autori:	dr Daniela Šojić Merkulov, redovni profesor Prirodno-matematički fakultet Univerzitet u Novom Sadu
	dr Biljana Abramović, redovni profesor Prirodno-matematički fakultet Univerzitet u Novom Sadu
	dr Sanja Armaković, docent Prirodno-matematički fakultet Univerzitet u Novom Sadu
	dr Nina Finčur, docent Prirodno-matematički fakultet Univerzitet u Novom Sadu
Recenzenti:	dr Jelena Molnar-Jazić, vanredni profesor Prirodno-matematički fakultet Univerzitet u Novom Sadu
	dr Snežana Kravić, vanredni profesor Tehnološki fakultet Univerzitet u Novom Sadu
Tehnička obrada slika:	Nada Popsavin
Izdavač:	Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Glavni i odgovorni urednik:	dr Milica Pavkov Hrvojević, redovni profesor, dekan Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

Udžbenik Hromatografske metode analize (elektronsko izdanje) je odobren za upotrebu odlukom Nastavno-naučnog veća Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu na sednici održanoj 02.07.2020. godine (rešenje broj 0602-218/6).

## Predgovor

Udžbenik *Hromatografske metode analize* je namenjen prvenstveno studentima hemije na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, ali smatramo da može biti od koristi i studentima srodnih fakulteta, kao i svima koji žele da se detaljnije upoznaju sa različitim hromatografskim tehnikama razdvajanja (gasna hromatografija, tečna hromatografija visoke efikasnosti, jonska hromatografija, ekskluziona hromatografija, afinitetna hromatografija, planarna hromatografija, superkritična fluidna hromatografija i dr.).

Sadržaj udžbenika je napisan tako da u potpunosti pokriva nastavni plan predmeta *Hromatografske metode* koji se izvodi na četvrtoj godini različitih studijskih programa u okviru osnovnih akademskih studija hemije, ali pokriva i delove gradiva iz predmeta *Osnovi instrumentalne analize*, *Analitička hemija okoline* i *Analitika okoline*, takođe u okviru osnovnih akademskih studija hemije. Međutim, pojedine oblasti su detaljnije opisane tako da udžbenik može da bude od koristi i studentima master i doktorskih akademskih studija hemije koji izučavaju kurseve *Hromatografski principi*, *Analitika organskih polutanata* i *Trendovi u instrumentalnoj analizi* na master akademskim studijama, kao i *Odabrane metode instrumentalne analize* i *Hromatografske metode* na doktorskim akademskim studijama.

Udžbenik je nastao sa ciljem da studentima omogući lakše savladavanje gradiva iz hromatografije u okviru predmeta *Hromatografske metode*, kao i svih pomenutih nastavnih predmeta.

Zahvaljujemo se recenzentima dr Jeleni Molanar Jazić, vanrednom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu i dr Snežani Kravić, vanrednom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu koje su svojim korisnim sugestijama i savetima doprinele boljem kvalitetu ovog udžbenika.

*Autori*

# SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED	1
1.1. Uvod	2
1.2. Istorijski aspekt	3
1.3. Osnovi hromatografskog razdvajanja	5
1.4. Podela hromatografije	15
1.5. Primena hromatografskih metoda	23
2. GASNA HROMATOGRAFIJA	28
2.1. Uvod	29
2.2. Istorijski aspekt	30
2.3. Princip rada	33
2.4. Delovi gasnog hromatografa	35
3. TEČNA HROMATOGRAFIJA	82
3.1. Uvod	84
3.2. Efikasnost kolona u LC	86
3.3. Instrumentacija	89
3.4. Podeona hromatografija	128
3.5. Adsorpciona hromatografija	150
4. JONSKA HROMATOGRAFIJA	153
4.1. Uvod	154
4.2. Istorijski aspekt	154
4.3. Sistem za jonsku hromatografiju	156
4.4. Prednosti jonske hromatografije	157
4.5. Podela jonske hromatografije	158
4.6. Detektori	177
5. SUPERKRITIČNA FLUIDNA HROMATOGRAFIJA	182
5.1. Uvod	183
5.2. Delovi superkričnog fluidnog hromatografa	185
5.3. Kolone	189
5.4. Mobilna faza	191
5.5. Faktori koji utiču na vreme trajanja analize	195
5.6. Poređenje SFC sa HPLC i GC	195
5.7. Oblasti primene SFC	196

6. EKSKLUZIONA HROMATOGRAFIJA	200
6.1. Uvod	201
6.2. Istorijski aspekt	201
6.3. Princip rada	203
6.4. Delovi ekskluzionog hromatografa	213
6.5. Struktura i osobine stacionarne faze	214
6.6. Određivanje apsolutne molekulske mase	215
7. AFINITETNE HROMATOGRAFIJA	219
7.1. Uvod	220
7.2. Osnovne komponente afinitetne hromatografije	221
7.3. Različiti tipovi afinitetne hromatografije	224
7.4. Primena afinitetne hromatografije	231
8. PLANARNA HROMATOGRAFIJA	235
8.1. Uvod	236
8.2. Priprema i nanošenje uzorka	236
8.3. Papirna hromatografija	237
8.4. Tankoslojna hromatografija (TCL)	240
8.5. Razvijanje hromatograma	243
8.6. Detekcija i kvantitativna analiza	247
8.7. Poređenje TLC sa drugim tehnikama hromatografske analize	249

## SPISAK SKRAĆENICA

AAC	analitička afinitetna hromatografija (eng. <i>Analytical Affinity Chromatography</i> )
AC	afinitetna hromatografija (eng. <i>Affinity Chromatography</i> )
AMC	afinitetna monolit hromatografija (eng. <i>Affinity Monolith Chromatography</i> )
APCI	hemijska jonizacija pri atmosferskom pritisku (eng. <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> )
API	jonizacija pri atmosferskom pritisku (eng. <i>Atmospheric pressure ionization</i> )
APPI	fotojonizacija pri atmosferskom pritisku (eng. <i>Atmospheric Pressure Photoionization</i> )
BAC	bioafinitetna hromatografija (eng. <i>Bioaffinity Chromatography</i> )
CI	hemijska jonizacija (eng. <i>Chemical Ionization</i> )
DAD	detektor sa nizom dioda (eng. <i>Diode-Array Detector</i> )
DLI	direktan unos tečnosti (eng. <i>Direct Liquid Introduction</i> )
EC	ekskluziona hromatografija (eng. <i>Exclusion Chromatography</i> )
ECD	detektor na bazi zahvata elektrona (eng. <i>Electron Capture Detector</i> )
ECNI	negativna jonizacija na bazi zahvata elektrona (eng. <i>Electron Capture Negative Ionization</i> )
EI	elektronska jonizacija (eng. <i>Electron Ionization</i> )
ELSD	detektor raspršivanja svetlosti (eng. <i>Evaporative Light-Scattering Detector</i> )
ESI	elektrosprej jonizacija (eng. <i>ElectroSpray Ionization</i> )
FAB MS	masena spektrometrija zasnovana na brzom atomskom bombardovanju (eng. <i>Fast Atom-Bombardment Mass Spectrometry</i> )
FAB	bombardovanje brzim atomima (eng. <i>Fast Atom Bombardment</i> )
FAC	frontalna afinitetna hromatografija (eng. <i>Frontal Affinity Chromatography</i> )
FI	jonizacija polja (eng. <i>Field Ionization</i> )
FID	plameno-jonizacioni detektor (eng. <i>Flame Ionization Detector</i> )
FPD	plameno-fotometrijski detektor (eng. <i>Flame Photometric Detector</i> )
GC	gasna hromatografija (eng. <i>Gas Chromatography</i> )

GC–MS	Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (eng. <i>Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i> )
GFC	gel-filtraciona hromatografija (eng. <i>Gel-Filtration Chromatography</i> )
GLC	gasno-tečna hromatografija (eng. <i>Gas-Liquid Chromatography</i> )
GPC	gel-propusna hromatografija (eng. <i>Gel-Permeation Chromatography</i> )
GSC	gasno-čvrsta hromatografija (eng. <i>Gas-Solid Chromatography</i> )
HPAC	AC visoke efikasnosti (eng. <i>High Performance Affinity Chromatography</i> )
HPIAC	IAC visokih performansi (eng. <i>High Performance Immunoaffinity Chromatography</i> )
HPIC	jonoizmenjivačka hromatografija (eng. <i>High Performance Ion Chromatography</i> )
HPICE	jon-ekskluziona hromatografija (eng. <i>High Performance Ion Chromatography Exclusion</i> )
HPLAC	tečna AC visoke efikasnosti (eng. <i>High Performance Liquid Affinity Chromatography</i> )
HPLC	tečna hromatografija visoke efikasnosti (eng. <i>High Pressure Liquid Chromatography</i> ili <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HPTLC	tankoslojna hromatografija visokih performansi (eng. <i>High Performance Thinlayer Chromatography</i> )
IAC	imunoafinitetna hromatografija (eng. <i>Immunoaffinity Chromatography</i> )
IC	jonska hromatografija (eng. <i>Ion Chromatography</i> )
IEC	jonoizmenjivačka hromatografija (eng. <i>Ion-Exchange Chromatography</i> )
IMAC	metal-jon imobilisana afinitetna hromatografija (eng. <i>Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography</i> )
IPC	hromatografijom sa građenjem jonskih parova (eng. <i>Ion-Pair Chromatography</i> )
IUPAC	Međunarodna unija za čistu i primenjenu hemiju (eng. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
LALS	rasejanja svetlosti pod malim uglom (eng. <i>Low Angle Light Scattering</i> )
LC	tečna hromatografija (eng. <i>Liquid Chromatography</i> )
LLC	tečno-tečna hromatografija (eng. <i>Liquid-Liquid Chromatography</i> )

LSC	tečno-čvrsta hromatografija (eng. <i>Liquid-Solid Chromatography</i> )
LSE	tečno-čvrsta ekstrakcija (eng. <i>Liquid Solid Extraction</i> )
MAGIC	eng. <i>Monodisperse Aerosol Generator for Chromatography</i>
MALDI	matriksom potpomognuta laserska desorpcija i jonizacija (eng. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization</i> )
MALS	višeugaono rasejanje svetlosti (eng. <i>Multi Angle Light Scattering</i> )
MCAC	metal-helatna afinitetna hromatografija (eng. <i>Metal-Chelate Affinity Chromatography</i> )
MIPs	polimeri sa imprintovanim molekulima (eng. <i>Molecularly Imprinted Polymers</i> )
MRM	praćenje višestruke fragmentacije (eng. <i>Multiple Reaction Monitoring</i> )
NI	negativna jonizacija (eng. <i>Negative Ionization</i> )
NPC	normalno-fazna hromatografija (eng. <i>Normal-Phase Chromatography</i> )
NPD	azot-fosforni detektor (eng. <i>Nitrogen Phosphorus Detector</i> )
PB	eng. <i>Particle Beam</i>
PC	papirna hromatografija (eng. <i>Paper Chromatography</i> )
PI	pozitivna jonizacija (eng. <i>Positive Ionization</i> )
PID	fotojonizacioni detektor (eng. <i>Photoionization Detector</i> )
QAC	kvantitativna afinitetna hromatografija (eng. <i>Quantitative Affinity Chromatography</i> )
QIT	kvadrupolni analizator na principu jonske zamke (eng. <i>Quadrupole Ion Trap</i> )
QMF	kvadrupolni maseni filter (eng. <i>Quadrupole Mass Filter</i> )
RPC	reverzno-fazna hromatografija (eng. <i>Reversed-Phase Chromatography</i> )
SEC	hromatografija sa izdvajanjem po veličini molekula (eng. <i>Size-Exclusion Chromatography</i> )
SELEX	sistematska evolucija liganada eksponencijalnim obogaćivanjem (eng. <i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i> )
SFC	superkrična fluidna hromatografija (eng. <i>Supercritical Fluid Chromatography</i> )
SIM	praćenje odabranog jona (eng. <i>Selected Ion Monitoring</i> )
SPE	ekstrakcija u čvrstoj fazi (eng. <i>Solid Phase Extraction</i> )
SPME	Mikroekstrakciju u čvrstoj fazi (eng. <i>Solid Phase Microextraction</i> )

SRM	praćenje izabranog fragmenta (eng. <i>Selected Reaction Monitoring</i> )
TCD	detektor termičke provodljivosti (eng. <i>Thermal Conductivity Detector</i> )
TIC	ukupne jonske struje (eng. <i>Total Ion Current</i> )
TLC	tankoslojna hromatografija (eng. <i>Thin-Layer Chromatography</i> )
TOF	analizator sa vremenom preleta (eng. <i>Time-Of-Flight</i> )
TSP	termosprej (eng. <i>ThermoSPray</i> )
UHPSFC	SFC ultra visoke efikasnosti (eng. <i>Ultra High Performance Supercritical Fluid Chromatography</i> )



---

# 1. UVOD I PREGLED

---

- 1.1. Uvod
  - 1.2. Istorijski aspekt
  - 1.3. Osnovi hromatografskog razdvajanja
  - 1.4. Podela hromatografije
    - 1.4.1. Fizičko stanje mobilne i stacionarne faze
    - 1.4.2. Oblik hromatografske podloge
    - 1.4.3. Tehnika rada
    - 1.4.4. Mehanizam razdvajanja
  - 1.5. Primena hromatografskih metoda
    - 1.5.1. Kvalitativna analiza
    - 1.5.2. Kvantitativna analiza
    - 1.5.3. Preparativna analiza
- LITERATURA
-

## 1.1. UVOD

Hromatografija je razvijena od strane ruskog botaničara M.S. Cvet-a kao tehnika za razdvajanje obojenih biljnih pigmenata. Definicija je generalizovana od strane specijalnog komiteta Međunarodne unije za čistu i primenjenu hemiju (eng. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) na osnovu koje je hromatografija metoda koja se prvenstveno koristi za razdvajanje komponenata uzorka, pri čemu su komponente raspoređene između dve faze, stacionarne (nepokretne) i mobilne (pokretne). Stacionarna faza može biti čvrsta, tečna naneta na čvrst nosač ili u vidu gela. Može biti pakovana u koloni ili naneta kao tanak sloj ili film na odgovarajući nosač. Mobilna faza može biti gas ili tečnost. Ovakva definicija zanemaruje mogućnost korišćenja superkritičnog fluida kao mobilne faze. Prema Cvet-u pojam hromatografija potiče od grčkih reči *chroma* – boja i *grafein* – pisati. Cvet je takođe istakao da bezbojne supstance mogu da se razdvajaju na isti način. Uopšteno, hromatografija je „univerzalna” i široko rasprostranjena tehnika. Podjednako se može primenjivati u svim oblastima hemije i biohemije, biologije, kontrole kvaliteta, za različita istraživanja, analize, razdvajanja, u preparativne svrhe, za fizičko-hemijska merenja, kao i u analizi uzoraka životne sredine. Može se podjednako uspešno primeniti na makro i mikro nivou.

Važnost hromatografije u nauci se može ilustrovati na mnogobrojne načine. Jedan od njih je broj publikacija povezan sa hromatografijom u odnosu na ukupan broj publikacija iz oblasti nauke. Nadalje, dve Nobelove nagrade iz oblasti hemije su dodeljene za postignuća u oblasti hromatografije (Švedaninu A. Tiselius-u 1948. godine i Britancima A.J.P. Martin-u i R.L.M. Synge-u 1952. godine). Takođe, hromatografija ima veoma važnu ulogu u istraživanjima koja su dovela do dodeljivanja još dvanaest Nobelovih nagrada između 1937. i 1972. godine.

## 1.2. ISTORIJSKI ASPEKT

Mnogi prirodni procesi, kao što je kretanje podzemnih voda kroz glinu i sediment, mogu da se opišu kao hromatografski procesi. U različitim spisima dat je opis procedura u okviru kojih se nesumnjivo ističe upotreba hromatografije. Jedan takav slučaj, opisan od strane Aristotela, je prevođenje slane i gorke vode u pitku vodu, pomoću gline. Principi hromatografije koji su zastupljeni i u današnjoj praksi su 1903. godine prvi put izneti od strane M.S. Cvet-a (slika 1.1) na sastanku Biološke sekcije varšavskog društva za prirodne nauke. Ovo predstavlja prvi izveštaj Cvet-ovog sistematskog istraživanja hromatografskog razdvajanja biljnih pigmenata. Ubrzo nakon toga postignuti rezultati istraživanja naišli su na osporavanje od strane Cvet-ovih savremenika. Cvet-ovo istraživanje iz oblasti hromatografije je završeno 1912. godine i tada je nastupio dvadesetogodišnji period mirovanja tokom kog je nekoliko istraživača koristilo pomenutu tehniku. Interesovanje za prirodne supstance i potreba za njihovim razdvajanjem i prečišćavanjem doprineli su da hromatografija kao tehnika bude prihvaćena. Edgar Lederer je u detaljnom pregledu literature pronašao citat Cvet-ovog rada i odlučio je da zajedno sa Richard Kuhn-om primeni hromatografiju u istraživanju o karotenoidima. Rad je objavljen u seriji radova 1931. godine i „nova” tehnika je uskoro prihvaćena kao standardna laboratorijska procedura. Značajan razvoj je postignut 1937. godine kada su Schwab i Jockers sa Univerziteta u Minhenu prilagodili tehniku za analizu neorganskih jona.



**Slika 1.1.** Ruski botaničar M.S. Cvet<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> 14. maj 1872. – 26. jun 1919. godine

Nastavljeno je sa korišćenjem hromatografije i njenim razvojem, pri čemu su uvedene određene izmene. U proceduri koja je primenjivana pre 1935. godine, kolona je pakovana odgovarajućim adsorbensom (kalcijum-karbonat, aluminijum itd.) i uzorak se dodavao na vrh kolone. Komponente su razdvajane pogodnim rastvaračem (tzv. mobilnom fazom ili eluentom). Proces se zaustavljao pre nego što se pojavi prva komponenta sa dna kolone (eluat), pakovanje kolone se polako uklanjalo u etapama i „čisto” jedinjenje se dobijalo ekstrakcijom. Nakon toga prihvaćena je metoda ispiranja ili eluiranja komponentata izvan kolone kontinualnim dodavanjem mobilne faze. Važno dostignuće je bilo razvoj procedure za kontinualno praćenje eluata koji napušta kolonu, merenjem indeksa refrakcije. Radi bržeg razdvajanja, kao i lakše detekcije i prinosa uzorka razvijena je hromatografija sa otvorenom kolonom.

Jonoizmenjivačka hromatografija (eng. *Ion-Exchange Chromatography*, IEC) je razvijena takođe krajem 1930-ih kada su Taylor i Urey razdvojili litijumove i kalijumove izotope na zeolitu. Martin i Synge su 1941. godine razvili podeonu hromatografiju u kojoj je stacionarna faza bila tečnost (npr. voda) naneta na čvrst nosač (silika-gel). Podeona hromatografija je posebno dobila na značaju sa pojavom papirne hromatografije (eng. *Paper Chromatography*, PC) koja je razvijena za analizu organskih jedinjenja, ali je vrlo brzo proširena na primenu u neorganskoj hemiji.

Razvoj reverzno-fazne hromatografije (eng. *Reversed-Phase Chromatography*, RPC) i gradijentnog eluiranja predstavlja uvod u modernu kolonsku hromatografiju. U slučaju RPC mobilna faza je polarnija od stacionarne, s tim da kod gradijentnog eluiranja polarnost mobilne faze varira tokom analize.

Naredni značajan korak je razvoj gasne hromatografije 1952. godine od strane James-a i Martin-a koji su opisali razdvajanje amina i karboksilnih kiselina uz korišćenje gasovite mobilne faze. Primena nove tehnike, gasno-tečne hromatografije (eng. *Gas-Liquid Chromatography*, GLC), je postala veoma značajna i zasenila je postojeće hromatografske tehnike. Najznačajniji korak u prihvatanju gasno-tečne hromatografije bio je pronalazak plameno-jonizacionog detektora 1958. godine od strane McWilliam-a i Dewar-a u Australiji i Harley-a *et al.* u Južnoj Africi.

Pomenuti detektor je obezbedio skoro univerzalan sistem za detekciju rastvorljivih organskih supstanci čime se povećala osetljivost gasno-tečne hromatografije za nekoliko redova veličine, a time je omogućeno određivanje manje količine uzorka i upotreba efikasnije kolone.

Nakon toga je uvedena kapilarna kolona od strane Golay-a, hromatografija sa izdvajanjem po veličini molekula (eng. *Size-Exclusion Chromatography*, SEC) i afinitetna hromatografija (eng. *Affinity Chromatography*, AC).

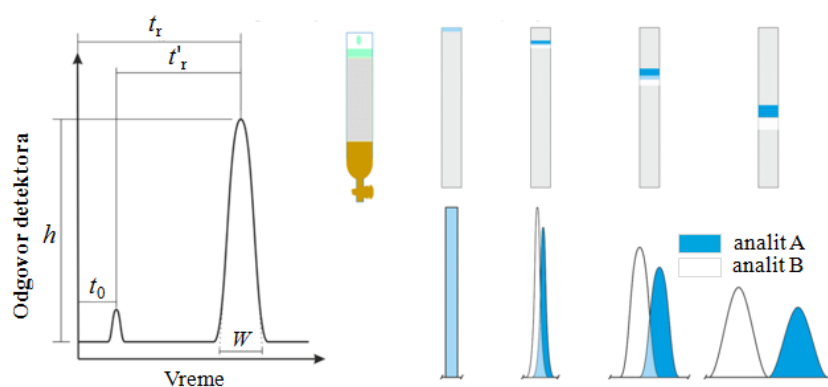
### 1.3. OSNOVI HROMATOGRAFSKOG RAZDVAJANJA

Kao što je pomenuto, u hromatografiji se komponente smeše razdvajaju zahvaljujući raspodeli između dve faze, od kojih je jedna stacionarna (čvrsta ili tečna), a druga mobilna (tečna, gasovita ili superkritični fluid). Na slici 1.2 je prikazan primer dvokomponentne smeše koja se u vremenu  $t_0$  uvodi u mobilnu fazu, koja je u kontaktu sa stacionarnom fazom. Konstantno proticanje mobilne faze je potrebno za transport komponenata uzorka kroz stacionarnu fazu. S obzirom na to da je supstanca koja se analizira (analit) u kontaktu sa stacionarnom fazom, raspoređuje se između dve faze u zavisnosti od afiniteta, što zavisi od molekulske strukture i međumolekulskih sila. U navedenom slučaju analit A ima veći afinitet prema stacionarnoj fazi u odnosu na analit B i zbog toga više vremena provodi u stacionarnoj fazi. U slučaju kada je analit prisutan u mobilnoj fazi, proći će kroz sistem istom brzinom kao i mobilna faza, ali kada je u stacionarnoj fazi tada je brzina jednaka nuli. Dakle, analiti sa većim afinitetom prema stacionarnoj fazi sporije se kreću kroz sistem, dok se analiti sa manjim afinitetom kreću znatno brže. Pomenuta razlika u brzini kretanja analita rezultuje razdvajanjem komponenata i napuštanjem kolone redosledom kako se kreću kroz sistem (slika 1.2) u vremenu  $t_1$  i  $t_2$ .

Iako je sistem dinamičan, poželjno je da funkcioniše pri približno ravnotežnim uslovima, što se postiže optimizacijom brzine kretanja mobilne faze i dizajniranjem stacionarne faze, kako bi što brže došlo do uspostavljanja ravnoteže, tj. brzina potrebna za raspodelu molekula rastvorenih supstanci između faza mora biti manja u poređenju sa brzinom kretanja mobilne faze. Pri navedenim uslovima sistem može da se opiše

termodinamičkim podelnim koeficijentom ili koeficijentom raspodele,  $K_D$ , koji se obično izražava kao odnos koncentracije analita u stacionarnoj fazi,  $c_s$  i u mobilnoj fazi,  $c_m$  (jednačina 1.1).

$$K_D = \frac{c_s}{c_m} \quad (1.1)$$



**Slika 1.2.** Šematski prikaz hromatografskog procesa razdvajanja dva analita

U slučaju SEC koeficijent raspodele molekula u porama različitih veličina definiše se prema jednačini 1.2:

$$K = \frac{V_u}{V_{i0}} \quad (1.2)$$

gde je  $V_u$  ukupna zapremina mobilne faze, a  $V_{i0}$  zapremina pora dostupna datoj ( $i$ -toj) vrsti makromolekula.

$V_r$  (zapremina eluiranja komponente) se može izraziti prema jednačini 1.3:

$$V_r = V_0 + KV_{i0} \quad (1.3)$$

gde  $V_0$  predstavlja zapreminu mobilne faze (mrtvu zapreminu, eng. *dead volume*).

Vrednost  $K$  može biti u opsegu:  $0 \leq K \leq 1$ , pri čemu najvećim molekulima odgovara  $K = 0$  (iz gornje jednačine sledi da je  $V_r$  tada jednako  $V_0$ ), a najmanjim molekulima  $K = 1$  (tada je  $V_r = V_0 + V_{i0}$ ).

Retenciono vreme nekog jedinjenja zavisi od njegovih fizičko-hemijskih osobina i uslova hromatografskog razdvajanja i ukoliko su uslovi identični, predstavlja karakterističnu veličinu za neko jedinjenje. Kako retenciono vreme zavisi od velikog broja spoljašnjih faktora, koje je teško kontrolisati, koriste se sledeći pojmovi: 1) retenciono (nekorigovano) vreme ( $t_r$ ) koje protekne od unošenja uzorka u kolonu do pojave maksimuma pika određenog jedinjenja, 2) korigovano (redukovano) retenciono vreme ( $t'_r$ ) koje ispitivana supstanca provede u stacionarnoj fazi i 3) retenciono vreme mobilne faze (mrtvo vreme,  $t_0$ , eng. *dead time*) koje supstanca provede u mobilnoj fazi. Navedene veličine predstavljene su izrazom 1.4:

$$t'_r = t_r - t_0 \quad (1.4)$$

Od retencionih parametara koristi se i retenciona zapremina ( $V_r$ ), koja predstavlja zapreminu mobilne faze koja je potrebna da se data komponenta eluira sa kolone i data je izrazom 1.5:

$$V_r = t_r v \quad (1.5)$$

gde je  $v$  protok mobilne faze (mL/s).

Redukovana retenciona zapremina se dobija pomoću izraza 1.6:

$$V'_r = V_r - V_0 \quad (1.6)$$

Jedan od osnovnih retencionih parametara je retencioni faktor kolone ( $k$ ) koji predstavlja sposobnost kolone da zadrži određenu komponentu (ukoliko je vrednost  $k$  manja, supstanca brže napušta kolonu), tj. predstavlja odnos retencionog vremena jedinjenja u stacionarnoj i mobilnoj fazi i u slučaju jedinjenja B dat je jednačinom 1.7:

$$k_B = \frac{t_{r,B} - t_0}{t_0} = \frac{t'_{r,B}}{t_0} \quad (1.7)$$

Retencioni faktor je direktno povezan sa konstantom ravnoteže kroz odnos mase stacionarne faze ( $w$ ) i zapremine mobilne faze ( $V_0$ ) (jednačina 1.8):

$$k = K_D \frac{w}{V_0} \quad (1.8)$$

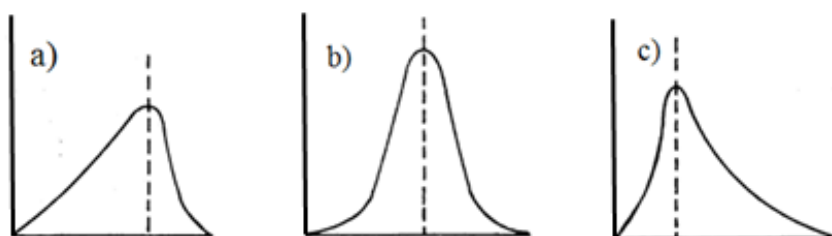
Koeficijent raspodele je tipična fizička karakteristika analita koja zavisi od njegove strukture, prirode obe faze i temperature. Razdvajanje dve komponente u odabranom hromatografskom sistemu zahteva različite koeficijente raspodele, odnosno dve komponente sa istim koeficijentom raspodele se ne razdvajaju. U ovom slučaju razdvajanje može da se poboljša promenom mobilne faze, stacionarne faze ili temperature sistema. U praksi je često teško predvideti efekat promene mobilne ili stacionarne faze. U gasnoj hromatografiji, mobilna faza je inertna, stoga samo stacionarna faza i temperatura mogu da se menjaju, dok je u slučaju tečne i superkritične fluidne hromatografije moguće menjati sve tri veličine, jer je mobilna faza interaktivna.

U idealnom slučaju hromatografsko razdvajanje bi se odvijalo tako da se u svim segmentima hromatografskog sistema momentalno uspostavlja ravnoteža, odnosno raspodela komponenata između mobilne i stacionarne faze. U tom slučaju bi pikovi imali oblik pravougaonika bez tendencije za širenjem (slika 1.2).

U praksi se hromatografsko razdvajanje izvodi u realnim uslovima, odnosno idealna ravnoteža se narušava dejstvom kinetičkih i difuzionih faktora. Svi molekuli jedne komponente se ne kreću istom brzinom kroz hromatografsku kolonu, već se jedni kreću brže, a drugi sporije. Brzina kretanja molekula uz zid kolone je približno jednaka nuli, dok je brzina kretanja u centru kolone maksimalna. Zbog različite brzine kretanja molekula iste komponente kroz kolonu, molekuli u različito vreme dospevaju u detektor, tako da se dobija signal koji, u idealnom slučaju,



izgleda kao Gausova kriva raspodele. Realni pikovi su vrlo često asimetrični (imaju prednji ili zadnji rep) i ne izgledaju kao Gausova kriva (slika 1.3b). Pik prikazan na slici 1.3a ima prednji rep koji nastaje zbog prezasićenosti kolone. Kolona ne može da zadrži svu količinu analita i višak se eluira prerano uzrokujući pojavu pika čija je leva strana iskošena. Pik prikazan na slici 1.3c ima zadnji rep uzrokovan time što se analit predugo zadržava kada u koloni postoje aktivna mesta. Ovo se može dogoditi u slučaju kolone sa tankom stacionarnom fazom.



**Slika 1.3.** Idealan Gausov pik (b) i razvučeni pikovi (a i c)

Da bi se ovaj nedostatak izbegao ili sveo na najmanju moguću meru, proizvođači utvrđuju kapacitet kolone koji je izražen u ng/jedinjenju i koji omogućava procenu optimalne količine supstance za analizu.

Dve teorije opisuju realnu hromatografiju:

1. Teorija ekvivalentnih teorijskih podova po Martin-u i Synge-u i
2. Teorija brzina po van Deemter-u.

1. Teorijski pod (ili plato) je zamišljeni deo kolone u kome je uspostavljena ravnotežna raspodela komponente između stacionarne i mobilne faze. Teorija ekvivalentnih teorijskih podova podrazumeva da se kolona sastoji od serije podova (slika 1.4). Raspodela komponente između mobilne i stacionarne faze se javlja na svakom podu. Što je veći broj podova supstance se bolje razdvajaju. Broj teorijskih podova ( $N$ ) predstavlja kvantitativnu meru efikasnosti kolone i predstavljen je izrazom 1.9:

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{W} \right)^2 \quad (1.9)$$

gde  $W$  predstavlja širinu osnove pika na baznoj liniji.



**Slika 1.4.** Ravnotežna raspodela komponente između stacionarne i mobilne faze

Vrednost  $N$  proporcionalna je dužini kolone ( $L$ ) (jednačina 1.10), tj. ukoliko je dužina kolone veća, bolje je razdvajanje. Pored toga, troškovi, otpor koji kolona pruža i vreme trajanja analize takođe su direktno proporcionalni dužini kolone.

$$H = \frac{L}{N} \quad (1.10)$$

gde  $H$  predstavlja visinu ekvivalentnu jednom teorijskom podu (eng. *Height Equivalent to a Theoretical Plate* – HETP).

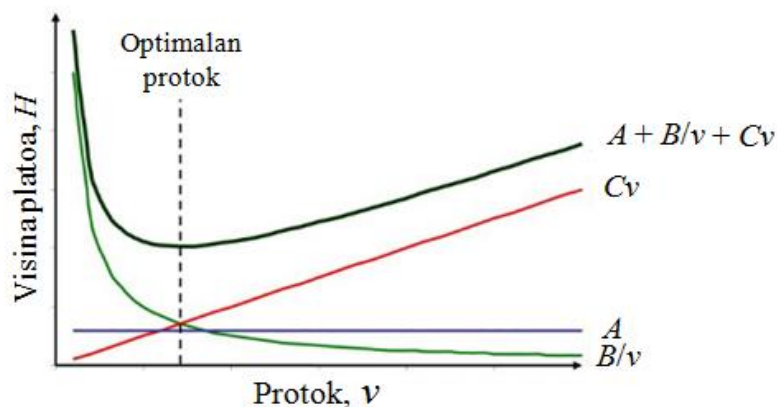
2. Teoriju brzina je razvio van Deemter, pri čemu visina ekvivalentna jednom teorijskom podu zavisi od brzine kretanja mobilne faze ( $v$ ), odnosno načina prenosa mase tokom hromatografskog razdvajanja (jednačina 1.11; slika 1.5).

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv \quad (1.11)$$

gde je  $A$  koeficijent turbulentne difuzije,  $B$  koeficijent longitudinalne difuzije i  $C$  je koeficijent prenosa mase između faza.

Međutim, koncept teorijskih podova ne uzima u obzir da prilikom hromatografskog razdvajanja dolazi do dinamičkog procesa prenosa mase. Nakon injektovanja uzorak ulazi u kolonu u vidu uske zone molekula nakon čega dolazi do širenja zone usled različitih interakcija komponenata sa stacionarnom fazom. Tri osnovna faktora koja dovode do širenja hromatografskih zona u koloni su: turbulentna difuzija, longitudinalna difuzija i uspostavljanje ravnoteže.

Prvi faktor van Deemter-ove jednačine ne zavisi od brzine kretanja mobilne faze, tj. protoka i pomoću ove veličine se definiše uticaj turbulentne difuzije na visinu ekvivalentnu teorijskom podu. *Turbulentna difuzija* je posledica različitih dužina putanja kojima molekul može da prođe kroz kolonu. U jednoj hromatografskoj koloni postoji bezbroj putanja kojima molekul može da prođe i oni su različite dužine. Zbog toga je nekim molekulima potrebno duže, a nekim kraće vreme da dođu do kraja kolone, pa se hromatografska zona širi. Drugi faktor van Deemter-ove jednačine odnosi se na *longitudinalnu difuziju* koja predstavlja difuziju rastvorene supstance u stacionarnu fazu i na taj način dolazi do širenja zone. Longitudinalna difuzija je obrnuto proporcionalna brzini kretanja mobilne faze. Treći faktor je *uspostavljanje ravnoteže* prilikom prelaska molekula iz jedne u drugu fazu i u najvećoj meri utiče na visinu ekvivalenta teorijskom podu i to pri većim protocima mobilne faze.



**Slika 1.5.** Zavisnost parcijalnih i ukupne funkcije visine ekvivalenta teorijskom podu od brzine kretanja mobilne faze

Uopšteno, van Deemter-ova jednačina se koristi za optimizaciju uslova hromatografskog razdvajanja, odnosno za utvrđivanje optimalnog protoka.

Prvi izvod jednačine 1.11 predstavljen je izrazom 1.12:

$$\frac{dH}{dv} = -\frac{B}{v^2} + C \quad (1.12)$$

Kako je  $v_{\text{opt}}$  pri  $H_{\text{min}}$ , odnosno kada je  $dH/dv = 0$ , tada je:

$$v_{\text{opt}} = \sqrt{\frac{B}{C}} \quad (1.13)$$

Međutim, imajući u vidu da se pomenuti proces optimizacije primenjuje u slučaju analize jedne supstance, ovakav način optimizacije se ne može primeniti u slučaju razdvajanja komponenata prisutnih u složenoj smeši, odnosno u realnom uzorku.

Pomoću proširene van Deemter-ove jednačine izražene su različite mogućnosti doprinosa kolone širenju pika u SEC (jednačina 1.14):

$$H = A + \frac{B}{v} + C_M v + C_{SM} v + C_S v \quad (1.14)$$

gde je  $C_M$  koeficijent prenosa mase između faza,  $C_{SM}$  je koeficijent stacionarnog prenosa masa i  $C_S$  je koeficijent adsorpciono-desorpcionog procesa tradicionalne tečne hromatografije.

Širenje pika proizilazi iz difuzionih procesa unutar hromatografske kolone, ali i kao posledica disperzije do koje može doći na više mesta izvan kolone, a koja uključuju injektor za uzorke, ćeliju detektora, ventile na kraju kolone, konektore itd. Izmerena ukupna širina pika,  $W_t$ , je funkcija kinetičke, van Deemter-ove vrste kolonskog procesa, označenog kao  $W_c$ , sa doprinosom  $W_i$  od injekcione zapremine uzorka i dodatnih doprinosa  $W_d$ ,  $W_j$ , i  $W_x$  koji potiču od detektora, ventila i povezivanja cevi u sistemu. Odnos ovih izraza može se prikazati jednačinom 1.15:

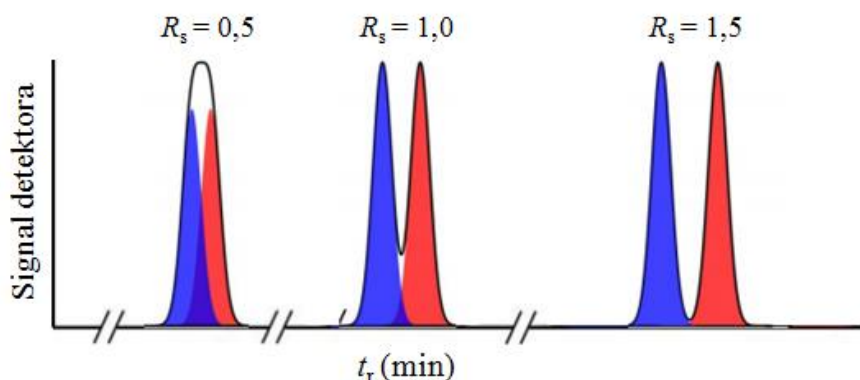
$$W_t^2 = W_c^2 + W_i^2 + W_d^2 + W_j^2 + W_x^2 \quad (1.15)$$

$W_c$  se može smanjiti određivanjem optimalne brzine protoka na kojoj bi visina platoa bila minimalna i čime se povećava broj platoa i optimizuje efikasnost kolone.

Efikasnost razdvajanja pikova na hromatogramu, koji predstavlja zavisnost jačine signala detektora od  $t_r$ , definisana je rezolucijom ( $R_s$ ) (jednačina 1.16), pa se prilikom razdvajanja komponenata smeše, odnosno pri optimizaciji eksperimentalnih uslova razdvajanja mogu javiti tri slučaja: 1)  $R_s = 1,5$  (postupak optimizacije je završen, slika 1.6); 2)  $R_s < 1,5$  (razdvajanje nije zadovoljavajuće, moguće je izvoditi kvalitativnu, ali ne i kvantitativnu analizu, slika 1.6) i 3)  $R_s \gg 1,5$  (komponente su dobro razdvojene ali je analiza spora, tako da se na neki način mora ubrzati, najčešće upotrebom kraće kolone ili povećanjem protoka).

$$R_s = \frac{2\Delta t}{W_A + W_B} \quad (1.16)$$

gde su  $\Delta t$  – razlika u retencionim vremenima komponenata B i A ( $t_{r,B} - t_{r,A}$ ),  $W_A$  – širina pika komponente A,  $W_B$  – širina pika komponente B.



**Slika 1.6.** Efikasnost razdvajanja pikova u zavisnosti od rezolucije

Rezolucija zavisi od efikasnosti kolone (broja teorijskih podova), selektivnosti i kapaciteta kolone i data je izrazom 1.17:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_B}{1 + k_B} \right) \quad (1.17)$$

Kvantitativni opis rezolucije u SEC nadovezuje se na jednačinu 1.16 i na zavisnost razdvajanja pikova  $\Delta V_r$  od molekulske mase, a koji se može dobiti konstruisanjem kalibracione krive (o čemu će biti reči u odeljku 6.3). Za dva molekula, 1 i 2, iste vrste polimera, a koji se međusobno razlikuju po molekularnoj masi  $M_2/M_1$ , rezolucija se može predstaviti jednačinom 1.18:

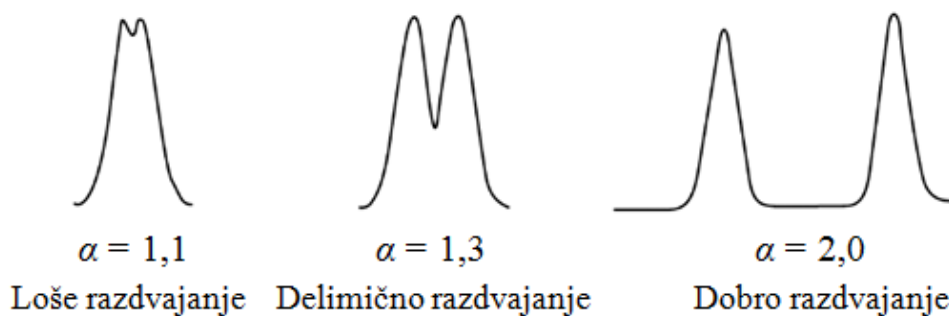
$$R_s = \frac{\ln(M_2/M_1)}{2D_2(\sigma_1 + \sigma_2)} \approx \frac{\Delta \ln M}{4D_2\sigma} \quad (1.18)$$

gde je  $\sigma$  standardna devijacija pika i  $D_2$  je nagib kalibracione krive. U okviru SEC manje je značajna rezolucija između određenog para analita od rezolucije ukupne krive eluiranja. U tom smislu, razvijen je izraz za specifičnu rezoluciju  $R_{sp}$ , koja eliminiše zavisnost  $R_s$  od  $M$  (jednačina 1.19):

$$R_{sp} = \frac{R_s}{\Delta \log M} = \frac{0,58}{D_2 \sigma} \quad (1.19)$$

Selektivnost je sposobnost hromatografskog sistema da napravi razliku između dve komponente na osnovu njihove različite raspodele između mobilne i stacionarne faze. Mera selektivnosti je faktor selektivnosti ( $\alpha$ ) koji predstavlja stepen razdvojenosti dve komponente i smatra se da je za  $\alpha \gg 1$  postignuto zadovoljavajuće razdvajanje ispitivanih komponenti. Što je vrednost  $\alpha$  veća, komponente su bolje razdvojene (slika 1.7). Vrednost  $\alpha$  se izračunava na osnovu jednačine 1.20:

$$\alpha = \frac{t'_{r,B}}{t'_{r,A}} = \frac{k_B}{k_A} \quad (1.20)$$



**Slika 1.7.** Uticaj faktora selektivnosti na razdvajanje pikova

#### 1.4. PODELA HROMATOGRAFIJE

Podela pojednostavljuje i olakšava bavljenje hromatografijom. Hromatografsko razdvajanje se može klasifikovati na mnogobrojne načine, u zavisnosti od potrebe, što dovodi do mnoštva preklapanja u podeli hromatografskih sistema. Bilo koji od faktora (stacionarna ili mobilna faza, mehanizam razdvajanja ili čak vrsta rastvorljive supstance), može poslužiti kao osnova za podelu.

### 1.4.1. Fizičko stanje mobilne i stacionarne faze

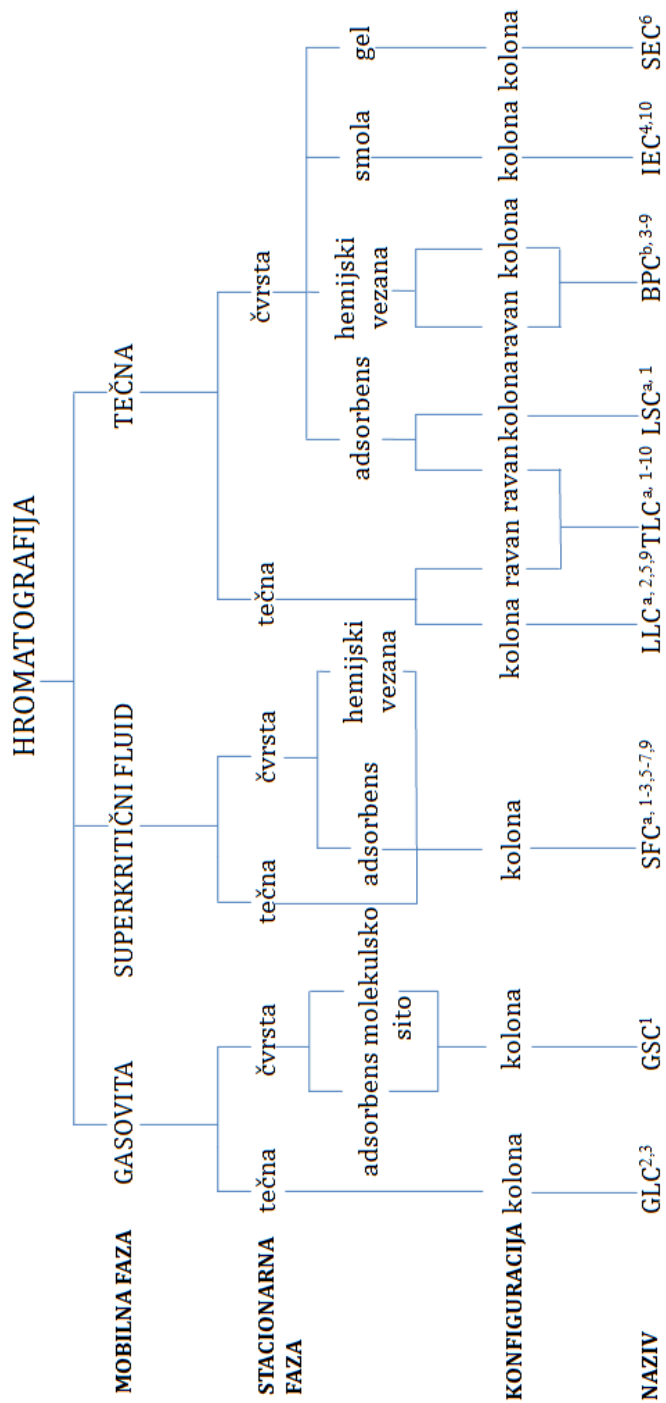
Jedan od načina klasifikacije zasniva se na agregatnom stanju mobilne faze i prema ovom načinu hromatografija se deli na tečnu hromatografiju (eng. *Liquid Chromatography*, LC), gasnu hromatografiju (eng. *Gas Chromatography*, GC) i superkritičnu fluidnu hromatografiju (eng. *Supercritical Fluid Chromatography*, SFC) (slika 1.8), u zavisnosti od toga da li je mobilna faza tečna, gasovita ili superkritični fluid. Dalja podela je definisana agregatnim stanjem mobilne i stacionarne faze, na tečno-tečnu (eng. *Liquid-Liquid Chromatography*, LLC), tečno-čvrstu (eng. *Liquid-Solid Chromatography*, LSC), GLC, gasno-čvrstu (eng. *Gas-Solid Chromatography*, GSC), pri čemu je mobilna faza tečna ili gasovita, a stacionarna faza tečna ili čvrsta (slika 1.8). Superkritični fluid se takođe primenjuje kao mobilna faza i ova tehnika je nazvana superkritična fluidna hromatografija, nezavisno od stanja stacionarne faze (slika 1.8).

### 1.4.2. Oblik hromatografske podloge

Tehnika se odnosi na uređaj i proceduru rada na instrumentu na kom se izvodi hromatografski proces. Postoje dva opšta oblika, planarna i kolonska hromatografija, koji obuhvataju veliki broj tehnika.

***Planarna i kolonska hromatografija.*** Dve tehnike u kojima je stacionarna faza naneta na planarnu površinu su papirna i tankoslojna hromatografija (eng. *Thin-Layer Chromatography*, TLC). U slučaju PC hartija čini stacionarnu fazu, dok kod *tankoslojne* hromatografije stacionarna faza sadrži tanak čvrst sloj najčešće nanet na staklo, plastiku ili aluminijum. Ukoliko je stacionarna faza tečnost potrebno je da bude imobilisana na tankom sloju ili u koloni, a to se postiže premazivanjem ili hemijskim vezivanjem tečne stacionarne faze za inertan čvrst nosač, koji se zatim pakuje u kolonu ili se nanosi u tankom sloju preko ravne ploče.





<sup>a</sup>Hromatografija sa normalnim/obrnutim fazama. Mehanizmi: <sup>1</sup>adsorpcija, <sup>2</sup>raspodela, <sup>3</sup>hemijsko vezivanje, <sup>4</sup>jonska izmena, <sup>5</sup>jonska interakcija, <sup>6</sup>veličina molekula, <sup>7</sup>afinitet, <sup>8</sup>građenje micela, <sup>9</sup>helacija i <sup>10</sup>jon ekskluzija.  
<sup>b</sup>(eng. *Bonded Phase Chromatography*; BPC)

**Slika 1.8.** Podela hromatografskih sistema

Planarna hromatografija je ograničena na tečnu hromatografiju jer postoje tehničke poteškoće zbog vezivanja gasa ili superkritičnog fluida za ravnu površinu. Nasuprot tome, *kolonska* hromatografija se koristi u tečnoj, gasnoj i superkritičnoj fluidnoj hromatografiji. U slučaju tečne hromatografije, postoje dva oblika koja se zbog hronološkog razvoja nazivaju klasična kolonska i moderna (visoke efikasnosti) kolonska hromatografija (eng. *High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC). Razdvajanje komponenata smeše u kolonskoj hromatografiji se izvodi između mobilne tečne ili gasovite faze i stacionarne faze koja je smeštena u kolonu. Krajnji cilj razdvajanja je dobijanje odvojenih čistih supstanci iz početne smeše.

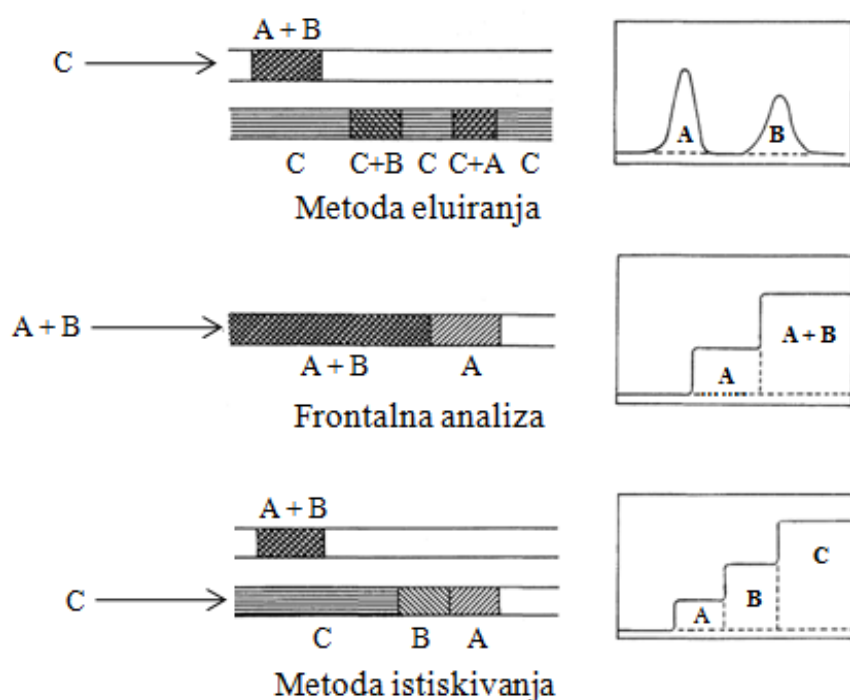
Klasifikacija u zavisnosti od kolone se izvodi prema prirodi i dimenzijama kolone. Konvencionalna kolonska procedura kod GC i LC, a u skorije vreme i kod SFC, podrazumeva upotrebu pakovanih kolona sa unutrašnjim prečnikom većim od 1,0 mm. Kod GC unutrašnji prečnik takvih kolona je od 2–4 mm, a u slučaju HPLC tehnike je 4,6 mm. Ovakve kolone sadrže stacionarnu fazu koja je ili čvrsta ili tečnost naneta ili vezana za inertan čvrst nosač.

Istorijski posmatrano, u periodu od 1967. do 1991. godine značajno je opao broj objavljenih naučnih radova koji se odnose na PC koja je postepeno zamenjena TCL. Period od 1967. do 1971. godine je posebno značajan jer je 1968. godine započeo snažan razvoj HPLC. SFC je u fazi razvoja, ali je prema broju objavljenih radova još uvek zastupljena u daleko manjem obimu u odnosu na celokupnu oblast hromatografije.

### **1.4.3. Tehnika rada**

Različite hromatografske tehnike kao što su GC, SFC, TLC, klasična kolonska hromatografija i HPLC mogu se izvoditi na tri načina: eluiranjem, istiskivanjem i metodom frontalne analize (slika 1.9). Najčešće se koristi metoda *eluiranja*, pri čemu se komponente nošene mobilnom fazom kreću kroz kolonu kao razdvojene zone. Manje popularna tehnika je *frontalna analiza* koja je korisna za dobijanje termodinamičkih podataka na osnovu hromatografskih merenja. U ovom slučaju uzorak se kontinualno propušta kroz kolonu. Kada se kolona zasiti određenom komponentom tada se ta

komponenta izdvaja sa kolone. Kada se zona čiste komponente u potpunosti eluira nakon toga izlazi smeša te komponente sa sledećom itd. Potpuno razdvajanje nije moguće i metoda ima ograničenje po pitanju primene u kvantitativnoj analizi. U slučaju jedinjenja visoke čistoće, može poslužiti za praćenje tragova nečistoća, pri čemu se nečistoća može koncentrisati ispred glavne komponente. *Istiskivanje* je tehnika koja je korisna u slučaju preparativne kolonske hromatografije. U ovom slučaju se na početak kolone nanosi uzorak koji se sastoji od komponenata i nakon toga se propušta mobilna faza koja se najjače vezuje za stacionarnu fazu. Mobilna faza potiskuje komponente smeše, koje obrazuju zone. Zbog stalnog dejstva mobilne faze, komponente smeše se ne mogu potpuno razdvojiti, već se zone međusobno dodiruju. Do izlaska iz kolone, sve tri zone se kreću istom brzinom, koja zavisi od brzine kretanja mobilne faze kroz kolonu.



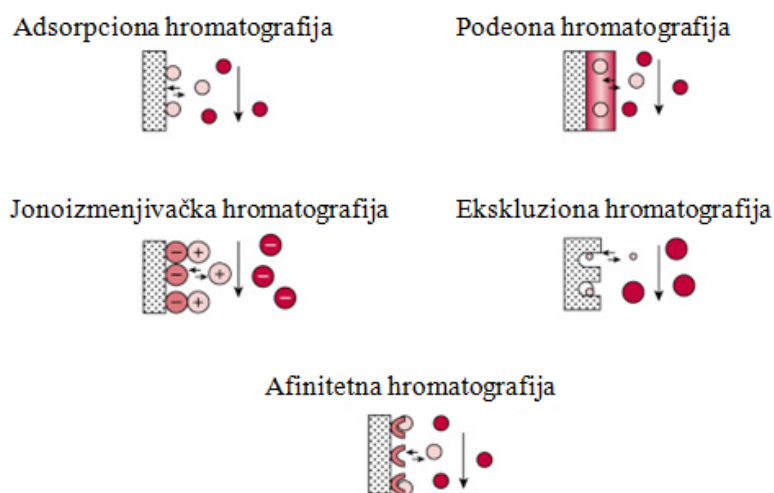
**Slika 1.9.** Šematski prikaz kretanja komponenata uzorka i zone razdvajanja pri različitim tehnikama rada. A i B - komponente uzorka; C - mobilna faza

#### 1.4.4. Mehanizam razdvajanja

Priroda interakcije između komponenata uzorka i dve faze utiče na dalji osnov za klasifikaciju, koji je ujedno i najpogodniji. Ove interakcije obuhvataju različite fizičko-hemijske procese koji se dešavaju u sistemu. Sile prisutne u ovim interakcijama su obično slabe intermolekulske sile kao što su van der Waals-ove sile ili vodonične veze. U nekim situacijama, jonske interakcije su izražene, dok su u retkim slučajevima prisutne specifične interakcije kao što su sile prenosa naelektrisanja. Na slici 1.10 prikazana je najosnovnija klasifikacija, dok u većini slučajeva nije lako utvrditi koji tip mehanizma je dominantan.

Mehanizmi na osnovu kojih se izvodi klasifikacija hromatografskih metoda su:

- Adsorpcija (adsorpciona hromatografija),
- Raspodela (podeona hromatografija),
- Jonska izmena (jonoizmenjivačka hromatografija),
- Veličina molekula (ekskluziona) i
- Afinitet (afinitetna hromatografija).



**Slika 1.10.** Podela hromatografskih razdvajanja prema mehanizmu razdvajanja

U slučaju *adsorpcione hromatografije* stacionarna faza je čvrsta (adsorbens), dok mobilna faza može biti tečna (LSC) ili gasovita (GSC). Ovaj vid hromatografije se izvodi kao kolonska i kao laminarna tehnika. Dominantan fenomen u razdvajanju je adsorpcija.

Adsorpcija nije fenomen koji je strogo specifičan za jednu supstancu ili skup supstanci. Čak i u najjednostavnijem slučaju, kada sistem sadrži samo jednu rastvorenu supstancu, adsorbens i rastvarač, adsorpcija se mora posmatrati u uslovima dinamičke ravnoteže uslovljene konkurencijom između sastavnih delova sistema.

Na adsorpciju, a time i na hromatografska razdvajanja uzrokovana fenomenom adsorpcije, veliki uticaj imaju priroda i karakteristike adsorbensa, svojstva supstance i rastvarača, kao i temperatura pri kojoj se hromatografska razdvajanja izvode.

Kao adsorbensi mogu da se koriste mnoge usitnjene supstance veoma različite po osobinama i hemijskoj prirodi. Prema jačini se dele na slabe, srednje jake i jake (tabela 1.1).

**Tabela 1.1.** Adsorbensi koji se koriste u adsorpcionoj hromatografiji

Slabi	Srednje jaki	Jaki
Saharoza	Kalcijum-karbonat	Magnezijum-silikat
Skrob	Kalcijum-fosfat	Aluminijum-oksidi
Inulin	Magnezijum-karbonat	Silika-gel
Talk	Magnezijum-oksidi	Aktivni ugalj
Natrijum-karbonat	Kalcijum-hidroksid	

Adsorpciona moć adsorbensa se može povećati na nekoliko načina. Jedna od mogućnosti je tzv. aktivacija adsorbensa koja podrazumeva uklanjanje vode koja može biti vezana za aktivne centre adsorbensa, čime se oslobađaju aktivni centri i time se povećava adsorpciona moć. Drugi način je usitnjavanje adsorbensa, jer se povećanjem površine po jedinici mase povećava i broj aktivnih centara. Pored dva prethodno opisana postupka, adsorpciona moć se može menjati i hemijskim modifikacijama. Kao polazni materijal se najčešće koristi silika-gel, čije se silanolne grupe vezuju pomoću hloro- ili alkoksi-derivata silana.

U *podeonoj tečnoj hromatografiji* supstance se razdvajaju između tečne mobilne faze i tečne stacionarne faze koja je naneta na inertni nosač ili na zidove kolone. Razdvajanja se izvode kolonskom i laminarnom tehnikom. U slučaju podeone hromatografije, normalno-fazna hromatografija (eng. *Normal-Phase Chromatography*, NPC) predstavlja slučaj u kojem je stacionarna faza polarna a mobilna faza je nepolarna. Pri razdvajanju nepolarnih supstanci, koje su mnogo bolje rastvorne u nepolarnoj mobilnoj fazi nego u stacionarnoj fazi, često se dešava da se neke supstance iz smeše kreću zajedno sa mobilnom fazom. Tada se kao nepokretna faza koristi nepolarni rastvarač, a kao mobilna faza polarni, što najčešće omogućava efikasno razdvajanje ovih supstanci. Ovaj slučaj se naziva RPC i znatno češće se primenjuje u tečnoj hromatografiji. Redosled eluiranja komponenata je obično obrnut od onog kod NPC. Inertni nosač ima zadatak da veže stacionarnu fazu i da svojom površinom učini dodirnu površinu stacionarne faze velikom.

Kao nosači polarnih stacionarnih faza najčešće se koriste inaktivirani silikatni materijali (silika-gel), materijali izrađeni na bazi dijatomejske zemlje i slabi adsorbensi kao što su celuloza, skrob, saharoza i inulin. Kao nosači nepolarnih stacionarnih faza koriste se različite plastične mase ili smole koji služe kao matriks izmenjivača jona.

U *jonoizmenjivačkoj hromatografiji* komponente se razdvajaju između mobilne tečne faze i čvrste stacionarne faze koju čini izmenjivač jona. Izmenjivač jona se najčešće definiše kao nerastvorni materijal koji sadrži labilno vezane jone koji se mogu reverzibilno i u ekvivalentnim količinama zamenjivati drugim jonima iz rastvora. Naelektrisanje izmenjivača jona je uravnoteženo sa naelektrisanjima labilno vezanih jona. Izmenjivači jona su prirodne ili sintetičke, neorganske ili organske supstance, koje se koriste za vezivanje, odnosno razdvajanje supstanci koje se mogu jonizovati. Izmenjivači jona mineralnog porekla se u analitici (hromatografiji) manje koriste, dok organski imaju veoma rasprostranjenu primenu.

*Ekskluziona hromatografija* je specifičan vid podeone hromatografije u kojoj se supstance razdvajaju po molekulskim veličinama

(masama) između tečne mobilne i stacionarne faze, pri čemu je stacionarna faza inkorporirana u specifični nosač koji se označava kao molekulska sito. U ovom vidu hromatografije se komponente raspodeljuju između iste faze od koje je jedan deo nepokretan, tj. zarobljen česticama molekulskog sita, dok je drugi deo mobilan i kreće se između čestica molekulskog sita. S obzirom na to da se raspodela supstanci odvija između mobilne i stacionarne faze istih karakteristika, očigledno je da razdvajanje mora biti zasnovano na osobinama molekulskog sita. Supstance iz smeše se razdvajaju prema veličini molekula tako što zajedno sa mobilnom fazom iz kolone izlaze svi molekuli čija je veličina veća od dimenzija pora, dok manji molekuli izlaze u frakcijama po opadajućoj veličini molekula. Ovaj vid hromatografske analize izvodi se isključivo kao kolonska tehnika.

U slučaju (*bio*)*afinitetne hromatografije* na matriks se kovalentnim vezama vezuje jedinjenje koje pokazuje veoma veliku specifičnost ka drugom jedinjenju koje treba izolovati iz smeše (npr. enzim prema supstratu, antitela prema proteinu itd.). Zbog veoma velike specifičnosti, za jedinjenje prethodno vezano za nosač vezuje se samo određena supstanca iz smeše. Istiskivanje sekundarno vezane supstance najčešće se izvodi dodatkom istog jedinjenja koje je prethodno vezano za nosač ili eluentima definisanog sastava, pH-vrednosti i jonske jačine. Zbog konkurencije ili promene osobina sekundarno vezana supstanca se eluira. Ovaj vid hromatografije se obično izvodi kolonskom tehnikom.

## **1.5. PRIMENA HROMATOGRFSKIH METODA**

Hromatografija se koristi za rešavanje velikog broja problema iz različitih oblasti istraživanja. Bez obzira na to, analitičar uvek rešava odgovore na pitanja: šta je prisutno, u kojoj količini ili kako se može izolovati čista supstanca iz smeše. Radi jednostavnosti, odgovori na ovo pitanje se daju odvojeno i odnose se na kvalitativnu, kvantitativnu i preparativnu hromatografiju.

### 1.5.1. Kvalitativna analiza

Hromatografija se veoma često koristi u cilju potvrde prisustva/odsustva jedinjenja u uzorku. To se postiže poređenjem hromatograma čiste supstance (standarda) sa nepoznatom, pri identičnim ekperimentalnim uslovima. Jedna od poteškoća što se tiče poređenja je da hromatogram nije jedinstven; mnoge supstance imaju isti hromatogram pri identičnim uslovima. Ovaj problem postoji s obzirom na činjenicu da je oko 10 miliona jedinjenja poznato i više od 60.000 njih je u komercijalnoj upotrebi. Ukratko, hromatografija može da se koristi za kvalitativnu analizu, uz određena ograničenja, ali osnovna namena svakako nije *screening* nepoznatog. Najbolja metoda za kvalitativnu analizu je kuplovanje tehnika pomoću kojih se kombinuje odlična moć razdvajanja sa mogućnošću identifikacije (GC–masena spektrometrija, GC–infracrvena spektroskopija, kao i odgovarajuće HPLC tehnike).

Hromatografija obezbeđuje informacije o složenosti uzorka. Broj pikova (GC, HPLC ili SFC) ili mrlja (TLC ili PC) ukazuje na minimalan broj komponenata, dok čistoća jedinjenja može biti proverena i prisustvo pojedinačnog pika ili mrlje predstavlja pokazatelj čistoće.

### 1.5.2. Kvantitativna analiza

Hromatografija se koristi za utvrđivanje količine komponenti prisutnih u uzorku poređenjem sa odgovarajućim standardima i kalibracijama. Kvantitativni podaci se koriste u industriji za kontrolu kvaliteta, u kliničkoj hemiji za testove telesnih tečnosti, kao i u zaštiti životne sredine za analizu uzoraka vazduha, vode i zemljišta.

Kvantitativna hromatografska analiza se zasniva na činjenici da je površina pika proporcionalna količini analiziranog jedinjenja. Najjednostavniji način za određivanje koncentracije datog jedinjenja naizgled se zasniva na merenju površine pika i deljenju te površine sa zbirom površina svih pikova. Međutim, ovakav način određivanja koncentracije je povezan sa mnogim ograničenjima od kojih su najčešća:

- Različita osetljivost detektora u pogledu različitih jedinjenja,



- Smanjenje intenziteta ili potpuno odsustvo pika usled trajnog zadržavanja pojedinih jedinjenja na koloni ili termičkog razlaganja u isparivaču ili koloni i
- Način uzimanja uzorka i način injektovanja.

Stoga se koriste druge metode kao što su metoda standardnog dodatka, metoda internog standarda, kao i metoda normalizacije površina.

**Metoda standardnog dodatka** koristi se za analizu supstanci prisutnih u malim koncentracijama u uzorku. Postupak se zasniva na tome da se uvek ista zapremina uzorka više puta hromatografski određuje pri istim eksperimentalnim uslovima i odredi se srednja visina pika ( $h$ ) jedinjenja koje se određuje. Zatim se u uzorak doda tačno odmerena količina supstance koja se određuje i ponovo se više puta hromatografski određuju iste zapremine pod istim uslovima i odredi se srednja visina pika. Na osnovu razlike u visini pikova dobija se visina koja je proporcionalna količini dodatog standarda i na osnovu te visine određuje se količina supstance.

**Metoda internog standarda** se ubraja u najpreciznije metode i podrazumeva pripremanje kalibracionih krivih za svako jedinjenje čija se koncentracija određuje. Kalibraciona kriva se konstruiše na osnovu standardnih rastvora koji sadrže različite masene odnose jedinjenja koje se određuje i standarda. Naime, odmerava se ista masa standarda za sve rastvore i različite mase supstance koja se određuje. Kalibraciona kriva predstavlja zavisnost količnika površine pikova analizirane supstance i standarda i mase analizirane supstance. Nakon dobijanja kalibracione krive u uzorak se dodaje odmerena količina internog standarda i zatim se snima. Određuju se površine pikova koji pripadaju standardu i analiziranoj supstanci i na osnovu kalibracione krive određuje se masa analizirane supstance.

**Metoda normalizacije površina** je najjednostavnija i najbrža metoda, pri čemu se u ovom slučaju pretpostavlja da su sve komponente

uzorka eluirane i detektovane. Svi pikovi se integrale, njihove površine sabiraju i normalizuju na 100% (jednačina 1.21), odnosno površina svakog pika izražava se u % ( $S_i$ ) u odnosu na ukupnu površinu.

$$\%S_i = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^n A_i} \quad (1.21)$$

gde je  $A_i$  površina pika posmatranog jedinjenja  $i$ , a  $\sum_{i=1}^n A_i$  površina svih pikova.

#### 1.4.2. Preparativna analiza

Sposobnost hromatografije da razdvaja komponente uzorka može se iskoristiti za dobijanje čistih komponenata na nivou laboratorijske i industrijske prakse. U početku se hromatografija koristila isključivo za potrebe preparativnog razdvajanja. U novije vreme se za izolaciju najviše koristi tankoslojna i kolonska hromatografija. HPLC se koristi prevashodno u analitičke svrhe, dok je u slučaju izolovanja primenljiva jedino za skupa i retka jedinjenja. Međutim, preparativna HPLC se u savremenim istraživanjima koristi u svrhu izolovanja malih količina jedinjenja iz složenih smeša.

#### LITERATURA

1. Hage, D.S., Chromatography, poglavlje 1 u: Rifai, N., Horvath, A.R., Wittwer C.T. (ur.), Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry: Small Molecules, Peptides, and Pathogens, šesto izdanje, Elsevier Science, 2018, str. 1–32.
2. Marjanović, N., Instrumentalne metode analize, I/1 Metode razdvajanja, Univerzitet u Banjoj Luci, Tehnološki fakultet, Banja Luka, 2001.
3. Robards, K., Haddad, P.R., Jackson, P.E. Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods, poglavlje 1, drugo izdanje, Elsevier Academic Press, 2004, str. 1–34.

4. Sparkman, O.D., Penton, Z.E., Kitson, F.G., Gas Chromatography and Mass Spectrometry, A Practical Guide, poglavlje 2, drugo izdanje, Elsevier Academic Press, Burlington MA, 2011, str. 1–83.
5. Rubinson, K.A., Rubinson, J.F., Contemporary Instrumental Analysis, poglavlje 13, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1999, str. 576–627.

---

# 2. GASNA HROMATOGRAFIJA

---

- 2.1. Uvod
  - 2.2. Istorijski aspekt
  - 2.3. Princip rada
  - 2.4. Delovi gasnog hromatografa
    - 2.4.1. Gas nosač
    - 2.4.2. Injektor i tehnike uvođenja uzoraka
      - 2.4.2.1. Tečni uzorci
      - 2.4.2.2. Gasoviti uzorci
      - 2.4.2.3. Isparljiva jedinjenja u tečnim i čvrstim uzorcima
      - 2.4.2.4. Direktno unošenje uzoraka
    - 2.4.3. Kolone
      - 2.4.3.1. Stacionarna faza
      - 2.4.3.2. Fizičke dimenzije i osobine kolone
      - 2.4.3.3. Odabir temperature kolone
    - 2.4.4. Detektori
    - 2.4.5. Masena spektrometrija
  - LITERATURA
-

## 2.1. UVOD

Gasna hromatografija spada u najprimenljivije hromatografske tehnike, pre svega zbog visoke rezolucije, selektivnosti i osetljivosti, koje su rezultat primene dugih i visokoefikasnih kolona, kao i veoma osetljivih detektora. Reč je o analitičkoj tehnici koja se rutinski koristi u većini analitičkih i industrijskih laboratorija i obuhvata sve hromatografske tehnike u kojima je mobilna faza gas. Gasna hromatografija ima prednost u odnosu na druge hromatografske tehnike zbog gasovitog stanja mobilne faze i uzorka; efikasnost razdvajanja je znatno veća jer se usled male viskoznosti mobilne faze kolone mogu koristiti duže. Od sredine XX veka pa sve do pojave HPLC tehnike, gasna hromatografija je predstavljala dominantnu tehniku razdvajanja. Koristi se za razdvajanje i identifikaciju supstanci koje su na sobnim temperaturama u gasovitom stanju, koje mogu da isparavaju pri višim temperaturama ili se odgovarajućim reakcijama mogu prevesti u isparljiva jedinjenja, a da se pri tome ne razgrađuju na temperaturama koje su neophodne za GC analizu. Indirektno se može primeniti i za analizu čvrstih ili tečnih supstanci koje nisu isparljive, izvođenjem pirolize pod određenim uslovima i analizom produkata pirolize. Pomoću ove tehnike identifikuju se jedinjenja koja imaju napon pare u opsegu 1–1000 mm Hg uz radnu temperaturu kolone –70 do 400 °C. U gasove i isparljiva jedinjenja se ubrajaju mnoge masne kiseline, alkoholi, etri, estri, aldehidi, ketoni, metalni kompleksi, ugljovodonici, proizvodi razgradnje polimera, pesticidi, esencijalna ulja, kao i mnogobrojne aktivne komponente lekova. Kiseline, aminokiseline, amini, amidi, neisparljive aktivne komponente lekova, šećeri i hormoni su jedinjenja koja uglavnom zahtevaju derivatizaciju da bi se prevela u isparljiviji oblik.

Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (eng. *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*, GC–MS) je jedna od najprisutnijih analitičkih tehnika za identifikaciju i kvantifikaciju organskih jedinjenja iz složenih uzoraka. Ova tehnika je nezamenljiva u oblastima zaštite životne sredine, forenzike, zaštite zdravlja, medicinskih i bioloških istraživanja, analize namirnica i mnogim drugim. Predstavlja kombinaciju dve moćne mikroanalitičke tehnike. Pomoću gasnog hromatografa se razdvajaju komponente smeše, dok maseni spektrometar obezbeđuje informacije koje

doprinosu strukturalnoj identifikaciji svake komponente. Ova kombinacija ima nekoliko prednosti. Prvo, dolazi do razdvajanja komponenata složene smeše i na taj način se mogu dobiti maseni spektri pojedinačnih komponenata u svrhu kvalitativne analize; drugo, mogu se dobiti informacije o kvantitetu ispitivanih jedinjenja.

Primenom GC–MS se može dobiti kompletan maseni spektar analita prisutnog u koncentraciji od nekoliko femtomola; idealno, ovakav spektar daje direktno dokaz o masi polaznog jedinjenja i obezbeđuje karakterističnu fragmentaciju koja kasnije služi kao osnova za identifikaciju jedinjenja zajedno sa retencionim vremenom.

## **2.2. ISTORIJSKI ASPEKT**

Hromatografija je počela sa razvojem kada i masena spektrometrija (oko 1900. godine), odnosno sa prvim publikacijama Cvet-a. Najranija istraživanja u okviru hromatografije podrazumevaju propuštanje tečnog uzorka kroz kratke kolone sa različitim adsorbensima ili hartijom kao adsorbensom. Razvoj podeone hromatografije od strane britanskih hemičara A.J.P. Martin-a i R.L.M. Synge-a i rezultati do kojih su došli 1941. godine naveli su ih na ideju o korišćenju gasovite mobilne faze i doveli su do razvoja GC 50-ih godina XX veka od strane A.J.P. Martin-a i A.T. James-a. Za svoja dostignuća u okviru izučavanja hromatografije dobili su Nobelovu nagradu 1952. godine. Veoma brzo nakon toga, započeti su pokušaji povezivanja gasnog hromatografa sa masenim spektrometrom, što je predstavljalo očekivan sled, s obzirom da se pomoću gasnog hromatografa razdvajaju organska jedinjenja i eluiraju se sa kolone u čistom stanju u gasovitoj fazi, a istovremeno rad sa masenim spektrometrom zahteva čiste analite u gasovitoj fazi radi procesa jonizacije. Međutim, gasni hromatografi iz tog perioda su podrazumevali upotrebu punjenih kolona sa protokom 20–30 mL/min, što je predstavljalo problem zbog razlike u pritiscima u odnosu na maseni spektrometar (slika 2.1a). Taj problem je prevaziđen upotrebom kapilarnih kolona sa protocima od 1,5 mL/min ili manjim, kao i znatno boljim sistemom pumpi da bi se postigao vakuum potreban za rad masenog spektrometra. Do sada nije razjašnjeno koja grupa naučnika je prvi put ostvarila pokušaj i uspešno izvela povezivanje gasnog hromatografa sa

masenim spektrometrom. Naime, J.C. Holmes i F.A. Morell su publikovali rad 1957. godine koji se odnosi na vezu između gasnog hromatografa i masenog spektrometra sa magnetnim analizatorom, dok su praktično istovremeno R.S. Gohlke i F. McLafferty saopštili rezultate svoga rada na konferenciji 1956. godine, koji su se odnosili na povezivanje GC–MS sa analizatorom sa vremenom preleta (eng. *Time-Of-Flight*, TOF), a 1959. godine su dobijene rezultate objavili i u naučnom časopisu.

Danas GC–MS predstavlja jedinstven instrument (slika 2.1b). Pomenute grupe naučnika su tretirale gasni hromatograf kao ulaz u maseni spektrometar, a maseni spektrometar kao detektor gasnog hromatografa. Međutim, treba imati na umu da se GC–MS razlikuje od GC ili masenog spektrometra zbog toga što razdvajanje komponenata zahteva više vrednosti pritiska u gasnom hromatografu, dok je za razdvajanje jona različitih odnosa masa i naelektrisanja ( $m/z$ ) u masenom spektrometru potreban znatno niži pritisak. Obe grupe naučnika pokušale su da spoje gasni hromatograf sa masenim spektrometrom odvajajući deo eluata iz gasnog hromatografa za maseni spektrometar, a ostatak se usmeravao na konvencionalni detektor gasnog hromatografa ili se izvodio iz sistema. Ovo je bilo neophodno da bi se prevazišao problem razlike u pritiscima između dva instrumenta. Šezdesetih godina prošlog veka razvijeni su uređaji za povećanje koncentracije analita prisutnog u eluatu koji izlazi iz pakovanih kolona gasnog hromatografa. Ovi uređaji su, u najvećem broju slučajeva, u novije vreme prestali da se koriste zbog primene kapilarnih kolona čija upotreba podrazumeva mnogo veće koncentracije analita, kao i poboljšanje vakuumskeg sistema. U slučaju modernih instrumenata izlaz kolone smeštene u gasnom hromatografu je postavljen direktno u jonski izvor masenog spektrometra.

Veoma važna stavka u procesu evolucije GC–MS je napredak u pogledu sistema za obradu podataka. Sve do razvoja i komercijalizacije minikomputera 1965. godine nije bilo moguće povezivanje GC–MS sa računarom. Do tada su se podaci morali prenositi sa masenog spektrometra na računar i unositi ručno. Nakon toga je 1970. godine usledila primena druge generacije mikroračunara.

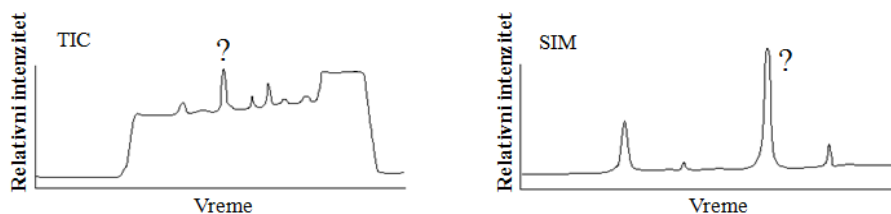


**Slika 2.1.** Izgled a) starijeg modela i b) savremenog GC–MS instrumenta

Napredak u pogledu injektora koji se koriste u slučaju kapilarnih kolona, razvoja kapilarnih kolona sa  $\text{SiO}_2$ , razvoja elektronske regulacije protoka i pritiska, kao i poboljšanja osobina kolona omogućili su lakše korišćenje GC–MS sistema sa sve nižim granicama detekcije. Povećanje stabilnosti kolone gasnog hromatografa, mogućnost primene kontrolisane velike brzine zagrevanja u slučaju brze hromatografije, a pored toga i skraćeno vreme hlađenja pećnice, takođe su jednim delom doprineli razvoju tehnike.

Upotreba GC–MS je ograničena na analite koji su ne samo isparljivi i termički stabilni, već imaju i  $M_r = 2\text{--}800$ . Čak i uz ova ograničenja, postoji veliki broj analita koji se mogu razdvojiti i identifikovati jedino pomoću ove tehnike. Jedinjenja koja postoje samo u gasovitoj fazi na temperaturama ispod  $100\text{ }^\circ\text{C}$  ne mogu se razdvojiti i jonizovati korišćenjem nekih drugih tehnika. Zbog mogućnosti prevođenja mnogih jedinjenja, koja nisu pogodna za GC–MS analizu u njihovim prirodnim oblicima, u stabilne, isparljive derivate, broj mogućih analita je znatno veći. Zbog procesa fragmentacije do kog dolazi, elektronska jonizacija (eng. *Electron Ionization*, EI) spada u red najčešće korišćenih GC–MS jonizacionih tehnika; postoji mnogo jedinjenja koja proizvode jedinstvene šablone u pogledu fragmentacije, koji se u kombinaciji sa retencionim vremenom koriste za nedvosmisleno identifikaciju jedinjenja. Ograničenja u smislu detekcije se mogu smanjiti korišćenjem posebnih tehnika prikupljanja podataka, kao što je praćenje odabranog jona (eng. *Selected Ion Monitoring*, SIM), umesto ukupne jonske struje (eng. *Total Ion Current*, TIC) (slika 2.2).





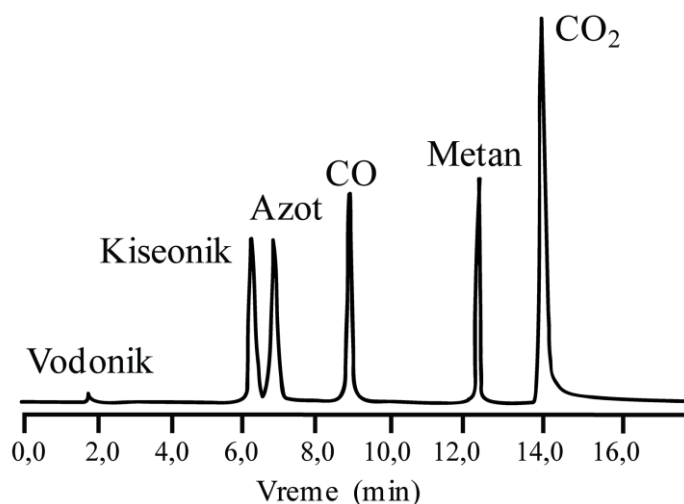
**Slika 2.2.** TIC i SIM mod u GC–MS

### 2.3. PRINCIP RADA

Instrumenti i tehnike vremenom postaju sve složeniji ali je osnovni princip rada na gasnom hromatografu nepromenjen. Reč je o *kolonskoj tehnici* koja se izvodi *metodom eluiranja*. Kao što je prikazano na slici 1.8, osim toga što je mobilna faza gas, GC podrazumeva primenu 1) čvrste stacionarne faze ili 2) tečne stacionarne faze nanete na čvrst porozni nosač (punjena ili pakovana kolona) ili na zid kolone (kapilarna kolona). Kao što je pomenuto, GSC obuhvata sve tehnike sa čvrstom stacionarnom fazom, dok GLC podrazumeva tečnu stacionarnu fazu. Uglavnom se koristi GLC, sa izuzetkom nekoliko specijalizovanih oblasti kao što je analiza neorganskih gasova. Ipak, instrumentacija je praktično identična u slučaju obe tehnike. Isto tako, osnovne komponente gasnog hromatografa su iste u slučaju pakovanih i kapilarnih kolona, mada u drugom slučaju postoje veći zahtevi u smislu performansi uređaja. Pomenuta razlika može biti pripisana manjem protoku mobilne faze u slučaju kapilarne kolone, a samim tim je potreban i brži odgovor detektora. Kapilarne kolone su zastupljenije u proizvodnji i većina instrumenata je prilagođena radu sa ovim tipom kolona, zbog čega su veoma često neadekvatni za rad sa punjenim kolonama, što zahteva modifikaciju dela injektora i detektora.

Princip tehnike se zasniva na unošenju uzorka u hromatograf kroz zagrejan injektor gde dolazi do trenutnog isparavanja, nakon čega uzorak dospeva u mobilnu fazu (gas nosač) kontinualnog protoka. Injektor mora biti zagrejan do temperature na kojoj uzorak potpuno isparava (za većinu uzoraka opseg iznosi 250–300 °C), dok se hromatografska kolona nalazi u posebnom termostatu (50–250 °C) gde se komponente smeše razdvajaju na

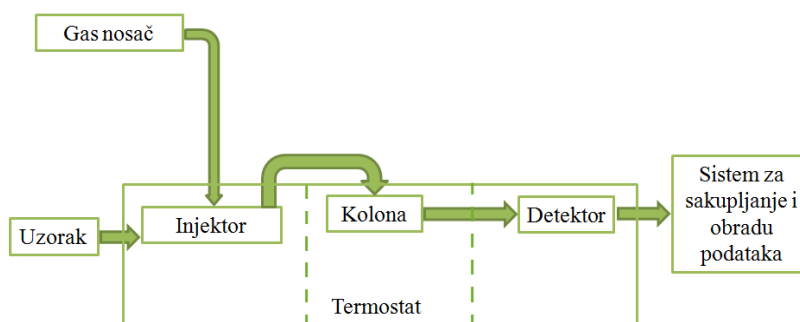
osnovu koeficijenata raspodele ili različitog adsorpcionog afiniteta prema stacionarnoj fazi. Pare komponenata uzorka se kreću različitim brzinama tako da se formiraju slojevi u koloni razdvojeni zonama čistog gasa nosača. Pojedinačne komponente smeše dospevaju u detektor gde se registruju u vidu električnog signala čiji je intenzitet proporcionalan njihovoj koncentraciji u gasu nosaču. Signal se iz detektora preko odgovarajućeg pojačivača šalje do pisača/softvera i beleži u funkciji vremena, što predstavlja krivu zavisnosti jačine signala od vremena, tj. gasni hromatogram (slika 2.3). U uslovima kada je postignuto dobro razdvajanje svaki signal na gasnom hromatogramu odgovara jednoj komponenti i okarakterisan je vremenom zadržavanja (retencionim vremenom,  $t_r$ , odnosno retencionom zapreminom,  $V_r$ ) i površinom pika. Retenciono vreme pri datim radnim uslovima ( $T$  kolone, protok gasa nosača, dužina kolone, količina tečne faze itd.) je karakteristično za odgovarajuću komponentu uzorka na osnovu čega se jedinjenje identifikuje (kvalitativna analiza). Istovremeno, površina pika neke komponente proporcionalna je njenoj koncentraciji koja se određuje primenom odgovarajuće kalibracije, o čemu je već bilo reči u prethodnom poglavlju. Dakle, kvalitativni, kao i kvantitativni podaci mogu se dobiti uz preciznu kontrolu temperature i protoka gasa nosača. Uz izotermalni proces temperatura u koloni je konstantna tokom analize, dok temperaturno programiranje u gasnoj hromatografiji podrazumeva kontrolisan temperaturni rast.



**Slika 2.3.** Prikaz gasnog hromatograma

## 2.4. DELOVI GASNOG HROMATOGRAFA

Osnovni delovi gasnog hromatografa su: 1) *Boca sa komprimovanim gasom nosačem* uz uređaj za redukciju, regulaciju i merenje protoka gasa nosača, 2) *Injektor* koji služi za unošenje uzorka u kolonu, 3) *Hromatografska kolona* za razdvajanje komponenata smeše, 4) *Termostat* (injektor, hromatografska kolona i detektor) za održavanje konstantne temperature, 5) *Detektor* koji detektuje komponente smeše istim redosledom kojim one napuštaju kolonu – na promenu koncentracije reaguje srazmernim naponskim ili strujnim signalom i 6) *Sistem za sakupljanje i obradu podataka* koji služi za dobijanje trajnog dokumenta – hromatograma (slika 2.4).



Slika 2.4. Šematski prikaz gasnog hromatografa

### 2.4.1. Gas nosač

Gas nosač se nalazi u čeličnim bocama zapremine 40 L pod pritiskom od 150 bara. Redukcija pritiska se postiže pomoću membranskog redukcionog ventila na kojem se pomeranjem membrane pomoću zavrtnja definiše iznos redukcije. Veoma važna je i regulacija pritiska i protoka gasa nosača, jer od toga zavisi  $t_r$  komponenata, odnosno efikasnost hromatografskog razdvajanja. Osnovni redukциони ventil je postavljen na izlazu iz boce. Njime se pritisak redukuje na oko 4 do 5 bara. U sklopu ovog redukcionog ventila nalazi se manometar pomoću koga se meri pritisak gasa u boci radi definisanja preostale količine. Moderni gasni hromatografi imaju

mogućnost elektronskog merenja i kontrole protoka nosećeg gasa, čime je omogućeno da se pritisak i protok nosećeg gasa mogu veoma precizno kontrolisati i tokom trajanja same analize, što daje veću efikasnost metodi. U idealnom slučaju, mobilna faza u gasnoj hromatografiji je inertna u odnosu na analit i stacionarnu fazu, hemijski čista, nezapaljiva, jeftina i dovoljne gustine kako bi došlo do smanjenja difuzije. Upotreba gasova (bilo kao aditiva u mobilnim fazama ili čistih) koji mogu da interaguju sa analitom i utiču na selektivnost je ograničena praktičnim problemima, kao što su primena odgovarajućeg detektora i ograničeni temperaturni opseg. Štaviše, hemijska reakcija analita i gasa predstavlja uobičajeni problem u slučaju GC na povišenim temperaturama. Najčešće korišćena mobilna faza u GC je inertni gas koji ne utiče na selektivnost. Gas nosač može uticati na rezoluciju posredno, jer od njega zavisi efikasnost kolone zbog razlika u brzini difuzije u rastvor u slučaju različitih gasova. To može uticati i na vreme trajanja analize i zbog toga ima poseban značaj u slučaju kada je potrebno ograničiti pritisak zbog razlike u viskoznosti gasa (tabela 2.1).

**Tabela 2.1.** Fizičke osobine (pri 273 K i 101 kPa) i primena gasova u GC

Gas	Termička provodljivost ( $10^8$ W/m K)	Viskoznost ( $10^{-7}$ Pa s)	Gustina (kg/m <sup>3</sup> )	Primena
Vodonik	16,75	84	0,0899	Gas nosač i sagorevajući gas
Helijum	14,07	186	0,1785	Gas nosač
Azot	2,39	166	1,2505	Gas nosač
Argon	1,67	212	1,7839	Gas nosač
Neon	4,56	298	0,8999	Gas nosač
Kiseonik	2,43	192	1,4289	Sagorevajući gas
Vazduh	2,39	171	1,2928	Sagorevajući gas

Uzimajući u obzir pomenute činjenice, vodonik, helijum i azot spadaju među najčešće korišćene gasove nosače u gasnoj hromatografiji. Izbor zavisi od prirode analizirane supstance i vrste detektora, kao i cene i pristupačnosti gasa koji mora biti izuzetne čistoće (99,999–99,9999%), kako bi se maksimalno produžio vek trajanja kolone, zbog čega se koriste i filteri koji se dodatno postavljaju u liniju gasa i primenjuju se za njegovo prečišćavanje kako bi se maksimalno zaštitio sistem. Tako na primer, uz detektor termičke provodljivosti se koristi helijum, uz plameno-jonizacioni detektor se koristi azot itd. U slučaju pakovanih kolona svi gasovi nosači su podjednako poželjni, mada u određenim situacijama postoje izuzeci. Naime, u slučajevima u kojima je pad pritiska ograničavajući faktor, preporučljivo je koristiti vodonik zbog male viskoznosti. Kod kapilarnih kolona postoji drugačiji pristup u pogledu odabira najpogodnijeg gasa nosača, pri čemu je pažljiva selekcija neophodna zbog optimizacije razdvajanja.

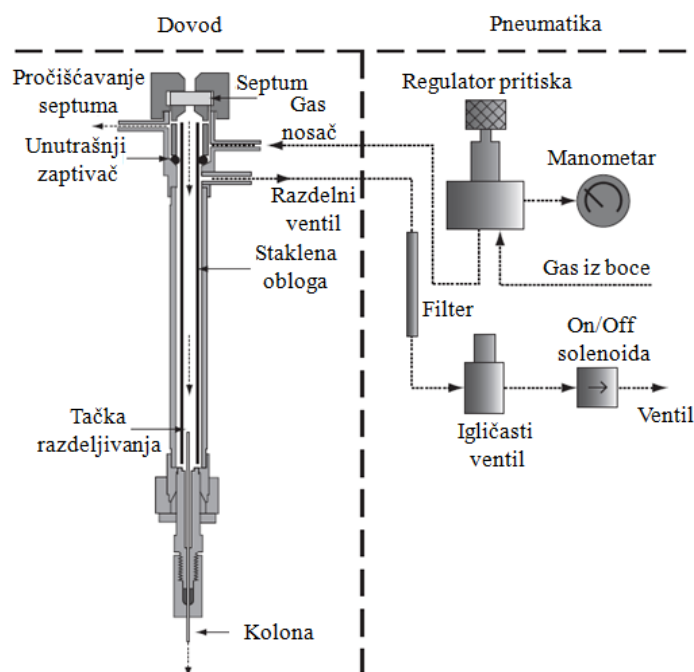
#### **2.4.2. Injektor i tehnike uvođenja uzoraka**

Metoda unošenja uzorka zavisi od agregatnog stanja uzorka i prirode procesa razdvajanja. Kao što je rečeno, u slučaju GC uzorci mogu biti čvrsti, tečni i gasoviti, iako se čvrsti i tečni uzorci unose kao razblaženi rastvori u isparljivom rastvaraču.

##### **2.4.2.1. Tečni uzorci**

Za unošenje tečnih uzoraka koristi se injektor (injekcioni blok). Univerzalna metoda podrazumeva unošenje tečnih uzorka pomoću mikrolitarskih špriceva, tako što se kroz otvor na zavrtnju iglom probuši gumeni zaptivač i brzim pritiskom na klip šprica ubrizga uzorak (0,1–10  $\mu\text{L}$ ). Ceo injekcioni blok izrađen od aluminijuma se zagreva preko grejača uz kontrolu i regulaciju temperature. Injekcioni blok se zagreva na temperaturu koja omogućava trenutno isparavanje svih komponenata uzorka kako bi celokupna količina uzorka, nošena mobilnom fazom, dospela u kolonu praktično istovremeno. Pored toga, potrebno je da količina uzorka koja dospe u kolonu bude odgovarajuća tako da ne premaši kapacitet kolone (naročito kod kapilarnih kolona) ili opseg linearnosti detektora. Pošto se

male količine uzorka (npr. 0,1  $\mu\text{L}$ ) ne mogu precizno uneti, primenjuje se postupak unošenja uzorka uz razdeljivanje (eng. *split*), kao najstarija i najčešće korišćena metoda u slučaju kapilarnih kolona. Međutim, osnovni nedostatak injektora sa razdeljivanjem je velika potrošnja gasa nosača, jer znatno veća zapremina gasa nosača tokom injektovanja i tokom analize dospeva u atmosferu. Zbog toga je razvijen sistem za unošenje uzoraka sa razdeljivanjem/bez razdeljivanja (eng. *split/splitless*). Odabir jednog od pomenuta dva moda, tj. *split* ili *splitless* zavisi od koncentracije analita u uzorku. Na slici 2.5 je šematski prikazan tipičan *split/splitless* injektor.



**Slika 2.5.** Poprečni presek *split/splitless* injektora

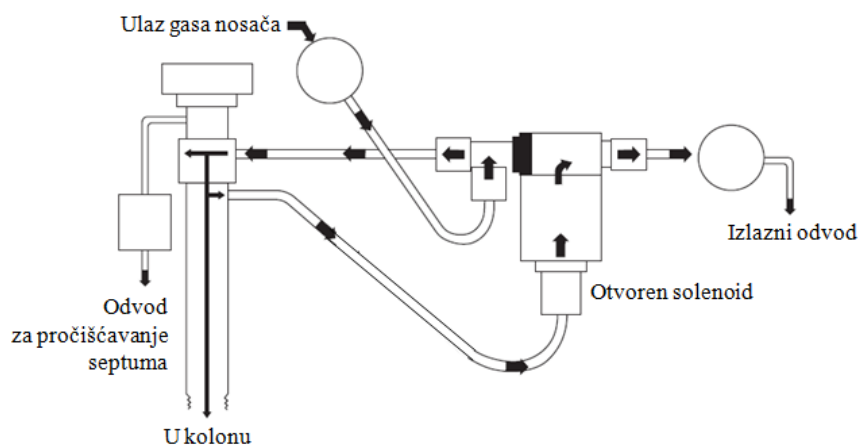
*Split* injektovanje se koristi za uzorke koji nisu rastvoreni ili za uzorke gde su analiti rastvoreni u rastvaraču i prisutni u relativno visokim koncentracijama. Režim *splitless* koristi se za uzorke koji sadrže analite u tragovima.

***Split mod.*** U slučaju *split* moda injektovan uzorak isparava i dospeva u struju gasa nosača pri čemu samo mali deo uzorka (0,5–5%) i

rastvarača, ukoliko je prisutan, dospeva u kolonu, dok ostatak uzorka preko izlaznog voda dospeva u atmosferu (slika 2.6). Tipičan opseg odnosa je od 10:1 do 400:1 i može se izračunati na osnovu jednačine 2.1:

$$\text{Split odnos} = \frac{v_k + v_o}{v_k} \quad 2.1$$

gde je  $v_k$  – protok gasa nosača u koloni (mL/min), a  $v_o$  – protok gasa nosača u odvodu (mL/min).



**Slika 2.6.** Put gasa nosača u *split* modu kod *split/splitless* injektora

Kod modernih instrumenata, pomenuti protoci se kontrolišu elektronski i odnos u *split* modu se podešava softverski. Koristi se za koncentrovana jedinjenja od interesa ( $> 100 \mu\text{g/mL}$ ) sa sličnim vrednostima tački ključanja. Ventil za razdeljivanje je otvoren tokom trajanja analize. Temperatura injektora mora biti dovoljno visoka da bi svi analiti isparili. Početna temperatura injektora trebalo bi da bude malo ispod temperature pri kojoj se prvo jedinjenje eluira.

Postoji nekoliko prednosti *split* moda:

- Vreme trajanja analize je kraće nego kod drugih metoda, jer nije potrebna niska početna temperatura kolone da bi se uzorak usmerio na kolonu,
- Izbegavaju se problemi sa rastvaračima koji nisu rastvorljivi u stacionarnoj fazi jer vrlo malo rastvarača dospeva na kolonu i
- Tehnika je dobra za termolabilne komponente, jer je vreme boravka u zagrejanom injektoru vrlo kratko.

Obloge (eng. *liners*) u injektoru za *split* mod dizajnirane su tako da doprinesu poboljšanju mešanja uzorka, tako da je *split* odnos isti za sve analite u uzorku. Zapremina uzorka je obično 1  $\mu$ L ili manja, pa se preporučuje velika brzina injektovanja.

***Splitless mod.*** Predstavlja drugi način upotrebe *split/splitless* injektora. U ovom modu uzorak se injektuje uz zatvoren ventil za razdeljivanje (slika 2.5). Nakon određenog vremena, ventil za razdeljivanje se otvara. Analiti iz uzorka su istaloženi na početku kolone i najveći deo isparljivog rastvarača se odvodi. Iz tog razloga, kao i zbog toga što se veliki deo uzorka može uneti, *splitless* mod se koristi za analizu tragova. Da bi se sprečili gubici lako isparljivih jedinjenja koja su od interesa, tačka ključanja rastvarača treba da bude najmanje za 20 °C niža u odnosu na najnižu temperaturu ključanja neke komponente prisutne u uzorku.

Kod *splitless* moda temperatura injektovanja treba da bude dovoljno visoka da bi svi analiti isparili, a početna temperatura kolone treba da bude 10–15 °C ispod tačke ključanja rastvarača. Pod tim uslovima, rastvarač i analiti se kondenzuju u uskoj zoni na stacionarnoj fazi na početku kolone. Kako se temperatura kolone povećava, analiti počinju da se kreću kroz stacionarnu fazu, eluiraju se iz kolone i na hromatogramu se pojavljuju kao oštri pikovi.

Jedan od glavnih problema kod *splitless* injektovanja je ograničenje po pitanju molekularne mase jedinjenja. To znači da ukoliko uzorak sadrži jedinjenja sa širokim opsegom tački ključanja, manji prinos će biti u slučaju



jedinjenja sa višom tačkom ključanja u odnosu na isparljivija jedinjenja iz uzorka. Drugi nedostatak *splitless* moda je relativno dugo vreme boravka uzorka u zagrejanom injektoru i termički labilna jedinjenja imaju tendenciju da se razgrade. Kao rezultat ovih nedostataka, pomenuti mod se preporučuje za analizu uzoraka u tragovima koji sadrže analite sa približno istim tačkama ključanja i ne sadrže analite koji su termički labilni.

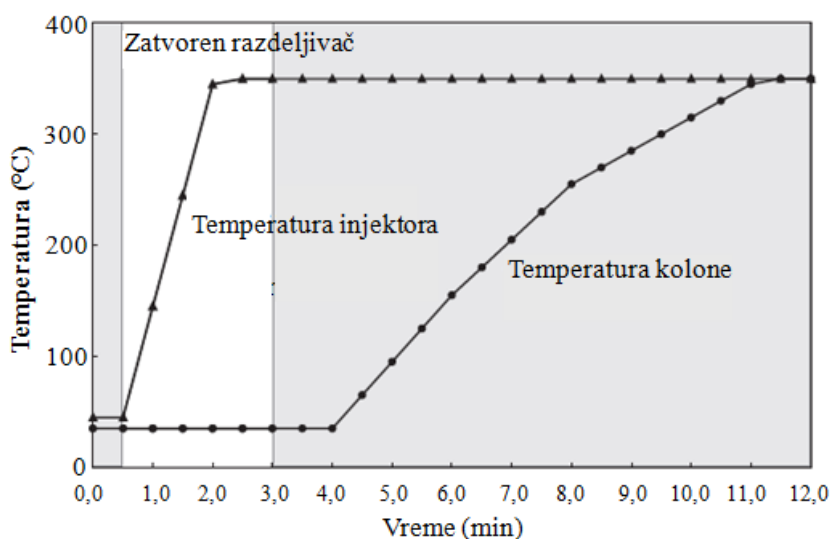
U slučaju *splitless* injektovanja relativno velika količina rastvarača dospeva na kolonu i rastvarač treba da bude kompatibilan sa stacionarnom fazom u koloni jer će u suprotnom to uticati na brzo eluiranje analita što dovodi do pojave širokih ili podeljenih pikova. Naime, za uzorke rastvorene u polarnim rastvaračima, kao što je metanol, trebalo bi da se koristi polarna stacionarna faza, dok su za nepolarne kolone odgovarajući rastvarači heksan, izooktan i toluen. Etil-acetat je odgovarajuć za većinu stacionarnih faza.

***Injektovanje na kolonu*** podrazumeva unošenje uzorka direktno na kolonu. Suprotno konvencionalnom *split/splitless* injektoru koji sadrži pećnicu koja održava temperaturu tokom analize konstantnom, ovaj tip injektovanja bolje funkcioniše uz režim temperaturnog programiranja pećnice. Temperatura injektora se podešava ispod tačke ključanja rastvarača. Nakon vađenja šprica, injektor se naglo zagreva (uobičajeno brzinom od 50 °C/min) na maksimalnu temperaturu koja mora biti dovoljno visoka kako bi sve komponente od interesa isparile. Nakon isparavanja, komponente dospevaju na početak kolone i temperatura kolone se programira uobičajenom procedurom. Ovakav način injektovanja daje velike prinose za većinu analita i posebno je dragocena u slučaju uzoraka koji sadrže komponente sa širokim opsegom tački ključanja ili termički labilne analite.

***Split/splitless injektovanje uz hlađenje*** se koristi u slučaju kada su uzorci koncentrovani (> 100 µg/mL) i sa širokim opsegom tački ključanja analita (*split*), a takođe i za tragove analita sa širokim opsegom tački ključanja (*splitless*). Radni uslovi su slični kao u slučaju *splitless* injektovanja uz zagrevanje, osim što se u ovom slučaju injektor hladi tokom unošenja uzorka i zatim naglo zagreva (50–200 °C/min). Nedostatak u

smislu molekulskih masa se na ovaj način eliminiše, ali se termički labilna jedinjenja na ovaj način razgrađuju zbog dugotrajnog boravka analita u injektoru.

**Injektovanje velikih zapremina** predstavlja modifikaciju *splitless* moda uz hlađenje. Zapremine uzoraka od 5 do 100  $\mu\text{L}$  se injektuju da bi se poboljšala granica detekcije analita vrlo niskih koncentracija. U ovom režimu, jedinjenja od interesa treba da imaju znatno višu tačku ključanja u odnosu na rastvarač kako bi se izbegli gubici prilikom odvođenja rastvarača. Uzorak se unosi polako, pri čemu su temperature kolone i injektora neposredno ispod tačke ključanja rastvarača i razdeljivač je otvoren. Većina rastvarača se odvodi, dok se analiti sa visokim tačkama ključanja zadržavaju na oblozi u injektoru. Nakon određenog vremena zadržavanja (obično do 1 min), razdeljivač se zatvara, a injektor se velikom brzinom zagreva i analiti dospevaju u kolonu. Nakon još nekoliko minuta, razdeljivač se otvara i zagrevanje kolone se temperaturno programira sve dok sva jedinjenja prisutna u uzorku ne napuste kolonu (slika 2.7). Ova tehnika je zahtevna u smislu optimizacije uslova za svaku analizu. Takođe, nečistoće u rastvaraču su uočljivije, ali to ne bi trebalo da predstavlja problem ukoliko se tehnika kombinuje sa visoko-selektivnim masenim spektrometrom kao detektorom.



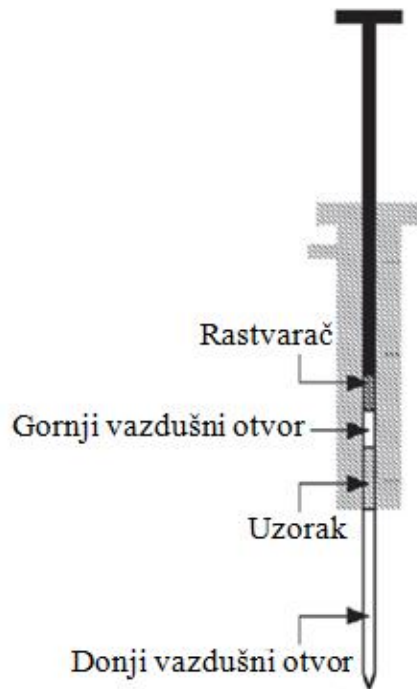
**Slika 2.7.** Eksperimentalni uslovi u slučaju injektovanja velikih zapremina

**Kompatibilnost injektora i uzorka.** Faktori koje treba uzeti u obzir prilikom odabira injektora ili načina unošenja uzorka, a da pri tom budu odgovarajući za tečni uzorak koji se analizira, su svakako koncentracija, tačka ključanja i termička stabilnost analita.

Očekivana koncentracija svakog analita treba da bude između najvišeg i najnižeg nivoa kalibracione krive koja se konstruiše korišćenjem standardnih rastvora poznatih koncentracija. Generalno, sadržaj u opsegu od pikograma do nanograma dospeva u GC detektor ili maseni spektrometar. Uzorci u kojima je koncentracija analita niža od nekoliko ng/ $\mu$ L smatraju se uzorcima u tragovima.

Na osnovu prethodne diskusije može se zaključiti da injektovanje uz hlađenje praćeno temperaturnim programiranjem daje najbolje rezultate što se tiče prinosa svih analita. Ovakav zaključak navodi na pitanje zbog čega se izotermalno injektovanje koristi u velikoj meri. Odgovor je da je izotermalno injektovanje prikladnije. Nedostatak kod metode unošenja uzorka uz hlađenje je neophodnost hlađenja injektora tečnim CO<sub>2</sub> ili tečnim azotom. Rezervoar sa tečnim CO<sub>2</sub> ili azotom obično zahteva konstantno nadgledanje. Kako se gas za hlađenje troši, vreme između analiza postaje sve duže. Mnogi uzorci se uspešno analiziraju *split/splitless* injektovanjem uz zagrevanje. Pored toga, ove metode je lakše optimizovati i ekonomski su povoljnije jer nema potrebe za upotrebom sredstava za hlađenje, a posebno u slučaju *split* metode gde je vreme trajanja analize kraće.

**Tehnike unošenja uzorka.** Injektovanje tečnih uzoraka u gasni hromatograf obično se izvodi pomoću 10- $\mu$ L špriceva. Da bi se postigla reproduktivnost ručnog injektovanja uzorka u injektor sa zagrevanjem, preporučuje se „sendvič” tehnika. Naime, mala količina rastvarača se uvlači u špic, nakon toga sledi zona vazduha, zatim uzorak i na kraju drugi vazdušni čep, pri čemu igla ostaje prazna (slika 2.8). Ovom tehnikom smanjuje se problem u vezi analiziranja jedinjenja visokih i niskih molekularnih masa. Kao što je ranije rečeno, u slučaju *splitless* moda, postoji ograničenje po pitanju količine uzorka. Zapremina zone rastvarača mora se uzeti u obzir pri korišćenju „sendvič” tehnike kod *splitless* moda.



**Slika 2.8.** Špric napunjen uzorkom i rastvaračem pre unošenja „sendvič” tehnikom

**Brzina unošenja uzorka.** Brzina unošenja uzorka ima značajan uticaj na rezultate hromatografske analize. U slučaju *split* moda se preporučuje veoma velika brzina injektovanja, dok kod *splitless* režima optimalna brzina injektovanja zavisi od kapaciteta staklene obloge i opsega tački ključanja jedinjenja prisutnih u uzorku:

- Za obloge sa manjim unutrašnjim prečnikom, brzina injektovanja treba da bude sporija,
- Velika brzina injektovanja rezultuje nemogućnošću analize isparljivijih jedinjenja i
- Mala brzina injektovanja rezultuje nemogućnošću analize manje isparljivih jedinjenja.

Za tehniku unošenja uzorka sa hlađenjem poželjnija je manja brzina.

Brzina injektovanja predstavlja važan parametar i potrebno ga je empirijski optimizovati. Korišćenjem autosemplera omogućeno je podešavanje različitih brzina injektovanja, čime se obezbeđuje ne samo odgovarajuća brzina, već i ponovljiva brzina uzastopnih injektovanja, što je jedan od mnogobrojnih razloga zbog kojih se preporučuje automatsko injektovanje uzorka.

**Pulsno unošenje uzorka pod pritiskom** podrazumeva povećanje pritiska gasa nosača za 2–3,5 bara neposredno pre injektovanja. Nakon toga, pritisak se spušta kako bi se održao željeni protok kroz kolonu. Kao posledica ovoga dolazi do kompresije uzorka na mnogo manju zapreminu, a takođe se prevazilazi i problem sa preopterećenjem injektora koji se javlja u slučaju *splitless* moda sa zagrevanjem.

#### 2.4.2.2. Gasoviti uzorci

Gasoviti uzorci se unose pomoću gasne slavine. Gasoviti uzorci za GC analizu mogu da potiču iz više različitih izvora, uključujući rezervoar za gas, poseban kontejner za prikupljanje uzoraka gasa, kao i *headspace*. Ponekad se gas unosi injektovanjem u jedan od gore navedenih injektora sa nepropusnim špricem za gas. Može da se koristi u slučaju bilo kog injektora uključujući *split/splitless* režime rada. Zapremina uzorka varira od 100  $\mu\text{L}$  do 2 mL ili više. Najčešće se koristi zapremina gasa od 1 mL. Injektovanje može da bude automatsko. U suštini, špric od 100  $\mu\text{L}$  može da se instalira u neke autosemple koji su dizajnirani za tečno injektovanje. Takođe, postoje automatizovani sistemi sa nepropusnim špricima koji mogu da se zagrevaju radi sprečavanja kondenzovanja analita iz gasovitog uzorka. Alternativno, gasoviti uzorak može se uneti u struju gasa nosača pomoću ventila za uzorkovanje gasa. Često se koriste ventili sa petljom za unošenje uzorka u kolonu. Uobičajeno se ventil za uzorkovanje gasa instalira na vrh GC kolone, obično u pećnici koja se posebno zagreva. Čak i kada je sistem namenjen analizi permanentnih gasova, poželjno je blago zagrevanje ventila kako bi se sprečila kondenzacija vode. Sama petlja je dostupna u različitim veličinama, ali za unošenje uzorka u gasni hromatograf najčešće se koriste

zapremine od 0,5 mL, 1 mL i 2 mL. Na slici 2.9 prikazan je izgled ventila i petlje za unošenje gasovitog uzorka.



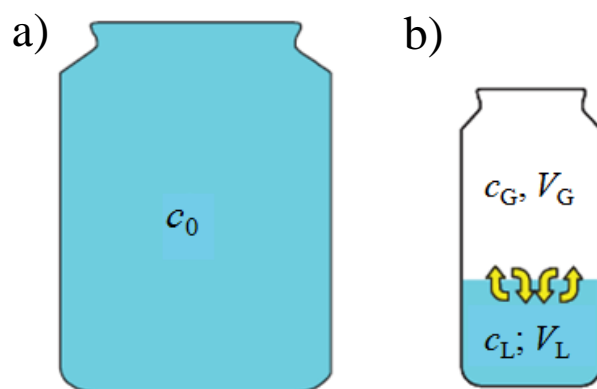
**Slika 2.9.** Ventil sa 10 ulaza i rotirajućim jezgrom (inset) i petlja

Analiti iz gasovitog uzorka mogu se adsorbovati na površini odgovarajućeg materijala za „hvatanje” i potom desorbovati zagrevanjem materijala, pri čemu dolazi do prenošenja analita u gasni hromatograf. „Hvatanje” analita iz gasovitog uzorka dovodi do smanjenja granice detekcije za razliku od samog injektovanja 1–2 mL gasa. Smanjenje granice detekcije nastaje zbog činjenice da se mnogo veća količina gasa uzorkuje „hvatanjem” analita. Pored toga, pri zagrevanju materijala, analiti se koncentrišu čineći usku zonu, što dovodi do pojave uskih pikova na hromatogramu, ali sa velikim šumom.

#### 2.4.2.3. Isparljiva jedinjenja u tečnim i čvrstim uzorcima

**Statički headspace.** *Headspace* je tehnika pripreme uzoraka za određivanje isparljivih jedinjenja u čvrstim i tečnim uzorcima. Tehnika je počela da se primenjuje sredinom XX veka i do danas se aktivno koristi. Ovom tehnikom, u GC kolonu se uvodi samo gasna faza iznad uzorka. *Headspace* analiza je popularna zbog jednostavnosti i činjenice da je to vrlo čist način unošenja isparljivih analita u gasni hromatograf (ne postoji mogućnost

unošenja neisparljivih komponenata uzorka), dok injektor i kolona praktično ne zahtevaju održavanje. Tečni uzorak koji treba da se analizira *headspace* tehnikom obično se sakuplja iz izvora i hladi u posudi koja se napuni do vrha tako da se iz uzorka ne izgube isparljiva jedinjenja. Neposredno pre analize, tečni ili čvrsti uzorak se postavlja u vijalu na sobnoj temperaturi, pri čemu se ostavi dovoljno slobodnog prostora za gasoviti deo uzorka, nakon čega se vijala zatvori i zagreva. Isparljiva jedinjenja počinju da prelaze u gasovitu fazu iznad uzorka sve dok se ne dostigne ravnoteža. U toj tački odnos koncentracija analita u gasovitoj fazi i tečnoj ili čvrstoj fazi je konstantan i predstavlja koeficijent raspodele. Proces uspostavljanja ravnoteže je prikazan na slici 2.10.



**Slika 2.10.** a) Tečni uzorak (najčešće voda) sa isparljivim analitom nepoznate koncentracije ( $c_0$ ) i b) Vijala poznate zapremine sa tečnim uzorkom poznate zapremine.  $c_L$  – koncentracija analita u tečnoj fazi nakon uspostavljanja ravnoteže;  $c_G$  – koncentracija analita u gasovitoj fazi nakon uspostavljanja ravnoteže;  $V_L$  – zapremina analita u tečnoj fazi;  $V_G$  – zapremina analita u gasovitoj fazi

Nakon uspostavljanja ravnoteže, uzima se alikvot gasovite faze uzorka iz vijale pomoću nepropusnog šprica ili *headspace* uređaja sa ventilom za gasovite uzorke i nakon toga se uzorak unosi u gasni hromatograf. Iako je uzorke moguće uneti manuelno, ipak se veća

preciznost i manja granica detekcije postižu pomoću specijalnih sistema za *headspace*.

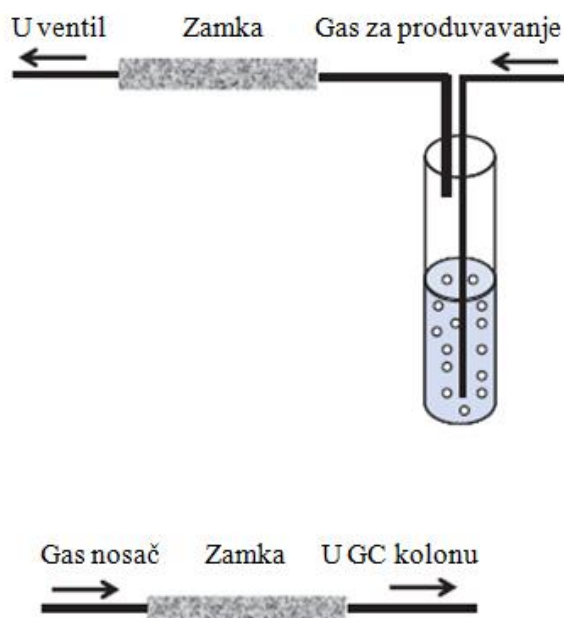
Dostupno je nekoliko *headspace* sistema pri čemu unošenje uzorka u gasni hromatograf može da se izvodi pomoću ventila za gasovite uzorke, nepropusnog šprica ili sistema sa uravnoteženim pritiskom, čija je prednost vrhunska preciznost i inertnost. U poređenju sa drugim *headspace* tehnologijama, ovaj sistem ne zahteva ventile za uzorkovanje gasovitih uzoraka, čime se izbegava kontakt uzorka sa vrućim metalnim petljama, što inače zahteva održavanje.

*Headspace* se veoma često koristi kao tehnika za određivanje alkohola u krvi, zaostalih rastvarača u farmaceutskim preparatima i začina iz hrane. Drugi uobičajeni primeri upotrebe ove metode su industrijske analize monomera u polimera, analiza pića i prehrambenih proizvoda, analiza parfema i kozmetičkih preparata, isparljivih organskih materija uključujući hlorovana jedinjenja, kao i monoaromatične ugljovodonike (benzen, toluen, etilbenzen i izomere ksilena) u uzorcima vode i čvrstim uzorcima.

***Dinamički headspace (purge and trap)***. Pod pojmom *headspace* se uglavnom podrazumeva statički *headspace*, iako se u određenim slučajevima odnosi i na dinamički *headspace*. U slučaju ove tehnike (slika 2.11) inertni gas se propušta kroz uzorak, a isparljivi analiti se zarobljavaju na adsorbensu. Adsorbens je najčešće sintetički polimer koji ne reaguje sa analitima, ali ih efikasno vezuje pri ambijentalnim uslovima i oslobađa ih na povišenoj temperaturi bez hemijske modifikacije, nakon čega se prenose u gasni hromatograf. Ostali adsorbensi koji se koriste su silika-gel, aktivni ugalj i molekulsko sito. Na kraju, radi uklanjanja zaostalih analita i vlage, adsorbens se zagreva na temperaturu višu od one koja je korišćena tokom desorpcije i nakon toga je sistem spreman za naredno uzorkovanje.

Ova tehnika podrazumeva nižu granicu detekcije u odnosu na statički *headspace*, jer po teoriji treba da se ukloni celokupna količina analita iz matriksa, dok se u drugom slučaju uklanja pojedinačni alikvot gasne faze.



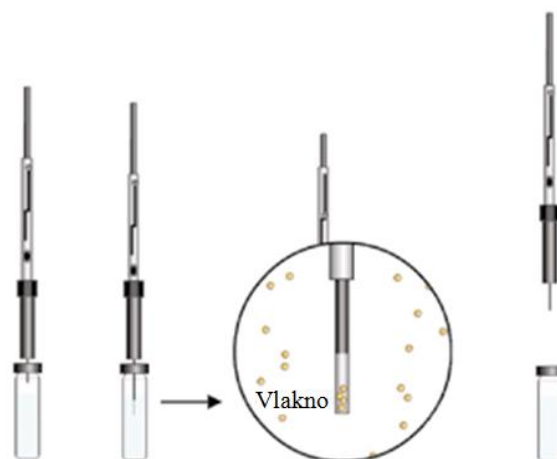


**Slika 2.11.** Produvanje gasa kroz uzorak koji sadži isparljive analite

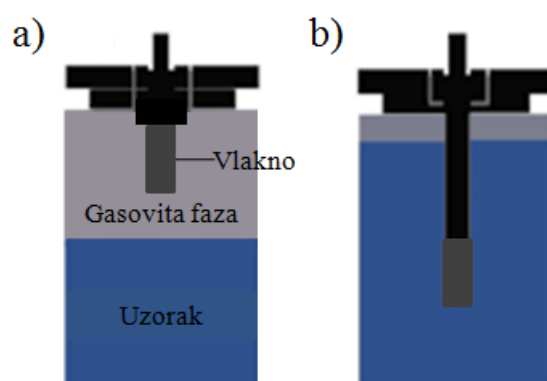
**Mikroekstrakcija u čvrstoj fazi.** Mikroekstrakciju u čvrstoj fazi (eng. *Solid Phase Microextraction*, SPME) razvili su Janusz Pawliszyn i njegovi saradnici na Univerzitetu Waterloo u Ontariju, Kanada. Arthur i Pawliszyn su rad o primeni prvog SPME instrumenta objavili 1990. godine, a prvi komercijalni uređaj sa špicom se pojavio 1993. godine (Supelco). Osnovni deo SPME sistema predstavlja tzv. SPME špic, koji podseća na hromatografski, s tom razlikom što sadži vlakno dugo 1 cm smešteno unutar igle šprica, koje je napravljeno od odgovarajućeg polimera nanetog na nosač od stopljenog  $\text{SiO}_2$ , prečnika od 110  $\mu\text{m}$ . Proces mikroekstrakcije se zasniva na preraspodeli analita između ekstrakcionog medijuma (vlakna) i matriksa uzorka, odnosno na selektivnoj sorpciji ciljnih analita u aktivnom sloju vlakna i direktnoj desorpciji u injektoru hromatografa. Postupak SPME se sastoji iz nekoliko koraka, pri čemu je osnovni princip mikroekstrakcije analita iz rastvora prikazan na slici 2.12. Pre same analize, vlakno je uvučeno u metalnu cevčicu SPME šprica. Posle probijanja septuma bočice u koju je prethodno stavljena određena zapremina uzorka,

vlakno se izvlači iz metalne zaštite, tj. izlaže uzorku spuštanjem klipa šprica. Nakon određenog vremena, vlakno sa sorbovanim analitima se ponovo uvlači u iglu, koja se izvlači iz bočice. Sorbovani analiti se desorbuju sa vlakna uvođenjem igle SPME šprica u injektor hromatografskog sistema (termička desorpcija u slučaju GC, odnosno eluiranjem rastvaračem u slučaju LC).

S obzirom na svoju jednostavnost i efikasnost, činjenicu da ne zahteva upotrebu organskih rastvarača i da se koraci prečišćavanja i koncentrovanja ekstrakta uzorka (ispitivanih analita) izvode istovremeno, SPME tehnika se sve više koristi u analitici ostataka pesticida u uzorcima različitog porekla. U poređenju sa ostalim ekstrakcionim tehnikama, SPME metoda zahteva znatno kraće vreme trajanja analize. Na primer, za određivanje sadržaja organohlornih pesticida u hrani ili drugim uzorcima, na tečno-čvrstu ekstrakciju (eng. *Liquid Solid Extraction*, LSE) se troši 4–18 h, na ekstrakciju u čvrstoj fazi (eng. *Solid Phase Extraction*, SPE) 2–3 h, a za SPME 0,5–1 h po uzorku. Dodatno, LSE i SPE tehnikama se uvek unose i određeni kontaminanti u finalni uzorak koji treba da se injektuje u hromatograf, što rezultira većim šumom u toku analize. Takođe, SPME tehnika zahteva male količine uzorka za analizu, ne zahteva upotrebu organskih rastvarača, a zbog izražene selektivnosti, šum je neznatan, što sve zajedno znatno olakšava identifikaciju i kvantifikaciju analita. SPME je ravnotežna tehnika u kojoj se analiti raspodeljuju između tri faze: uzorak, gasovita faza i vlakno (slika 2.13). Vlaknom se pri tome ne izvlači celokupna količina analita prisutna u uzorku, ali se odgovarajućom kalibracijom ova tehnika može koristiti i za uspešnu kvantifikaciju. Postoji dva načina uzorkovanja 1) *headspace* uzorkovanje–mikroekstrakcija iz gasovite faze (HS–SPME, slika 2.13a) i 2) direktno uzorkovanje–mikroekstrakcija iz rastvora (DM–SPME, slika 2.13b).



**Slika 2.12.** Postupak mikroekstrakcije analita iz rastvora



**Slika 2.13.** Radni modovi: a) HS-SPME i b) DM-SPME

#### 2.4.2.4. Direktno unošenje uzoraka

**Direktno unošenje tečnih i čvrstih uzoraka.** Može da se koristi u dva moda: 1) analiti mogu da se razdvajaju u konvencionalnim GC kolonama i da se određuju pomoću GC detektora ili masenog spektrometra i 2) analiti mogu da se prenesu u maseni spektrometar bez razdvajanja. Prvi način je preporučljiv u slučaju kada se određuju jedinjenja koja su podložna

razdvajanju pomoću GC, dok je drugi način pogodan u slučaju određivanja jednog ili dva jedinjenja, posebno termički labilnih jedinjenja koja se razgrađuju pri uslovima koji podrazumevaju duže zadržavanje u GC koloni.

U slučaju oba moda, tečni i čvrsti uzorci se postavljaju u staklene mikrovijale. Analiza započinje isparavanjem rastvarača (tečni uzorci) pri čemu je temperatura injektora relativno niska što je praćeno naglim zagrevanjem injektora do temperature koja je potrebna da bi jedinjenja iz uzorka isparila. Neisparljivi ostaci matriksa se zadržavaju, pri čemu analit isparava. Sa konvencionalnim načinom GC razdvajanja poluisparljiva jedinjenja iz uzorka se analiziraju pomoću masenog spektrometra ili GC detektora.

Za direktno unošenje uzorka u maseni spektrometar preporučljiva je upotreba kratke kolone (dužine 2 m i prečnika 0,1 mm), bez premaza ili sa tankim filmom (0,1  $\mu\text{m}$ ). U ovom slučaju temperatura treba da bude dovoljno visoka kako se analiti ne bi zadržavali na koloni.

Direktno unošenje uzorka ima značajnu prednost u slučaju čvrstih i termički nestabilnih uzoraka koji se unose u jonski izvor masenog spektrometra, pri čemu neisparljiva jedinjenja zaostaju u koloni i jonski izvor ostaje čist.

Uređaj je komercijalno dostupan i može da se koristi za analizu pesticida u hrani, biološkim uzorcima i aerosolima. Posebno interesantna primena je u analizi kokaina iz vlasi kose.

**Pirolizeri.** U slučaju pirolize neisparljivi čvrsti i tečni uzorci se zagrevaju do temperatura koje su više u odnosu na GC injektore. Pod ovim uslovima specifične hemijske veze se raskidaju i isparljivi proizvodi razgradnje se otpuštaju i prenose u gasni hromatograf ili GC–MS radi ispitivanja i moguće identifikacije. U nekim slučajevima se koristi plameno-jonizacioni detektor i broj pikova, kao i retencionna vremena pikova se porede sa hromatogramima dobijenim snimanjem standardnih rastvora. Piroliza može takođe da se koristi u slučaju primene masenog spektrometra za identifikaciju analita koji su dobijeni kao rezultat termičkog raspada čvrstog uzorka.

Temperatura pri kojoj se odvija piroliza mora biti optimizovana za svaki tip uzorka. Potrebno je da bude dovoljno visoka kako bi se dobio širok

spektar proizvoda. Pri relativno niskim temperaturama razgradnja može biti previše spora da bi bila od koristi. Veoma visoke temperature mogu da dovedu do intenzivne razgradnje i nastanka veoma malih nespecifičnih proizvoda. Neki pirolizeri mogu postići temperaturu do 1400 °C, ali u većini slučajeva se primenjuje temperatura u opsegu 500–800 °C.

Osnovna primena GC ili GC–MS pirolize je u medicine, farmaciji, forenzici, analizi hrane i uzoraka iz životne sredine, industriji itd.

### **2.4.3. Kolone**

U gasnoj hromatografiji komponente se razdvajaju u zagrejanju u koloni koja sadrži stacionarnu fazu. Komponente injektovanog uzorka se unose u kolonu pomoću gasa nosača (mobilne faze) i selektivno se zadržavaju na stacionarnoj fazi. Temperatura pećnice u kojoj se nalazi kolona obično se povećava brzinom 4–20 °C/min, tako da se komponente sa višom tačkom ključanja i one koje su jače vezane za stacionarnu fazu sukcesivno oslobađaju sa stacionarne faze.

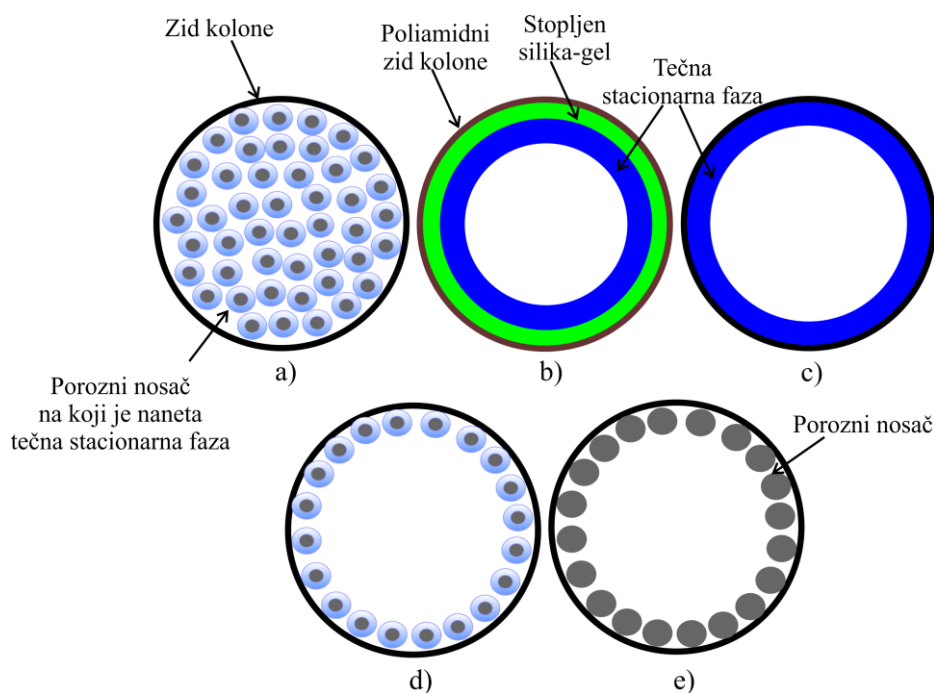
Prema nameni, kolone za gasnu hromatografiju se dele na preparativne i analitičke, ali je mnogo rasprostranjenija podela prema načinu pripreme i prečniku, na kolone sa punjenjem i kapilarne.

Standardne punjene kolone (slika 2.14a) su dužine od 1,5 do 10 m, prečnika od 2 do 4 mm, sadržaj tečne faze iznosi od 5 do 10%, a prosečni prečnik zrna inertnog nosača je od 100 do 150 μm. Inertni nosači obično su izrađeni od materijala na bazi dijatomejske zemlje. U početku su se kolone pravile od bakra, aluminijuma, nerđajućeg čelika i stakla i punjene su malim česticama inertnog čvrstog nosača na koji je nanet tanak sloj stacionarne faze. Nosač se sastojao od čestica dijatomejske zemlje jednake veličine, a stacionarna faza je bila viskozni tečni polimer visoke tačke ključanja. Ove kolone su korišćene za razdvajanje jedinjenja tečnog agregatnog stanja ili čvrstih supstanci na sobnoj temperaturi. Pakovane kolone su takođe punjene sitnim česticama čvrstog polimera ili molekulskog sita i korišćene su za razdvajanje permanentnih gasova i veoma isparljivih tečnosti.

Kapilarne kolone dele se na:

- FSOT (eng. *Fused Silica Open Tubular*) – izrađene su od amorfnog silikatnog materijala, bez prisustva metalnih oksida, zbog čega pokazuju veliku inertnost. Vrlo su fleksibilne, a radi povećanja čvrstine se sa spoljašnje strane oblažu polimernim materijalima (slika 2.14b). Tečna faza se u unutrašnjosti kolone ne vezuje fizičkim silama, već kovalentnim vezama preko silanolnih (Si-OH) grupa. Pokazuju veliku stabilnost pri povišenim temperaturama i visok stepen čistoće, a čak i minorne organske primese poreklom od stacionarne faze mogu se ukloniti propuštanjem odgovarajućeg rastvarača. Osnovni nedostatak ovih kolona je visoka cena i nedovoljno razvijeni postupci vezivanja polarnih tečnih faza.
- WCOT (eng. *Wall-Coated Open Tubular*) – standardne kapilarne kolone, danas su gotovo potpuno van upotrebe. Unutrašnji zid im je obložen samo stacionarnom tečnom fazom (slika 2.14c). Dužina im je do 200 m, a prečnik 0,25–0,5 mm. Proizvode se od stakla koje se prethodno hemijski tretira, kako bi se obezbedilo dobro prekrivanje površine i ujednačena debljina tečnog sloja. Ove kolone su lomljive, a problemi se uglavnom javljaju prilikom postavljanja, ili vađenja kapilara iz termostata gasnog hromatografa.
- SCOT (eng. *Support Coated Open Tubular*) – kapilarne kolone sa unutrašnjim zidom koji je obložen stacionarnom tečnom fazom i sprašenim inertnim nosačem (slika 2.14d), prečnika oko 1 mm, dužine 15–100 m i prečnika zrna inertnog nosača oko 1  $\mu\text{m}$ .
- PLOT (eng. *Porous Layer Open Tubular*) – kapilarne kolone sa unutrašnjim zidom od stopljenog  $\text{SiO}_2$  koji je obložen slojem adsorbensa (slika 2.14e).
- Mikropakovane kolone – izrađuju se od nerđajućeg čelika (ne preporučuju se pri analizi masnih kiselina) i stakla (prečnik  $\leq 0,1$  mm), koje je mnogo povoljniji materijal, jer je inertnije, lako se uočava da li je kolona dobro pakovana i da li se pojavljuju praznine u punjenju tokom upotrebe. U potpunosti su ispunjene inertnim nosačem sa nanetom stacionarnom tečnom fazom (2.14a). Nosač se

dodaje koloni u malim količinama preko levka i pažljivo sabija pomoću vakuuma na drugom kraju kapilare. Ako je punjenje previše gusto, kolone će se tokom upotrebe inaktivirati. U suprotnom, kada je punjenje nedovoljno gusto, razdvajanje komponenti biće nepotpuno.

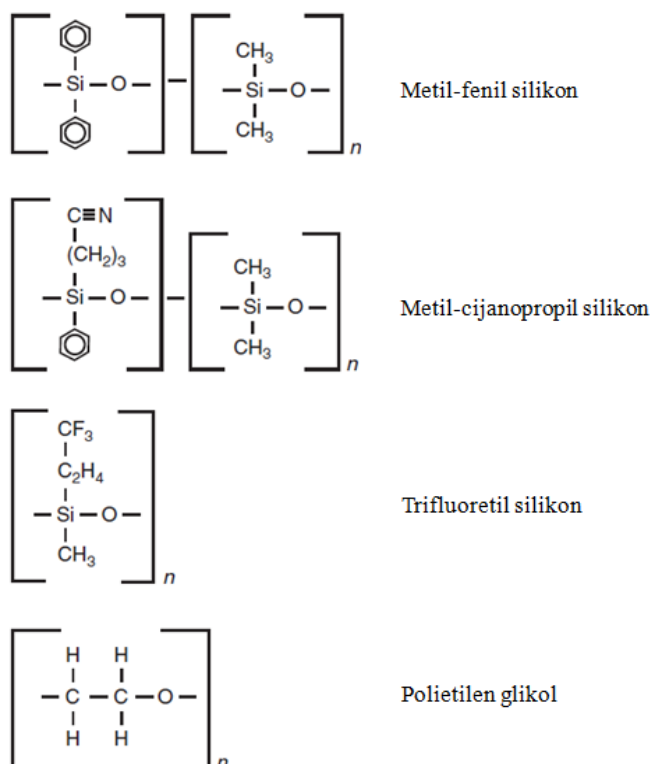


**2.14.** Šematski prikaz poprečnog preseka: a) standardne punjene i mikropakovane, b) FSOT, c) WCOT, d) SCOT i e) PLOT kolone

Da bi se postiglo adekvatno razdvajanje jedinjenja iz smeše, radna temperatura kolone mora se kontrolisati u rasponima od nekoliko °C. Po empirijskom pravilu ona iznosi nekoliko stepeni više od prosečne temperature ključanja uzorka. U tom slučaju, vreme eluiranja se kreće od 2 do 30 min. Kada se bira radna temperatura, potrebno je napraviti balans, jer se sa njenim povećanjem skraćuje vreme eluiranja, ali loše utiče na rezoluciju. Za razdvajanje komponenata vrlo različitih tački ključanja, koristi se temperaturno programiranje, koje omogućava konstantne, ili periodične promene temperature tokom hromatografskog razdvajanja.

### 2.4.3.1. Stacionarna faza

Dimetilsiloksani i 5% fenil/95% dimetilsiloksani su pogodne faze jer imaju rasprostranjenu primenu. Ove relativno nepolarne faze imaju tendenciju za razdvajanje jedinjenja prema njihovoj tački ključanja. Međutim, da bi se razdvojila jedinjenja koja imaju slične tačke ključanja, a različitu polarnost, često su neophodne selektivnije faze. Da bi se odabrala odgovarajuća stacionarna faza za određenu primenu, korisnik može da se informiše na osnovu pregleda literature ili da koristi preporuke proizvođača kolona za određene klase jedinjenja. Na raspolaganju je i softver koji korisniku pomaže da odabere odgovarajuću kolonu i eksperimentalne uslove za analizu. Strukture odabranih najčešće korišćenih faza su prikazane na slici 2.15. Stvarno vreme zadržavanja jedinjenja na određenoj fazi varira u zavisnosti od dužine kolone, debljine stacionarne faze, temperaturnih uslova i protoka gasa nosača.



**Slika 2.15.** Strukture najčešće korišćenih GC faza. Prikazane faze su rastuće polarnosti



Za svaku stacionarnu fazu tačno je definisana minimalna i maksimalna temperatura primene. Ispod minimalne temperature viskoznost faze je izražena i difuzija analita između stacionarne i mobilne faze je na taj način sprečena. Sa zagrevanjem kolone dolazi do curenja stacionarne faze i na taj način se jedan njen deo gubi. Iznad maksimalne temperature curenje značajno skraćuje vek trajanja kolone i dovodi do pojave nepoželjnih jona u masenom spektru. Kolone sa polarnom stacionarnom fazom podložnije su curenju u odnosu na one sa nepolarnom stacionarnom fazom. Proizvođači ulažu velike napore kako bi se pojava curenja stacionarne faze smanjila i kako bi se produžio vek trajanja kolone, ali je curenje i dalje prisutno na 350 °C u slučaju nepolarnih, a u slučaju polarnih stacionarnih faza i na nižim temperaturama.

Debljina stacionarne faze je važna promenljiva koja se uzima u razmatranje. Uopšteno, tanka stacionarna faza (~0,2 μm) je poželjna za rad sa masenim spektrometrom zbog slabog curenja. Pogodna je za razdvajanje jedinjenja sa visokom tačkom ključanja, ali u slučaju jedinjenja sa niskom tačkom ključanja neophodna je stacionarna faza veće debljine (~1,0 μm) da bi se obezbedilo dobro razdvajanje.

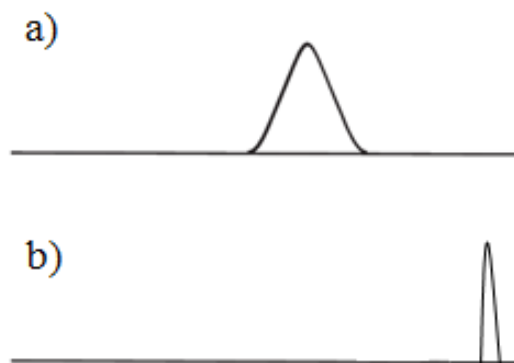
Nove kolone je potrebno kondicionirati pre upotrebe da bi se uklonio višak isparljivih sastojaka koji potiču od procesa proizvodnje i da bi se postigla stabilna bazna linija.

#### 2.4.3.2. Fizičke dimenzije i osobine kolone

Poznato je da se umesto pakovanih kolona sve češće koriste kapilarne kolone. U tabeli 2.2 upoređene su dimenzije ova dva tipa kolona. U slučaju kolone sa odgovarajućom stacionarnom fazom, promene fizičkih karakteristika mogu značajno da poboljšaju GC razdvajanje. Veoma važna karakteristika kolone je broj teorijskih podova, o čemu je već bilo reči u prethodnom poglavlju. Na slici 2.16 upoređeni su hromatogrami dobijeni kao rezultat injektovanja datog jedinjenja u kolonu sa istom stacionarnom fazom, ali sa različitim brojem platoa. Efikasnost kolone zavisi od mnogih faktora uključujući temperaturu kolone, vrstu i brzinu kretanja gasa nosača, lakoću kojom molekuli analita difunduju u i iz stacionarne faze, kao i fizičkih osobina kolone.

**Tabela 2.2.** Fizičke karakteristike kapilarnih i pakovanih kolona

Vrsta kolone	Prečnik (mm)	Dužina (m)	Opis
Kapilarne	0,1–0,53	10–60	Otvorena cev omogućava manji otpor protoku kroz kolonu (kod dužih kolona potreban je veći pritisak gasa nosača) i lakšu raspodelu analita između stacionarne faze i gasa nosača
Pakovane	2–4	1–3	Zahteva visok pritisak zbog pakovanja kako bi gas nosač prolazio kroz kolonu



**Slika 2.16.** Hromatogrami dobijeni kao rezultat injektovanja jedinjenja u kolonu sa a) 152 i b) 6167 platoa

Promene fizičkih parametara kolone imaju svoje prednosti i mane. Smanjenjem prečnika i debljine stacionarne faze smanjuje se kapacitet kolone, a takođe smanjenje debljine stacionarne faze kolone može dovesti do veće dostupnosti aktivnih mesta. Često se problemi sa kolonama manifestuju kroz prednji i zadnji rep pika, o čemu je bilo reči u prethodnom poglavlju.

Kao što je rečeno, kolona može biti izuzetno efikasna za razdvajanje jedinjenja sa sličnim tačkama ključanja, ali različitim polarnostima, zbog

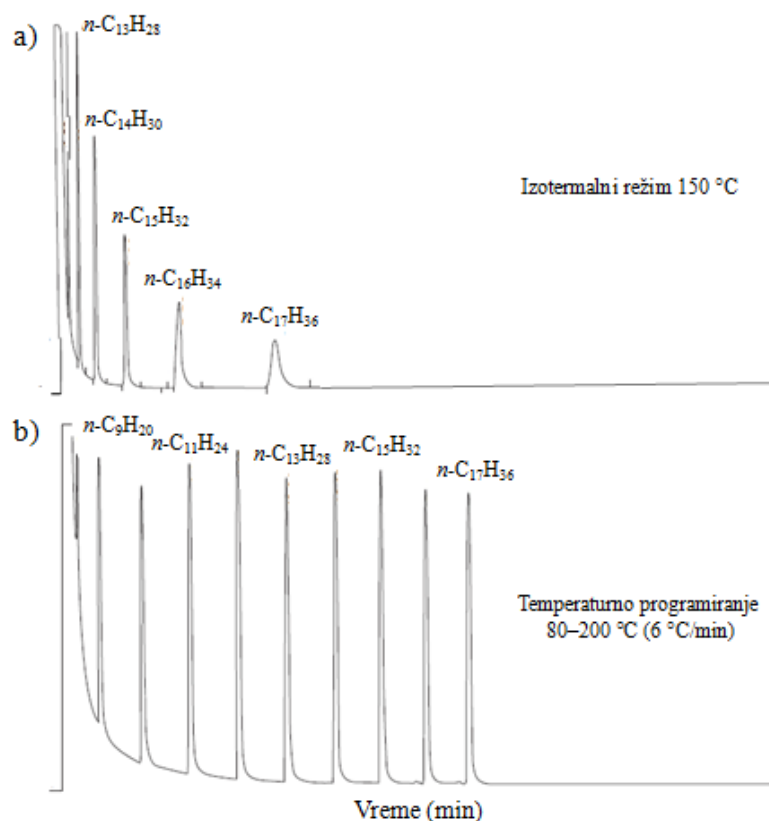
čega je potrebno razmotriti selektivnost kolone. Kapilarne kolone imaju izuzetno visoku efikasnost pa selektivnost nije toliko bitna, kao što je to slučaj kod pakovanih kolona. Ipak, da bi se slična jedinjenja razdvojila, selektivnost kolone mora biti zadovoljavajuća. U slučaju GC–MS, razdvajanje nije toliko važno ako koeluirajuća jedinjenja imaju različite masene spektre.

#### 2.4.3.3. Odabir temperature kolone

Nakon odabira kolone najvažniji korak u optimizaciji GC razdvajanja je podešavanje temperature pećnice u kojoj se nalazi kolona. Postoji više mogućnosti izvođenja analize (slika 2.17): a) pri konstantnoj temperaturi (izotermalni režim), b) uz temperaturno programiranje (gradijentni režim) pri konstantnoj brzini i c) gradijentni režim pri različitim brzinama u različitim vremenima tokom analize (višestepeno temperaturno programiranje). Na kraju, temperatura se može održavati konstantnom za različite vremenske intervale – na početku, u sredini i na kraju analize. Uopšteno, izotermalni režim se primenjuje kada je u uzorku prisutno nekoliko jedinjenja sa sličnim tačkama ključanja i polarnostima. Kada uzorak sadrži veći broj jedinjenja širokog raspona tački ključanja, temperaturno programiranje je neophodno za razdvajanje komponenata smeše.

Prednosti temperaturnog programiranja u odnosu na izotermalni režim su:

- Znatno kraće vreme trajanja analize,
- Podjednako dobro razdvajanje komponenata sa niskim i visokim tačkama ključanja,
- Ujednačena širina pikova i
- Minimalno zaostajanje komponenata sa visokim tačkama ključanja na koloni.



**Slika 2.17.** Gasni hromatogrami dobijeni razdvajanjem smeše *n*-alkana ( $\text{C}_9\text{--C}_{17}$ ) a) izotermalnim režimom i b) uz temperaturno programiranje

*Početna temperatura* zavisi od temperature pri kojoj se prvo jedinjenje eluira, rastvarača u kome se analit rastvara i načina injektovanja. Već je spomenuto da tačka ključanja rastvarača treba da bude za oko 20 °C niža u odnosu na tačku ključanja prvog analita, a početna temperatura treba da bude za 10–15 °C niža u odnosu na tačku ključanja rastvarača. Navedeni uslovi su važni zbog oblika početnih pikova koji moraju biti dobro razdvojeni od pika rastvarača. Da bi se skratilo vreme trajanja analize, poželjno je odabrati rastvarač sa tačkom ključanja koja nije mnogo niža od tačke ključanja prvog analita. U slučaju *split* injektovanja gde samo mala količina rastvarača dospeva u kolonu, početna temperatura kolone treba da bude nešto niža od temperature pri kojoj se prvo jedinjenje eluira.

*Brzina temperaturnog programiranja i višestepeno temperaturno programiranje* je najčešće u opsegu 4–20 °C/min i zavisi od broja analita u uzorku i od toga koliko su im bliska vremena eluiranja. Kod višestepenog temperaturnog programiranja trebalo bi primeniti malu brzinu za razdvajanje jedinjenja sa sličnim temperaturama ključanja. U tom slučaju brzina temperaturnog programiranja bi trebalo da raste samo kada se očekuje eluiranje jedinjenja različitih tački ključanja.

Kada se sva jedinjenja od interesa eluiraju tada bi trebalo povećati brzinu na oko 50 °C/min kako bi iz sistema izašla i jedinjenja sa visokim tačkama ključanja.

*Krajnja temperatura.* Ukoliko se sva jedinjenja eluiraju pri temperaturi koja je u velikoj meri ispod temperaturnog limita kolone i ukoliko u uzorku ili u koloni nisu prisutne nečistoće sa visokim tačkama ključanja, krajnja temperatura može biti ta pri kojoj poslednji analit napušta kolonu.

#### 2.4.4. Detektori

Velika prednost GC analize se ogleda u dostupnosti različitih detektora. Nekoliko najčešće korišćenih detektora je opisano u narednim potpoglavljima, a njihove osobine su prikazane u tabeli 2.3. Ovi detektori su dizajnirani za rad pri velikim protocima gasa u odnosu na protoke koji se primenjuju u kapilarnim kolonama i obično zahtevaju dodavanje maskirajućeg gasa helijuma ili azota.

**Tabela 2.3.** Osobine odabranih gasno-hromatografskih detektora

Tip	Granica detekcije (g/L)	Opseg linearnosti	Osobine
Detektor termičke provodljivosti	$10^{-5}$ – $10^{-6}$	$10^3$ – $10^4$	Univerzalan, merenje promene termičke provodljivosti
Plameno-jonizacioni detektor	$10^{-12}$	$10^6$ – $10^7$	Selektivan za sagorljiva organska jedinjenja

Nastavak tabele 2.3

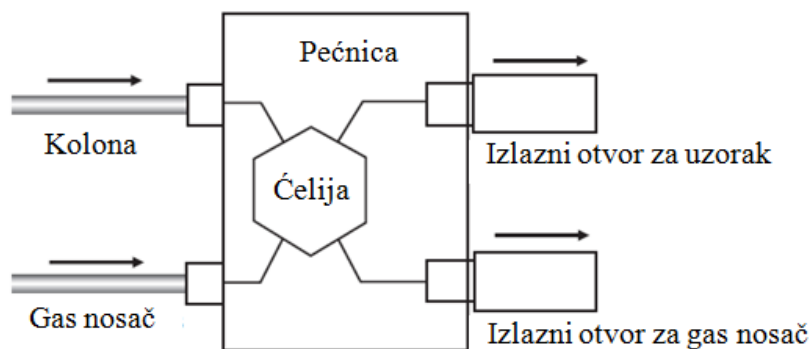
Detektor na bazi zahvata elektrona	$10^{-14}$	$10^2-10^3$	Selektivan za jedinjenja koja sadrže atome sa velikim afinitetom prema elektronima
Plameno-fotometrijski detektor	$10^{-13}$	$10^2$	Selektivan za jedinjenja koja sadrže S i P
Azot-fosforni detektor	$10^{-8}-10^{-14}$	$10^5-10^7$	Selektivan za jedinjenja koja sadrže N i P
Fotojonizacioni detektor (eng. <i>Photoionization Detector</i> , PID)	$10^{-8}-10^{-12}$	$10^5$	Selektivan za aromatična jedinjenja
Maseno-spektrometrijski detektor	$10^{-12}$	*	Univerzalan

\*Varira u zavisnosti od tipa masenog spektrometra kao i vrste jedinjenja koja se analiziraju.

#### 2.4.4.1. Detektor termičke provodljivosti

Za razliku od drugih detektora detektor termičke provodljivosti (eng. *Thermal Conductivity Detector*, TCD) je univerzalan detektor pomoću koga se mogu detektovati sva jedinjenja koja izlaze iz GC kolone. Koristi se češće za detekciju permanentnih gasova nego za organska jedinjenja. Na slici 2.18 je prikazan tipičan TCD koji sadrži ćeliju sa dva kanala, za protok gasa nosača i komponenata uzorka. Eluat iz analitičke kolone protiče kroz jedan kanal, dok drugi kanal služi kao referentni i povezan je sa izvorom čistog gasa nosača. Unutar ćelije je Wheatston-ov (Vitstonov) most sa četiri filamenta. Iz kolone gas nosač sa komponentama uzorka prolazi kroz dva filamenta, dok čist gas nosač prolazi kroz druga dva filamenta. Kada čist gas nosač prolazi kroz oba kanala detektora, tada nema signala. U slučaju prolaska jedinjenja različitih termičkih provodljivosti, nastaje signal koji je proporcionalan razlici u termičkoj provodljivosti između gasa nosača i smeše gasa nosača i date komponente. Granica detekcije analita odgovara

razlici u termičkoj provodljivosti između analita i gasa nosača. Helijum se uglavnom koristi kao gas nosač s obzirom na to da ima veću vrednost termičke provodljivosti u odnosu na većinu analita.



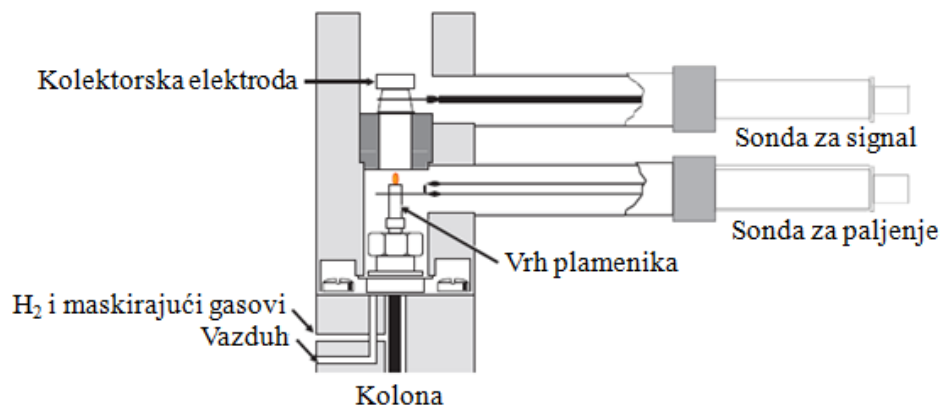
**Slika 2.18.** Šema detektora termičke provodljivosti

TCD je nedestruktivan detektor i ima malu osjetljivost, pa se u slučaju veoma niskih koncentracija komponente iz uzorka mogu određivati pomoću drugog detektora. Tako na primer, vodonik, kiseonik i azot iz uzorka mogu da se detektuju pomoću TCD, a gasoviti sumpor ili organska jedinjenja mogu proći kroz TCD i nakon toga se detektovati pomoću plameno-fotometrijskog ili plameno-jonizacionog detektora.

#### 2.4.4.2. Plameno-jonizacioni detektor

Plameno-jonizacioni detektor (eng. *Flame Ionization Detector*, FID) se ubraja u red najčešće korišćenih detektora u GC i služi za određivanje jedinjenja sa ugljovodoničnim vezama. Zahteva upotrebu vodonika i vazduha u odnosu 1:10. Gasovi se mešaju i gore iznad plamenika (slika 2.19). Nastaje voda pa se lako može proveriti da li plamen svetli držanjem predmeta sa glatkom površinom nad detektorom i posmatranjem kondenzacije vodene pare na njegovoj površini. Negativni polarizacioni napon se primenjuje između vrha plamena i kolektorske elektrode. Dok se analiti eluiraju iz kolone prolaze kroz plamen i sagorevaju dajući jone. Elektroni nastali u plamenu uzrokuju proticanje struje u prostoru između

vrha plamena i elektrode. Pojačavanjem ovog strujnog toka nastaje signal. FID imaju širok raspon linearnosti ( $\sim 10^7$ ).



**Slika 2.19.** Šema plameno-jonizacionog detektora

#### 2.4.4.3. Detektor na bazi zahvata elektrona

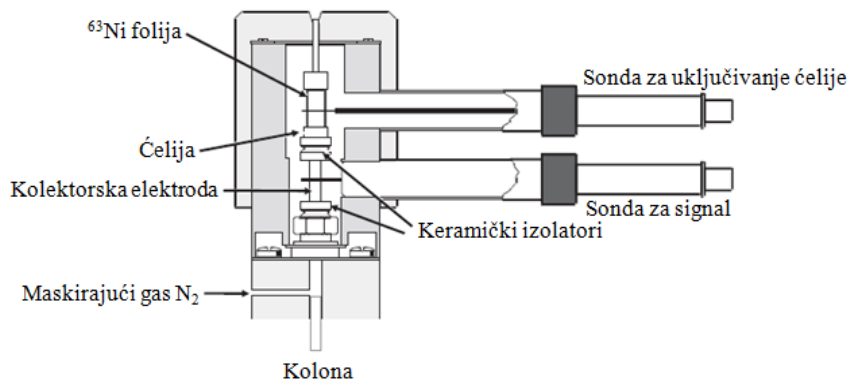
Detektor na bazi zahvata elektrona (eng. *Electron Capture Detector*, ECD, slika 2.20) ima nisku granicu detekcije za supstance koje imaju sposobnost da hvataju elektrone (elektrofilni analiti), a istovremeno daje snažan odgovor za halogenovana jedinjenja, kao i za mnoge druge molekule kao što su  $N_2O$ , nitro-organska jedinjenja, diketoni i diacetali.

ECD sadrži radioaktivnu foliju, obično  $^{63}Ni$ , koja je emiter  $\beta$ -čestica i koristi se za jonizaciju azota ili argon/metan gasa nosača. Elektroni nastali jonizacijom migriraju do anode i stvaraju stalnu struju. Ako GC eluat sadrži jedinjenje koje hvata elektrone, struja se smanjuje jer se negativni joni kreću sporije od elektrona. Izmereni signal predstavlja gubitak električne struje. Za mnoga jedinjenja poput višehalogenovanih organskih molekula, ECD ima nižu granicu detekcije od bilo kog drugog GC detektora, uključujući maseni spektrometar.

Nedostaci ECD se odnose na relativno uzan opseg linearnosti ( $10^3$ – $10^4$ ) i na odgovor koji u velikoj meri zavisi od broja i tipa elektronskih funkcionalnih grupa u molekulu. To znači da  $CCl_4$  daje mnogo jači odgovor



nego  $\text{CH}_3\text{Cl}$ . U slučaju halogena, odgovor se povećava sa povećanjem atomske mase; jod daje najjači odgovor, a fluor najslabiji.



**Slika 2.20.** Šema detektora na bazi zahvata elektrona

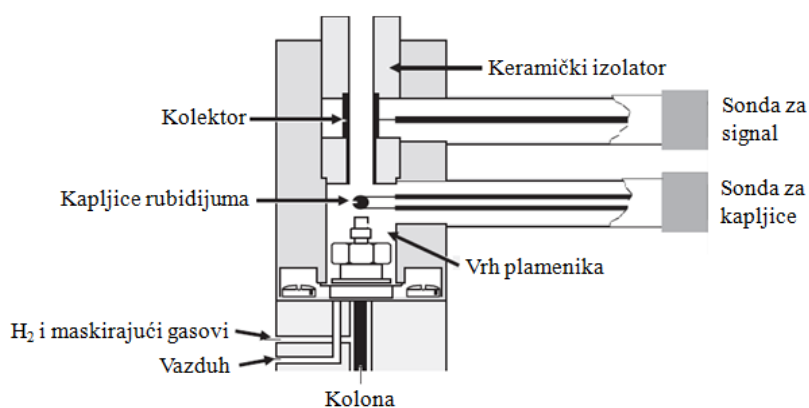
#### 2.4.4.4. Plameno-fotometrijski detektor

Plameno-fotometrijski detektor (eng. *Flame Photometric Detector*, FPD) se prvenstveno koristi za detekciju isparljivih organskih i neorganskih molekula koji sadrže sumpor i fosfor. Sa FPD, kao i pomoću FID, GC eluat koji sadrži analit sagoreva u plamenu vodonik/vazduh pri čemu nastaju hemiluminiscentni proizvodi. Korišćenjem optičkih filtera za odabir talasnih dužina specifičnih za element od interesa i fotomultiplikatora, jedinjenja koja sadrže sumpor ili fosfor mogu se selektivno detektovati. Za razliku od azot-fosfornog detektora, koji detektuje i azot i fosfor, kao i ECD, koji je osjetljiv na više različitih grupa, FPD je visoko-selektivan i osjetljiv je samo na sumpor ili fosfor, zavisno od toga koji je filter postavljen.

Kada sumporna jedinjenja sagorevaju u plamenu, nastaje pobuđeni molekul sumpora,  $\text{S}_2^*$ , a odgovor je češće drugog reda nego što je linearan. Jedinjenja fosfora daju linearni odgovor. U slučaju FPD nastaju i sporedni proizvodi kao posledica emisije ugljovodonika, zbog čega se moraju koristiti i filteri uskog opsega u cilju eliminacije ove ometajuće emisije. Ova vrsta filtera negativno utiče na granicu detekcije.

#### 2.4.4.5. Azot-fosforni detektor

Azot-fosforni detektor (eng. *Nitrogen Phosphorus Detector*, NPD, slika 2.21) je osjetljiv za jedinjenja iz uzorka koja sadrže azot i/ili fosfor. Azotna jedinjenja uglavnom daju dobar odgovor ako je prisutna C–N veza, a detektor se generalno koristi za detekciju svih organskih jedinjenja koja sadrže azot, kao i za cijano-vodonik (HCN). Većina isparljivih organskih i neorganskih jedinjenja koja sadrže fosfor mogu se detektovati pomoću ovog detektora.



**Slika 2.21.** Šema azot-fosfornog detektora

NPD zahteva upotrebu vazduha i vodonika kao pomoćnih gasova, pri čemu je odnos vazduha i vodonika približno 100:1, dok plamen nije prisutan. Protok vodonika je obično oko 3–4 mL/min. Gasovi okružuju zagrejane kapljice rubidijum-sulfata. Jedinjenja koja sadrže azot i fosfor povećavaju struju u plazmi jona rubidijuma. Reakcija sa jedinjenjima fosfora je sporija nego sa jedinjenjima azota, što se manifestuje pojavom razvučenih pikova tih jedinjenja.

Detektor je bio veoma popularan za analize uzoraka koji sadrže aktivne komponente lekova i pesticida, ali nakon što je bazni maseni spektrometar postao pristupačniji, masena spektrometrija je počela češće da se koristi u te svrhe.

#### 2.4.5. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom

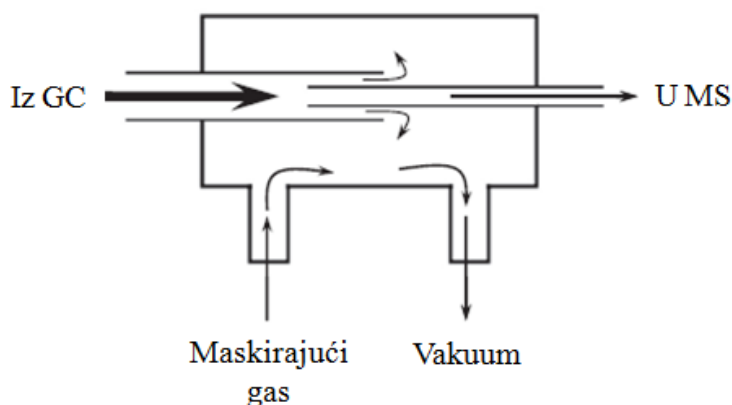
Kao što je pomenuto, kombinacija gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom jedna je od najmoćnijih tehnika za identifikaciju organskih jedinjenja složenih smeša, iako se uspešno primenjuje samo na ograničen broj nepolarnih i lako isparljivih organskih jedinjenja. Pri gasno-hromatografskoj analizi polarnih organskih supstanci potrebno je znatno više vremena, zbog koraka derivatizacije koji je neophodan posle prečišćavanja ekstrakta uzorka. Uloga derivatizacije je da prevede polarna organska jedinjenja u manje polarne isparljive i termički stabilnije analite čime se omogućava GC–MS analiza, odnosno poboljšano razdvajanje, detekcija i kvantifikacija, ali koja je često praćena neadekvatnom ponovljivošću. Nedvosmislena identifikacija pomoću GC–MS nije moguća za veliki broj supstanci, uglavnom zbog toga što analizirane komponente nisu isparljive na ulazu u gasni hromatograf. Pored toga, jedinjenja slične strukture (npr. *cis* i *trans* izomeri) generalno imaju slične masene spektre (sličan put fragmentacije), što takođe otežava identifikaciju. Primena naprednih instrumentalnih tehnika, kao što je tečna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom omogućila je prevazilaženje ovih problema. Tečni hromatograf omogućava razdvajanje složene smeše jedinjenja sa širokim spektrom hemijske polarnosti i različitim molekulskim masama, a maseni spektrometar njihovu detekciju zbog visoke osetljivosti i selektivnosti.

Velika osetljivost masenog spektrometra (potrebna količina uzorka je reda  $\sim 10^{-10}$  g), kao i mogućnost brzog snimanja masenog spektra (manje od 1 s) omogućavaju direktno povezivanje GC kolone sa masenim spektrometrom i direktno snimanje masenih spektara svih eluiranih jedinjenja. Analizom dobijenih spektara dolazi se do struktura komponenata ispitivane smeše. Prema tome, kod ove kombinacije uloga gasne hromatografije se svodi na razdvajanje, a masene spektrometrije na identifikaciju komponenti.

Veliki problem kod povezivanja ova dva instrumenta je razlika u pritiscima. Dok je u masenom spektrometru visoki vakuum, na izlazu iz GC kolone pritisak je nešto iznad atmosferskog. Da bi se ova razlika kompenzovala (za kolone većeg prečnika, 530–750  $\mu\text{m}$ ), a istovremeno

povećala koncentracija jedinjenja koja dospevaju u jonski izvor masenog spektrometra, GC kolone se povezuju sa jonskim izvorom preko separatora. Zadatak separatora je selektivno uklanjanje malih molekula gasa nosača iz eluata i propuštanje znatno većih organskih molekula u jonski izvor. Dva uređaja koja se danas koriste su *open split* interfejs i molekularni separator (eng. *jet separator*).

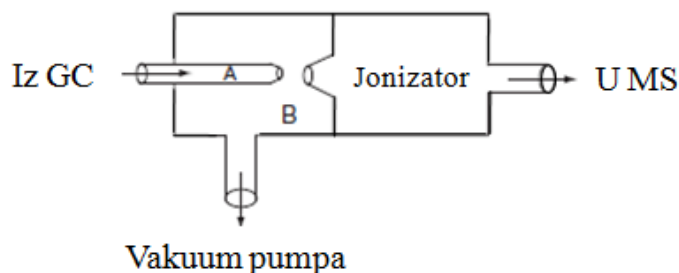
*Open split* interfejs prikazan na slici 2.22 obezbeđuje adekvatnu vezu između GC kolone i masenog spektrometra. Protok u jonizacionom izvoru zavisi od dimenzija kapilarne kolone. Funkcija ovog uređaja zavisi od maskirajućeg gasa (najčešće helijuma) koji ulazi na mestu blizu kraja kolone ukoliko je protok eluata manji od 1 mL/min. Celokupan sadržaj ili samo deo eluata iz kolone ulazi u jonizacioni izvor, u zavisnosti od protoka sadržaja iz kolone, kao i maskirajućeg gasa. *Open split* interfejs omogućava da sa povećanjem protoka maskirajućeg gasa skoro celokupan sadržaj gasa nosača i analiziranih komponenti dospe u jonizacioni izvor. Kod *open split* interfejsa kraj kolone je povezan sa kapilarnom (reduktorom) kroz koju prolazi maskirajući gas (obično vodonik ili helijum). Kraj kolone je postavljen u liniji sa reduktorom koji ulazi u jonizacioni izvor, što omogućava da iz kolone u jonizacioni izvor dospe fiksna količina eluata. Reduktor obezbeđuje potreban protok od 1 mL/min na ulazu u jonizacioni izvor. Što je prečnik kolone veći u odnosu na reduktor, to je gubitak analita koji dospeva u jonizacioni izvor veći (višak izlazi napolje), što nepovoljno utiče na granicu detekcije. Najpogodnije je da se koristi kolona koja obezbeđuje protok od 1 mL/min.



**Slika 2.22.** Prikaz *open split* interfejsa

Najpopularniji uređaj koji se koristi u slučaju pakovanih kolona je *molekulski separator*, koji se i dalje koristi u modernoj instrumentaciji sa kapilarnim kolonama. Rad ovog separatora zasnovan je na principu difuzije. Kao što je prikazano na slici 2.23, eluat dolazi iz GC, širi se kroz raspršivač A i usmerava se prema otvoru u zidu susedne komore, na putu ka jonizacionom izvoru. U procepu između tačaka A i B dolazi do širenja gasova. Jedinjenja koja imaju veliku moć difuzije (malih molekulskih masa) difunduju pod pravim uglom. Stoga, ako se smeša organskih molekula od ~400 Da u helijumu koji ima masu od 4 Da, propusti kroz raspršivač A, helijum ima veću tendenciju da pod pravim uglom difunduje u komoru B u odnosu na molekule analita. To znači da veći broj organskih molekula mase 400 Da ostaje u snopu koji dospeva u jonizacioni izvor, u poređenju sa atomima helijuma, što znači da većina gasa nosača difunduje u komoru B i uklanja se pomoću vakuum pumpe.

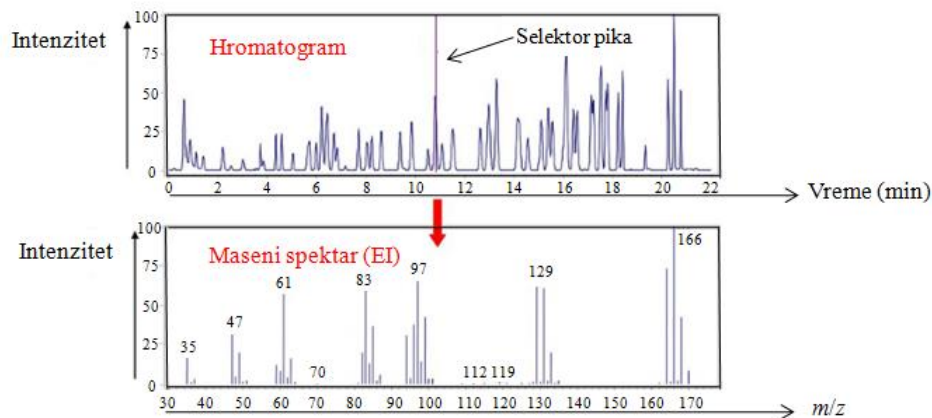
Važan nedostatak molekulskog separatora je taj što zahteva protok od ~20 mL/min. Najšire kapilarne kolone (prečnika 720  $\mu\text{m}$ ) imaju optimalnu vrednost protoka manju od 15 mL/min, što znači da je za pravilno funkcionisanje ovog uređaja na izlazu iz GC kolone potrebno dodati maskirajući gas. To dodatno razblažuje analit u struji gasa koji ide ka izvoru jona i nepovoljno utiče na granicu detekcije, što ovaj uređaj ne čini pogodnijim za korišćenje u odnosu na prethodno opisani.



**Slika 2.23.** Prikaz molekulskog separatora

Kao što je rečeno, u novije vreme je ovaj problem prevaziđen upotrebom kapilarnih kolona sa maksimalnim protokom od 2 mL/min i *direktnim uvođenjem* razdvojenih komponenta smeše u jonski izvor masenog spektrometra.

Masena spektrometrija se zasniva na tome da se analizirani uzorak prevodi u stanje jonizovanog gasa, čije komponente imaju međusobno različit odnos mase i naelektrisanja ( $m/z$ ). Kretanjem naelektrisanih čestica, tj. jona u električnom ili magnetnom polju polazni snop jona se razlaže upravo na osnovu razlike  $m/z$ . Nastali joni se provode kroz analizator koji razdvaja jone u prostoru i/ili vremenu. Iz analizatora se joni usmeravaju na detektor i daju električni signal koji se registruje na računaru. Dakle, pored snimanja masenih spektara, maseni spektrometar ima i ulogu gasnohromatografskog detektora. Neprekidnim merenjem ukupne jonske struje, tj. sume struja svih jona koji postoje u jonskom izvoru za vreme izvođenja analize dobija se gasni hromatogram (slika 2.24). Maseni spektar se dobija merenjem struja koje potiču od jona razdvojenih prema  $m/z$  vrednostima. Predstavlja se kao zavisnost jonske struje od  $m/z$  vrednosti (slika 2.24). Uobičajeno je da se intenzitet jonske struje u masenom spektru izražavaju (u %) u odnosu na intenzitet osnovnog jona koji iznosi 100%.



**Slika 2.24.** Prikaz hromatograma i masenog spektra

GC–MS uređaji su povezani sa računarom, što u velikoj meri povećava mogućnosti ove tehnike. Kompjuterski se može obavljati niz operacija, od kojih su najvažnije:

- Neprekidna kontrola rada celog uređaja,

- Neprekidno automatsko snimanje masenih spektara za vreme hromatografske analize,
- Prikupljanje, obrada i skladištenje svih GC–MS podataka,
- Određivanje bruto formula jona na osnovu precizno izmerenih masa i
- Identifikacija jedinjenja poređenjem njihovih masenih spektara sa spektrima poznatih jedinjenja iz baza.

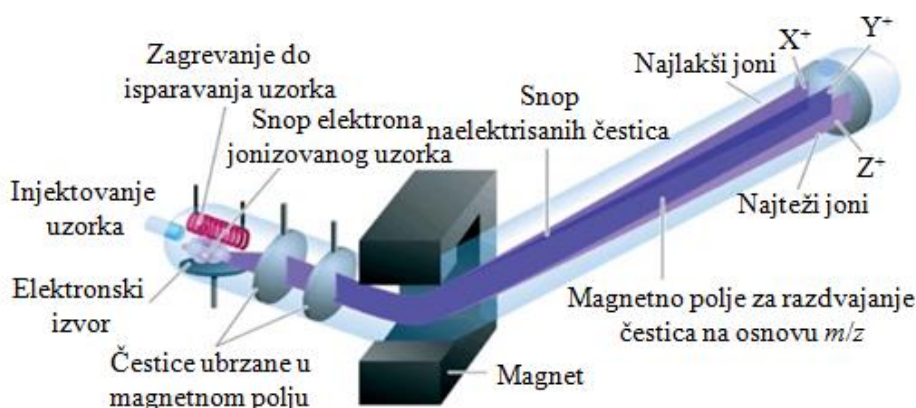
Veliki značaj povezivanja GC–MS sistema sa računarom se ogleda u tome što se snimljeni spektri mogu odmah upoređivati sa spektrima poznatih jedinjenja iz baze računara. Ako se radi o jedinjenju čiji spektar ne postoji u bazi, onda je često moguće, na osnovu sličnosti sa spektrom nekog poznatog jedinjenja pretpostaviti kom strukturnom tipu ono pripada.

Primena računara omogućava uklanjanje jednog od problema koji se često javlja u slučaju GC–MS analize, a to je eluiranje tečne faze sa kolone i to posebno na višim temperaturama. Zbog toga se u masenim spektrima hromatografski razdvojenih jedinjenja često javljaju maksimumi koji potiču od tečne faze, a korišćenjem softvera moguće je njihovo naknadno uklanjanje.

Da bi jedinjenje bilo analizirano u masenom spektrometru mora biti naelektrisano. Međutim, većina organskih molekula je neutralna pa ih je potrebno jonizovati u izvoru. Osnovni deo masenog spektrometra je *jonizacioni izvor (jonizator)* koji obezbeđuje naelektrisane čestice, tj. jone, ubrzava ih i šalje u naredni deo, *analizator*, koji vrši selekciju, tj. razdvajanje jona u zavisnosti od njihovog odnosa  $m/z$ , o čemu je već bilo reči. Razdvojeni joni se detektuju pomoću *detektora* i signal se beleži u bazi podataka radi dalje analize.

Važan deo masenog spektrometra je sistem za održavanje niskog pritiska  $10^{-2}$ – $10^{-5}$  Pa, tj. *sistem za visoki vakuum*. Visoki vakuum obezbeđuje minimalnu verovatnoću molekulske reakcije jona, tj. omogućava jonima da sa jednog kraja instrumenta dospeju na drugi, a da tom prilikom ne dođe do njihovog sudara sa drugim molekulima i do njihove neutralizacije ili reakcije fragmentacije.

Osnovne funkcije masenog spektrometra su, kao što je pomenuto: jonizacija reprezentativnog dela molekula iz uzorka, razdvajanje jona prema njihovoj masi, odnosno prema  $m/z$  i merenje relativne zastupljenosti (prinos jona u % na određenoj masi, tj. na  $m/z$ ). Put jona kroz maseni spektrometar je prikazan na slici 2.25.



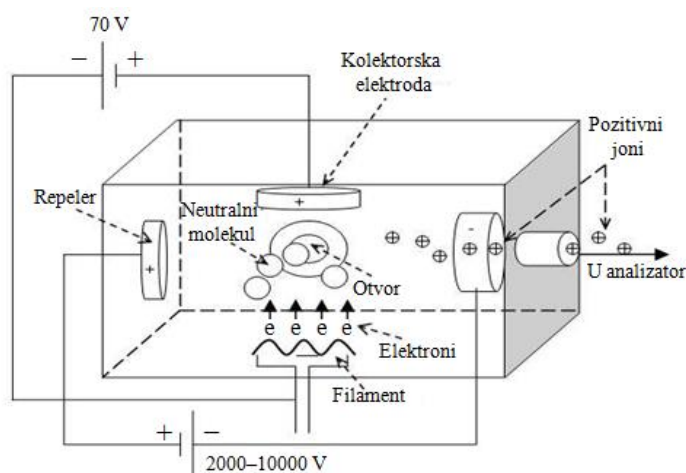
**Slika 2.25.** Put jona u masenom spektrometru

Proces jonizacije u *jonizatoru* (slika 2.26) podrazumeva dovođenje energije molekulu, pri čemu se izbacuje jedan ili više elektrona. Elektroni koji se koriste za jonizaciju nastaju propuštanjem struje kroz filament od volframa, koji se sastoji od katodne na jednoj i anodne ploče na drugoj strani. Jonizacija se odvija pri energiji elektrona od 50 do 70 eV. Količina propuštene struje utiče na broj elektrona emitovanih sa filamenta. Električno polje ubrzava elektrone dok prolaze kroz jonizator, usmerava ih i povećava im energiju. Normalno na električno polje, deluje permanentni magnet. Rezultanta dejstva dva polja uzrokuje helikoidno kretanje elektrona. Kada molekuli analita prođu kroz ovakav elektronski snop, prelaze u jone, pri čemu može doći i do fragmentacije molekula na dva ili veći broj fragmenata. Fragmentacija je poželjna jer pojava fragmenata u spektru ukazuje na to od kojih je komponenata sastavljen ispitivani molekul. Dešifrovanjem pojedinih fragmenata može se dobiti struktura molekula.



Najčešće se molekul fragmentiše na različite načine dok jedan deo ostane ceo i u spektru daje signal s najvećom vrednošću mase. Dakle, strukturne informacije mogu se dobiti preko specifičnih fragmentacionih reakcija, tj. modom za praćenje izabranog fragmenta (eng. *Selected Reaction Monitoring*, SRM) ili modom za praćenje višestruke fragmentacije (eng. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM). Snaga masene spektrometrije leži u činjenici da su maseni spektri različitih jedinjenja dovoljno specifični da omogućavaju njihovu identifikaciju sa velikim stepenom poverenja, veoma često i sa potpunom sigurnošću.

U slučaju GC–MS, gasoviti eluat se jonizuje u jonizatoru u momentu kada dospeva u maseni spektrometar iz GC kolone. Važno je napomenuti da eluat sadrži mobilnu fazu (obično molekuli vodonika ili atomi helijuma), molekule analita, isparljive komponente matriksa koje se eluiraju sa analitom i molekule koji nastaju curenjem stacionarne faze (obično ciklični siloksani). U slučaju određenih tehnika jonizacije, joni koji predstavljaju osnovni molekul imaju dovoljno energije da podležu fragmentaciji na jone manje mase. U GC–MS, većina nastalih jona ima jednostruko naelektrisanje. Samo joni aromatičnih ugljovodonika podvrgnuti elektronskoj jonizaciji formiraju jone sa dvostrukim naelektrisanjem; ovi joni su manjeg intenziteta u poređenju sa jonima iste mase, ali jednostrukog naelektrisanja. Kao što je rečeno, maseni spektrometar razdvaja jone prema odnosima njihovih  $m/z$ ; prema tome, s obzirom da gotovo svi joni imaju jednostruko naelektrisanje,  $m/z$  vrednost jona smatra se masom jona.



**Slika 2.26.** Šema elektronskog jonizatora

Nakon inicijalnog nastanka jona koji predstavljaju osnovni molekul i njegove naknadno nastale fragmente, oni se ubrzavaju električnim poljem napona od 2000 do 10000 V i kreću iz jonskog izvora u analizator. U GC–MS sistemu se primenjuje EI, hemijska jonizacija (eng. *Chemical Ionization*, CI), negativna jonizacija na bazi zahvata elektrona (eng. *Electron Capture Negative Ionization*, ECNI), jonizacija polja (eng. *Field Ionization*, FI) i u mnogo manjem obimu hemijska jonizacija pri atmosferskom pritisku (eng. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI). Korišćenjem EI i FI nastaju molekularni radikal-joni pozitivnog naelektrisanja ( $M^+$ ), dok primenom ECNI nastaju molekularni radikal-joni negativnog naelektrisanja ( $M^-$ ). To su joni koji imaju isti elementarni sastav kao molekul iz koga su nastali, ali imaju jedan elektron više ili manje u odnosu na prvobitni molekul. Pomoću CI i APCI nastaju protonovani molekuli ( $MH^+$ ), deprotonovani joni ( $[M-H]^-$ ) ili aduktivi joni ( $[M + C_2H_5]^+$  ili  $[M + Cl]^-$ ). Svi ovi joni imaju različit elementarni sastav i različite mase u odnosu na masu polaznog molekula.

Primenom CI, ECNI, FI i APCI tokom procesa jonizacije molekulu se predaje mala količina energije i zbog toga se nazivaju tehnikama meke jonizacije.

Izbijanjem valentnih elektrona iz molekula analita, EI dovodi do nastanka molekularnih jona velike energije sa, kao što je pomenuto, pozitivnim naelektrisanjem ( $M^+$ ). Dok elektron prolazi pored molekula, usled njegovog naelektrisanja narušava se elektronski oblak oko molekula, elektron predaje kinetičku energiju oblaku, a ukoliko je predata energija dovoljna, molekul odbacuje valentni elektron i formira se katjon. Značajan broj ovih molekularnih jona podleže fragmentaciji, u zavisnosti od strukture. Različiti molekularni joni mogu da proizvode fragmentne jone sa različitim vrednostima  $m/z$  i različitim elementarnim sastavima. Nastajanje i naknadno detektovanje fragmentnih jona dovodi do pojave karakterističnog EI masenog spektra, koji se ponekad naziva „EI otisak prsta” i karakterističan je za dato jedinjenje. Molekularni joni nastali primenom EI ponekad imaju toliko veliku energiju da se na njihovim masenim spektrima ne uočavaju  $M^+$  pikovi. Zbog toga se tehnike meke jonizacije i EI mogu smatrati komplementarnim, jer se pomoću tehnika meke jonizacije obično dobijaju molekularne mase analita. Fragmenti proizvedeni pomoću EI su ono što je

neophodno za utvrđivanje strukture polaznog molekula, dok meke tehnike jonizacije imaju ograničenu primenu u određivanju identiteta analita zbog nedostatka nastanka fragmentnih jona.

CI je druga po važnosti tehnika jonizacije koja se u velikoj meri koristi u GC–MS. U slučaju CI gas reagens, koji učestvuje u procesu jonizacije jedinjenja koja su od interesa, se jonizuje elektronskim snopom koji nastaje ubrzavanjem elektrona iz filameta, kao što je slučaj i kod EI. Međutim, potencijal koji se koristi za ubrzanje elektrona u slučaju CI je mnogo veći (~200 V), čime se obezbeđuje da elektroni prolaze kroz gusti oblak reagens gasa. Tipični reagens gasovi koji se koriste u CI su amonijak, metan i izobuten. Za razliku od EI gde se jedinjenja koja su od interesa direktno jonizuju slobodnim elektronima, kod CI se reagens gasovi koriste u procesu jonizacije. Broj molekula u sastavu reagens gasa je daleko veći nego što je to slučaj sa jedinjenjima koja se određuju. U početku se reagens gas jonizuje i nakon toga jonizuje jedinjenja koja su od interesa. Ovaj prenos jonizacije u velikoj meri smanjuje energiju koju apsorbuju jedinjenja koja su od interesa. Zbog ovog manjeg energetskeg uticaja, CI se smatra mekom jonizacijom, jer veoma često ne dolazi do fragmentacije jona polaznog molekula.

ECNI je najmanje korišćena u odnosu na prethodne dve tehnike jonizacije u GC–MS analizi. Jonizacija se dešava kada elektrofilni analit „hvata” toplotno-energetski elektron (0,1 do ~10 eV), pri čemu nastaje molekulski jon negativnog naelektrisanja ( $M^{-}$ ).

FI tehnika je konkurentna CI, jer takođe rezultira nastajanjem malog broja jona koji predstavljaju polazni molekul. U slučaju FI se jonizacija molekula analita u gasovitoj fazi odvija u električnom polju ( $10^7$ – $10^8$  V/mL) koje se održava između ivica dve elektrode.

Tehniku APCI treba smatrati održivom alternativnom tehnikom meke jonizacije. U ovom slučaju jonizacija se odvija izvan vakuuma masenog spektrometra i zato je vek trajanja jonske optike smeštene neposredno pre analizatora duži.

Masena spektrometrija postala je popularna tehnika, jer su MS *analizatori* vrlo osetljivi i imaju rasprostranjenu primenu u „otkrivanju” jedinjenja koja su prisutna u vrlo niskim koncentracijama u složenim matriksima. Ovi analizatori su visoko selektivni pri identifikaciji analita, što

je zasnovano na molekulskoj masi jedinjenja. Selektivnost masenog analizatora zavisi od rezolucije, opsega molekulskih masa i brzine snimanja spektra. Odabir instrumenta zavisi od zahtevnosti analize, a izvodi se na osnovu navedenih karakteristika. Rezolucija ili moć razdvajanja,  $R$ , definiše se kao najmanja razlika masa, koje se još uvek mogu razdvojiti. Praktično se izračunava na osnovu dimenzija snimljenog pika prema jednačini 2.2:

$$R = \frac{x}{b_{1/2}} \frac{m}{\Delta m} \quad (2.2)$$

gde je  $m$  – nominalna masa merenog pika,  $\Delta m$  – razlika masa između dva pika,  $x$  – rastojanje između maksimuma pikova,  $b_{1/2}$  – širina pika na polovini visine.

U masenom analizatoru, delovanjem magnetnog i/ili električnog polja joni ispitivanih analita razdvajaju se prema odnosu  $m/z$ . Postoji veliki broj komercijalno dostupnih masenih analizatora, a u slučaju GC–MS se najčešće koriste kvadrupolni maseni filter (eng. *Quadrupole Mass Filter*, QMF) i kvadrupolni analizator na principu jonske zamke (eng. *Quadrupole Ion Trap*, QIT), kao i TOF analizator. Maseni analizatori su različiti po konfiguraciji i dizajnu, opsegu masa koje detektuju, rezoluciji, tačnosti merenja mase i stoga se koriste u različite analitičke svrhe.

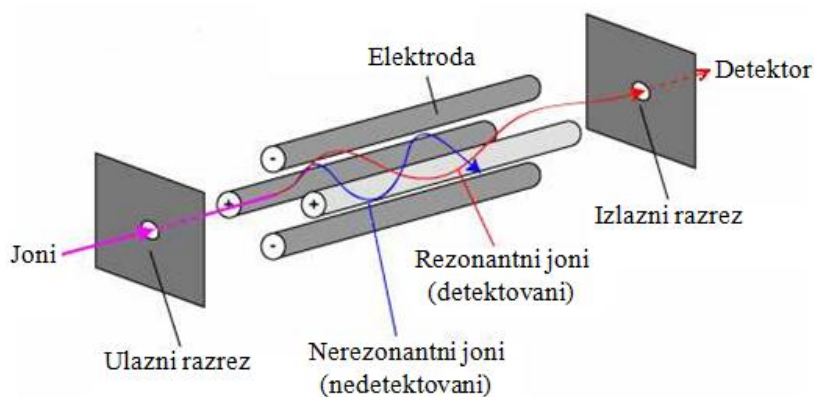
*Kvadrupolni maseni analizator* se koristi od 50-ih godina XX veka. Danas je najčešće korišćen, a naziva se „maseni filter” jer propušta samo jone istog odnosa  $m/z$ . Najčešće se koristi kvadrupolni analizator zbog pogodnih dimenzija, velike brzine snimanja spektra, visoke efikasnosti transmisije (broj jona koji stigne do detektora), umerenog vakuuma ( $p \sim 10^{-4}$  mbar) i niske cene, iako spada u analizatore niske rezolucije.

Kvadrupolni analizator (slika 2.27) se sastoji od četiri međusobno paralelne elektrode, kojima se saopštava osnovni potencijal definisan izrazom 2.3:

$$\pm \Phi = U + V \cos \omega t \quad (2.3)$$

gde su  $\Phi$  – osnovni potencijal,  $U$  – jednosmerni potencijal,  $V$  – amplituda naizmeničnog potencijala,  $\omega$  – frekvencija naizmeničnog potencijala i  $t$  – vreme.

Osnovni potencijal dve susedne elektrode je istog intenziteta, ali različitog naelektrisanja. Dok prolaze kroz analizator, joni se filtriraju na osnovu  $m/z$  vrednosti, tako da samo pojedini bivaju propušteni, jer imaju stabilnu putanju (kreću se stojećim trodimenzionalnim talasima), dok ostali bivaju razelektrisani na elektrodama.



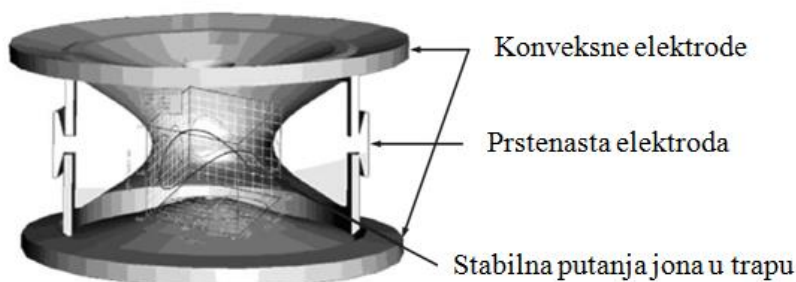
**Slika 2.27.** Šema kvadrupolnog analizatora

Snimanje masenog spektra izvodi se promenom jednosmerne i naizmenične komponente napona, pri čemu je njihov odnos konstantan. Radio frekventni potencijal odbija, ili prenosi jone na osnovu  $m/z$  vrednosti, fokusirajući ih naizmenično u različitim ravnima. Za vreme prve polovine radiofrekventnog ciklusa, gornja i donja elektroda su pozitivno, a leva i desna negativno naelektrisane. Ovakav raspored naelektrisanja potiskuje pozitivne jone u horizontalnu ravan. U drugoj polovini ciklusa polarizovanost je obrnuta, pa se joni fokusiraju u vertikalnoj ravni. Električno polje kvadrupolnog analizatora nastavlja da se menja na isti način pa nastaje trodimenzionalni talas kretanja jona. Da bi stigli na

kolektor, amplituda duž dve ose treba da bude takva, da onemogući privlačenje jona od strane elektrode. Odabirom odgovarajuće radio frekvencije i potencijala, analizator će propuštati jone većeg  $m/z$  odnosa do detektora, a joni manjeg  $m/z$  odnosa bivaju privučeni ka elektrodama.

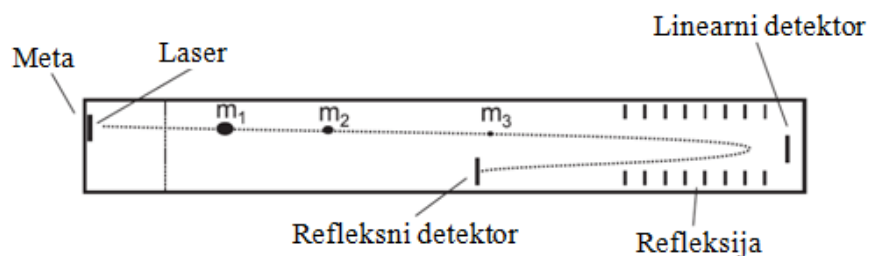
Jednosmerni napon takođe ima uticaja na kretanje jona. Uticaj je veći na „teže” jone, jer se sporije refokusiraju pod dejstvom radio frekventnog polja, nego „laki” joni. Zbog toga se oni polako usmeravaju dalje od centra kvadrupola, a pri kraju analizatora privlače ih elektrode.

*Analizator na principu jonske zamke* je uređaj u kojem dolazi do zarobljavanja jona delovanjem elektromagnetnog polja. IT sadrži prstenastu elektrodu i dve konveksne elektrode (slika 2.28), između kojih se uspostavlja trodimenzionalno elektromagnetno polje u kome joni u širokom opsegu  $m/z$  vrednosti prate stabilnu, kompleksnu putanju, odnosno zarobljeni su. U ovom analizatoru svi eksperimenti izvode se na istom mestu, ali u različito vreme. Analizator na bazi jonske zamke ima nisku rezoluciju (jediničnu) i postoji mogućnost nastajanja neželjenih jon-molekulskih reakcija unutar analizatora. U cilju smanjenja pojave jon-molekulskih reakcija neophodno je uvođenje helijuma radi smanjenja kinetičke energije jona i njihovog fokusiranja u centar zamke, što istovremeno obezbeđuje maksimalnu rezoluciju i osetljivost. Glavne prednosti ovog masenog analizatora su što je jednostavan za rukovanje i održavanje, a pored toga može biti povezan sa drugim analizatorima, kao što je kvadrupol.



**Slika 2.28.** Šema analizatora na principu jonske zamke

*Analizator sa vremenom preleta* spada u red najjednostavnijih, brzih analizatora, ali ima slabiju moć razdvajanja. Prednosti TOF su neograničen opseg  $m/z$ , niska granica detekcije i velika brzina skeniranja. Princip rada zasniva se na razdvajanju jona na osnovu vremena potrebnog da različiti joni pređu poznato rastojanje do detektora, nakon ubrzanja u električnom polju (slika 2.29). Na početku procesa svi joni imaju istu energiju i njihove brzine su proporcionalne odnosu  $m/z$ . U izvoru TOF instrumenta svi joni nastaju istovremeno brzom eksplozijom sa filameta. Ova metoda se zove pulsna jonizacija. Zatim se joni ubrzavaju izvan jonskog izvora korišćenjem električnog potencijala od 2–2,5 kV. Kroz cev preleta (bez prisustva električnog polja) dužine oko 100 cm putuju joni i sva energija se u toku kretanja pretvara u kinetičku energiju. Joni veće mase putuju sporije. Maseni spektar se dobija akumulacijom izlaznog signala sa detektora u funkciji vremena, a zatim se ta vrednost konvertuje u  $m/z$  vrednost. Joni koji se razlikuju po vremenu preleta za najmanje 1 ns mogu se detektovati. Kada se najsporiji joni detektuju sledeći set jona se formira i ubrzava električnim poljem izvan izvora ka detektoru. Opseg  $m/z$  koji biva podvrgnut analizi mora se pažljivo birati jer joni sa većim  $m/z$  od zadatog opsega mogu nastaviti da se kreću ka detektoru, iako su novi joni formirani i ubrzani.



Oblast ubrzanja električnim poljem    Oblast skretanja

**Slika 2.29.** Šema TOF analizatora

Kada se jonske vrste razdvoje u masenom analizatoru potrebno ih je detektovati. **Detekcija** se najčešće izvodi električnim putem, tako što se meri relativna zastupljenost – TIC. Kada su vrednosti relativnih zastupljenosti male jačine ( $10^{-9}$ – $10^{-6}$  A), koriste se razni jednosmerni električni pojačivači, elektron multiplikatori i fotomultiplikatori.

Princip rada elektron multiplikatora zasniva se na upotrebi više uzastopnih „Faradejevih šolja” sa rastućim potencijalom. Jonski snop iz masenog analizatora pada na elektrodu multiplikatora i izbija elektrone, obično jedan do dva elektrona po jonu. Oni bivaju ubrzani na putu ka sledećoj „Faradejevoj šolji” koja ima viši potencijal nego prethodna, pa se emituje još veći broj elektrona i tako redom 8 do 20 puta. Na taj način ulazni signal pojačava se od 10 do 12 puta zbog čega ima visoku osetljivost. Najveća osetljivost postiže se pri naponu od oko 3000 V, ali ovako visok napon skraćuje vek trajanja detektora.

Kod fotomultiplikatora joni izlaze iz masenog analizatora, prevode se u fotone i kao takvi detektuju. Ovaj uređaj ima manju osetljivost, ali znatno duži vek trajanja.

Maseni spektrometar radi pod visokim *vakuuom*, a pritisak je reda veličine  $10^{-2}$  do  $10^{-7}$  mbar. Ovakve uslove obezbeđuju dve pumpe: mehanička i difuziona, ili turbomolekularna pumpa. Prva smanjuje pritisak na  $10^{-3}$  mbar, nakon čega se uključuje druga, osnovna pumpa koja postiže viši vakuum.

Danas se *kvalitativna gasnohromatografska analiza* izvodi najčešće korišćenjem GC–MS tehnike gde, kao što je napomenuto, gasni hromatograf služi da razdvoji komponente smeše, a maseni spektrometar da snimi masene spektre izolovanih komponenti. Poređenjem masenih spektara izolovanih komponenti sa masenim spektrima čistih jedinjenja vrši se identifikacija nepoznatih komponenti smeše. Svi GC–MS sistemi danas se isporučuju sa bibliotekom masenih spektara velikog broja jedinjenja u elektronskom obliku. Osim toga, komercijalno su dostupne biblioteke masenih spektara u elektronskom obliku, kao i programi za njihovo korišćenje, odnosno brzu pretragu i poređenje. U slučaju analize jednostavnijih smeša i dobrog poklapanja dobijenih masenih spektara sa literaturnim, maseni spektar je dovoljan za identifikaciju jedinjenja prisutnih u smeši. Međutim, kod analiza složenih smeša koje sadrže komponente sa sličnim retencionim vremenima i gde nije postignuta najbolja rezolucija, dobijeni maseni spektri mogu biti značajno različiti od literaturnih i tada je neophodno koristiti i retencione parametre za identifikaciju komponenti smeše.



Kombinacijom podataka o retencionim parametrima i literaturnih masenih spektara dolazi se do nedvosmislene identifikacije nepoznatog jedinjenja.

## LITERATURA

1. Boyd R.K., Basic C., Bethem R.A. Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry. (2008). John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
2. Buletin 923A: Solid phase microextraction – theory and optimization of conditions, solid phase microextraction application guide and additional SPME literature. Supelco – Sigma – Aldrich, četvrto izdanje, 1999.
3. Introduction to MS Quantitation and Modes of LC/MS Monitoring, Mass Spectrometry Educational Resource, <https://www.ionsource.com/tutorial/msquan/intro.htm> (pristupljeno 19. 01. 2020).
4. Miliosavljević, S., Strukturne instrumentalne metode, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 1997.
5. Pawliszyn, J.: US Patent 5 691 206, 1997.
6. Robards, K., Haddad, P.R., Jackson, P.E. Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods, poglavlje 3, drugo izdanje, Elsevier Academic Press, 2004, str. 1–34.
7. Sparkman, O.D., Penton, Z.E., Kitson, F.G., Gas Chromatography and Mass Spectrometry, A Practical Guide, drugo izdanje, Elsevier Academic Press, Burlington MA, 2011.

---

# 3. TEČNA HROMATOGRAFIJA

---

- 3.1. Uvod
- 3.2. Efikasnost kolona u LC
  - 3.2.1. Uticaj veličine čestica stacionarne faze
  - 3.2.2. Ekstrakolonsko širenje pikova u LC
- 3.3. Instrumentacija
  - 3.3.1. Sistem za snabdevanje mobilnom fazom
  - 3.3.2. Sistem pumpi
  - 3.3.3. Sistem za unos uzorka
  - 3.3.4. Kolone za HPLC
    - 3.3.4.1. Analitička kolona
    - 3.3.4.2. Pretkolona
    - 3.3.4.3. Kontrola temperature u koloni
  - 3.3.5. Tipovi pakovanja kolona
  - 3.3.6. Detektori
    - 3.3.6.1. Vrste detektora
    - 3.3.6.2. UV-vis detektor
    - 3.3.6.3. Infracrveni detektori
    - 3.3.6.4. Fluorescentni detektori
    - 3.3.6.5. Detektori indeksa prelamanja
    - 3.3.6.6. Detektor raspršivanja svetlosti na isparenom uzorku
    - 3.3.6.7. Elektrohemijski detektori
    - 3.3.6.8. Masenospektrometrijski detektori
- 3.4. Podeona hromatografija
  - 3.4.1. Kolone sa hemijski vezanom stacionarnom fazom
  - 3.4.2. Razvoj metoda u podeonoj hromatografiji
  - 3.4.3. Gradijentno eluiranje

---

3.4.4. Primena podeone hromatografije

3.5. Adsorpciona hromatografija

LITERATURA

---

### 3.1. UVOD

Kao što je u uvodnom delu napomenuto pod tečnom hromatografijom se podrazumeva svaka hromatografska tehnika u kojoj je pokretna faza tečnost. Tečna hromatografija se najčešće izvodi u koloni tzv. kolonska hromatografija, ali obuhvata i planarnu hromatografiju (tankoslojnu i na hartiji). Tečna hromatografija se najčešće koristi od svih tehnika analitičkog razdvajanja. Razlozi popularnosti ove metode su njena osetljivost, tačnost, jednostavnost automatizacije, pogodnost za odvajanje neisparljivih ili termički nestabilnih jedinjenja (a takvih je oko 85% od svih poznatih jedinjenja), jonskih jedinjenja, kao i jedinjenja na osnovu veličine njihovih molekula. Ima široku primenu u analizi analita i uzoraka koji su od značaja za različite grane industrije, mnoge oblasti nauke i zaštitu životne sredine, u forenzici, kliničkim ispitivanjima i dr. Primeri takvih analita uključuju ugljovodonike, masne kiseline, amine, proteine, aminokiseline, peptide, nukleinske kiseline, alkaloidne, ugljene hidrate, terpenoide, steroide, metal-organska jedinjenja, razne neorganske supstance i dr.

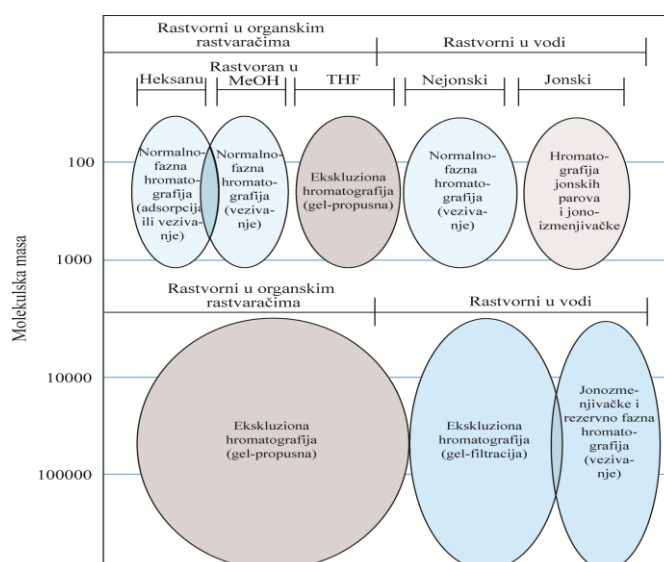
Prema mehanizmu razdvajanja (zadržavanja) analita u tečnoj hromatografiji razlikujemo pet vrsta:

- Adsorpciona (tečno–čvrsta),
- Podeona ili particiona (tečno–tečna),
- Jonoizmenjivačka,
- Eksluziona i
- Afinitetna hromatografija.

Na slici 3.1 su prikazani različiti tečno-hromatografski postupci koji su komplementarni u svojoj primeni. Podela hromatografskog razdvajanja prvenstveno zavisi od molekulske mase ( $M_w$ ), polarnosti i naelektrisanja analita. Za analizu makromolekula ( $M_w > 1000$ ), uključujući i biološke polimere – proteine, polinukleotide i polisaharide tradicionalno se primenjuju eksluziona hromatografija. Ukoliko se analiziraju molekuli koji su nerastvorni u vodi primenjuje se gel-propusna hromatografija (eng. *Gel-Permeation Chromatography*, GPC), a za one koji su rastvorni u vodi gel-

filtracija (eng. *Gel-Filtration Chromatography*, GFC). Međutim, mogu se primeniti i druge nedenedurirajuće tehnike – jonoizmenjivačka hromatografija i hromatografija zasnovana na hidrofobnim interakcijama (HILIC). I konvencionalna reverzno-fazna hromatografija može doći u obzir kod razdvajanja proteina, mada visok sadržaj organskih modifikatora u mobilnoj fazi često dovodi do denaturacije.

Za jonske vrste sa nižom molekulskom masom veoma često se koristi jonoizmenjivačka hromatografija. Isto tako za analizu jakih kiselina, jakih baza i uopšte jonskih ili jonizabilnih jedinjenja reverzno-faznom hromatografijom može se postići hromatografijom sa građenjem jonskih parova (eng. *Ion-Pair Chromatography*, IPC). Male polarne ali nejonske molekulske vrste kao i članovi homolognog niza najefikasnije se razdvajaju primenom reverzno-fazne hromatografije. Adsorpciona hromatografija je ranije korišćena za odvajanje nepolarnih vrsta, strukturnih izomera i klasa jedinjenja, kao npr. alifatičnih ugljovodonika od alifatičnih alkohola. Zbog problema sa reproduktivnošću retencije i ireverzibilnom adsorpcijom, adsorpciona hromatografija je u velikoj meri zamenjena normalno-faznom hromatografijom. Među specijalnim oblicima LC često se koristi afinitetna hromatografija za izolaciju i pripremu biomolekula, a hiralna hromatografija se koristi za odvajanje enantiomera.



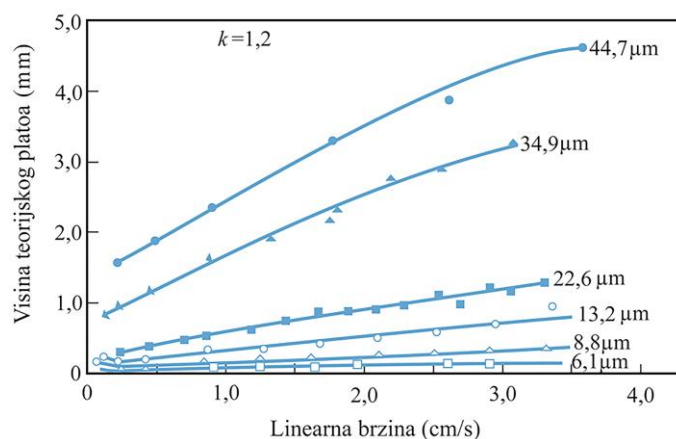
**Slika 3.1.** Izbor pogodnog tipa hromatografije

## 3.2. EFIKASNOST KOLONA U LC

Diskusija o proširenju zona u Uvodnom delu uglavnom je primenljiva i na LC. U ovom odeljku biće prikazan važan uticaj veličine čestica u stacionarnoj fazi, kao i dva dodatna izvora širenja zona koji su ponekad od velikog značaja u LC.

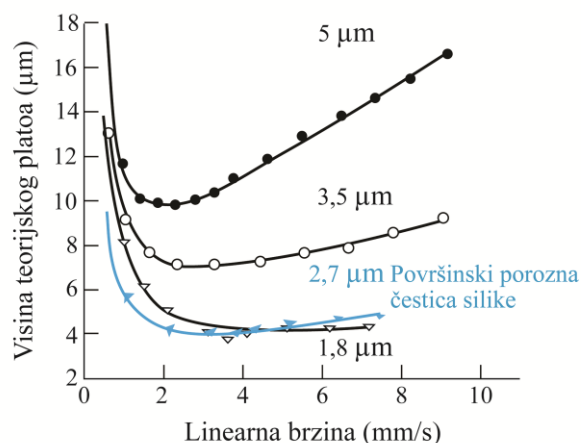
### 3.2.1. Uticaj veličine čestica stacionarne faze

Koeficijent prenosa mase pokretne faze,  $c_M$ , u jednačini 1.14 direktno je povezan sa kvadratom prečnika čestica,  $d_p$ , koje čine pakovanje kolone. Imajući to u vidu efikasnost LC kolone bi trebala značajno da se poveća sa smanjenjem veličine čestica. Kao što se na slici 3.2. može videti smanjenje veličine čestica od 45 na 6,1  $\mu\text{m}$  rezultira u preko deset puta manjoj visini teorijskog platoa. Takođe se može zapaziti da samo pri nižim veličinama čestica ( $\leq 13,2 \mu\text{m}$ ) kriva ima minimum koji je predviđen jednačinom 1.14. Sa daljim smanjenjem veličine čestica smanjuje se i visina teorijskog platoa (slika 3.3).



**Slika 3.2.** Uticaj veličine čestica i protoka na visinu teorijskog platoa u HPLC. Dimenzije kolone: 30 cm x 2,4 mm. Rastvor: N,N'-dietil-p-aminoazobenzen. Mobilna faza: smeša heksana, metilen-hlorida i izopropil-alkohola

Takođe se može zapaziti da pri maloj veličini čestice povećanje protoka iznad optimalnog ne utiče na visinu teorijskog platoa. Na istoj slici je prikazana i promena visine teorijskog platoa za male pelikularne čestice (plava kriva) o čemu će biti više reči u odeljku 3.3.5.



**Slika 3.3.** Uticaj veličine malih čestica i protoka na visinu teorijskog platoa u LC

Međutim, sa smanjenjem veličine čestica raste i neophodan pritisak da bi se ostvario protok mobilne faze (tabela 3.1) i dat je sledećom jednačinom:

$$P = f \frac{v\eta L}{\pi r^2 d_p^2} \quad (3.1)$$

gde su:  $v$  protok,  $\eta$  viskoznost rastvarača,  $L$  dužina kolone,  $r$  poluprečnik kolone,  $d$  prečnik čestice i  $f$  faktor koji zavisi od oblika čestica i pakovanja.

**Tabela 3.1.** Karakteristike u funkciji veličine čestice

Velicina čestica, $d_p$ (μm)	Retenciono vreme (min)	Broj platoa (N)	Potreban pritisak (bar)
5,0	30	25000	19
3,0	18	42000	87
1,5	9	83000	700
1,0	6	125000	2300

### 3.2.2. Ekstrakolonsko širenje pikova u LC

U LC pored širenja pikova u koloni, koje je proporcionalno zadržavanju, može doći i do značajnog širenja pikova i izvan pakovanja kolone tzv. ekstrakolonsko širenje (eng. *extracolumn band broadening*), tj. može doći do disperzije u ostalim delovima instrumenta – injektoru, detektoru i cevima koje povezuju pojedine delove instrumenta. Ovde dolazi do širenja pikova zbog razlike u protoku između slojeva tečnosti blizu zidova cevi i u centru cevi. Zbog toga, mobilna faza u središnjem delu cevi kreće se brže od perifernog dela. U GC ekstrakolonsko širenje u celini se kompenzuje difuzijom. Difuzija u tečnostima je, međutim, znatno sporija i širenje traka ove vrste često postaje primetno.

Nađeno je da je doprinos ekstrakolonskog širenja na ukupnu visinu teorijskog platoa,  $H_{ek}$ , dat sledećom jednačinom:

$$H_{ek} = \frac{\pi r^2 v}{24 D_M} \quad (3.2)$$

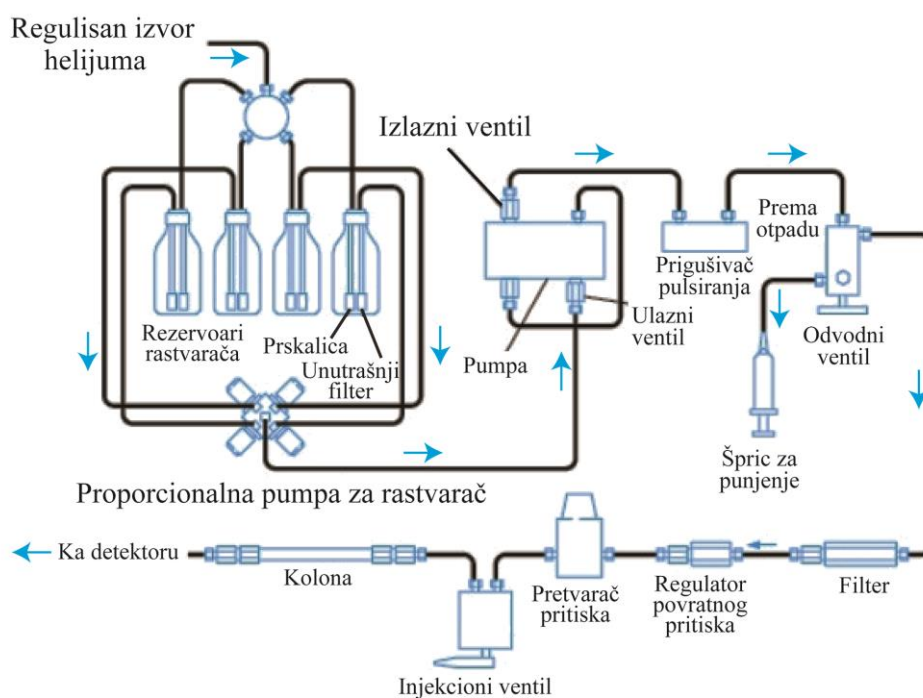
gde je  $v$  linearna brzina mobilne faze (cm/s),  $r$  prečnik cevi (cm), a  $D_M$  koeficijent difuzije analita u mobilnoj fazi (cm<sup>2</sup>/s).

Ekstrakolonsko širenje može postati prilično ozbiljan problem kod pikova sa malim retencionim vremenima i kada se koriste uske (kapilarne) kolone. Pošto ekstrakolonski delovi sistema ne povećavaju efikasnost razdvajanja u LC, već samo dovode do širenja pikova, ekstrakolonsku zapreminu treba svesti na minimum. Preporučeno je da ekstrakolonska zapremina treba da bude manja od 10% zapremine pika. Kod klasičnih HPLC kolona (npr. 150 mm x 5 mm) ovo je lako postići, dok kod kapilarnih kolona ( $\phi < 2$  mm) ovo predstavlja ozbiljan problem i neophodno je izvršiti određene izmene hardvera. U ovom slučaju neophodno je smajiti zapremine injektora i detektorske ćelije i koristiti kapilarne kolone malih dužina za povezivanje pojedinih modula LC, kako da bi se ovaj izvor širenja pikova sveo na minimum. Ovo je u velikoj meri i razlog ograničene rasprostranjenosti kapilarne LC. Male ekstrakolonske zapremine su takođe od velikog značaja kod gradijentnog eluiranja.

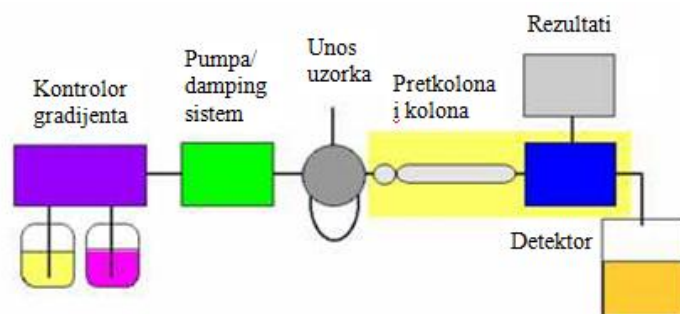


### 3.3. INSTRUMENTACIJA

Kao što je u odeljku 3.2.1 konstatovano (tabela 3.1) pritisci od nekoliko stotina atmosfera (bara) su potrebni da bi se postigli zahtevani protoci u koloni sa pakovanjima čije su čestice od 3–10  $\mu\text{m}$ , koja su uobičajena u savremenim LC. Zbog ovih visokih pritisaka, oprema za HPLC je složenija i skuplja od opreme za druge vrste hromatografije. Iz tog razloga tehnika se zove tečna hromatografija pod visokim pritiskom, odnosno visokopritisna tečna hromatografija (eng. *High Pressure Liquid Chromatography*) ili tečna hromatografija visoke efikasnosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*) čiji je akronim HPLC. Na slikama 3.4 i 3.5 je prikazana šema tipičnog HPLC instrumenta.



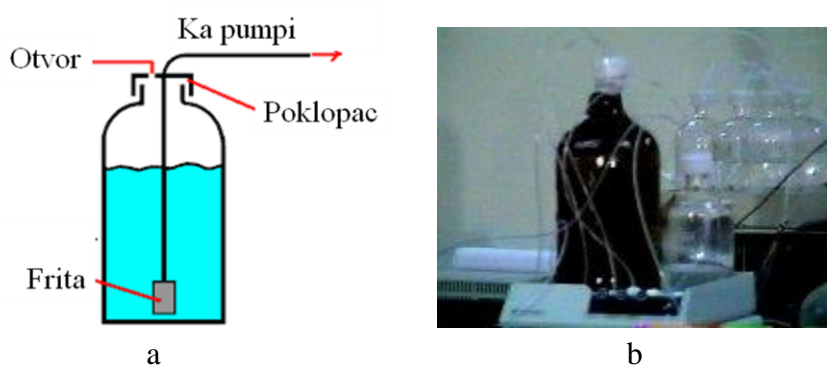
Slika 3.4. Blok dijagram tipičnog HPLC instrumenta



**Slika 3.5.** Jednostavna šema aparature za tečnu hromatografiju.

### 3.3.1. Sistem za snabdevanje mobilnom fazom

Savremeni HPLC instrument opremljen je sa jednim ili više rezervoara od kojih svaki sadrži 500 cm<sup>3</sup> ili više rastvarača mobilne faze. Rezervoar bi trebalo da bude izrađen od materijala koji je otporan na dejstvo komponenata mobilne faze i koji ne otpušta neželjene komponente u rastvarač. Rezervoari za mobilnu fazu mogu biti od standardnog laboratorijskog staklenog posuđa, poput čaša ili tikvica prekrivenih aluminijumskom folijom do većih posuda, poput boca za rastvarače, do namenskog staklenog posuđa koje uključuje ugrađenu opremu za mešanje i degaziranje (slika 3.6).



**Slika 3.6.** „Generički” rezervoar za mobilnu fazu prikazuje glavne komponente rezervoarskog modula (a), rezervoari za mobilnu fazu (b)

Rastvarači koji čine mobilnu fazu moraju biti visokog stepena čistoće (*for HPLC analysis, HPLC gradient grade, for trace analysis* i sl.). Iz mobilne faze je neophodno ukloniti rastvorene gasove i prašinu. Naime, rastvoreni gasovi mogu dovesti do nereproduktivnog protoka mobilne faze i širenja pikova. Pored toga, mehurići i prašina mogu da ometaju rad većine detektora. Rastvoren kiseonik razara kolonu i apsorbuje u intervalu 200–250 nm.

Postoji nekoliko načina za uklanjanje rastvorenih gasova i prašine. Eksterni degazeri se mogu sastojati od sistema vakuum pumpi, destilacionog sistema, uređaja za grejanje i mešanje, ultrazvučnog kupatila, ili od sistema za prodivavanje (eng. *sparging*) inertnog slabo rastvorljivog gasa (npr. helijum) pri čemu se rastvoreni gasovi istiskuju. Često sistemi sadrže i sredstvo za filtriranje prašine i čestica iz rastvarača kako bi se sprečilo da te čestice oštete pumpe ili sisteme za ubrizgavanje ili začepi kolonu. Na primer, pogodan način obrade rastvarača pre unošenja u rezervoar je filtriranje kroz membranske filtre od regenerisane celuloze, teflona i sl. (materijal se bira prema prirodi rastvarača), sa prečnikom pora od tipično 0,45  $\mu\text{m}$  ili 0,2  $\mu\text{m}$  pod vakuumom. Ovim postupkom se uklanjaju gasovi kao i suspendovane materije. Kod nekih HPLC su degazeri i filtri sastavni delovi HPLC sistema kao što je prikazano na slici 3.4. Postupci pri online degaziranju mogu biti prodivavanje helijumom ili primena vakuuma.

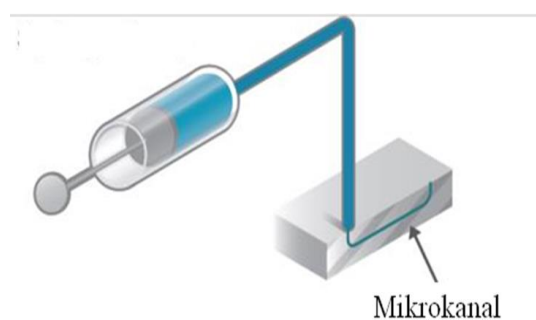
Analiti se sa kolone mogu eluirati na dva načina: ***izokratski*** (*isocratic elution*) i ***gradijentno*** (*gradient elution*). Eluiranje sa jednim rastvaračem ili smešom rastvarača sa konstantnim sastavom tokom cele hromatografske analize naziva se izokratsko eluiranje. Kod gradijentnog eluiranja koriste se dva (a ponekad i više) sistema rastvarača koji se značajno razlikuju u polarnosti i menjaju se u sastavu tokom razdvajanja, tj. sastav mobilne faze je promenljiv tokom hromatografske analize. Odnos dva rastvarača se varira na unapred programirani način, ponekad kontinualno a ponekad u nizu koraka o čemu će biti više reči u odeljku 3.4.3. Savremeni HPLC instrumenti često su opremljeni gradijentnim ventilima koji unose rastvarače iz dva ili više rezervoara u odnosima koji se mogu kontinualno menjati.

### 3.3.2. Sistem pumpi

Sistem pumpi ima zadatak da obezbedi potreban pritisak. Zahtevi koje pumpe treba da zadovolje u HPLC su: (1) stvaranje pritiska do oko 400 bara, (2) bez oscilacija, (3) protok u opsegu od 0,1 do 10 mL/min, (4) reproduktivnost protoka od 0,5% (relativno) ili bolje i (5) otpornost na koroziju od strane raznih rastvarača. Visoki pritisci proizvedeni pumpama u tečnoj hromatografiji ne predstavljaju opasnost od eksplozije, jer tečnosti ne mogu da se komprimuju. Međutim, pri visokim pritiscima može doći do curenja rastvarača što može da izazove požar ili da štetno utiče na okolinu pri korišćenju određenih rastvarača.

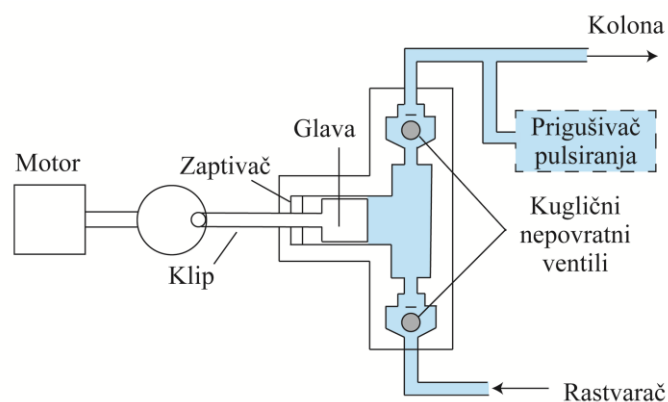
U tečnoj hromatografiji se najčešće prema mehanizmu potiskivanja koriste dve vrste pumpi: pumpe sa špricem (eng. *syringe pumps*, *displacement pumps*) i klipne pumpe (eng. *reciprocating pumps*). Klipne pumpe se koriste u skoro svim modernim komercijalnim hromatografima.

**Pumpe sa špricem.** Pumpe za špricem se sastoje od komore šprica u kojoj se nalazi klip koji se pokreće motorom u jednom smeru (slika 3.7). Ove pumpe proizvode protok koji obično ne zavisi od viskoznosti i povratnog pritiska. Pored toga obezbeđuju ravnomeran protok, bez oscilacija. Nedostaci ovakve pumpe su što imaju ograničeni kapacitet mobilne faze (~250 mL) zbog jednokratnog istiskivanja i javljaju se znatne poteškoće kada se mobilna faza mora menjati. Primenuju se samo pri niskim protocima, tj. kod kapilarnih i *microbore* HPLC.



**Slika 3.7.** Izgled pumpe sa špricem za HPLC

**Klipne pumpe.** Klipne pumpe obično se sastoje od male komore tzv. glave i klipa (slika 3.8). Pri povlačenju klipa dolazi do otvaranja ulaznog nepovratnog ventila pri čemu se zatvara izlazni ventil i komora se puni tečnošću. Pri potiskivanju klipa dolazi do obrnutog procesa, tj. otvaranja izlaznog ventila i zatvaranja ulaznog. Na taj način se istiskuje mala zapremina tečnosti (35–400  $\mu\text{L}$ ) iz komore ka koloni. Tečnost je u direktnom kontaktu sa klipom. Kao alternativa, pritisak se može preneti na tečnost preko fleksibilne dijafragme, koja je hidraulički potisnuta klipom. Nedostatak rada klipnih pumpi je što pritisak, a time i protok rastvarača, ima oscilacije. Ove oscilacije se moraju prigušiti jer doprinose šumu bazne linije na hromatogramu pri korišćenju nekih vrsta detektora čime se povećava granica detekcije. Iz tog razloga savremeni HPLC instrumenti koriste klipne pumpe sa dve glave (slika 3.8). U ovom slučaju dok jedna glava potiskuje tečnost ka koloni druga glava se puni. Na taj način su oscilacije pritiska, odnosno protoka mnogo manje nego kod pumpe sa jednom glavom. Prednosti klipne pumpe su mala unutrašnja zapremina, visok izlazni pritisak (do 700 bara), mogućnost primene gradijentnog eluiranja, neograničen rezervoar tečnosti i konstantan protok koji je u velikoj meri nezavisan od povratnog pritiska iz kolone i viskoznosti tečnosti.



**Slika 3.8.** Klipna pumpa za HPLC

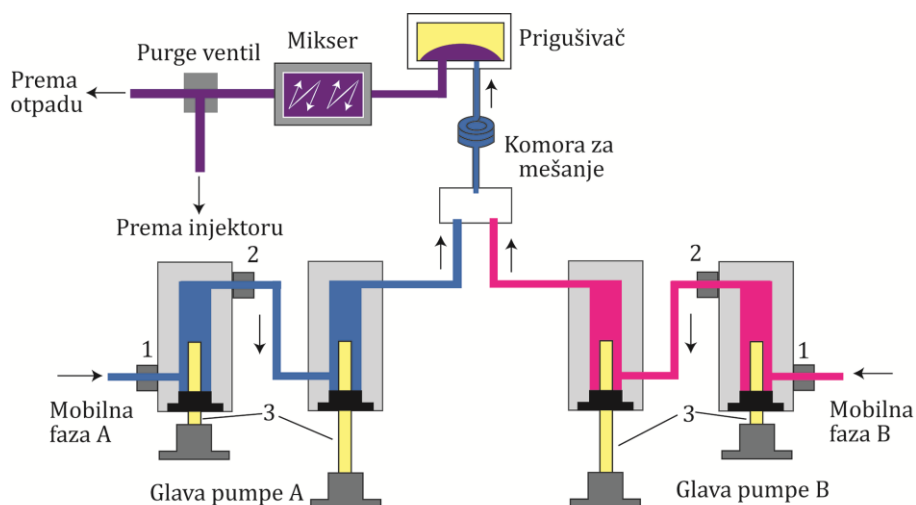
Ipak i primenom klipne pumpe sa dve, čak i sa tri glave protok tečnosti nije kontinualan (bez oscilacija), zbog čega mnogi sistemi imaju prigušivače koji se postavljaju iza pumpe a pre injektora. Jedan od najčešće korišćenih prigušivača je duga, spiralno uvijena kapilarna cev koja je sposobna da akumulira višak energije tj. pritiska. Ove kapilare treba da imaju što manju zapreminu kako bi ekstrakolonsko širenje pika bilo svedeno na minimum.

**Sistemi za kontrolu i programiranje protoka.** Kao deo sistema pumpi, mnogi komercijalni instrumenti su opremljeni računarom kontrolisanim uređajima za merenje protoka koji registruju pad pritiska preko restriktora koji se nalazi na izlazu iz pumpe. Svaka razlika u signalu od unapred određene vrednosti dovodi do povećanja ili smanjenja brzine motora pumpe. Većina instrumenata takođe ima mogućnost da varira sastav mobilne faze bilo kontinuirano ili postepeno (skokovito) – gradijentno eluiranje. Gradijentni sistemi omogućavaju istovremeno pumpanje i mešanje više rastvarača, tj. formiranje binarnog, ternernog ili kvaternernog gradijenta. Rastvarači se mogu mešati na dva načina, pri visokom ili pri niskom pritisku (*high-/low-pressure mixing*).

Na slici 3.4 je prikazano mešanje pri niskom pritisku koje je uobičajeno kod savremenih HPLC sistema. U ovoj konfiguraciji, rastvarači se mešaju pri niskom pritisku, na ulaznoj strani pumpe i zatim se gotova smeša potiskuje dalje prema injektoru. Sastav smeše, tj. udeo pojedinačnih komponenata, podešava se korišćenjem gradijentnog ventila (slika 3.4). Rastvarači moraju biti dobro degazirani jer u protivnom, gasovi izdvojeni mešanjem pri niskom pritisku ostaće zarobljeni u pumpi.

Na slici 3.9 je prikazano mešanje pri visokom pritisku. U ovom slučaju se komponente mobilne faze mešaju sa injektorske (izlazne) strane pumpe, dakle, kada su one već pod pritiskom. Postupak je praktičan samo kod binarnog gradijenta. Za svaki rastvarač koristi se posebna izokratska pumpa. Podešavanjem protoka obe pumpe istovremeno se regulišu i ukupan protok i sastav mobilne faze. Ovakav sistem naročito je pogodan u slučajevima kada su neophodne veoma male mrtve zapremine u sistemu, kao što je slučaj kod kapilarne HPLC. S druge strane, klipne pumpe imaju lošu preciznost na oba ekstrema raspona protoka, tj. u ranim i kasnim

fazama gradijenta. Drugi problem je mešanje rastvarača koji se razlikuju po kompresibilnosti, ili čije zapremine nisu aditivne (npr. 100 mL vode + 100 mL acetonitrila daje samo 170 mL smeše), zbog čega će stvarni protok na koloni biti manji od zadatog. Na kraju, ovaj sistem zahteva kompletnu pumpu visokog pritiska za svaki rastvarač ponaosob, što povećava cenu instrumenta.

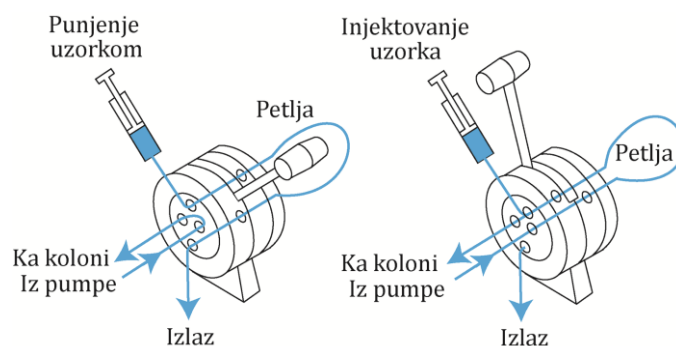


**Slika 3.9.** Šema binarne pumpe Agilent Technologies sistema serije 1100 i 1200. 1 – ulazni ventil; 2 – izlazni ventil; 3 – klip

### 3.3.3. Sistem za unos uzorka

Uzorci se u HPLC sistem unose pomoću injektora. Jedan od ograničavajućih faktora u preciznosti tečne hromatografske analize je reproduktivnost kojom se uzorci mogu uneti u kolonu. Kao posledica nereproduktivnog injektovanja i dužeg unošenja uzorka u sistem dolazi do povećanog širenja pika. Dakle, količina uzorka mora biti vrlo mala - nekoliko desetina mikrolitara do maksimalno 500  $\mu\text{L}$ . Pored toga, neophodno je da se uzorak injektuje bez promene protoka i pritiska u sistemu. Najčešća metoda unošenja uzorka u HPLC zasniva se na šestokrakom ventilu sa petljom za uzorkovanje, poput onih prikazanih na slici 3.10. Ovi uređaji su često sastavni deo tečne hromatografske opreme i imaju izmenljive petlje koje omogućavaju izbor zapremine uzorka od 1  $\mu\text{L}$

do 100  $\mu\text{L}$  ili više (slika 3.11). Ovakve petlje za uzorkovanje omogućavaju unošenje uzoraka pri pritisku do 500 bara s reproduktivnošću od nekoliko desetih delova procenta. Kod manualnih injektora, uzorak se u injekcioni port ubrizgava špricom, u količini dovoljnoj da ispere ceo put i napuni petlju.



**Slika 3.10.** Šema šestokrakog ventila sa petljom za uzorkovanje u HPLC. A – položaj za punjenje; B – položaj za injektovanje. Sa ručicom ventila kao što je prikazano u položaju A, petlja se puni iz šprica, a mobilna faza teče od pumpe do kolone. Kada se ventil postavi u položaj B, petlja se ubacuje između pumpe i kolone tako da mobilna faza spira uzorak iz petlje u kolonu

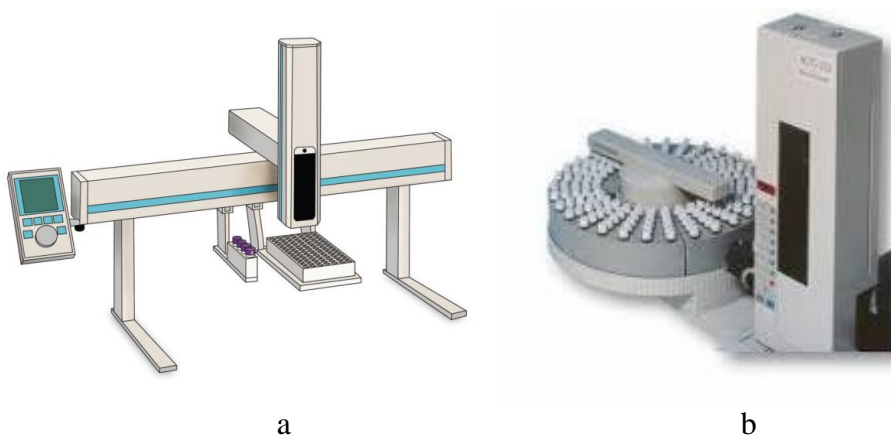


**Slika 3.11.** Tipični HPLC injektor. Nerđajući čelični prsten sa šest otvora od kojih je jedan povezan za kolonu



Većina savremenih hromatografa ima autoinjektore (autosempleri, slika 3.12). Takve jedinice su sposobne da injektuju uzorke u HPLC iz vijala (slika 3.13) koje se nalaze na karuselu za uzorke ili na mikrotitar pločama. Obično sadrže petlje za uzorkovanje i pumpu sa špricem za ubrizgavanja zapremina manjih od 1  $\mu\text{L}$  pa od većih od 1 mL (slika 3.14). Neki imaju kontrolisanu temperaturu okoline koja omogućava skladištenje uzoraka i derivatizaciju pre injektovanja. Većinom su programabilni tako da je omogućeno automatsko injektovanje bez nadzora HPLC sistema. Uzorci se dalje automatski injektuju prema redosledu zadatom u softveru.

Uzorci se najčešće smeštaju u vijale zapremine 2 mL (slika 3.13a), mada mogu biti u opsegu 1–25 mL. Vijale su najčešće izrađene od bezbojnog borosilikatnog stakla, a za uzorke osetljive na svetlost koriste se vijale od tamnog stakla. U slučajevima kada kontaminanti iz stakla mogu da ometaju analizu vijale su od polipropilena. Ukoliko je raspoloživa zapremina uzorka mala, mogu se koristiti vijale sa koničnim dnom (slika 3.13b) ili inserti zapremine 100–400  $\mu\text{L}$  koji se ubacuju u standardne vijale od 2 mL (slika 3.13c). Neki autosempleri podržavaju i korišćenje 300- $\mu\text{L}$  ependorfa za ultracentrifugu, kao i 96- ili 384-komorne mikrotitar pločice.

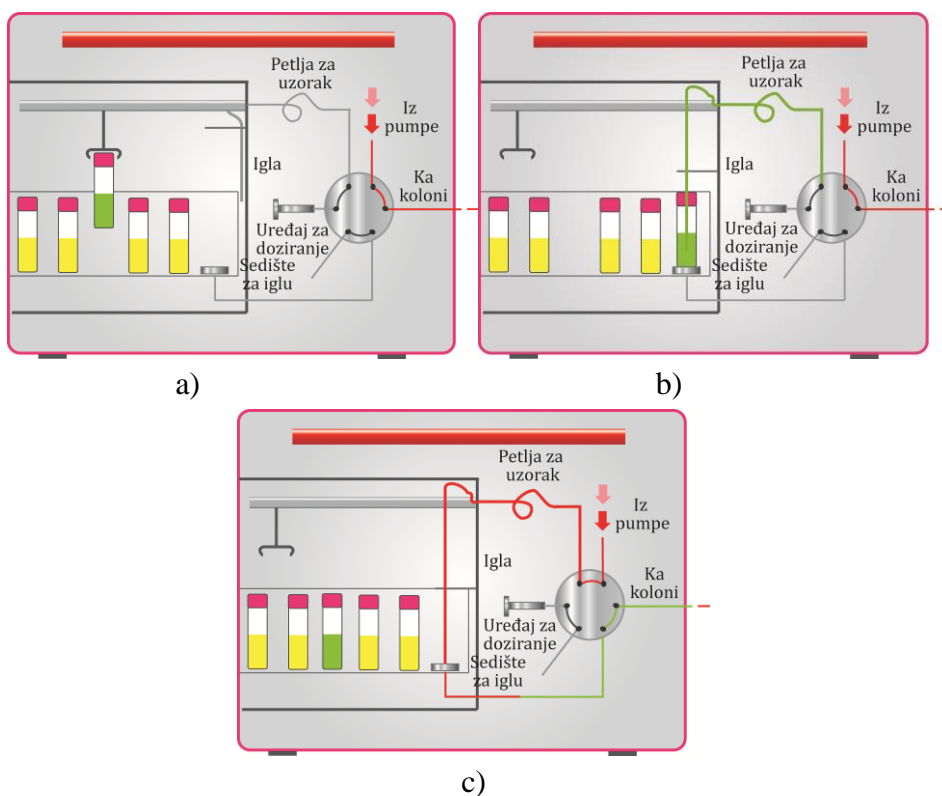


**Slika 3.12.** Autosempleri za HPLC: (a) XY i (b) karusel



a                      b                      c

**Slika 3.13.** Različiti tipovi sudova za uzorke: (a) običana vijala, (b) vijala sa koničnim dnom i (c) vijala sa insertom



a)

b)

c)

**Slika 3.14.** Tri faze u injektovanju uzorka u slučaju korišćenja autosemplera. (a) Prenos vijale sa uzorkom na mesto gde se vrši uzimanje uzorka, (b) punjenje petlje uzorkom i (c) injektovanje uzorka u kolonu

### 3.3.4. Kolone za HPLC

Kao i u gasnoj hromatografiji, kolone u tečnoj hromatografiji predstavljaju važan deo HPLC sistema (slika 3.15). Od njenih karakteristika, kao što su struktura stacionarne faze, veličina i dizajn kolone zavisi efikasnost i selektivnost razdvajanja komponenti uzorka. Kolone za HPLC obično su izrađene od nerđajućeg čelika, koji poseduje i zadovoljavajuću hemijsku otpornost i mehaničku čvrstoću. U slučaju rada sa agresivnijim mobilnim fazama (npr. HCl) ili analitima koji se mogu adsorbovati na čeliku ili razgraditi u kontaktu sa njim (npr. proteini), mogu se koristiti kolone od stakla ili polimera kao npr. polietetereterketon (PEEK) ili politetrafluoretilen (PTFE), mada su one mehanički manje otporne i zahtevaju niže pritiske. Pored toga, dostupne su i kolone od nerđajućeg čelika obložene staklom ili PEEK-om. Takođe, metal može da gradi helate sa nekim analitima, što dovodi do nereproduktivnih retencionih vremena i/ili pojave repa na hromatografskim pikovima. Ovaj problem se može rešiti pasivizacijom kolone fosfornom kiselinom. Danas su na tržištu dostupne na stotine pakovanih kolona različitih veličina i pakovanja.



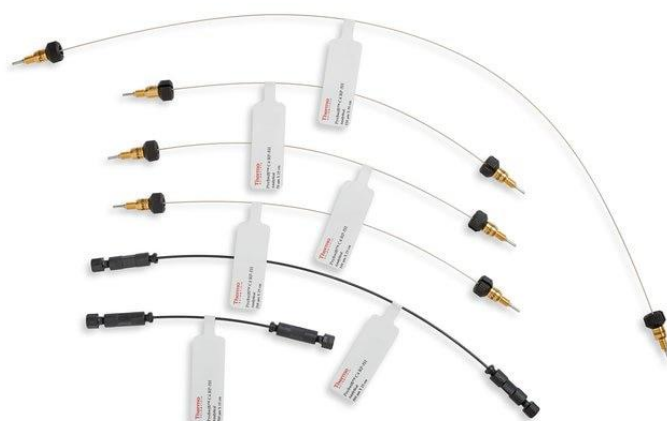
Slika 3.15. HPLC kolone. Izvor: Analytical Sales and Services

#### 3.3.4.1. Analitičke kolone

Većina kolona za HPLC ima dužinu od 50 do 300 mm i uvek su ravne. U retkim sličajevima se dužina može povećati spajanjem dve ili više kolona. Kao što je ranije pomenuto (odjeljak 1.3), efikasnost kolone (broj teorijskih platoa) srazmerna je dužini kolone. Međutim, zbog činjenice da su otpor koji kolona pruža i vreme trajanje analize direktno srazmerni njenoj dužini (odjeljak 1.3), u praksi se veoma retko primenjuju kolone duže od 250–300 mm. Unutrašnji prečnik analitičkih kolona je najčešće 3 do 5 mm a veličina čestica od 3 do 10  $\mu\text{m}$ . Za razdvajanje manje složenih smeša, koriste se kraće kolone, dužine 100–150 mm, unutrašnjeg prečnika 4,6 mm i veličine čestica 5  $\mu\text{m}$ . Kolone ovih karakteristika imaju 40.000 do 70.000 platoa/m (obično oko 10.000 platoa/kolona).

Osamdesetih godina 20. veka postaju dostupne kolone sa unutrašnjim prečnicima od 1 do 4,6 mm i dužinama od 3 do 7,5 cm. Ove kolone, koje su punjene česticama od 3 do 5  $\mu\text{m}$ , postižu čak 100.000 platoa/m i imaju prednost u brzini i minimalnoj potrošnji rastvarača. Mala potrošnja rastvarača je od posebnog značaja, jer su rastvarači visoke čistoće skupi, kao i zbog neophodnosti njihovog odlaganja nakon upotrebe. Primenom *narrow bore* kolona (kolona dužine 40 mm sa unutrašnjim prečnikom od 4 mm i veličinom čestica od 3  $\mu\text{m}$ ) analiza traje 15-tak sekundi. Danas imamo na raspolaganju i *microbore* analitičke kolone sa unutrašnjim prečnikom od 1 mm, kapilarne analitičke kolone (slika 13.6) sa unutrašnjim prečnikom 0,3–0,5 mm kao i nanoanalitičke kolone sa unutrašnjim prečnikom 0,075–0,1 mm. Veliki nedostatak kapilarnih i nanoanalitičkih kolona je potreba za specijalizovanom instrumentacijom. Naime, injektovane zapremine su vrlo male u odnosu na standardnu HPLC analizu, ekstrakolonske zapremine kod standardnih HPLC su velike, pumpe predviđene za rad pri visokim protocima ne mogu precizno da mere protoke karakteristične za kapilarnu HPLC ( $< 0,1 \text{ mL/min}$ ) i ne mogu korektno da registruju oštre, blisko eluirajuće pikove, što rezultuje lošom rezolucijom. Zbog navedenih nedostataka, kapilarna i nano HPLC se uprkos svojim

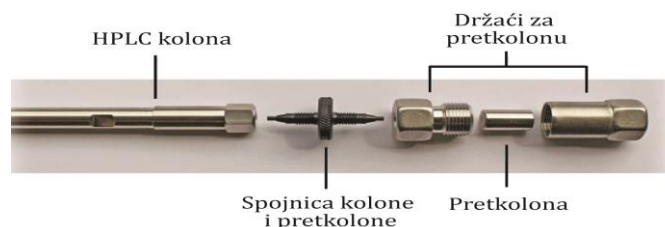
prednostima retko primenjuje za rutinske analize, i uglavnom se primenjuju u naučnim istraživanjima.



**Slika 3.16.** Kapilarne monolitne kolone

#### 3.3.4.2. Pretkolone

Obično se kratka zaštitna kolona tzv. pretkolona (slika 3.17) nalazi ispred analitičke kolone kako bi se povećao vek analitičke kolone uklanjanjem ne samo čestičnih materija i kontaminanata iz rastvarača, već takođe i komponenti uzorka koje se nepovratno vezuju za stacionarnu fazu. Sastav pakovanja pretkolone treba da bude sličan sastavu analitičke kolone. Međutim, veličina čestica je obično veća, kako bi se smanjio pad pritiska. Kada je pretkolona kontaminirana, ponovo se pakuje ili zamenjuje novom istog tipa. Tako se pretkolona žrtvuje da bi se zaštitila skuplja, analitička kolona.



**Slika 3.17.** Analitička kolona sa pretkolonom

#### 3.3.4.3. Kontrola temperature u koloni

Za neke aplikacije nije neophodno strogo kontrolisati temperaturu kolone i kolone rade na sobnoj temperaturi. Međutim, ukoliko se kolona ne termostatira dolazi do fluktuacije temperature što utiče na reproduktivnost hromatograma. Pored toga, pri korišćenju malih čestica dolazi do zagrevanja kolone usled trenja. Centar kolone je topliji nego zidovi, kao i izlaz iz kolone nego ulaz u kolonu. Tako na primer kolona dužine 100 mm, prečnika 2,1 mm i veličine čestica 1,7  $\mu\text{m}$  generiše razliku temperature između izlaza iz kolone i ulaza u kolonu oko 10 °C i između centra i zida kolone oko 2 °C. Razlika u temperaturi doprinosi širenju pika što treba minimizirati.

Takođe zagrevanje hromatografske kolone je poželjno da bi se smanjila viskoznost rastvarača čime se smanjuje potreban pritisak (jednačina 3.1) ili je moguće ostvariti veći protok. Isto tako, povećanje temperature redukuje retenciono vreme. Povišenje temperature ima kao dodatni efekat i povećanje efikasnosti putem olakšanja difuzije analita iz mobilne do stacionarne faze, kao i putem slabljenja sekundarnih interakcija odgovornih za širenje pikova.

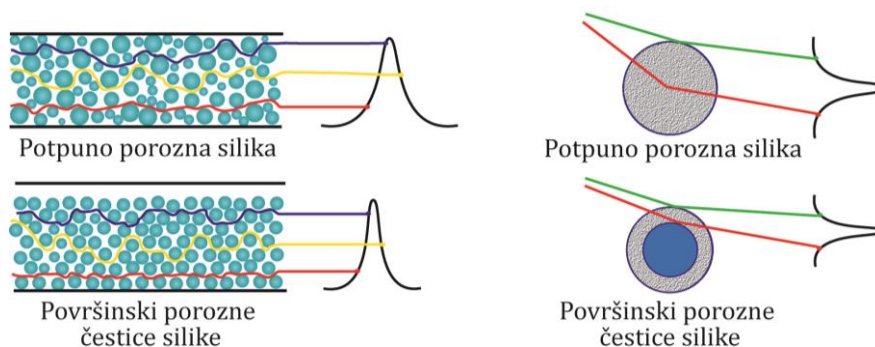
Većina savremenih komercijalnih instrumenata poseduje termostatirani odeljak za kolone koji kontroliše temperaturu kolone na nekoliko desetih delova stepeni od blizu sobne do 150 °C. Mnogi analitičari smatraju da je kontrola temperature od suštinske važnosti za reproduktivno razdvajanje. Zagrevanje kolone 10 °C iznad sobne temperature povećava reproduktivnost retencionog vremena i reproduktivnost kvantitativne analize. Međutim, značajnije povećanje temperature hromatografske kolone može izazvati razgradnju analita, kao i stacionarne faze a time i smanjenje dužine života kolone.

#### 3.3.5. Tipovi pakovanja kolona

Dva osnovna tipa pakovanja kolona se koriste u HPLC, potpuno porozne i pelikularne čestice.

Tipično pakovanje potpuno poroznim česticama za HPLC sastoji se od potpuno poroznih mikročestica koje imaju prečnik od 3 do 10  $\mu\text{m}$  (za razliku od ranije korišćenih koje su imale prečnik od 20 do 40  $\mu\text{m}$ ). Za datu veličinu čestica poželjna je vrlo uska raspodela veličine čestica čime se smanjuje veličina A u van Deemter-ovoj jednačini. Čestice su od silicijum-dioksida,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , sintetičke smole polistiren-divinilbenzen ili smole za izmenu jona. Silicijum-dioksid je daleko najčešće pakovanje u HPLC-u. Čestice silicijum-dioksida se pripremaju aglomeracijom submikronskih čestica silicijum-dioksida pod uslovima koji dovode do većih čestica koje imaju vrlo ujednačen prečnik.

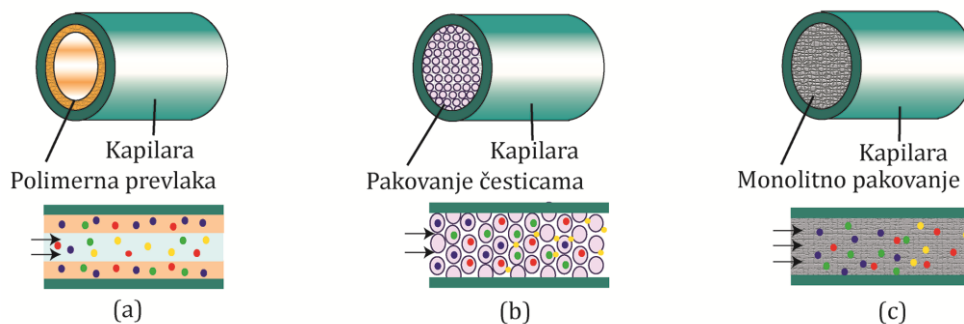
U početku primene pelikularne čestice su bile prečnika od 30 do 40  $\mu\text{m}$  i sastojale su se od sferne, neporozne, staklene ili polimerne kuglice na čijoj površini se nalazio tanak porozni sloj koji je činio samu stacionarnu fazu. Ovaj tanak, porozni sloj je bio od silike,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , polistiren-divinilbenzen sintetičke smole ili smola za jonsku izmenu. Danas su male porozne mikročestice u potpunosti zamenile ove velike pelikularne čestice. Poslednjih godina primenjuju se male pelikularne čestice ( $< 3 \mu\text{m}$ ) (*Superficially Porous Particles, SPP, core-shell particles, fused-core particles*) koje su efikasnije od uobičajenih potpuno poroznih mikročestica. Efikasnije su u odnosu na mikročestice istih dimenzija, a u odnosu na mikročestice iste efikasnosti imaju veći prečnik (slika 3.3), te pružaju manji otpor i omogućavaju veće protoke, tj. bržu analizu bez gubitka karakteristika. Naime, SPP se proizvode sa mnogo užom raspodelom veličine čestica (slika 3.18, levo) što rezultira u smanjenju koeficijenta „A” u van Deemter-ovoj jednačini (jednačina 1.14), a time i u smanjenju širine pika. Druga karakteristika SPP je smanjena putanja difuzije kroz koju analit mora da prođe zbog čvrstog jezgra što smanjuje koeficijent „C”. Analit ima mnogo duži put difuzije sa potpuno poroznom česticom u poređenju sa SPP što ima za posledicu oštrije pikove i veću efikasnost kolone (slika 3.18, desno).



**Slika 3.18.** Prednost primene malih pelikularnih čestica (SPP) u odnosu na potpuno porozne mikročestice

Postoji nekoliko tipova kapilarnih kolona: open-tubular, punjene i punjene monolitne (slika 3.19).

Punjene kapilarne kolone (slika 3.19B) sadrže čvrste čestice stacionarne faze (manje gusto pakovane od konvencionalnih kolona) ili monolitnu stacionarnu fazu (slika 3.19C), dok je kod *open-tubular* kolona stacionarna faza naneta na unutrašnji zid u vidu tečnosti ili kovalentno vezana za njega (slika 3.19A). Kapilarne kolone (naročito *open-tubular*) imaju manji kapacitet od konvencionalnih kolona, ali daju oštrije pikove, što omogućava analize tragova.



**Slika 3.19.** Tipovi kapilarnih kolona: (a) open-tubular, (b) punjene i (c) punjene monolitne



### 3.3.6. Detektori

HPLC detektori su često tradicionalni analitički instrumenti prilagođeni protočnim ćelijama za merenje niskih koncentracija analita u tečnoj struji. Veliki izazov u razvoju HPLC instrumenata je u prilagođavanju i poboljšanju takvih uređaja.

Idealni detektor za HPLC analizu trebalo bi da ima ista svojstva kao i detektori za GC, a to su:

- Visoka osetljivost ( $10^{-15}$ – $10^{-8}$  g rastvorka/s),
- Brz odgovor,
- Nizak šum,
- Stabilan, reproduktivan i linearan odgovor,
- Širok dinamički opseg,
- Stabilna bazna linija,
- Jednostavna konstrukcija i pristupačna cena,
- Robustan,
- Nedestruktivan i
- Uniforman odgovor za sve analite.

Za razliku od detektora u GC, HPLC detektor ne mora da funkcioniše u tako velikom temperaturnom opsegu. Međutim, pored navedenih osobina, HPLC detektor treba da ima minimalnu unutrašnju zapreminu da bi se smanjilo ekstrakolonsko širenje traka i trebalo bi da bude kompatibilan sa protokom tečnosti.

#### 3.3.6.1. Vrste detektora

Detektori u tečnoj hromatografiji se prema svojstvima koja prate mogu podeliti u dve grupe, univerzalne i selektivne. Univerzalni detektori (eng. *bulk-property detectors*) registruju promenu fizičkog svojstva eluata, kao što je indeks prelamanja, dielektrična konstanta ili gustina, koje se menjaju u prisustvu analita. S druge strane, selektivni detektori registruju fizičku ili

hemijsku osobinu analita, kao što su UV apsorpcija, fluorescencija ili difuziona struja i dr., koje ne poseduje mobilna faza. Selektivni detektori su osetljiviji od univerzalnih.

U tabeli 3.2 navedeni su najčešće korišćeni detektori za HPLC analizu i neka od njihovih najvažnijih svojstava.

**Tabela 3.2.** Osobine odabranih HPLC detektora

HPLC detektor	Komercijalno dostupan	Granica detekcije (uobičajeno)	Linearan opseg (dekade)
Apsorbancija	Da	10 pg	3–4
Fluorescencija	Da	10 fg	5
Elektrohemijski	Da	100 pg	4–5
Indeks refrakcije	Da	1 ng	3
Provodljivost	Da	100 pg – 1 ng	5
Maseni spektrometar	Da	< 1 pg	5
FTIR	Da	1 µg	3
Rasipanje svetlosti	Da	1 µg	5
Nastavak tabele 3.2			
Optička aktivnost	Ne	1 ng	4
Selektivnost na element	Ne	1 ng	4–5
Fotojonizacija	Ne	< 1 pg	4

Masa koja odgovara granici detekcije zavisi od jedinjenja, instrumenta i HPLC uslova. Vrednosti koje su navedene su tipične vrednosti za komercijalne sisteme.

Najčešće korišćeni detektori za HPLC zasnivaju se na apsorpciji ultraljubičastog ili vidljivog zračenja. Fluorescencija, indeks prelamanja i elektrohemijiski detektori takođe se često koriste. Primena masenog spektrometra kao detektora danas je veoma popularna. Takvi LC/MS sistemi mogu u velikoj meri pomoći u identifikaciji analita koji izlaze iz kolone (odjeljak 3.3.6.8).

### 3.3.6.2. UV-vis detektori

UV-vis detektori su nedestruktivni detektori koji registruju apsorpciju elektromagnetnog zračenja u određenom delu UV-vis spektra. Na slici 3.20 je prikazana šema jedne tipične UV-vis protočne apsorpcione ćelije. Kao što se može videti uobičajeni oblik protočne ćelije je u obliku slova Z za merenje apsorpcije analita u eluatu koji izlazi sa hromatografske kolone. Da bi se minimiziralo ekstrakolonsko širenje traka, zapremina ćelije treba da bude što je moguće manja. Omogućava indentifikaciju velikog broja organskih jedinjenja. UV-vis detektori su primenljivi samo ukoliko mobilna faza ne apsorbuje u primenjenoj oblasti spektra i ukoliko analit apsorbuje u datoj oblasti, dakle spada u selektivne detektore. Zbog svoje pristupačnosti primenjuju se u preko 70% slučajeva.

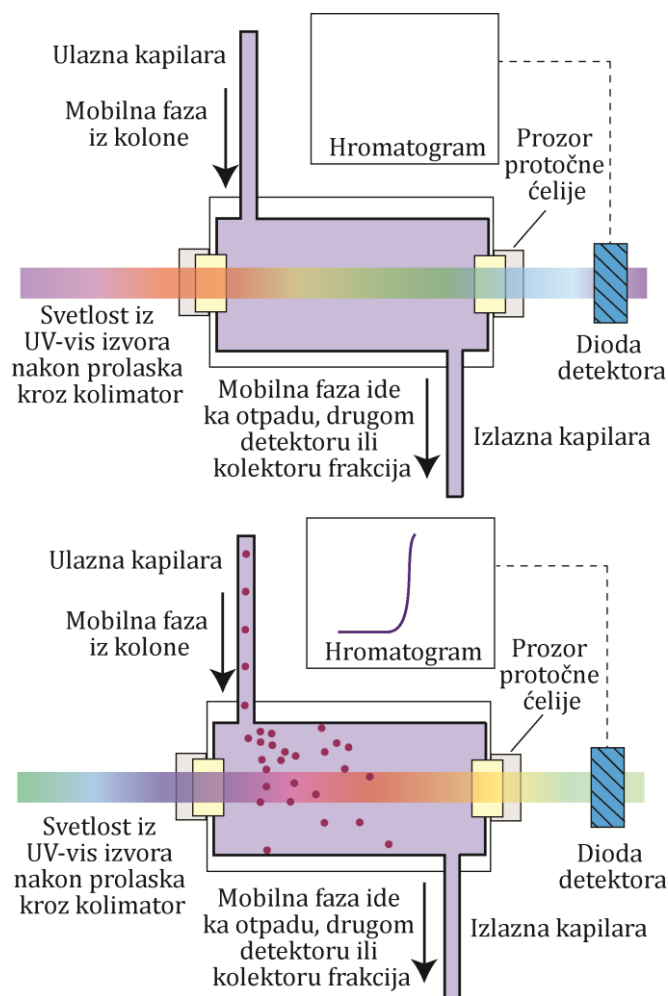
Tipične zapremine ćelija su od 1 do 10  $\mu\text{L}$  sa dužinom optičkog puta od 2 do 10 mm. Većina detektora su instrumenti sa dva zraka u kojima jedan zrak prolazi kroz ćeliju za eluiranje a drugi zrak je referentni. Merenja se zasnivaju na poređenju intenziteta ova dva zraka. Alternativno, može se primeniti dvozračni detektor apsorpcije sa vremenski razdvojenim snopovima pomoću rotirajućeg sektorskog ogledala koji usmerava celi snop prvo od monohromatora kroz referentni rastvor, a zatim kroz uzorak. U oba slučaja, hromatogram se sastoji od grafika apsorpcije (logaritama odnosa dva signala) u funkciji vremena.

Prvi detektori apsorpcije, detektori sa fiksnom talasnom dužinom, su bili fotometri sa filtrima uz primenu živine lampe kao izvora. Najčešće je primenjivana intenzivna linija na 254 nm. Kod nekih instrumenata nekoliko linija (250, 313, 334 i 365 nm) je korišćeno uz zamenu filtera. Međutim, ova vrsta detektora je ograničena na analite koji apsorbuju jednu od navedenih talasnih dužina. U ovoj oblasti talasnih dužina apsorbuje više organskih funkcionalnih grupa i jedan broj neorganskih vrsta koje imaju široke apsorpcione trake koje obuhvataju jednu ili više ovih ultraljubičastih talasnih dužina. Takođe su korišćene deuterijumova ili volframova lampa sa interferentnim filtrima kao jednostavno sredstvo za detekciju vrsta koje apsorbuju UV-vis zračenje. Neki instrumenti su imali detektore sa dve talasne dužine ili su bili opremljeni nosačem filtera koji je sadržao nekoliko

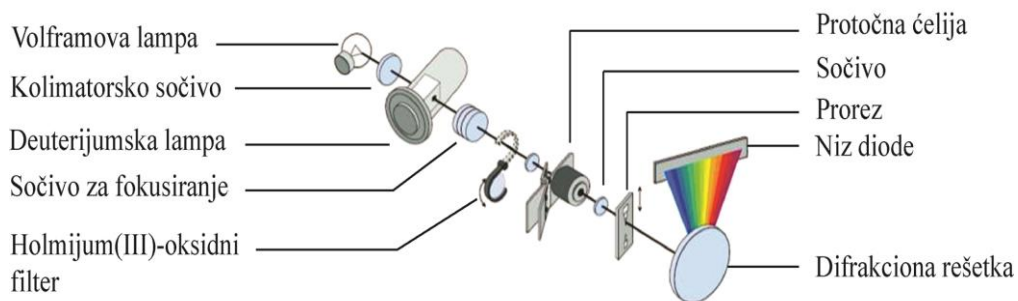
filtera koji su se mogli brzo smenjivati da bi se mogle detektovati različite vrste pri eluiranju sa kolone. Zbog toga su od početka 1980-ih godina većim delom napušteni u korist detektora sa promenljivom talasnom dužinom (skenirajući detektori) i, kasnije, detektora sa nizom dioda (eng. *Diode-Array Detector*, DAD).

Danas veliki broj proizvođača HPLC nudi detektore koji se sastoje od skenirajućeg spektrofotometra sa optičkim rešetkama. Neki su ograničeni na UV zračenje, dok drugi obuhvataju UV i vidljivo zračenje. Instrument nudi nekoliko načina rada. Na primer, ceo hromatogram se može dobiti na jednoj talasnoj dužini. Alternativno, kada pikovi analita imaju dovoljno veliku razliku u retencionim vremenima, mogu se odabrati različite talasne dužine za svaki pik. I ovde se često koristi kompjuterska kontrola za izbor najbolje talasne dužine za svaki analit. U slučaju gde su celi spektri poželjeni za identifikaciju, protok eluata može se zaustaviti na dovoljan period da se omogući skeniranje u željenom području talasnih dužina.

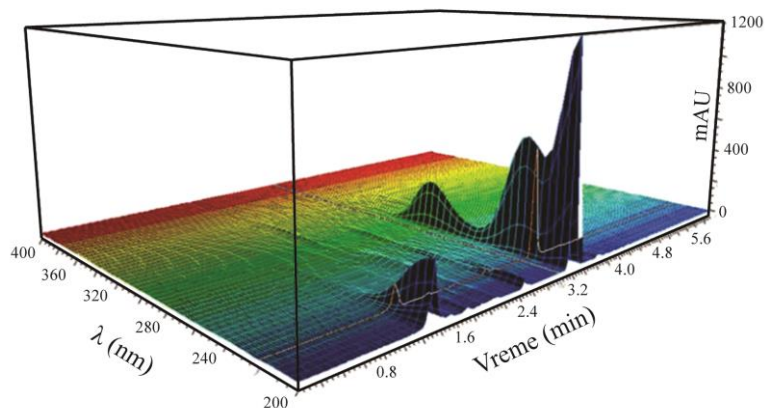
Najpogodniji UV spektrofotometrijski detektori su instrumenti sa nizom dioda (slika 3.21) koji omogućavaju snimanje celog spektra za približno 1 s sa rezolucijom od oko 1 nm ili manje). Tako, spektralni podaci za svaki hromatografski pik se sakupljaju i čuvaju onako kako se pikovi pojavljuju na kraju kolone. Jedan oblik prezentacije spektralnih podataka koji olakšava identifikaciju analita, kao i izbor uslova za kvantitativno određivanje, je trodimenzionalni grafik poput onog prikazanog na slici 3.22.



**Slika 3.20.** UV-vis protočna apsorpciona ćelija za HPLC



**Slika 3.21.** Šema detektora sa nizom dioda



**Slika 3.22.** 3D hromatogram dobijen nakon 180 min fotokatalitičke razgradnje klopivalida (1,0 mM) u prisustvu  $\text{TiO}_2$  (2 mg/mL) primenom UV zračenja. Kolona: Eclips XDB-C18 (150 mm×4,6 mm, veličina čestica 5  $\mu\text{m}$ ). Mobilna faza (protok 1 mL/min) ACN:H<sub>2</sub>O (3:7, v/v), pri čemu je voda zakišeljena sa 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

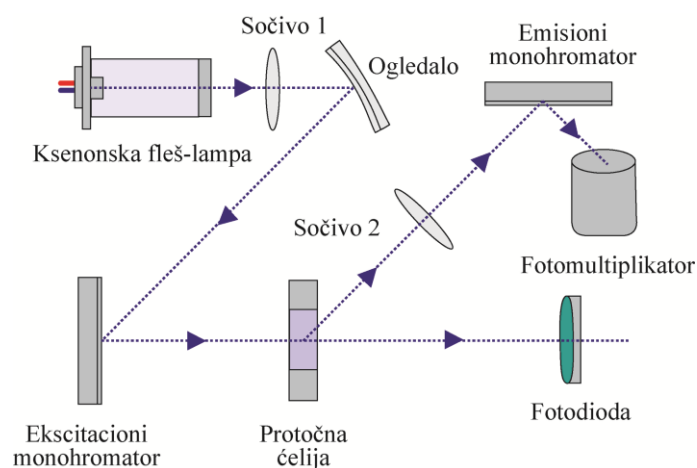
### 3.3.6.3. Infracrveni detektori

Kod HPLC instrumenata primenjuju se dve vrste infracrvenih detektora. Prvi instrumenti su imali filtere. Kasnije, mnogo sofisticiraniji tip IR detektora zasnovan je na instrumentima sa Fourierovim transformacijama (FTIR). Čelije IR detektora slične su po konstrukciji onima koje se koriste sa UV-vis zračenjem, samo što su prozori napravljeni od natrijum-hlorida ili kalcijum-florida. Dužine ćelijskog puta se kreću od 0,2 do 1,0 mm, a zapremine od 1,5 do 10  $\mu\text{L}$ .

Glavno ograničenje primene IR detektora leži u slaboj transparentnosti mnogih rastvarača koji se koriste u HPLC analizi. Na primer, široke IR apsorpcione trake za vodu i alkohole u velikoj meri onemogućavaju korišćenje ovog detektora za mnoge namene. Takođe, upotreba vodenih mobilnih faza može dovesti do brzog propadanja protočnih ćelija, osim ako se ne koriste specijalni arc prozori. Visoka granica detekcije za mnoge analite takođe je ograničavajući faktor upotrebe IR detektora. Uvođenje masenih spektrometrijskih detektora za HPLC (odjeljak 3.3.6.8) dovelo je do dramatičnog pada primene IR detektora.

#### 3.3.6.4. Fluorescentni detektori

Fluorescentni detektori za HPLC slični su po dizajnu fluorometrima i spektrofluorometrima. Najčešće fluorescencija se posmatra fotoelektričnim pretvaračem koji se nalazi pod uglom od  $90^0$  u odnosu na ekscitujućii zrak. Najjednostavniji detektori koriste kao izvor zračenja živinu lampu i jedan ili više filtera za izolaciju trake emitovane svetlosti. Kod sofisticiranijih instrumenata izvor zračenja je ksenonska fleš-lampa i ima rešetku kao monohromator za izolaciju fluorescentnog zračenja (slika 3.23). Ksenonska fleš-lampa bleskovima u trajanju od 3  $\mu$ s obezbeđuje intenzivnu svetlost sa kontinualnim spektrom u opsegu 200–900 nm. Zračenje lampe se fokusira ka prvom sočivu i reflektuje ogledalom ka rešetki ekscitacionog monohromatora, od koga se usmerava snop svetlosti određene talasne dužine ( $\lambda_{EX}$ ) prema ulazu u kvarnu protočnu ćeliju. Zračenje koje potiče od luminiscencije uzorka se emituje u svim smerovima. Da bi se sprečilo stizanje upadne svetlosti iz ksenonske fleš-lampe do dektora svetlost koju emituje uzorak se sakuplja najčešće pod uglom od  $90^0$  u odnosu na upadni snop. Rešetka emisionog monohromatora iz izlaznog snopa izdvaja svetlost željene talasne dužine ( $\lambda_{EM}$ ) koja stiže do fotomultiplikatora. Primenjuje se i laserom indukovana fluorescencija zbog svoje osetljivosti i selektivnosti.



Slika 3.23. Šema fluorescentnog detektora

Prednost korišćenja fluorescentnog detektora je njegova visoka osetljivost, koja je obično veća za više od jedanog reda veličine u odnosu na većinu apsorpcionih postupaka. Pored toga, fluorescentni detektor obezbeđuje visoku selektivnost jer je samo 10% organskih jedinjenja sposobno da fluorescira. Ova prednost je iskorišćena u HPLC za razdvajanje i određivanje komponenti uzoraka koje fluoresciraju kao što su na primer lekovi, prirodni proizvodi, klinički uzorci i naftni proizvodi. Broj analita koji se mogu odrediti fluorescentnim detektorom se može povećati derivatizacijom analita sa reagensima koji formiraju fluorescentne derivate. Derivatizacija može da bude pretkolonska i postkolonska. Na primer, 5-dimetilamino-naftalen-1-sulfonil-hlorid, koji reaguje sa primarnim i sekundarnim aminima, aminokiselinama i fenolima dajući fluorescentna jedinjenja, često se koristi za detekciju aminokiselina u hidrolizatima proteina.

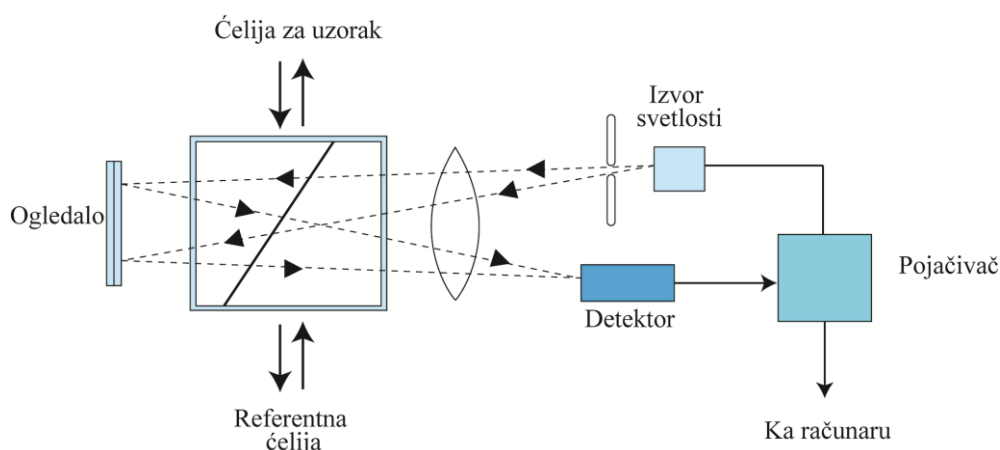
#### 3.3.6.5. Detektori indeksa prelamanja

Detektori indeksa prelamanja spadaju u univerzalne detektore koji imaju značajnu prednost u odnosu na druge detektore zbog svoje univerzalnosti. Naime, indeks prelamanja je univerzalno svojstvo svih transparentnih materijala i zavisi od njihovog sastava, tako da se mogu primeniti za detekciju bilo kog jedinjenja. Detektor indeksa prelamanja meri promenu u indeksu prelamanja mobilne faze usled prisustva analita i to merenjem ugla prelamanja ili intenziteta prelomljene svetlosti. Zbog toga su ovi detektori univerzalni detektori slično plameno-jonizacionom detektoru i detektoru termičke provodljivosti u gasnoj hromatografiji. Detektori indeksa prelamanja se primenjuju u HPLC kada nemamo na raspolaganju neki drugi tip detektora koji je osetljiv na analit, ili kada analit pokazuje veliku razliku u indeksu prelamanja u odnosu na primenjenu mobilnu fazu.

Na slici 3.24 prikazana je šema detektora diferencijalnog indeksa prelamanja u kome zrak svetlosti iz izvora prolazi kroz protočnu ćeliju koja je podeljena po dijagonali na ćeliju za uzorak i referentnu ćeliju. Mobilna faza prolazi kroz jednu polovinu protočne ćelije na putu ka koloni, dok eluat protiče kroz drugu polovinu. Zrak svetlosti iz izvora prolazi kroz protočnu ćeliju i nakon refrakcije, svetlost se odbija od ogledala, ponovo prolazi kroz



protočnu ćeliju pri čemu dolazi do skretanja inicijalnog snopa, ako se dva rastvora razlikuju u indeksu prelamanja tj. ako iz kolone izlazi analit. Skretanje snopa svetlosti dovodi do razlike u osvetljenosti fotodioda na osnovu koje se generiše signal, koji, kada se pojača i registruje, daje hromatogram.



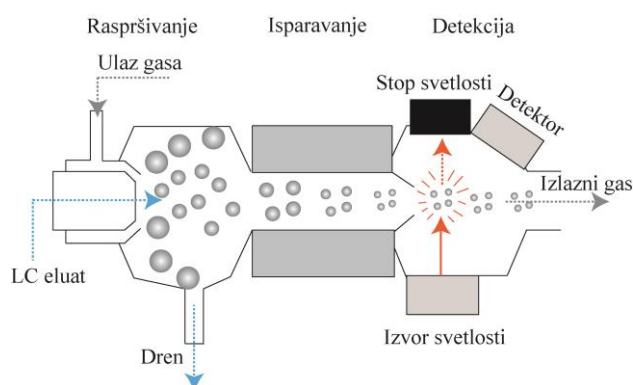
**Slika 3.24.** Šema detektora indeksa prelamanja

Detektori indeksa prelamanja su pouzdani i na njih ne utiče protok. Međutim, pošto indeks prelamanja zavisi od temperature otička jedinica i eluat su termostatorani. Treba napomenuti da ovi detektori registruju svaku promenu sastava eluata, uključujući i promenu sastava mobilne faze, zbog čega se HPLC analiza izvode isključivo u izokratskom modu. Naime, promena indeksa prelamanja usled promene sastava mobilne faze je mnogo veća od promene koja nastaje usled eluiranja analita. Ukoliko se koriste mešane mobilne faze, one se pripremaju pre analize, a ne korišćenjem binarne pumpe. Nadalje, ovi detektori nisu osetljivi kao mnoge druge vrste detektora. Detektori indeksa prelamanja nalaze primenu u određivanju analita koji nemaju hromofore niti fluorofore poput šećera.

### 3.3.6.6. Detektor raspršivanja svetlosti na isparenom uzorku

Kod detektora raspršivanja svetlosti (eng. *Evaporative Light-Scattering Detector*, ELSD) eluat iz kolone se u raspršivaču (eng. *nebulajzer*) protokom azota ili vazduha raspršuje u sitne kapljice (slika 3.25). Kapljice se zatim prenose kroz zagrejanu cev sa kontrolisanom temperaturom (previsoka temperatura dovodi do gubitaka lakše isparljivih analita, a preniska je nedovoljna za isparavanje krupnijih kapi što dovodi do visokog nivoa šuma) gde dolazi do isparavanja mobilne faze i stvaranja sitnih čestica analita suspendovanih u gasu. Oblak čestica analita zatim prolazi kroz laserski snop. Raspršeno zračenje se detektuje pod uglom od  $45^{\circ}$  u odnosu na upadni zrak. Teorijski, pošto je disperzija svetlosti u detektoru pretežno Rayleigh-jevo rasipanje, intenzitet rasute svetlosti ne zavisi od prirode supstance, već samo od njene mase (koncentracije). Međutim, u praksi odgovor značajno varira od jedinjenja do jedinjenja, a zavisi i od dimenzije čestica, protoka gasa i mobilne faze, kao i temperature cevi za isparavanje.

Glavna prednost ove vrste detektora je što je njegov odziv približno isti za sve neisparljive analite. Pored toga, mnogo je osetljiviji od detektora indeksa prelamanja, sa granicama detekcije od  $0,2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . Omogućava analizu jedinjenja koja apsorbuju UV zračenje pri niskim vrednostima talasne dužine. Primenom ovog detektora moguće je analizirati sva jedinjenja koja su manje isparljiva od mobilne faze, tj. neisparljiva i poluisparljiva jedinjenja. Nedostatak je što je sastav mobilne faze ograničen samo na isparljive komponente.



**Slika 3.25** Šema detektora raspršivanja svetlosti na isparenom uzorku

### 3.3.6.7. Elektrohemijski detektori

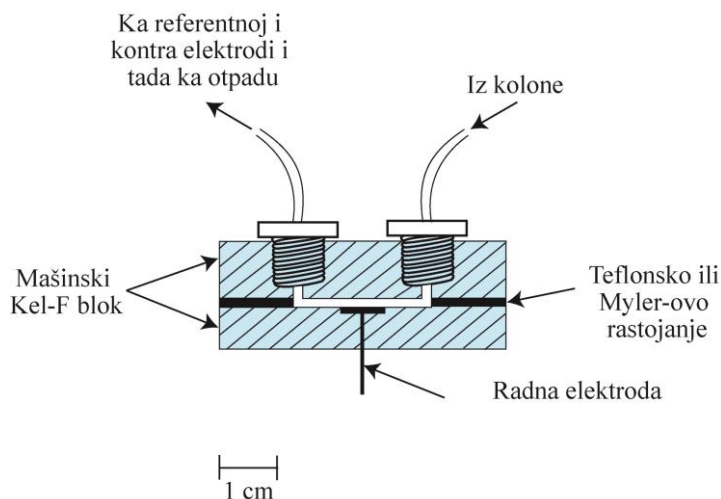
Više vrsta elektrohemijskih detektora su dostupni za HPLC instrumente. Elektrohemijski detektori obuhvataju amperometrijske, voltometrijske, kulometrijske, potenciometrijske i konduktometrijske detektore.

Iako se elektrohemijski detektori ne koriste u tolikoj meri kao optički detektori, imaju određene prednosti u mnogim slučajevima, kao što su visoka osjetljivost, jednostavnost i praktičnost. Primena ove vrste detektora je posledica povoljnog potencijalnog područja u kojima dolazi do oksidacije ili redukcije velikog broja organskih funkcionalnih grupa. U principu, analiti koji sadrže elektroaktivne funkcionalne grupe se mogu detektovati amperometrijskim, voltometrijskim ili kulometrijskim detektorima. Glavno ograničenje primene elektrohemijskih detektora je što nisu kompatibilni sa gradijentnim eluiranjem.

Mobilna faza pri korišćenju elektrohemijskog detektora mora da bude elektroprovodna, zbog čega se najčešće koriste vodeni puferi (fosfatni, acetatni, citratni i dr.) koncentracije od 10 do 100 mM ili pomoćni elektroliti (natrijum-acetat, amonijum-perhlorat i dr.). Zbog toga se elektrohemijski detektori ne koriste u podeonoj hromatografiji sa normalnim fazama. Kao organska komponenta najčešće se koriste metanol (MeOH) i acetonitril (ACN), dok rastvarači koji grade perokside nisu pogodni.

Na slici 3.26 je prikazana protočna ćelija sa tankim slojem za amperometrijsku detekciju. U ovom slučaju je površina radne elektrode deo zida kanala koji se nalazi između 50- $\mu$ m teflonskog zaptivača unutar dva obrađena bloka Kel-F plastike. Radna elektroda je najčešće izrađena od staklastog ugljenika ili ugljenične paste, mada može biti i od platine, zlata, srebra, žive i dr. Referentna elektroda i pomoćna (kontra) elektroda nalaze se nizvodno od bloka radne elektrode. Zapremina ćelije je od 1 do 5  $\mu$ L. Ćelija može da ima i dve radne elektrode, koje mogu raditi serijski ili paralelno. Prva konfiguracija, u kojoj eluent teče prvo preko jedne elektrode, a zatim preko druge, zahteva da se analit podvrgne reverzibilnoj oksidaciji (ili redukciji) na uzvodnoj elektrodi. Druga elektroda tada radi kao katoda (ili anoda) za određivanje oksidacionog (ili redukcionog) proizvoda. Ovakav raspored radnih elektroda povećava selektivnost

detektora. Zanimljiva primena ovog sistema je za detekciju i određivanje komponenti u smeši koje sadrže i tiole i disulfide.



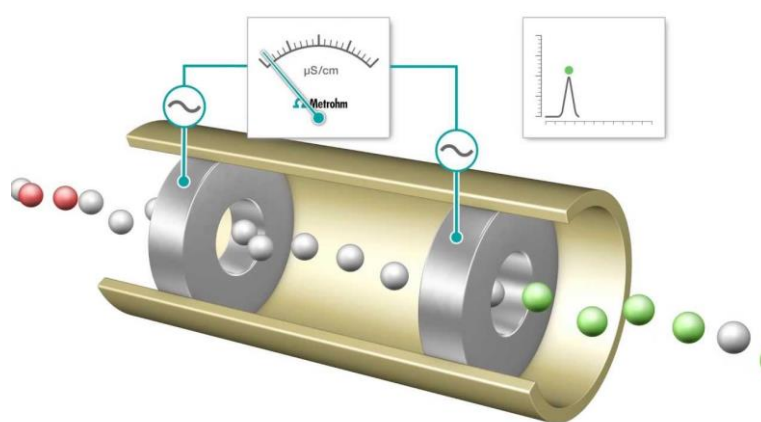
**Slika 3.26.** Amperometrijski detektor sa tankoslojnom ćelijom za HPLC

U paralelnoj konfiguraciji, dve elektrode se rotiraju tako da je osa između njih na  $90^{\circ}$  u odnosu na protok eluata. Ovim dvema radnim elektrodama mogu biti saopšteni različiti potencijali u odnosu na referentnu elektrodu što često ukazuje na čistoću pika. Alternativno jedna radna elektroda može funkcionisati kao anoda, a druga kao katoda što omogućava simultanu detekciju i oksidansa i reduktora.

Za razliku od amperometrijske detekcije koja je niskoefikasna jer samo mala količina analita izreaguje pri detekciji, kulometrijska detekcija je visokoefikasna jer sva količina analita izreaguje pri čemu se meri ukupna utrošena količina naelektrisanja.

Rad konduktometrijskih detektora zasniva se na merenju električne provodljivosti rastvora, veličine koja je direktno proporcionalna koncentraciji jona. Postoje dva tipa detektorskih ćelija - kontaktne i beskontaktne. Kod kontaktnog detektora (slika 3.27), elektrode su u direktnom dodiru sa eluatom. Iako se elektrode izrađuju od otpornih materijala (nerđajući čelik, Pt, Au), postepeno se zagađuju komponentama uzorka. U slučaju beskontaktne ćelije, elektrode su razdvojene od eluata izolatorom, te zbog odsustva direktnog kontakta, nema kontaminacije

elektroda. Ovi detektori su univerzalni za jone, registruju svaku jonsku vrstu i, za razliku od velike većine detektora, sposobni su da registruju i neorganske katjone i anjone. Pored toga konduktometrijski detektori su nedestruktivni (usled korišćenja naizmenične struje ne dolazi do elektrolize i polarizacije elektroda). Dodatna prednost je jednostavna minijaturizacija koja ne narušava karakteristike, tako da se može koristiti i u hromatografiji ili kod elektroforeze na čipu.

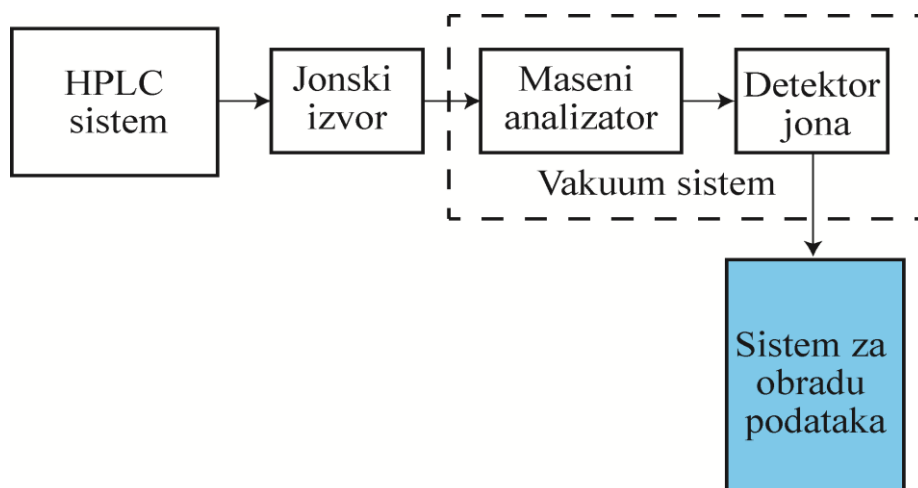


**Slika 3.27.** Konduktometrijski detektor

#### 3.3.6.8. Masenospektrometrijski detektori

Kombinacija HPLC i masenog spektrometra kao detektora je idealna kombinacija za razdvajanje, detekciju i kvantifikaciju analita uzorka jer je MS detektor i univerzalan i selektivan. Blok dijagram tipičnog LC–MS sistema prikazan je na slici 3.28. Prednost MS detektora u pogledu kvalitativne analize je taj što sama HPLC ima vrlo ograničene mogućnosti za identifikaciju, budući da je jedina informacija koju nudi retenciono vreme. S obzirom na to da je poznato preko 100 miliona hemijskih jedinjenja, retenciono vreme ne omogućava jednoznačnu identifikaciju detektovanog pika. Uobičajeni spektrometrijski HPLC detektori (UV-vis, fluorescentni) takođe daju veoma malo strukturnih informacija, za razliku od MS koji u mnogim slučajevima omogućava delimično ili potpuno rasvetljavanje strukture, određivanje molekulske mase, kao i tačnu

kvantitativnu analizu. Takođe omogućava da se nerazdvojeni pikovi mogu izolovati praćenjem samo odabrane mase. LC–MS tehnika može obezbediti otisak prsta određenog analita umesto da se oslanja na retenciono vreme kao u konvencionalnoj HPLC.



**Slika 3.28.** Blok dijagram tipičnog LC–MS sistema

Slično kao i u GC, MS je od velike pomoći u identifikaciji analita nakon eluiranja sa hromatografske kolone. Međutim, povezivanje HPLC sa MS detektorom počinje da se primenjuje u većoj meri tek 1980-ih godina, dve decenije nakon GC–MS. Uzrok njihovog sporog razvoja su problemi u povezivanju dva, u mnogim aspektima nekompatibilna instrumenta. Najveći problem je činjenica da je tečnu mobilnu fazu visokog protoka (1 mL/min) potrebno uvesti u maseni spektrometar, koji radi pod visokim vakuumom ( $10^{-9}$  bar), a bez narušavanja vakuuma. Dodatno, većina uobičajenih aditiva za mobilnu fazu su neisparljivi što bi odmah dovelo do kontaminacije i blokade jonskog izvora MS. Pored toga, problem je i jonizacija termolabilnih i/ili neisparljivih analita, koji nisu kompatibilni sa elektronskom i hemijskom jonizacijom. Isto tako, budući da su mnoga jedinjenja koja se razdvajaju primenom LC–MS mnogo složenija i njihova fragmentacija je složenija. Razvijen je veliki broj različitih LC–MS interfejsa, od kojih će ovde biti opisano samo nekoliko savremenih, najčešće korišćenih.

Kao što je već napomenuto, najveći problem pri kuplovanju LC i MS predstavlja mobilna faza, koja kontinualno dolazi u jonski izvor, a čije bi isparavanje narušavalo visoki vakuum neophodan za rad analizatora i detektora MS. U početku razvoja LC–MS su primenjivane tehnike jonizacije razvijene za GC–MS, kao i za samostalni MS sa EI, CI, matriksom potpomognuta laserska desorpcija i jonizacija (eng. *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization*, MALDI) i bombardovanje brzim atomima (eng. *Fast Atom Bombardment*, FAB). Da bi se to realizovalo u početku su primenjiveni interfejsi kod kojih se jonizacija izvodila pod vakuumom:

- Direktni unos tečnosti (eng. *Direct Liquid Introduction*, DLI) - uvođen efluent niskog protoka,
- Termosprej (eng. *ThermoSpray*, TSP) interfejs - eluat iz HPLC kolone se zagreva tačno toliko koliko je potrebno da mobilna faza ispari pre ulaska u jonsku komoru,
- Particle Beam (PB) interfejs tzv. MAGIC (eng. *Monodisperse Aerosol Generator for Chromatography*) - pre ulaska analita u jonski izvor vrši se nebulizacija, isparavanje mobilne faze i njeno isisavanje,
- Protočni FAB (eng. *Flow-FAB*) interfejs - bombardovanje tankog sloja eluenta brzim atomima ili jonima unutar jonskog izvora i dr.

Od navedenih interfejsa 90-tih godina 20. veka najviše je primenjivan TSP interfejs. Međutim, da bi se smanjilo opterećenje vakuum-pumpe kod većine navedenih sistema bilo je neophodno da se koriste ili niski protoci mobilne faze (smanjena efikasnost razdvajanja i povećana dužina trajanje analize) ili da se tok eluata deli pri čemu samo mali deo uzorka dospeva u MS (smanjena osetljivost). Pored toga, pošto je najčešće korišćena elektronska jonizacija koja je vrlo agresivna, ovi MS nisu uspevali da bez fragmentacije jonizuju mnoge analite, niti su analizatori i detektori bili sposobni da razdvoje i detektuju jone visokih vrednosti  $m/z$ .

Sredinom poslednje dekade 20. veka u sve većoj meri se koristi jonizacija analita pri atmosferskom pritisku (eng. *Atmospheric pressure ionization*, API):

- Hemijska jonizacija pri atmosferskom pritisku,
- Elektrosprej jonizacija (eng. *ElectroSpray Ionization*, ESI),
- Fotojonizacija pri atmosferskom pritisku (eng. *Atmospheric Pressure Photoionization*, APPI),
- MALDI i drugi.

Danas je najpopularni pristup primena niskog protoka eluata uz jonizaciju pri atmosferskom pritisku. Zahvaljujući većoj fleksibilnosti savremenih jonskih izvora, MS detektori za HPLC postali su čak umnogome bolji od originalnih detektora za GC.

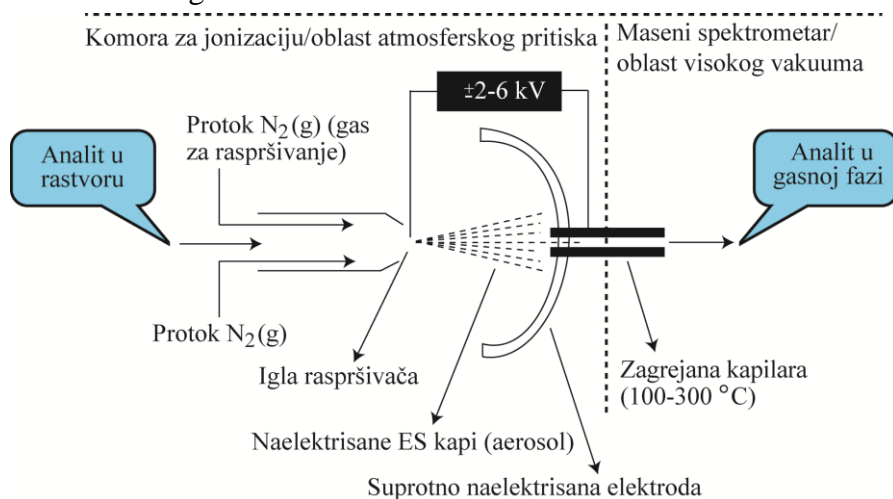
U daljem tekstu ukratko će biti prikazani sistemi jonizacije pri atmosferskom pritisku. Detalje možete naći u udžbenicima za instrumentalnu analizu ili isključivo o masenoj spektrometriji.

***Elektrosprej jonizacija.*** Elektrosprej jonizacija je tehnika meke jonizacije kod koje se joni formiraju direktno iz tečne faze (rastvora). Generisanje jona teče u tri faze: raspršivanje (nebulizacija), naelektrisanje, desolvatacija i isparavanje jona. Na slici 3.29 je prikazana šema elektrosprej jonskog izvora.

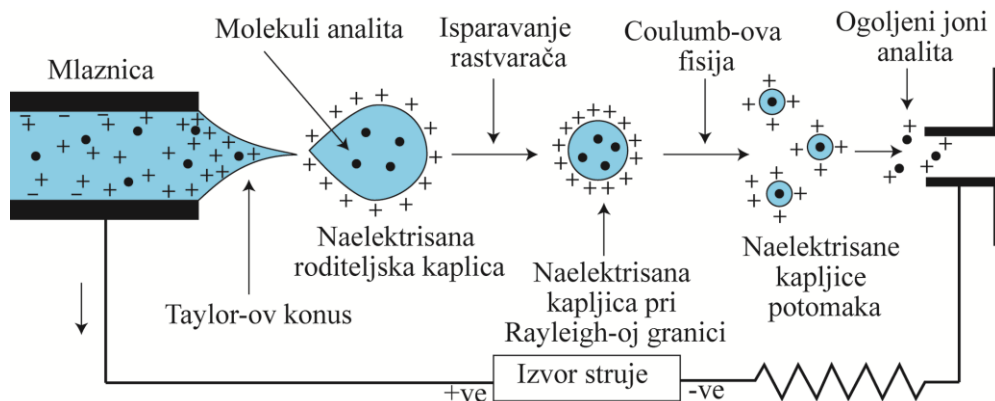
Eluent sa kolone se raspršuje u fine kapljice pomoću raspršivača (nebulizator). Iгла raspršivača tj. mlaznica je uzemljena, a oko nje je postavljena polucilindrična elektroda pod visokim naponom od nekoliko kV. Visok napon između igle i elektrode (koje se nalaze najčešće na rastojanju od 1–3 cm) formira jako električno polje koje dovodi do disperzije eluata u aerosol visokoelektrisanih elektrosprej kapljica. Kod pneumatske ESI, proces je potpomognut koncentričnim tokom gasa za raspršivanje (npr. N<sub>2</sub>) pod pritiskom. Uloga ovog gasa je da pored poboljšanja raspršivanja, usmeri kapljice koje izlaze iz vrha kapilare prema masenom spektrometru. Dimenzije naelektrisanih kapljica se smanjuju isparavanjem mobilne faze što je potpomognuto protokom azota (gasom za sušenje). Smanjenje kapljica dovodi do porasta gustine naelektrisanja sve



dok odbojne elektrostatičke (Coulomb-ove) sile ne nadvladaju kohezione (površinski napon), nakon čega dolazi do tzv. kulonovske eksplozije, tj. do razbijanja na manje kapljice, nakon čega se proces ponavlja (slika 3.30). Na kraju, jako električno polje na površini mikrokapljica dovodi do izbacivanja jona iz rastvora u gasnu fazu.



**Slika 3.29.** Šema ESI izvora

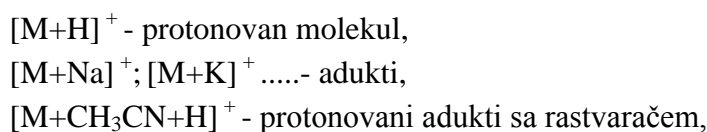


**Slika 3.30.** Šematski prikaz procesa u ESI izvoru

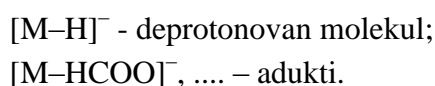
Sastav mobilne faze u velikoj meri utiče na proces raspršivanja i jonizacije. Mobilne faze sa visokim površinskim naponom i/ili viskoznošću, kao što su faze sa visokim udjelom vode, nepoželjne su jer vode formiranju kapljica velikih dimenzija. Visoke koncentracije pufera su poželjne jer dovode do nastanka manjih kapljica. Međutim, mora se voditi računa o

koncentraciji pufera jer u koncentracijama iznad mM dovode do nelinearne zavisnosti odgovora od koncentracije analita. Protok mobilne faze takođe utiče i na veličinu kapljica i na količinu naelektrisanja po kapljici, što se odražava na izgled spektra. Kod klasičnog ESI, jonizacija je najefikasnija pri protoku od 5–100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , što zahteva upotrebu kapilarnih kolona ili deljenje toka. Korišćenje pneumatski potpomognutog elektrospreja i/ili zagrejanog jonskog izvora omogućava korišćenje viših protoka (čak i preko 1 mL/min).

Joni u parnoj fazi su privučeni od strane suprotno naelektrisanog ulaza u kapilaru i prosleđuju se dalje u MS. Polaritet kapilare određuje koji će joni biti uzorkovani – kod pozitivne jonizacije (eng. *Positive Ionization*, PI) ulaz u kapilaru je negativno naelektrisan i uvlači katjone (pogodno za određivanje amina, amida, peptida itd.), dok u negativnom modu (eng. *Negative Ionization*, NI) je suprotno od PI (pogodno za određivanje karboksilnih i sulfonskih kiselina, fenola, konjugovanih metabolita (fosfati, sulfati, glukuronidi) itd.). Tipični joni u PI modu su:



a u NI modu:



Većina ESI izvora koristi ortogonalnu geometriju, kod koje je kapilara postavljena pod uglom od  $90^\circ$  u odnosu na kapilaru raspršivača. Zahvaljujući ovakvom dizajnu, neisparene kapljice i nenaelektrisane čestice se prosleđuju u odvod otpada i na taj način ne blokiraju otvor za uzorkovanje i ne ulaze u kapilaru.

Mobilna faza treba da ima takvu pH-vrednost da analiti budu maksimalno jonizovani tj. da budu u obliku  $[\text{M}-\text{H}]^-$  ili  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Ukoliko je pH-vrednost mobilne faze manja od 7 (kisela sredina) tj.  $\text{pH} \ll \text{p}K_a$  uslovi su pogodni za određivanje baza, koristeći PI modul ESI, dok je za analizu

kiselina potrebno da je  $\text{pH} \gg \text{p}K_a$  tj. bazna sredina koristeći NI modul ESI. Međutim, postoje neki izuzeci od ovog opšteg pravila. Naime uočeno je da je i pri visokim vrednostima pH (bazna sredina) koje su znatno više od optimalne, PI modul ESI pogodan za određivanje baza. Protonovanje i deprotonovanje pogodno je za jonizaciju niza biomolekula, uključujući proteine, nukleinske kiseline, vitamine, koenzime, mnoge polisaharide, konjugate (sa sumpornom, fosfornom, glukuronskom kiselinom) itd. Naime, zbog višestrukog naelektrisanja moguće je primeniti jednostavne kvadrupolne analizatore za analizu proteina sa velikom molarnom masom.

Mnoga jedinjenja, kao npr. šećeri ili triacilgliceroli, koja nemaju permanentnu šaržu i ne podležu transferu protona takođe se mogu analizirati zahvaljujući formiranju nekovalentnih kompleksa sa jonima iz rastvora. U slučaju kompleksiranja katjonima ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  i  $\text{Li}^+$ ) proces se naziva katjonizacija, a u slučaju kompleksiranja anjona ( $\text{HCOO}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) anjonizacija. Joni mogu biti dodati (npr. 20  $\mu\text{M}$   $\text{CH}_3\text{COONa}$  za građenje  $\text{Na}^+$ -adukata), poticati iz mobilne faze ( $\text{HCOOH}$  i  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) ili predstavljati nečistoće ( $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  iz staklenih boca za mobilnu fazu).

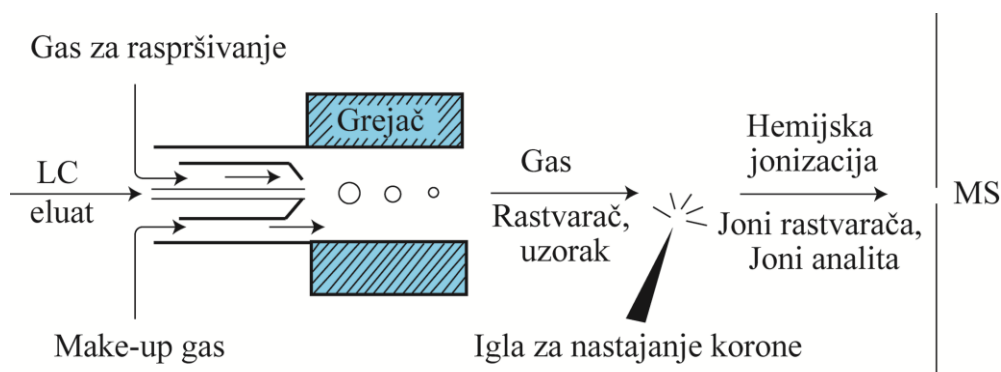
Jedinjenja koja se ne mogu jonizovati nijednim od navedenih mehanizama jonizacije, kao što su alkani, nije moguće registrovati ESI-MS tehnikom.

Kao što je već ranije napomenuto ESI je tehnika meke jonizacije i pri uobičajenim uslovima ne dolazi do fragmentacije molekula, što je slučaj sa npr. elektronskom jonizacijom kod GC-MS (odjeljak 2.4.5). Ako je potrebna fragmentacija jona pri primeni ESI, ona se mora naknadno izazvati različitim postupcima, najčešće kolizijom sa molekulima inertnog gasa.

***Hemijska jonizacija pri atmosferskom pritisku.*** Hemijska jonizacija pri atmosferskom pritisku je analogna jonizacionoj tehnici CI. Značajna razlika između ove dve tehnike je ta da se APCI odigrava pri atmosferskom pritisku i da ima glavnu primenu u oblasti jonizacije jedinjenja male mase. Pored toga, APCI nije pogodna za analizu termolabilnih jedinjenja.

Pošto primenom ESI nije moguće analizirati nepolarna jedinjenja, kao što su ugljovodonici, steroidi itd., jer se ne mogu jonizovati u zadovoljavajućoj meri (ili uopšte nije moguće), razvijena je alternativna

tehnika, hemijska jonizacija pri atmosferskom pritisku. Slično kao i kod ESI, eluat se raspršuje pneumatskim raspršivačem (slika 3.31) pri čemu se najveći deo mobilne faze uklanja prilikom prolaska mikrokapljica kroz grejač – isparivač (oko 400 °C). Nastale neutralne čestice prolaze kroz koronu – električno pražnjenje koje se formira na vrhu igle. Joni iz plazme predaju naelektrisanje molekulima analita, jonizujući ih pritom procesima protonacije/deprotonacije ili razmene naelektrisanja. U PI modu, jon-reagensi su protonovani joni mobilne faze ( $\text{SH}^+$ ), a u NI su  $\text{O}_2^-$ , njegovi hidrati i klasteri ( $[\text{S-H}]^-$ ). Da bi došlo do protonacije analita u PI modu neophodno je da je afinitet analita prema protonu veći nego eluenta (jednačina 3.3), odnosno deprotonacije analita u NI modu da je afinitet analita prema protonu manji nego eluenta (jednačina 3.4). Joni analita bivaju privučeni od strane suprotno naelektrisanog kraja kapilare i prosleđeni dalje u MS.



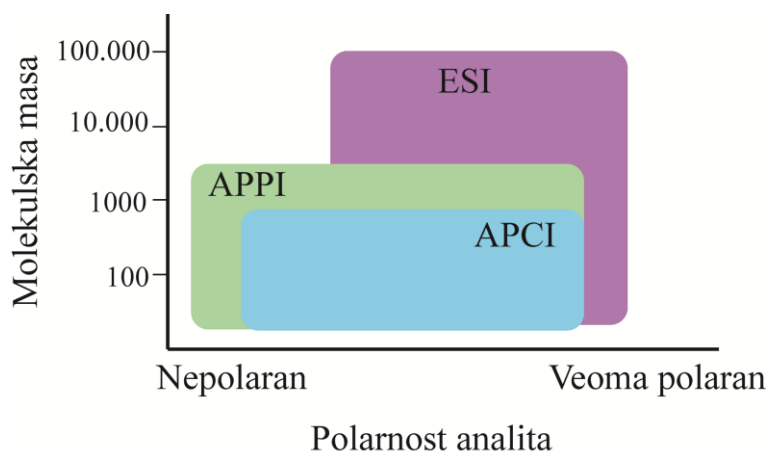
**Slika 3.31.** Šema APCI jonskog izvora



APCI je efikasna, relativno blaga tehnika jonizacije i može se primeniti i pri relativno visokim protocima mobilne faze (0,5–2 mL/min). Može se koristiti za jedinjenja niske do umerene polarnosti (masne kiseline, PAH, PCB i dr.), kao i za jedinjenja koja ne poseduju ni kisele ni bazne

grupe (ugljovodonici, alkoholi, karbonilna jedinjenja, estri i dr.), što je čini komplementarnom ESI.

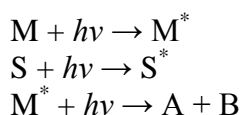
**Fotojonizacija pri atmosferskom pritisku.** Tehnika fotojonizacije pri atmosferskom pritisku je relativno nova tehnika, razvijena nakon ESI i APCI za potrebe analize jedinjenja koja se ovim dvema tehnikama slabo jonizuju, kao što su nepolarna jedinjenja (slika 3.32). APPI tehnika mnogo je manje zastupljena od ESI i APCI. Međutim, ona omogućava da se, kao što je napomenuto, i neutralna, nepolarna jedinjenja analiziraju LC-MS tehnikom, pri čemu se često postiže mnogo bolja osetljivost.

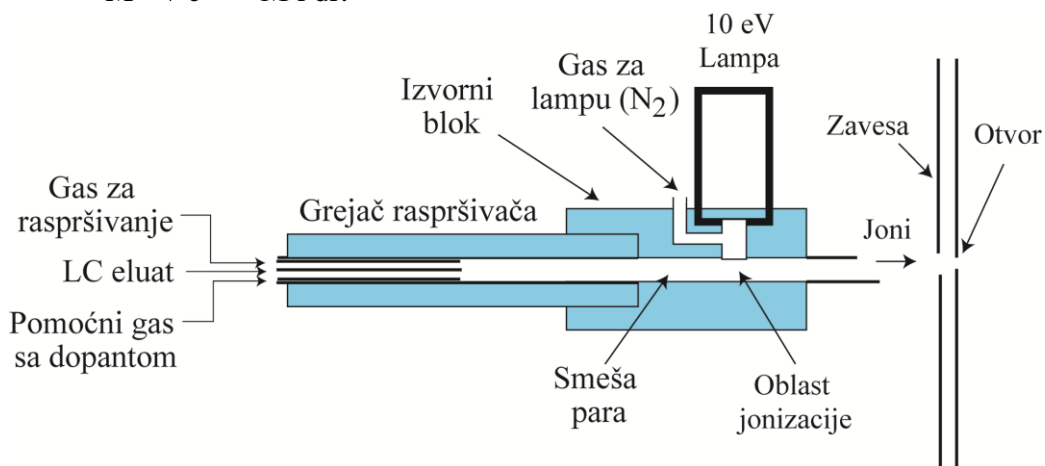
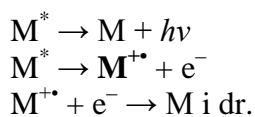


**Slika 3.32.** Oblast primene ESI, APCI i APPI

Kod APPI tehnike eluent isparava na sličan način kao i kod APCI, nakon čega se ozračivanjem UV fotonima (umesto koronom u APCI) pobuđuju molekuli mobilne faze i aditiva – dopanta, a koji dalje jonizuju molekule analita (slika 3.33).

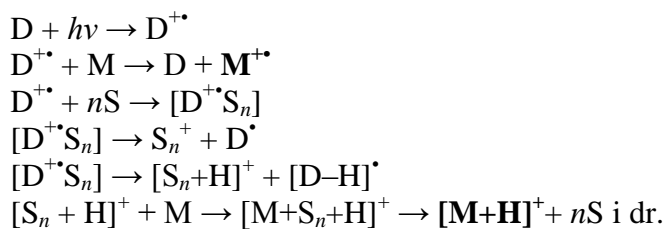
UV zraci mogu da jonizuju samo molekule čija je energija jonizacije niža od energije fotona (10 eV). Pod dejstvom UV lampe se odigrava niz procesa:





**Slika 3.33.** Šema APPI jonskog izvora

Međutim, ovi procesi fotojonizacije su često neefikasni zbog interakcija fotona sa neutralnim molekulima. Zbog toga, uobičajeno je dodavanje dopanta (D), rastvarača koji ima energiju jonizacije ispod 10 eV. Nastali  $D^{+\bullet}$  joni dalje reaguju sa molekulima analita i rastvarača generišući, pored ostalog,  $[M+H]^+$  jone:



Kao dopanti se najčešće koriste toluen, aceton pojedinačno ili u smeši.

APPI se može koristiti i u NI modu pri čemu se jonizacija odigrava termalnim elektronima koji su nastali fotojonizacijom dopanta ili emisijom iz metalnih površina jonskog izvora.

Za neke složene smeše, LC-MS sistem ne daje dovoljno dobru rezoluciju. Pored toga budući da su API tehnike uglavnom tehnike meke

jonizacije te pri uobičajenim uslovima ne dolazi do fragmentacije molekula, ukoliko je fragmentacija potrebna u cilju proučavanja strukture molekula ona se mora naknadno izazvati različitim postupcima, najčešće kolizijom sa molekulima inertnog gasa. To se postiže spajanjem dva ili više masenih analizatora tj. formiraju se tandemske masene spektrometri, LC–MS/MS instrument (slika 3.34). Tandemske masene spektrometri obično su trostruki četveropolni sistemi ili spektrometri sa četveropolnom jonskom zamkom. Da bi se postigla veća rezolucija nego što se može postići primenom kvadrupolnog masenog analizatora, krajnji maseni analizator u tandemskom MS sistemu može biti maseni analizator na bazi vremena preleta jona. Sektorski maseni spektrometri takođe se mogu kombinovati za dobijanje tandemskih sistema. Maseni spektrometar sa Furije-transformisanom jonskom ciklotronskom rezonancom, kao i maseni spektrometar sa jonskom zamkom mogu da rade tako da se obezbedi ne samo dvofazna masena analiza, već i eksperimenti  $n$ -tog reda. Takvi MS<sup>n</sup> sistemi omogućavaju eksperimente  $n$ -tog reda unutar jednog analizatora mase. Oni mogu biti kombinovani sa LC sistemima u instrumentima LC–MS<sup>n</sup>. LC–MS sistemi su uvek kompjuterski kontrolisani. Pomoću ovih instrumenata mogu se dobiti hromatogrami i spektri eluiranih pikova kako u realnom vremenu, tako i računom rekonstruisani. Akvizicija podataka je slična kao i kod GC–MS (odjeljak 2.4.5).



**Slika 3.34.** Izgled savremenog LC–MS/MS instrumenta

### 3.4. PODEONA HROMATOGRAFIJA

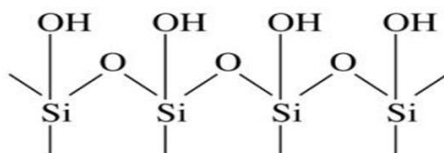
Najčešće korišćen tip HPLC je podeona hromatografija, u kojoj je stacionarna faza neka druga tečnost koja je nemešljiva sa tečnom mobilnom fazom. U početku se uglavnom primenjivala za nejonska, polarna jedinjenja niske do umerene molekulske mase (obično < 3000). Kasnije su, međutim, razvijene metode (derivatizacija i jonski parovi) koje su proširile oblast primene podeone hromatografije i na jonska jedinjenja.

Kod ranijih oblika podeone hromatografije korišćene su kolone kod kojih je tečna stacionarna faza bila adsorbovana na čvrstoj inertnoj podlozi, tj. tečnost je bila fiksirana fizičkom adsorpcijom. Pošto je u ovom slučaju tečna stacionarna faza nestabilna, njena primena u savremenoj HPLC nije česta. Danas se u modernim HPLC sistemima koriste kolone kod kojih je tečna stacionarna faza hemijski vezana za čvrst nosač, kao što su npr. C<sub>18</sub>-kolone, kod kojih se dugi ugljovodonični nizovi ponašaju kao tečnost. Kao posledica hemijskog vezivanja ova pakovanja se karakterišu visokom stabilnošću i nerastvorljivošću u mobilnoj fazi. Kolone sa hemijski vezanom stacionarnom fazom su takođe kompatibilne sa tehnikom gradijentnog eluiranja. Stoga će nadalje diskusija biti usresređena isključivo na podeonu hromatografiju sa hemijski vezanom stacionarnom fazom.

#### 3.4.1. Kolone sa hemijski vezanom stacionarnom fazom

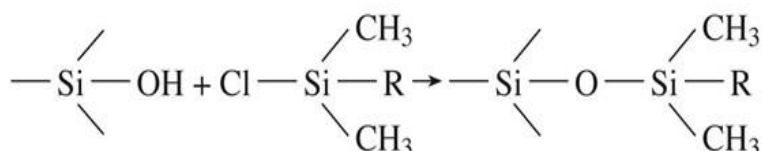
Nosači za većinu hemijski vezanih stacionarnih faza za podeonu hromatografiju se pripremaju od silicijum-dioksida (silika) ili kompozita na bazi silike. Ove čvrste supstance su formirane kao jednolične, porozne, mehanički čvrste čestice koje obično imaju prečnik od 1,5 do 10 μm pri čemu su najčešće veličine čestica od 3 do 5 μm. Površina potpuno hidrolizovanog silikagela (hidrolizovana zagrevanjem sa 0,1 M HCl tokom jednog ili dva dana) ima hemijski reaktivne silanolne grupe (slika 3.35). Površina silike najčešće sadrži oko 8 μmol/m<sup>2</sup> OH-grupa i ima površinu od 100 do 300 m<sup>2</sup>/g. Važno je napomenuti da se silicijum-dioksid rastvara u baznoj sredini pa se stoga ne sme koristiti iznad pH 8.





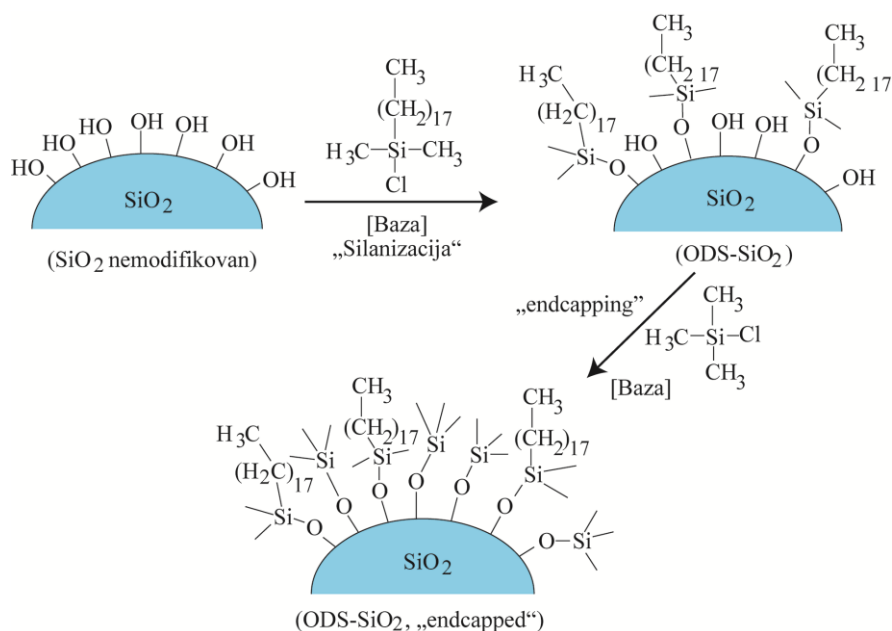
**Slika 3.35.** Struktura površine silikagela

Najčešće korišćeni za hemijsko vezivanje faze su siloksani koji nastaju reakcijom silanizacije hidrolizovane površine sa organohlorsilanom (slika 3.36).



**Slika 3.36.** Reakcija silanizacije. R je neka alkil-grupa ili neka supstituisana alkil-grupa

Prekrivanje površine silanizacijom ograničeno je na  $4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  ili manje zbog sternih razloga. Neizreagovale Si-OH grupe daju nepoželjnu polarnost površine, što može da dovede do pojave repa na hromatografskim pikovima (tzv. tejlovanja), naročito ukoliko je bazna sredina. Da bi se smanjio ovaj uticaj, siloksansko pakovanje se često sekundarno modifikuje daljom reakcijom silanizacije sa kratkolančanim agensima kao npr. trimetilhlorsilanom (proces poznat kao *end-capping*), koji se zbog svoje manje veličine, može vezati za neke neizreagovale silanolne grupe (slika 3.37). Alternativno, mobilnoj fazi mogu da se dodaju kiseline kao maskirajući agensi, koje maskiraju slabe silanolne interakcije, kao i katjoni ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ili  $\text{Ca}^{2+}$  ili  $\text{R}_4\text{N}^+$ ) koji sprečavaju jače interakcije.

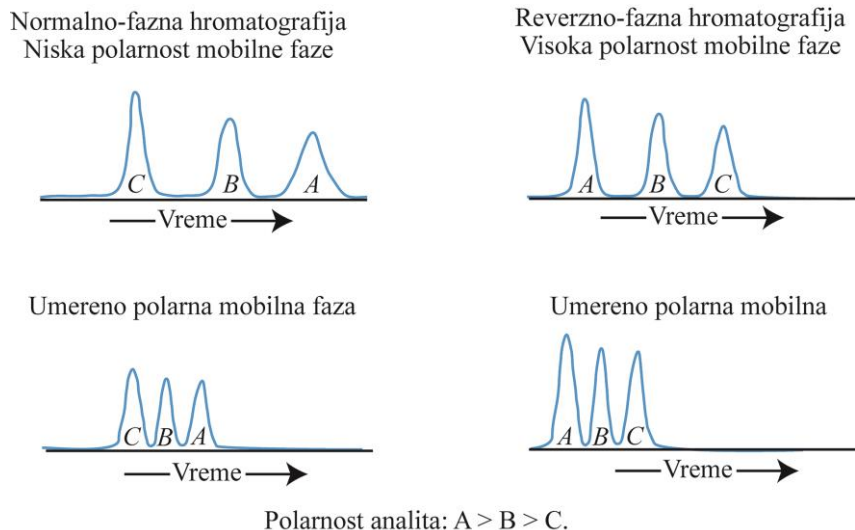


**Slika 3.37.** Reakcija silanizacije i „end-capping” rezidualnih silanolnih grupa

***Pakovanje kolone u normalno- i reverzno-faznoj hromatografiji.***

Razlikuju se dve vrste podeone hromatografije na osnovu polarosti mobilne i stacionarne faze. U početku razvoja HPLC primenjivane su vrlo polarne stacionarne faze sa OH-grupama, kao što su na primer trietilen-glikol ili voda, s jedne strane, i manje polarna mobilna faza kao što je heksan ili *i*-propil-etar, s druge strane. Iz istorijskih razloga, ova vrsta hromatografije danas se naziva **normalno-fazna hromatografija**. Kod NPC, najmanje polarna komponenta se prvo eluira, da bi se sa povećavanjem polarosti mobilne faze skraćivalo vreme eluiranja. S druge strane što je analit polarniji jače se vezuje za stacionarnu fazu i duže se zadržava u koloni.

U **reverzno-faznoj hromatografiji**, kako joj samo ime kaže, situacija je obrnuta, tj. stacionarna faza je nepolarna, često ugljovodonik, a mobilna faza je smeša polarnih rastvarača (kao što su voda, metanol, acetonitril ili tetrahidrofur). U ovom slučaju se najpolarnija komponenta prvo eluira, a povećavanje polarosti mobilne faze produžava vreme eluiranja. Ovi odnosi su prikazani na slici 3.38.

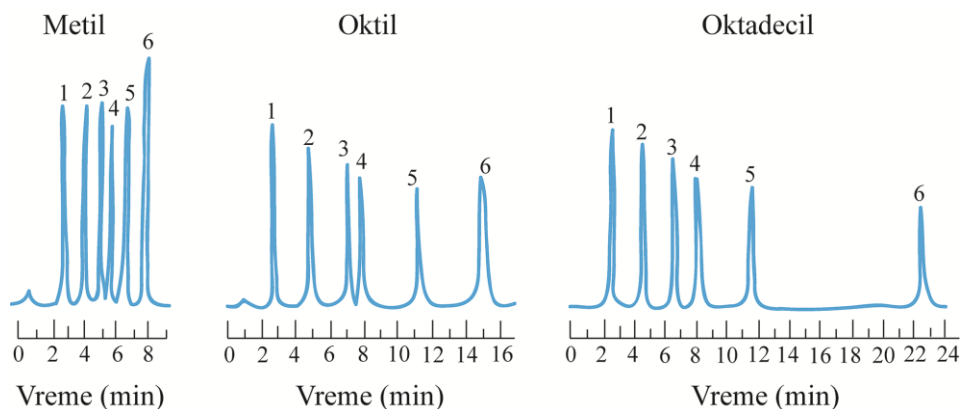


**Slika 3.38.** Relacija između polarnosti i dužine eluiranja kod NPC i RPC

Kao što se može videti sa slike 3.1, normalno-fazna hromatografija i adsorpciona hromatografija značajno se preklapaju. Zapravo, čini se da je zadržavanje kod većine tipova normalno-fazne hromatografije posledica procesa adsorpcije i desorpcije.

Pakovanja sa hemijski vezanom fazom se klasifikuju kao **reverzna faza** kada je hemijski vezana faza nepolarnog karaktera i kao **normalna faza** kada sadrži polarne funkcionalne grupe. Procena je da se tri puta češće HPLC razdvajanja vrše u kolonama sa pakovanjima sa reverznom fazom. Glavna prednost razdvajanja primenom reverzne faze je ta što se kao mobilna faza može koristiti voda, jer je voda jeftin, netoksičan, UV-transparentan rastvarač kompatibilan s biološkim analitima. Takođe, prenos mase je brz sa nepolarnim stacionarnim fazama, kao što je ravnoteža rastvarača posle gradijentnog eluiranja. Najčešće R-grupe (slika 3.36) su *n*-oktadecil (C<sub>18</sub>, česta skraćenica ODS), *n*-oktil (C<sub>8</sub>), fenil, F<sub>5</sub>-fenil i dr. Na slici 3.39 prikazan je uticaj dužine lanca alkil-grupe na retenciono vreme. Kao što se može videti sa porastom dužine lanca zadržavanje na stacionarnoj fazi eksponencijalno raste (slika 3.39). Pored toga, veća dužina lanca omogućava analizu i veće količine uzoraka. Tako na primer, maksimalna

količina uzorka ukoliko je vezana grupa  $C_{18}$  je otprilike duplo veća od one za  $C_4$  pri sličnim eksperimentalnim uslovima.



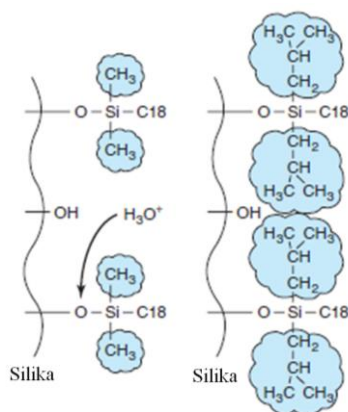
**Slika 3.39.** Uticaj dužine alkil-lanca stacionarne faze na retenciono vreme odabranih jedinjenja

Mehanizam pomoću kojeg ove površine zadržavaju analit nije sasvim jasan. Razvijene su dve teorije kojima se objašnjava mehanizam retencije i razdvajanja na vezanim RP fazama – solvofobna i teorija raspodele. Prema **solvofobnoj teoriji**, retencija analita više je povezana sa solvofobnim interakcijama sa mobilnom fazom, nego sa specifičnim interakcijama sa stacionarnom fazom. Prema **teoriji raspodele**, stacionarna faza ima važniju ulogu u procesu retencije. Smatra se da je analit u potpunosti „uronjen” između lanaca stacionarne faze (umesto prosto adsorbovan na njenoj površini) koja se ponaša kao tečnost. Može se reći da se uspostavlja raspodela između mobilne i stacionarne faze. Pretpostavlja se da je stvarni mehanizam retencije verovatno kombinacija oba navedena, pri čemu je raspodela važnija kod stacionarne faze sa dužim lancima, a adsorpcija kod stacionarne faze sa kraćim. Bez obzira na detaljni mehanizam zadržavanja, vezana faza se obično može tretirati kao konvencionalno, fizički zadržana tečnost.

Zahvaljujući širokom spektru različitih podloga, vezanih grupa (-O-SiR'R''C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>) i *end-capping* grupa, na tržištu je dostupan veliki broj  $C_{18}$  faza različite selektivnosti, stepena sekundarnih interakcija sa baznim i

kiselim analitima, stabilnosti i dr. Zbog toga, pri opisivanju eksperimentalnog postupka, nije dovoljno navesti da je razdvajanje izvršeno na „C<sub>18</sub>-koloni”, nego je neophodno precizirati korišćenu stacionarnu fazu.

U većini primena RPC, mobilna faza je polaran rastvarač, naprimer, vodeni rastvor metanola, acetonitrila ili tetrahidrofuran. U ovom režimu rada mora se voditi računa da pH-vrednost mobilne faze ne bude veća od pH 8, jer dolazi do disocijacije i rastvaranja silikagela. Isto tako, hidroliza siloksana odigrava se i u alkalnim rastvorima, što dovodi do razgradnje ili uništavanja hemijski vezane faze. S druge strane, kisela hidroliza siloksana ograničava mogućnost primene mobilne faze čiji je pH ispod 2. Radni opseg stacionarne faze u pogledu pH može se proširiti njenom modifikacijom, tj. uvođenjem dodatnih funkcionalnih grupa. Tako na primer ako su voluminozne izobutil-grupe vezane za atome silicijuma vezane faze (slika 3.40), stacionarna faza je zaštićena od napada H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> i stabilna je tokom dužeg perioda pri niskom pH, čak i na povišenoj temperaturi (naprimer, pH 0,9 na 90 °C).



**Slika 3.40.** Uvođenje voluminoznih izobutil-grupa štiti siloksanske veze od hidrolize pri niskim vrednostima pH

U komercijalnim pakovanjima kolona sa normalnom fazom, R u siloksanskoj strukturi je polarna funkcionalna grupa kao što je cijano -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CN; diolna, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>OH; amino, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>; i dr. Polarnost ovih materijala za pakovanje variraju u znatnom rasponu, pri

čemu je cijano-tip najmanje polaran, diolna faza umereno polarna, a amino-tipovi faza najpolarniji. Kod pakovanja sa normalnom fazom, mobilna faza je relativno nepolaran rastvarač, kao što su etil-etar, hloroform i *n*-heksan.

### 3.4.2. Razvoj metoda u podeonoj hromatografiji

Razvoj metoda u HPLC je složeniji nego u GC, jer u tečnoj mobilnoj fazi dolazi do interakcije analita i sa stacionarnom i sa mobilnom fazom. Međutim, u GC mobilna faza samo prenosi analite kroz stacionarnu fazu i ne doprinosi efikasnosti separacionog procesa. Dakle, na efikasnost separacije u GC ne utiče značajno primenjena mobilna faza, tj. da li je u pitanju helijum, azot ili vodonik. Za razliku od toga, uspešnost razdvajanja primenom podeone hromatografije često u velikoj meri zavisi od primenjene mobilne faze tj. da li je na primer acetonitril, heksan ili dioksan.

*Izbor kolone u podeonoj hromatografiji.* Uspešno hromatografsko razdvajanje sa interaktivnim mobilnim fazama zahteva pravilan balans intermolekularnih sila između tri učesnika procesa razdvajanja - analita, mobilne i stacionarne faze. Ove intermolekularne sile su kvalitativno opisane u odnosu na njihovu relativnu polarnost. Polarnost funkcionalnih grupa različitih analita povećava se u sledećem nizu: ugljovodonicima < etri < estri < ketoni < aldehidi < amidi < amini < alkoholi. Voda je polarnija od jedinjenja koja sadrže bilo koju od prethodnih funkcionalnih grupa.

Često se kolone u podeonoj hromatografiji biraju vodeći računa da je polarnost stacionarne faze sličnija polarnosti analita, dok je polarnost mobilne faze znatno drugačija. Ovaj postupak je u principu mnogo uspešniji pri razdvajanju analita u podeonoj hromatografiji od onog u kome su polarnosti analita i mobilne faze slični, dok su različiti od polarnosti stacionarne faze. U ovom slučaju se stacionarna faza često ne može uspešno „takmičiti” za analite uzorka, zbog čega je retenciono vreme veoma kratko i nije pogodno za praktičnu primenu, tj. retencioni faktor, *k*, je manji od 2. S

druge strane, ukoliko je polarnost analita i stacionarne faze vrlo slična i veoma različita od mobilne faze, retencija je veoma duga što takođe nije pogodno za praktičnu primenu, tj.  $k$  je znatno veći od 10.

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da se na osnovu polarosti analita, polarost mobilne i stacionarne faze moraju pažljivo odabrati da bi separacija analita bila efikasna (dobro razdvojeni hromatografski pikovi), a da analize ne traje dugo ( $2 \leq k \leq 10$ ). Nažalost, teorije interakcija mobilne i stacionarne faze za pojedine grupe analita uzorka su nesavršene, i u najboljem slučaju korisnik može samo da suzi izbor stacionarne faze. Kada se napravi uži izbor kolone, neophodno je izvesti određen broj eksperimenata kako bi se optimizovali uslovi za hromatografsku analizu, tj. odabrala odgovarajuća mobilna faza. Visok stepen korelacije između sastava mobilne faze i retencionih faktora moguće je predvideti na osnovu samo nekoliko eksperimenata. Ako se pokaže da je razdvajanje svih analita smeše nemoguće, možda je potrebno izabrati drugu vrstu kolone.

*Izbor mobilne faze u podeonoj hromatografiji.* Poboljšanje rezolucije hromatografske kolone se može postići promenom jednog od tri parametra,  $N$ ,  $k$  i  $\alpha$  (jednačina 1.17). U HPLC eksperimentalno se najlakše poboljšava rezolucija promenom retencionog faktora zbog njegove velike zavisnosti od sastava mobilne faze. Kao što je ranije konstatovano, optimalna vrednost  $k$  je u rasponu između 2 i 10. Međutim, za složene smeše ovaj opseg se često mora proširiti na od 0,5 do 20 da bi se obezbedilo dovoljno vremena da se pojave pikovi svih analita.

Međutim, ukoliko prilagođavanje vrednosti  $k$  ne da zadovoljavajuće rezultate, tj. ne dobije se hromatogram sa dobro razdvojenim pikovima, tada se varira i faktor  $\alpha$ . I u ovom slučaju je najjednostavniji način optimizacije promena sastava mobilne faze vodeći računa da  $k$  ipak ima navedene vrednosti. Alternativno,  $\alpha$  se može menjati i izborom drugog pakovanja kolona.

**Uticao jačine rastvarača na retencioni faktor.** Rastvarači koji snažno reaguju sa analitom često se nazivaju „jakim“ rastvaračima. Jačina rastvarača zavisi od prirode analita i stacionarne faze. Nekoliko indeksa je razvijeno za kvantitativno opisivanje polarnosti rastvarača, ali za podeonu hromatografiju najpogodniji je indeks polarnosti,  $P'$ . Indeks polarnosti je zasnovan na merenju rastvorljivosti analita u tri rastvarača: dioksan (nizak dipol proton akceptor), nitrometan (visoki dipol proton akceptor) i etanol (visoki dipol proton donator). Indeks polarnosti je numerička mera relativne polarnosti različitih rastvarača. U tabeli 3.3 su dati indeksi polarnosti (i druga svojstva) za brojne rastvarače koji se koriste u podeonoj hromatografiji. Kao što se može videti indeks polarnosti varira od 10,2 za visoko polarnu vodu do -2 za visoko nepolarne fluoroalkane. Bilo koji indeks polarnosti između ovih granica može se postići mešanjem dva odgovarajuća rastvarača. Tako je indeks polarnosti  $P'_{AB}$  smeše rastvarača A i B dat sledećim izrazom (jednačina 3.5):

$$P'_{AB} = \Phi_A P'_A + \Phi_B P'_B \quad (3.5)$$

gde su  $P'_A$  i  $P'_B$  indeksi polarnosti dva rastvarača a  $\Phi_A$  i  $\Phi_B$  zapreminske frakcije rastvarača A i B.

Kao što je u prethodnom odeljku istaknuto najlakši način za poboljšanje hromatografskog razdvajanja dve komponente je manipulacija sa  $k$  koji može da se menja promenom indeksa polarnosti rastvarača. Podešavanje  $P'$  se lako postiže upotrebom mobilnih faza koje se sastoje od smeše dva rastvarača. Obično promena za dve jedinice u  $P'$  daje (približno) deseterostruku promenu u  $k$ . Tako, pri razdvajanju primenom normalnih faza važi sledeća relacija (jednačina 3.6):

$$\frac{k_2}{k_1} = 10^{(P'_1 - P'_2)/2} \quad (3.6)$$

gde su  $k_1$  i  $k_2$  početna i krajnja vrednost za  $k$  za analite, a  $P'_1$  i  $P'_2$  su odgovarajući indeksi polarnosti. Za kolonu sa reverznom fazom važi sledeća relacija (jednačina 3.7):



$$\frac{k_2}{k_1} = 10^{(P_2 - P_1)/2} \quad (3.7)$$

Treba naglasiti da ove jednačine daju samo približne vrednosti.

Pošto se u NPC koristi polarna stacionarna faza sa povećanjem polarnosti mobilne faze raste i njenja eluciona moć. S druge strane u RPC se primenjuje nepolarna stacionarna faza te sa smanjenjem polarnosti mobilne faze raste eluciona moć. U principu jačina eluenta raste ukoliko je mobilna faza sličnija stacionarnoj fazi.

Često se u RPC koristi smeša rastvarača koja sadrži jedan polarni organski rastvarač (kao naprimer metanol (CH<sub>3</sub>OH), acetonitril (CH<sub>3</sub>CN) ili tetrahidrofuran (THF)) i vodu (ili vodeni pufer). Kombinacija ovih rastvarača obezbeđuju dovoljan raspon dipolnih i vodoničnih interakcija sa analitima da bi se omogućilo efikasno razdvajanje velikog broja jedinjenja u RPC. Prva smeša rastvarača koju bi trebalo isprobati je smeša acetonitril–voda. Acetonitril ima nisku viskoznost, što omogućava relativno nizak radni pritisak i omogućava detekciju u UV oblasti spektra do 190 nm. Metanol je drugi izbor za organski rastvarač, jer ima višu viskoznost i može se primeniti do 205 nm, dok je tetrahidrofuran treći izbor, jer se može primeniti do 212 nm, sporo se oksiduje i sporo uspostavlja ravnotežu sa stacionarnom fazom.

Retencioni faktor se može kontrolisati promenom zapreminskog udela organskog rastvarača. Efekat takve kontrole je prikazan hromatogramima na slici 3.40a i b. Ukoliko se eluira smešom rastvarača acetonitril : voda 41 : 59 (v/v), *k* ima malu vrednost koja iznosi 5 (misli se na poslednji pik) i svi analiti su eluirani u kratkom vremenu (~2 min) tako da je razdvajanje uglavnom nepotpuno (slika 3.41a). Povećavanjem zapreminskog udela vode na 70% (povećava se polarnost rastvarača, a time smanjuje eluciona moć), eluiranje se odvija tokom 7 min, tj. vrednost *k* je dva puta veća (slika 3.41b). Iako je ukupno vreme eluiranja dovoljno za postizanje efikasnog razdvajanja, jedinjenja 1 i 3 nisu potpuno razdvojena, a u manjoj meri i 5 i 6.

**Tabela 3.3.** Osobine uobičajenih mobilnih faza u HPLC

Rastvarač	Indeks refrakcije <sup>a</sup>	Viskoznost, cP <sup>b</sup>	Tačka ključanja, °C	Indeks Polarnosti, $P'$	Jačina eluenta <sup>c</sup> , $\epsilon^0$
Fluoroalkani <sup>d</sup>	1,27-1,29	0,4-2,6	50-174	<-2	-0,25
Cikloheksan	1,423	0,90	81	0,04	-0,2
<i>n</i> -heksan	1,372	0,30	69	0,1	0,01
1-hlorbutan	1,400	0,42	78	1,0	0,26
Ugljentetrahlorid	1,457	0,90	77	1,6	0,18
<i>i</i> -propietar	1,365	0,38	68	2,4	0,28
Toluen	1,494	0,55	110	2,4	0,29
Dietiletar	1,350	0,24	35	2,8	0,38
Tetrahidrofuran	1,405	0,46	66	4,0	0,57
Hloroform	1,443	0,53	61	4,1	0,40
Etanol	1,359	1,08	78	4,3	0,88
Etil-acetat	1,370	0,43	77	4,4	0,58
Dioksan	1,420	1,2	101	4,8	0,56
Metanol	1,326	0,54	65	5,1	0,95
Acetonitril	1,341	0,34	82	5,8	0,65
Nitrometan	1,380	0,61	101	6,0	0,64
Etilenglikol	1,431	16,5	182	6,9	1,11
Voda	1,333	0,89	100	10,2	Velik

<sup>a</sup> na 25°C.

<sup>b</sup> Centipoaz je uobičajena jedinica za dinamičku viskoznost; SI jedinica, 1 cP = 1 mN s/m<sup>2</sup>.

<sup>c</sup> Na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Množenjem sa 0,8 dobija se  $\epsilon^0$  na SiO<sub>2</sub>.

<sup>d</sup> Svojstva zavise o rasponu molekulske mase datih podataka.

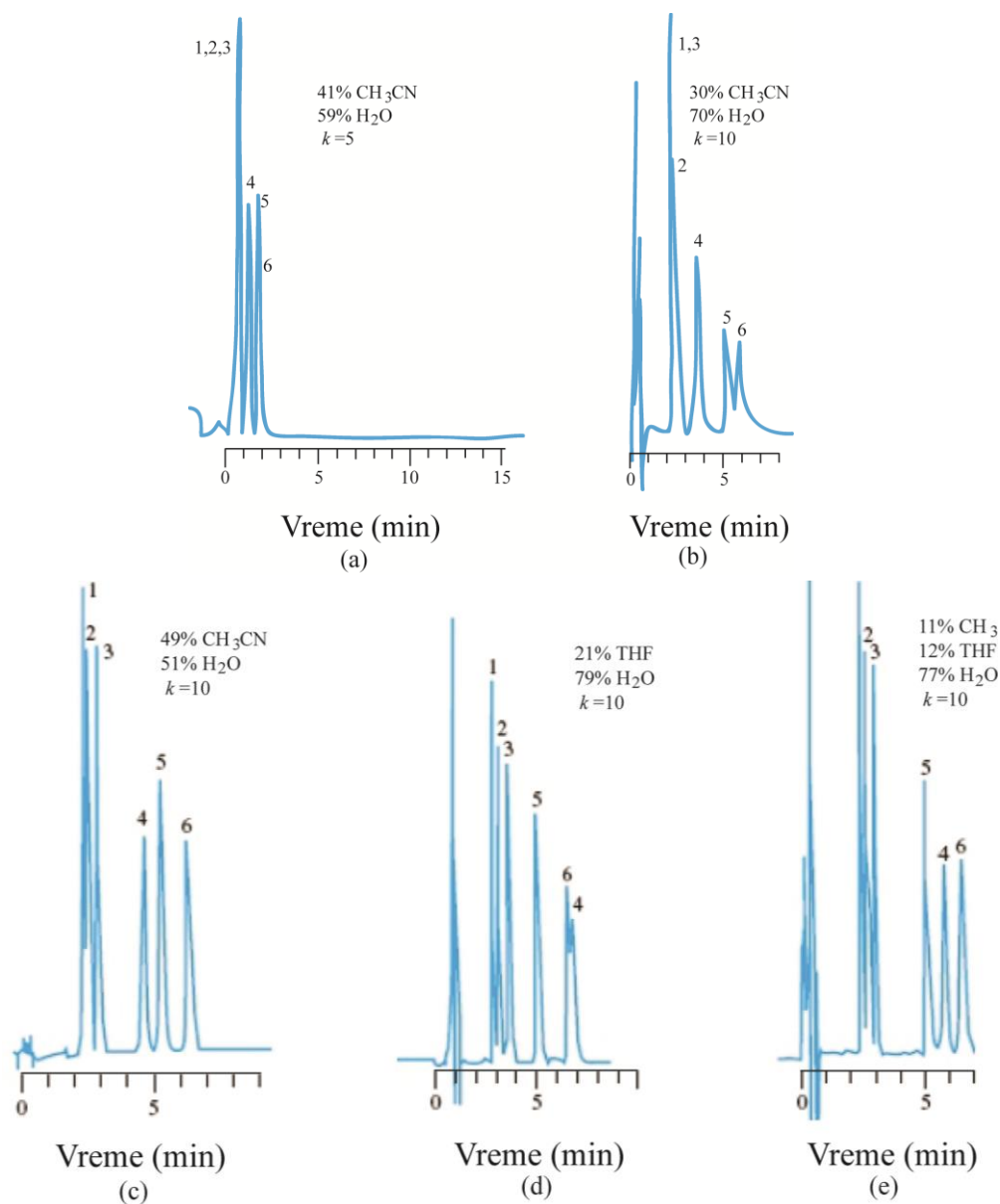
**Uticao mobilne faze na selektivnost.** U mnogim slučajevima je podešavanje vrednosti  $k$  dovoljno da bi razdvajanje analita uzorka bilo zadovoljavajuće. Međutim, kada se dva pika i nakon podešavanje vrednosti  $k$  preklapaju (kao što je slučaj na slici 3.41a i b), potrebno je povećati faktor selektivnosti za ta dva analita. Povećanje  $\alpha$  se najlakše može postići promenom hemijske prirode mobilne faze, pri čemu se uglavnom zadržava ista unapred određena vrednost za  $k$ . Najčešći pristup za ovu vrstu

optimizacije naziva se „**trougao selektivnosti rastvarača**” tj. koristi se smeša dva ili tri organska rastvarača. U ovom slučaju se uticaj mobilne faze na selektivnost posmatra kao rezultat interakcije proton-donora, proton-akceptora i dipolarnog karaktera (interakcija putem dipolarnih i polarizacionih sila). Rastvarači koji imaju ove interakcije su zatim izabrani za statistički dizajnirane eksperimente za pronalaženje optimalne smeše rastvarača.

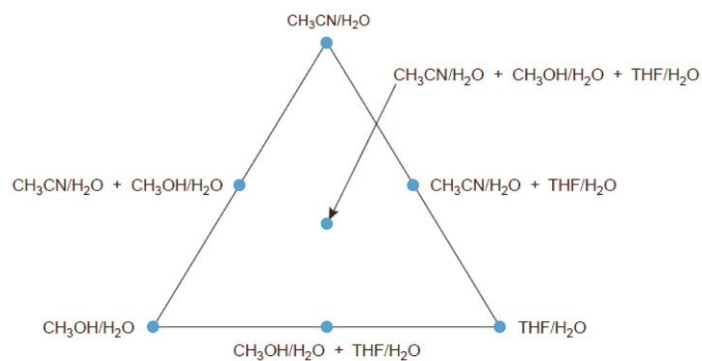
Za RPC tri rastvarača modifikatora su acetonitril, metanol i tetrahidrofur. Voda se zatim koristi za podešavanje jačine smeše rastvarača i dobijanje odgovarajuće vrednosti  $k$ . Tri binarne smeše rastvarača (voda plus modifikator) definišu tri vrha trougla rastvarača kao što je prikazano na slici 3.42. Obično je sedam do deset eksperimenata dovoljno da se definiše sastav rastvarača koji će dati najbolju selektivnost za pogodan  $k$  opseg. Takođe je korišćeno nekoliko drugih šema statističkog dizajna, kao što su puni faktorski dizajni, ali ovaj pristup zahteva više eksperimenata. Takođe su dostupni softveri koji olakšavaju optimizaciju sastava mobilne faze. Pored toga, softveri za simulaciju, kao naprimer DriLab (Molnár-Institute), ChromSwordAuto (ChromSword), LCSimulator (ACD/Labs), OSIRIS (Kromatek), HPLC Simulator, i dr. se često koriste za razvoj i optimizaciju metode.

Slika 3.41 b–e) ilustruje sistematski „trougao selektivnosti rastvarača” pristup za razvoj metode razdvajanja šest jedinjenja primenom RPC. Kao što je već napomenuto sa  $k = 10$  za komponentu 6, postoji prostor na vremenskoj skali za diskretne pikove, međutim,  $\alpha$  vrednost za komponente 1 i 3 (a u manjoj meri i 5 i 6) nije dovoljno velika za zadovoljavajuću rezoluciju. Zatim su urađeni dodatni eksperimenti da bi se našle bolje vrednosti za  $\alpha$  pri čemu je u svakom slučaju udeo vode podešen na nivo koji je dao  $k = 10$  za poslednji eluiran analit. Rezultati eksperimenata sa smešama metanol–voda i tetrahidrofur–voda prikazani su na slici 3.41c i d. Izvršeno je nekoliko dodatnih eksperimenata koji su uključivali sistematsku varijaciju parova dva organska rastvarača (u svakom slučaju  $k$  ja podešen na 10 pomoću vode). Konačno, sastav mobilne faze

primenom koje je dobijen hromatogram prikazan na slici 3.41e odabran je kao optimalan za odvajanje posmatrane grupe jedinjenja.



**Slika 3.41.** Sistematski pristup razdvajanja 6 jedinjenja primenom RPC. Korišćenjem vode je podešena veličina  $k$  hromatogrami a) i b). Uticaj promene  $\alpha$  pri konstantnoj vrednosti  $k$  je prikazan na hromatogramima b)–e)



**Slika 3.42.** Trougao selektivnosti rastvarača za optimizaciju razdvajanja sa RP. Prikazano je sedam smeša tri organska rastvarača (metanol, acetonitril i tetrahidrofuran). Voda se koristi za održavanje jačine rastvarača i održavanje vrednosti  $k$  u odgovarajućem opsegu

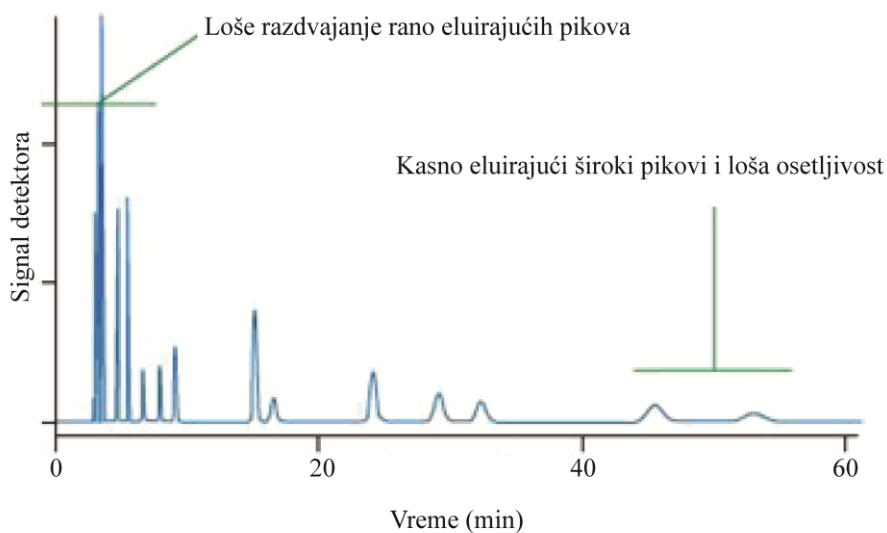
Za razdvajanje u **normalno-faznoj hromatografiji**, koristi se sličan trougao u kome su rastvarači za selektivnost dietil-etar, metilen-hlorid i hloroform. U ovom slučaju se podešavanje jačine rastvarača vrši sa  $n$ -heksanom. Sa ovim sistemima rastvarača, optimizacija se može postići minimalnim brojem eksperimenata. Treba imati na umu da su hlorovani rastvarači sada predmet strogih ekoloških propisa.

### 3.4.3. Gradijentno eluiranje

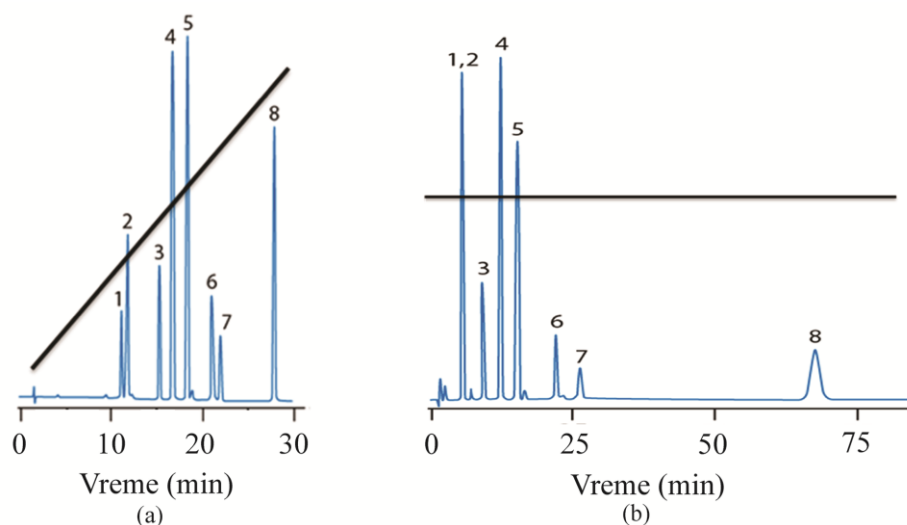
Kao što je bilo napisano u odeljcima 3.3.1 i 3.3.2 analiti se mogu eluirati na dva načina – izokratski, uz konstantan sastav mobilne faze tokom cele analize, i gradijentno, gde se sastav mobilne faze menja po unapred definisanom programu. Izokratsko eluiranje se primenjuje za veoma jednostavne uzorke sa analitima slične polarnosti, dok se gradijentno eluiranje uglavnom koristi u HPLC analizi kompleksnih uzoraka. Ako su komponente uzorka širokog opsega polarnosti, izokratsko eluiranje bi rezultovalo dugim vremenom analize (u slučaju slabe mobilne faze) ili brzim ali nedovoljnim razdvajanjem (u slučaju jake mobilne faze). Dugo vreme analize pored toga ima za posledicu i veliku potrošnju mobilne faze,

kao i širenje kasno eluirajućih pikova što otežava njihovu detekciju i kvantifikaciju (slika 3.43). Pored toga, komponente sa snažnom retencijom mogu ostati vezane za kolonu čime se narušavaju njene karakteristike u vidu smanjenja kapaciteta i eventualno promenom selektivnosti.

Prednosti gradijentnog eluranja su mnogobrojne. Gradijento eluiranje može da se isprogramira tako da se na početku analize koristi slaba mobilna faza koja je pogodna za eluiranje jedinjenja koja se slabo vezuju za stacionarnu fazu tj. imaju mali retencioni faktor, zatim da se tokom analize mobilna faza pojačava pri čemu se eliraju komponente koje se umereno jako vezuju za stacionarnu fazu, da bi na kraju eluiranja bila jaka mobilna faza, pogodna za eluiranje jedinjenja koja se čvrsto vezuju. Na ovaj način, pošto su kasniji (silazni) delovi pika eluirani jačom mobilnom fazom od početnih (uzlaznih), dolazi do kompresije pika i smanjenja *tail*-ovanja, tj. do poboljšanja simetrije. Sa slike 3.44 se može videti prednost gradijentnog eluiranja u odnosu na izokratsko. Zapreminski odnos rastvarača može se menjati linearno ili eksponencijalno.



**Slika 3.43.** Hromatogram dobijen izokratskom HPLC analizom

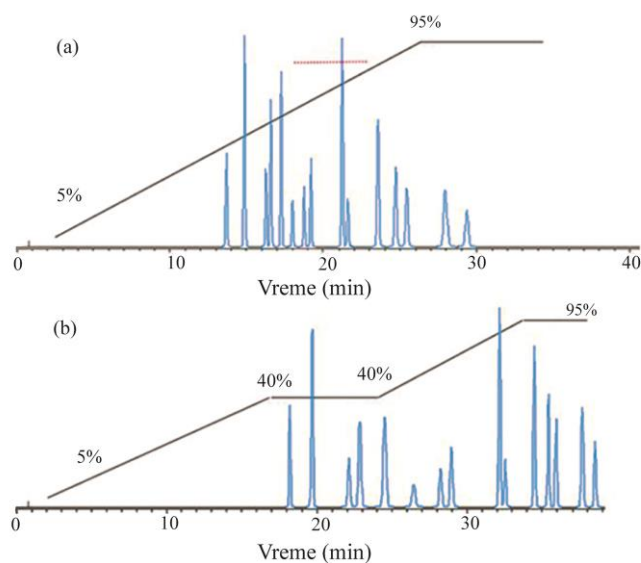


**Slika 3.44.** Prednosti a) gradijentnog u odnosu na b) izokratsko eluiranje. Crne linije prikazuju gradijentni profil

Gradijentno eluiranje se postiže korišćenjem bar dva rastvarača, jedan označen sa A (obično slabija faza, kod RPC – vodena) i B (jača faza, kod RPC – organski rastvarač). Polazi se od visokog sadržaja faze A (npr. 80–95%, odn. 5–20% B) i postepeno linearno podiže sadržaj faze B do 100% u toku zadatog perioda. Međutim, ukoliko je neka od komponenata uzorka nerastvorna u B njen maksimalan udeo ide samo do 70%. Nakon ovog perioda mobilna faza sa visokim %B se još neko vreme pumpa kroz sistem radi sigurnog ispiranja kolone (slika 3.45a). Po potrebi, početni i završni sastav eluenta, kao i nagib gradijenta (promena %B u jedinici vremena), mogu se dalje menjati radi optimizacije razdvajanja. Ako uzorak sadrži jedinjenja širokog spektra polarnosti, moguće je kreirati i gradijent sa više segmenata konstantnog ili promenljivog sastava mobilne faze (slika 3.45b). Nakon dostizanja maksimalnog udela komponente B („jakog” rastvarača) na koloni sa **reverznom fazom**, kolonu treba ispirati sa 10–20 zapremina kolone mobilnom fazom da bi se rastvorio eventualno jako vezan analit.

Pored binarnog gradijentat, mogući su i ternerni i kvaternerni koji podrazumevaju korišćenje 3 ili 4 rastvarača. Međutim, ove tehnike su mnogo složenije za optimizaciju, a zahtevaju i poseban hardver (ternerne i kvaternerne pumpe) visoke cene.

Najbrži način utvrđivanja da li analiti u uzorku treba da budu razdvojeni primenom gradijentnog eluiranja je da se uradi hromatografska analiza u širokom opsegu gradijenta (npr. 10–90% ACN) (slika 3.46a). Kao što se sa slike može videti razlika u retencionim vremenima prvog i poslednjeg pika iznosi ( $\Delta t$ ) 21,5 min, dok je gradijentno vreme (vreme tokom koga se menja sastav mobilne faze),  $t_G$ , 40 min.



**Slika 3.45.** a) Originalni gradijentni profil i b) gradijentni profil sa izokratskim delovima

Smatra se da gradijentno eluiranje treba koristiti ako je  $\Delta t/t_G > 0,25$ , odnosno, izokratsko eluiranje ako je  $\Delta t/t_G < 0,25$ . Dakle, ako se svi pikovi eluiraju u uskom opsegu sastava rastvarača, tada je izokratsko eluiranje odgovarajući izbor. Ako nije tako, tada bi za izokratsko eluiranje trebalo puno vremena i u tom slučaju treba koristiti gradijentno eluiranje. Ako je izokratsko eluiranje odgovarajući izbor, ili ako nemamo mogućnost da koristimo gradijentno eluiranje tada treba koristiti takav sastav mobilne faze koji se nalazi na sredini između prvog i poslednjeg pika. U primeru prikazanom na slici 3.46  $\Delta t/t_G = 21,5 \text{ min}/40 \text{ min} = 0,54 > 0,25$ , dakle treba primeniti gradijentno eluiranje. Ukoliko je razdvajanje analita dovoljno dobro i vreme analize prihvatljivo – to je metoda izbora. U ovom slučaju



separacija je dobra ali je vreme analize 36 min što je relativno dugo. Zbog toga treba pokušati dalju optimizaciju metode.

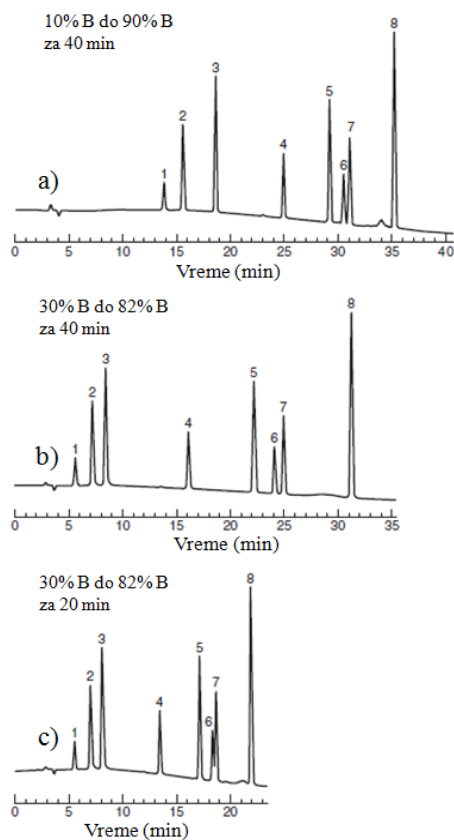
Na slici 3.47 je prikazan sastav mobilne faze u koloni u funkciji vremena. Kao što se može videti, u ovom slučaju je vreme zadržavanja tj. vreme za koje gradijent stigne do kolone 5 min tzv. *dwel time*. Retenciono vreme prvog pika je 14 min, a poslednjeg na 35,5 min (slika 3.46a) pri čemu je sastav mobilne faze 28% B i 72% vode odnosno, 71% B i 29% vode (slika 3.47). Iz toga se može zaključiti da nije potrebno eluirati mobilnom fazom sastava od 10 do 28% B i preko 71% B. Zbog toga drugi gradijent treba da bude od 28 do 71% B u istom  $t_G$  od 40 min. Ako se primeni gradijent od 30 do 82% B za istih 40 min dobija se hromatogram prikazan na slici 3.46b. Kao što se može videti pikovi su bolje razdvojeni, ali je dužina trajanja analize neznatno smanjena (32 min).

Da bi smo skratili dužinu trajanja analize može da se pokuša da se zadrži isti opseg gradijenta ali da se  $t_G$  skрати na 20 min (slika 3.46c). Kao što se može videti rezolucija je lošija, pikovi 6 i 7 se preklapaju te se stoga zadržava prethodni gradijent kao optimalan.

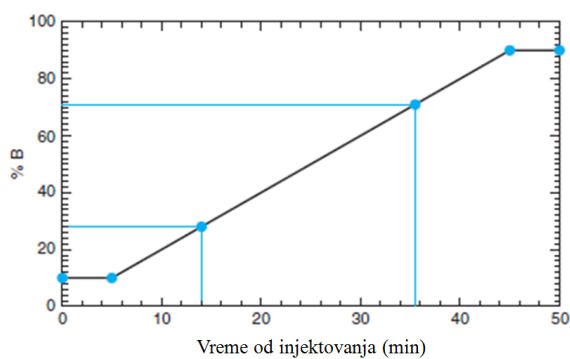
Ako linearan gradijent (slika 3.46b) ne daje zadovoljavajuće razdvajanje u prihvatljivom vremenu može se pokušati sa primenom tzv. segmentnog gradijenta kao na slici 3.45b. Segmentni gradijent obezbeđuje odgovarajući sastav mobilne faze za svaki region hromatograma. Na slici 3.48 je prikazan hromatogram za isti uzorak kao na slici 3.46.

Ukoliko ni segmentni gradijent ne da zadovoljavajuće razdvajanje analita u prihvatljivom vremenskom periodu može se pokušati na jedan od sledećih načina:

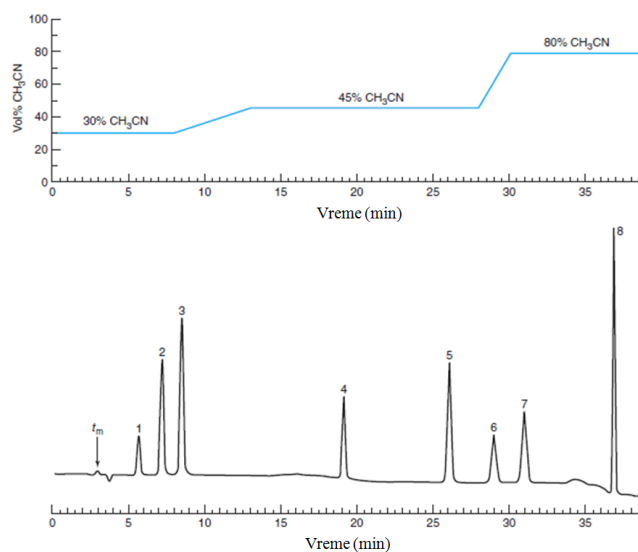
- Promeniti mobilnu fazu,
- Koristiti dužu kolonu,
- Koristiti manje veličine čestica ili
- Promeniti stacionarnu fazu.



**Slika 3.46.** Hromatogram uzorka snimljen u širokom opsegu linearnog gradijenta



**Slika 3.47.** Gradijent rastvarača za sliku 3.46. Gradijent je počeo pri  $t = 0$ , ali je vreme kašnjenja gradijenta (*dwel time*) 5 min. Zbog toga je rastvarač 10% B za prvih 5 min. Nakon toga sastav raste linearno do 90% B u toku 40 min. Nakon  $t = 45$  min sastav mobilne faze je konstantan, 90% B



**Slika 3.48.** Segmentni gradijent za primer na slici 3.46

#### 3.4.4. Primena podeone hromatografije

Kolone sa hemijski vezanom reverznom fazom, kada se koriste u kombinaciji sa jako polarnim rastvaračima (često vodenim) su idealan pristup za univerzalni sistem za LC. Zbog širokog spektra primene, njihove praktičnosti i lakoća kojom se  $k$  i  $\alpha$  mogu izmeniti izmenom sastava mobilne faze, ova se pakovanja najčešće primenjuju radi ispitivanja efikasnosti razdvajanja sa novim tipovima uzoraka.

U tabeli 3.4 je prikazano nekoliko najčešćih primera primene podeone hromatografije od mnoštva u raznim oblastima. Kompletna slika mnogobrojne primene ove tehnike može se dobiti u konsultaciji sa preglednim člancima i knjigama (pogledati preporučenu literaturu). Na slikama 3.49 i 3.50 prikazane su dve od više hiljada primena hromatografije sa hemijski vezanom reverznom fazom za analizu potrošačkih i industrijskih materijala.

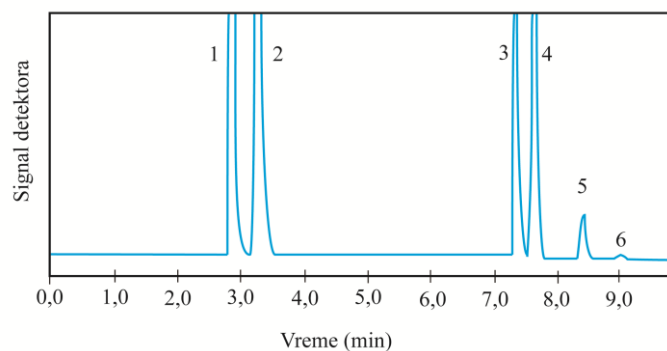
**Formiranje derivata.** U nekim slučajevima je korisno neke analite uzorka derivatizovati pre ili ponekad nakon hromatografskog razdvajanja. Takav tretman može biti poželjan da bi se:

- Smanjila polarnost molekularnih vrsta kako bi se mogle koristiti podeone, a ne adsorpcione ili jonoizmenjivačke kolone,

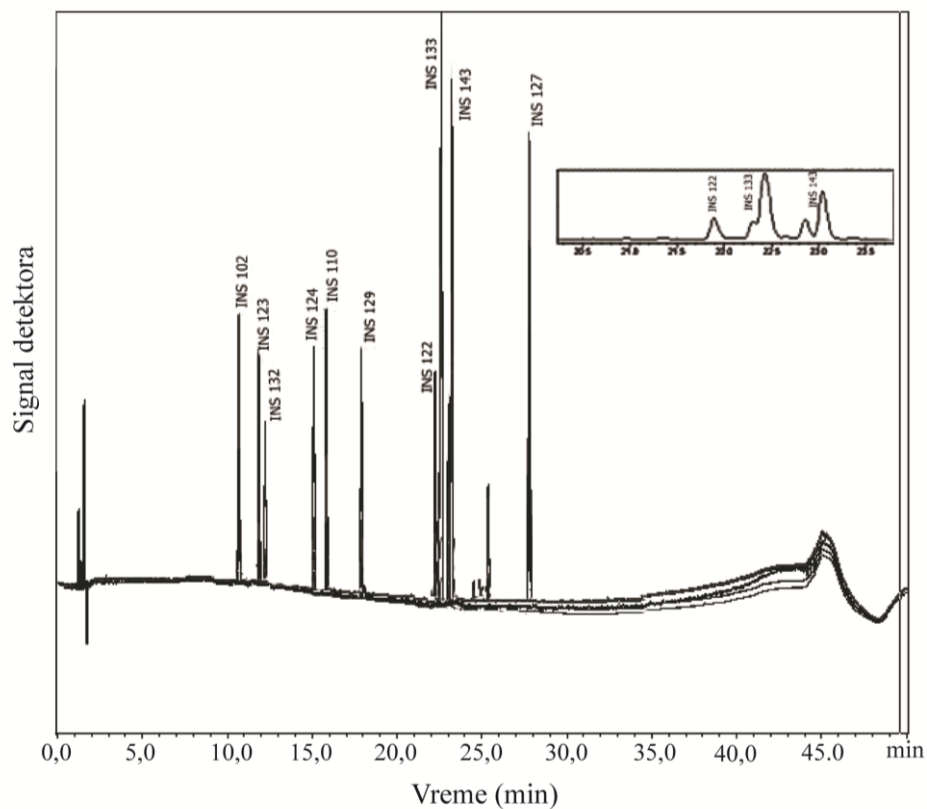
- Povećao odziv detektora, a samim tim i osetljivost na sve analite uzorka i
- Selektivno povećao odziv detektora na određene molekulske vrste uzorka.

**Tabela 3.4.** Najčešće oblasti primene podeone hromatografije

Polje	Tipovi smeša
Farmaceutika	Antibiotici, psihoaktivni lekovi, steroidi, analgetici
Biohemija	Amino kiseline, proteini, masti, ugljenihidrati
Prehrambeni proizvodi	Veštački zaslađivači, antioksidansi, mikotoksini, aditivi
Hemijska industrija	Kondenzovana aromatična jedinjenja, površinski aktivne supstance, boje
Polutanti životne sredine	Pesticidi, fenoli, polihlorovani bifenili, farmaceutici
Forenzika	Lekovi, droga, otrovi, alkohol u krvi
Klinička hemija	Metaboliti lekova, ekstrakti u urinu, estrogen

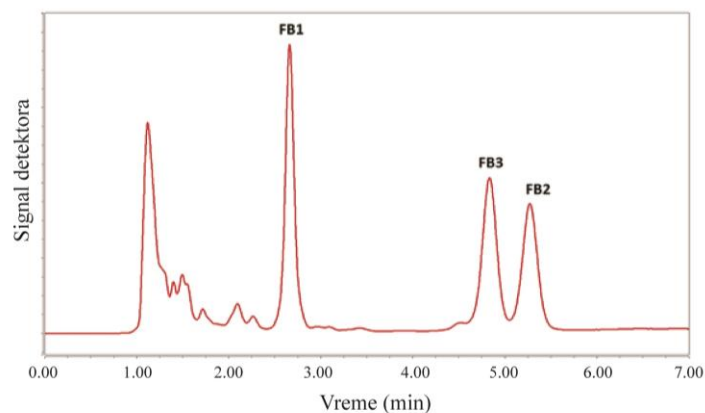


**Slika 3.49.** Hromatogram sintetičke smeše pet dodataka hrani i kafeina u soku: 1) natrijum-benzoat (15  $\mu\text{g/mL}$ ), 2) kalijum-sorbat (15  $\mu\text{g/mL}$ ), 3) kafein (15  $\mu\text{g/mL}$ ), 4) ponceau 4R (6  $\mu\text{g/mL}$ ), 5) alura crveno (6  $\mu\text{g/mL}$ ) i 6) karmoizin (6  $\mu\text{g/mL}$ ). Kolona: RP Inertsil ODS-3V (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). Mobilna faza: 0.025 M acetatni pufer, pH 6.0 i acetonitril sa gradijentom 0–5 min, 95 : 75 (v/v) i 5–10 min, 70 : 30 (v/v). Protok: 1,0 mL/min. UV-vis 230 nm



**Slika 3.50.** Simultano određivanje sintetičkih boja u jogurtu primenom HPLC. Kolona: Nucleodur C18ec (150 mm × 4.6 mm, veličina čestica 3 μm). Mobilna faza: A 1% amonijum-acetat (pH 7) i B (metanol : ACN 80 : 20 (v/v)). Gradijentno eluiranje: 0–2 min 100% A, 2–37 min A : B 20 : 80 (v/v), 37–40 min A : B 20 : 80 (v/v), 40–45 min 100% A, 45–50 min 100% A. ). Protok: 1,2 mL/min. Temperatura 38–40 °C. Vis 427–624 nm

Slika 3.51 ilustruje upotrebu pretkolonske derivatizacije u cilju određivanja fumonizina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>3</sub> koji inače ne apsorbuju u UV-vis delu spektra.



**Slika 3.51.** Hromatogram o-ftaldialdehid–2-merkptoetanolnih derivata standardnih rastvora FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> i FB<sub>3</sub> koncentracije 2,0 µg/mL. Kolona: Hyperilsil GOLD (150 × 3 mm, veličina čestica 3 µm). Mobilna faza: MeOH–0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 75 : 25 (v/v), pH 3,43 podešen sa H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Izokratsko eluiranje. Protok: 0,8 mL/min. Fluorescentni detektor: talasne dužina ekscitacije 335 nm i emisije 440 nm

### 3.5. ADSORPCIONA HROMATOGRAFIJA

Adsorpciona ili tečno-čvrsta hromatografija je klasični oblik HPLC koji je Tsvett prvi put uveo početkom XX veka (odeljak 1.2). Zbog velikog preklapanja između NP podeone hromatografije i adsorpcione hromatografije, mnogi principi i tehnike korišćeni u prvom slučaju se primenjuju i za adsorpcionu hromatografiju. Naime, u mnogim razdvajanjima primenom NP, procesi adsorpcije–desorpcije određuju retenciju.

Silicijum-dioksid i aluminium-oksidi su jedine stacionarne faze koje se koriste za adsorpcionu hromatografiju. Silicijum-dioksid je poželjna za većinu primena zbog većeg kapaciteta uzorka. Adsorpcione karakteristike ovih dveju supstanci su međusobno slične. U oba slučaja, retenciona vremena postaju duža kako se povećava polarnost analita.

Nađeno je da indeks polarnosti  $P'$ , koji je opisan u odeljku 3.4.2, takođe može da posluži kao orijentacioni vodič jačine rastvarača za adsorpcionu hromatografiju. Mnogo bolji indeks je, međutim, snaga eluenta

$e^{\circ}$ , koja predstavlja energiju adsorpcije po jedinici površine rastvarača. Snaga eluenta zavisi od adsorbensa, a vrednosti  $e^{\circ}$  za silicijum-dioksid je oko 0,8 aluminijum-oksida. Vrednosti za  $e^{\circ}$  u poslednjoj koloni Tabele 3.3 odnose se na aluminijum-oksid. Treba imati u vidu da su razlike između rastvarača u  $e^{\circ}$  otprilike slične onima za  $P'$ .

Zbog svestranosti i dostupnosti vezanih stacionarnih faza, upotreba tradicionalne adsorpcione hromatografije sa čvrstim stacionarnim fazama je poslednjih godina smanjena u korist normalno-faze hromatografije.

## LITERATURA

1. Abramović, B.F., Anderluh, V.B., Šojić, D.V., Gaál, F.F., Photocatalytic removal of the herbicide clopyralid from water, *Journal of Serbian Chemical Society*, 72, 1477–1486 (2007).
2. Aşçi, B., Dinç Zor, Ş., Aksu Dönmez, Ö., Development and validation of HPLC method for the simultaneous determination of five food additives and caffeine in soft drinks, *International Journal of Analytical Chemistry*, No 2879406, 6 p (2016).
3. Banerjee, S., Mazumdar, S., Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte, *International Journal of Analytical Chemistry*, ID 282574, 40 p, (2012).
4. Bento, W.D.A.S., Lima, B.P., Paim, A.P.S., Simultaneous determination of synthetic colorants in yogurt by HPLC, *Food Chemistry*, 183, 154–160 (2015).
5. Bruins, A.P., Atmospheric-pressure-ionization mass spectrometry: i. instrumentation and ionization techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, 13 (1), 37–43 (1994).
6. CHROMacademy, e-learning for the analytical chemistry community, Instrumentation of HPLC, Detectors, Crawford Scientific.
7. CHROMacademy, e-learning for the analytical chemistry community, Theory of HPLC, Gradient HPLC, Crawford Scientific.
8. Harvey, D., Modern Analytical Chemistry, McGraw-Hill Higher Education, USA, 2000.
9. <https://instrumentalanalysis.community.uaf.edu/files/2014/04/HPLC-Powerpoint.pdf> (pristupljeno 04. 04. 2020).
10. [http://people.whitman.edu/~dunnivfm/C\\_MS\\_Ebook/CH3/3\\_3\\_7.html](http://people.whitman.edu/~dunnivfm/C_MS_Ebook/CH3/3_3_7.html) (pristupljeno 04. 04. 2020).
11. [http://share.psu.ac.th/system/assets/media/files/000/000/760/original\\_DAD.JPG?1306826842](http://share.psu.ac.th/system/assets/media/files/000/000/760/original_DAD.JPG?1306826842) (pristupljeno 04. 04. 2020).
12. <https://slideplayer.com/slide/6863927> (pristupljeno 04. 04. 2020).
13. [https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-151014APP\\_Performance\\_Brief.pdf](https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-151014APP_Performance_Brief.pdf) (pristupljeno 04. 04. 2020).
14. <https://www.fishersci.co.uk/shop/products/proswift-c4-rp-5h-capillary-columns/p-6337028> (pristupljeno 04. 04. 2020).
15. <https://www.slideserve.com/kaz/high-performance-liquid-chromatography-hplc> (pristupljeno 04. 04. 2020).

16. <https://www.youtube.com/watch?v=SWrWPT5Lq84> (pristupljeno 04. 04. 2020).
17. [https://www.youtube.com/watch?v=fA4p8\\_Icyaw](https://www.youtube.com/watch?v=fA4p8_Icyaw) (pristupljeno 04. 04. 2020).
18. Jakšić, S., Živkov-Baloš, M., Mihaljev, Ž., Mašić, Z., Jajić, I., Banić, N., Abramović, B., Extraction without organic solvents in the determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>3</sub> in maize, by HPLC–FLD and ELISA tests, *Food Analytical Methods*, 8, 1446–1455 (2015).
19. Kirkland, J.J., Trends in HPLC column design for improved method development, *American Laboratory*, 26(9), pp. 28K (1994).
20. MacNair, J.E., Patel, K.D., Jorgenson, J.W., Ultrahigh-pressure reversed-phase capillary liquid chromatography with 1.0- $\mu$ m particles, *Analytical Chemistry*, 71, 700 (1999).
21. Magnusson, L.-E., Risley, D.S., Koropchak, J.A., Aerosol-based detectors for liquid chromatography, *Journal of Chromatography, A* 1421, 68–81 (2015).
22. Majors, R.E., Effect of particle size on column efficiency in liquid-solid chromatography, *Journal of Chromatographic Science*, 11 (2), 88–95 (1973).
23. Nazario, C.E.D., HenriqueFumes, B., Silva, M.R. MauroLanças, F., Chapter 13 - Miniaturized Column Liquid Chromatography, *Nanomaterials in Chromatography, Current Trends in Chromatographic Research Technology and Techniques*, 359–385 (2018).
24. Orčić, D., HPLC: Teorija I primena u biohemijskim naukama, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju I zaštitu životne sredine, Novi Sad, 2016.
25. Robb, D.B, Covey, T.R.; Bruins, A.P., Atmospheric pressure photoionization: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 72(15), 3653–3659 (2000).
26. Rogatsky, E., Gallitto, M., Stein, D.T., A novel performance test for outlet check valve function in HPLC pumps, *American Laboratory*, September 28, 2010.
27. Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R., Principles of Instrumental Analysis, Thomson Brooks/Cole, Belmont, 2007.
28. Wang, C., The ionization technology of LC-MS, Advantages of APPI on detection of PPCPs and hormones, *Austin Chromatography*, 2(2), ID 1032, 3 p (2015).



---

# 4. JONSKA HROMATOGRFIJA

---

- 
- 4.1. Uvod
  - 4.2. Istorijski aspekt
  - 4.3. Sistem za jonsku hromatografiju
  - 4.4. Prednosti jonske hromatografije
  - 4.5. Podela jonske hromatografije
    - 4.5.1. Jonoizmenjivačka hromatografija
    - 4.5.2. Jon-ekskluziona hromatografija
    - 4.5.3. Jon-par hromatografija
    - 4.5.4. Elektrostatička jonska hromatografija
    - 4.5.5. Helaciona jonska hromatografija
  - 4.6. Detektori
- LITERATURA
-

## 4.1. UVOD

Jonska hromatografija (eng. *Ion Chromatography*, IC) predstavlja proces izmene jona gde rastvor na bazi vode (mobilna faza), teče kroz kolonu koja je napunjena čvrstim materijalom za izmenu jona (stacionarna faza). Na stacionarnoj fazi se nalaze fiksirane jonske vrste na koje su labavije vezani suprotno naelektrisani joni (kontrajoni) koji se izmenjuju sa jonima istog naelektrisanja iz rastvora. Analiti se razdvajaju na osnovu njihovih različitih relativnih afiniteta prema jonskim vrstama na stacionarnoj fazi i mehanizam razdvajanja se uglavnom odvija kao jonska izmena između kontrajona na stacionarnoj fazi i jona (analit ili druga vrsta) u mobilnoj fazi. Najčešće upotrebljavan univerzalni detektor u IC je konduktometrijski detektor. Primenom pomenutog detektora, definisana su dva načina izvođenja analize, „prigušivačka” i „neprigušivačka” jonska hromatografija. Po prvom načinu rada, prigušivačka kolona se postavlja ispred detektora i time se omogućava smanjenje ili potpuno uklanjanje doprinosa provodljivosti eluata usled prisustva visokih koncentracija elektrolita u mobilnoj fazi, povećavajući na taj način osetljivost detekcije analita. Pored konduktometrijske detekcije, spektrofotometar, amperometar i spektrometar takođe mogu da se primene kao detektori u IC.

U procesu IC dominantan mehanizam je jonska izmena, međutim u mnogim slučajevima su uključene i sekundarne ravnoteže. Poslednjih nekoliko godina, pojam IC obuhvata i druge hromatografske tehnike, npr. IPC, helataciona jonska hromatografija i elektrostatička-jonska hromatografija, gde pomenute sekundarne ravnoteže igraju relevantnu ulogu.

## 4.2. ISTORIJSKI ASPEKT

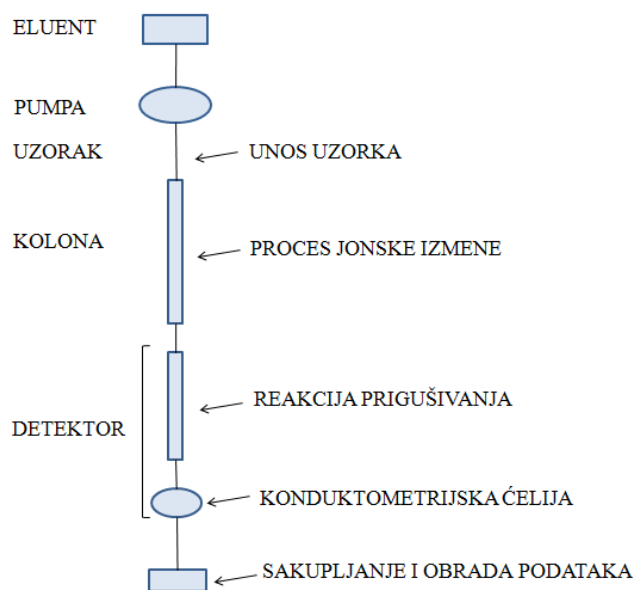
Jonsku hromatografiju su 1975. uveli Small, Stevens i Baumann kao novu analitičku metodu. Za kratko vreme, IC je razvijena od tehnike za razdvajanje nekoliko odabranih neorganskih anjona i katjona do sveobuhvatne analitičke tehnike za razdvajanje svih jonskih vrsta. Za veoma osetljivu detekciju jona merenjem njihove električne provodljivosti, mobilna faza iz kolone prolazi kroz prigušivačku kolonu. Prigušivačka

kolona hemijski smanjuje provodljivost mobilne faze tj. smanjuje šum eluenta, istovremeno povećavajući električnu provodljivost jona analita. Fritz je 1979. godine prikazao alternativni način razdvajanja i detekcije za neorganske anjone, u kojima je kolona za razdvajanje direktno povezana sa ćelijom detektora za merenje provodljivosti. Za ovakvo hromatografsko razdvajanje, moraju se upotrebljavati jonoizmenjivačke smole sa niskim kapacitetom, tako da se mogu koristiti mobilne faze male jonske jačine. Dodatno, joni mobilne faze bi trebalo da pokazuju malu provodljivost, omogućavajući tako detekciju visoke osetljivosti za komponente uzorka. Krajem 1970-ih godina, IC je prvi put primenjena za analizu organskih jona. Potreba za kvantitativnom analizom organskih kiselina dovela je do razvoja IC koja se zasniva na ekskluziji (isključenju) jona, koju su 1953. prvi opisali Wheaton i Bauman. Poslednjih 30 godina smo svedoci razvoja kolona sa visokom efikasnošću razdvajanja, što je rezultovalo značajnim smanjenjem dužine trajanja analize. Pored toga, metode zasnovane na jon-par procesu uvedene su kao alternativa za IEC, jer omogućavaju razdvajanje i određivanje i anjona i katjona. Mogućnosti primene IC znatno su povećane uvođenjem novih elektrohemijskih i spektrofotometrijskih detektora.

Prekretnica u razvoju IC je bilo uvođenje pulsnog amperometrijskog detektora 1983. godine, što je omogućilo veoma osetljivu detekciju ugljenih hidrata. Sve veći broj metoda u kojima se koristi kombinacija derivatizacije nakon razdvajanja u koloni i fotometrijska detekcija otvorilo je mogućnost primene IC u analizi teških i prelaznih metala. Sve nabrojano čini jonsku hromatografiju sastavnim delom moderne neorganske i organske analize.

### 4.3. SISTEM ZA JONSKU HROMATOGRAFIJU

Osnovni delovi jonskog hromatografa su prikazani na slici 4.1.



**Slika 4.1.** Osnovni delovi jonskog hromatografa

Pumpe dostavljaju mobilnu fazu kroz sistem jonskog hromatografa. Uloga mobilne faze je takmičenje sa jonima analita za mesta na stacionarnoj fazi, kao i razdvajanje analita iz uzorka u jasno definisane pikove na hromatogramu. Osnovni faktor pri odabiru mobilne faze je vrsta detektora koja će se upotrebljavati, priroda matriksa uzorka, vrsta uzorka, kao i vrsta kolone. Protok mobilne faze bez promene pritiska je neophodan kada se upotrebljava UV/Vis ili amperometrijski detektor.

Uzorak se u sistem unosi pomoću injektorskog ventila. Nakon zatvaranja injektorskog ventila, uzorak se uz pomoć mobilne faze prenosi u kolonu za razdvajanje.

Najvažniji deo sistema je upravo pomenuta kolona na kojoj se razdvajaju komponente uzorka. Kolona je pakovana čvrstim materijalom sa fino razdvojenim česticama sfernog oblika i predstavlja stacionarnu fazu. Prostor između čestica stacionarne faze predstavlja zapreminu šupljina,  $V_0$ .

Rastvor, mobilna faza, se propušta kontinualno kroz kolonu i popunjava prostor između čestica stacionarne faze. Rastvor koji napušta sistem nakon analize naziva se eluat, a proces ispiranja se naziva i eluiranje.

Izbor odgovarajuće stacionarne faze i hromatografskih uslova utiče na kvalitet analize. Razdvajanje se obično odvija na sobnoj temperaturi. Analiti se detektuju i kvantifikuju primenom detektorskih sistema. Kao što je pomenuto, konduktometar je najčešće upotrebljavan detektor u IC i koristi sa ili bez prigušivačkog sistema. Glavna funkcija prigušivačkog sistema, kao dela sistema za detekciju, je hemijsko smanjenje visoke provodljivosti elektrolita u mobilnoj fazi i prevođenje jona uzorka u oblik koji ima bolju provodljivost. Naime, sa detekcijom primenom prigušivača, mobilna faza se prevodi u manje provodan oblik. U početku su se u tu svrhu upotrebljavale prigušivačke kolone, a sa daljim razvojem tehnike, danas se najčešće upotrebljavaju mikromembranski prigušivači. Na primer, u slučaju anjonske analize, prigušivačka kolona sadrži katjonski izmenjivač, koji zamenjuje proton sa katjonom iz mobilne faze i uzorka. Pored konduktometra, najčešće se upotrebljavaju UV/Vis, amperometrijski, kao i fluorescentni detektori.

#### **4.4. PREDNOSTI JONSKE HROMATOGRAFIJE**

Određivanje jonskih vrsta u rastvoru je klasičan analitički problem koji se može rešiti na različite načine. Dok su u oblasti analize katjona dostupne brze i osetljive analitičke metode (atomska apsorpciona spektrofotometrija, polarografija i druge), postoji nedostatak odgovarajućih, visoko osetljivih metoda za analizu anjona. Konvencionalne hemijske metode kao što su titracija, fotometrija, gravimetrija, turbidimetrija i kolorimetrija su veoma naporne, dugotrajne i često nisu dovoljno osetljive. Suprotno tome, IC ima prednosti, kao što su brzina, osetljivost, selektivnost, simultana detekcija i stabilnost kolone za razdvajanje.

Važan aspekt pri odabiru neke metode je vreme potrebno za analizu, s obzirom da se broj uzoraka stalno povećava. Sa primenom visoko efikasnih kolona za razdvajanje koje se upotrebljavaju u IEC, jon-ekskluzionij i IPC skracuje se vreme potrebno za analizu u odnosu na konvencionalne hemijske metode

Uvođenjem mikroprocesorske tehnologije u kombinaciji sa modernim stacionarnim fazama visoke efikasnosti razdvajanja, omogućeno je određivanje jona u ppb koncentracijama bez prekoncentracije. Granica detekcije za jednostavne neorganske anjone i katjone je oko 10 ppb u slučaju uzoraka zapremine 50  $\mu$ l. Pored toga, primenom tehnika prekoncentracije, granica detekcije se može smanjiti na ppt.

Selektivnost jonskih hromatografskih metoda za analizu neorganskih i organskih anjona i katjona obezbeđena je izborom odgovarajućih sistema za razdvajanje i detekciju.

Glavna prednost IC, posebno za razliku od drugih instrumentalnih tehnika, kao što su fotometrija i atomska apsorpciona spektrofotometrija, je njena sposobnost da istovremeno detektuje sve komponente uzorka. Anjonski i katjonski profili mogu se dobiti za kratko vreme i pružaju informaciju o sastavu uzorka. Simultana detekcija jonskih vrsta je ograničena u slučaju ekstremnih razlika u koncentraciji komponenata uzorka.

Stabilnost kolona za razdvajanje u velikoj meri zavisi od vrste materijala koji se koristi za pakovanje kolone. Za razliku od kolona na bazi silicijuma, koje se obično koriste u HPLC, materijali od smole, poput polimera polistiren/divinilbenzena se koriste kao stacionarne faze u jonskoj hromatografiji. Visoka stabilnost ovih smola pri različitim pH-vrednostima omogućava upotrebu jakih kiselina i baza kao mobilne faze, što je preduslov za rasprostranjenu primenu ove metode. Nedostatak organskih polimera je njihova ograničena stabilnost prema organskim rastvaračima.

#### **4.5. PODELA JONSKE HROMATOGRAFIJE**

Moderna jonska hromatografija, kao deo tačne hromatografije, se zasniva na tri različita mehanizma razdvajanja komponenata, što i predstavlja osnov za podelu jonske hromatografije na jonoizmenjivačku hromatografiju visokih performansi (eng. *High Performance Ion Chromatography*, HPIC), jon-ekskluzionu hromatografiju visokih performansi (eng. *High Performance Ion Chromatography Exclusion*, HPICE) i IPC.

#### 4.5.1. Jonoizmenjivačka hromatografija

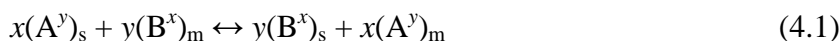
Jonska izmena je jedan od najstarijih procesa razdvajanja opisan u literaturi. Klasična kolonska hromatografija na makroporoznim jonoizmenjivačkim smolama je osnov moderne HPIC. Osnovne razlike između procesa su način unošenja uzorka, vrsta razdvajanja i detekcije. U klasičnoj IEC, kolone dužine od 10 do 50 cm obično su ispunjene anjonskom ili katjonskom smolom koje imaju veličinu čestica između 0,075 i 0,25 mm. Nakon unošenja uzorka na vrh kolone, analit se kreće kroz kolonu pod dejstvom gravitacione sile i odvija se proces razdvajanja. Pojedinačne frakcije mobilne faze sakupljaju se korišćenjem sakupljača frakcija i potom analiziraju. Zbog velike sposobnosti jonske izmene na kolonama, visoke koncentracije elektrolita su neophodne da bi se obezbedilo potpuno ispiranje jona uzorka iz kolone.

Veliki napredak u mogućnostima savremene jonoizmenjivačke hromatografije ogleda se u razvoju jonoizmenjivačkih smola niskog kapaciteta i visoke efikasnosti razdvajanja. Potrebna zapremina uzorka je značajno smanjena na 10–100  $\mu$ l, što je rezultovalo poboljšanom rezolucijom analize. Drugo značajno poboljšanje metode je automatska detekcija, koja omogućava kontinualno detektovanje komponenata uzorka tokom analize. I posebno, uvođenje konduktometra kao detektora provodljivosti jonskih vrsta, dodalo je novu dimenziju IEC.

**Osnovni principi.** Jonoizmenjivačke smole koje se upotrebljavaju u HPIC imaju funkcionalne grupe sa konstantnim naelektrisanjem. Odgovarajući kontraioni nalaze se u blizini ovih funkcionalnih grupa i na taj način ih neutrališu. U anjonskoj jonoizmenjivačkoj hromatografiji, kvaternerne amonijumove baze se uglavnom koriste kao grupe za razmenu jona, dok se sulfonatne grupe koriste u katjonskoj IEC. Kada se kontraion zameni sa jonom iz rastvora, jon se zadržava na stacionarnoj fazi. Različiti joni iz uzorka se zadržavaju različito vreme unutar kolone zbog različitih afiniteta prema stacionarnoj fazi i na taj način dolazi do razdvajanja.

Dakle, osnovni princip razdvajanja primenom HPIC je kompeticija između jona mobilne faze (analit ili druga vrsta) i kontraiona na fiksiranim

jonskim mestima na stacionarnoj fazi, kao što je pomenuto. Reakcije koje su uključene u proces HPIC su prikazane izrazom 4.1.



gde  $s$  i  $m$  predstavljaju stacionarnu i mobilnu fazu, a  $x$  i  $y$  predstavljaju naelektrisanje jona B i A (znak nije prikazan, jer jednačina opisuje proces i katjonske i anjonske izmene).

Reakcija se opisuje ravnotežnom konstantom  $K_{A,B}$  koja je prikazana jednačinom 4.2.

$$K_{A,B} = \frac{[B_s^x]^y [A_m^y]^x}{[A_s^y]^x [B_m^x]^y} \quad (4.2)$$

Parametri koji karakterišu jonsku izmenu su i koeficijent raspodele  $K_D$  (jednačina 1.1), retencioni faktor (jednačina 1.7), rezolucija (jednačina 1.16), kao i koeficijent selektivnosti (jednačina 1.20), o čemu je već bilo reči u uvodnom delu.

Najvažniji parametar za postizanje dobrog razdvajanja je selektivnost, koja se definiše kao relativna sposobnost jona uzorka da formira katjon-anjon par na stacionarnoj fazi. Selektivnost u jonoizmenjivačkoj hromatografiji zavisi od prirode analita (naelektrisanje, radijus jona, solvatacija), elektrostatičkih interakcija između jona i jonoizmenjivačkih grupa, mogućih hidrofobnih interakcija, solvatacije matriksa i kontrajona, fizičkih i hemijskih osobina stacionarne faze i sastava mobilne faze.

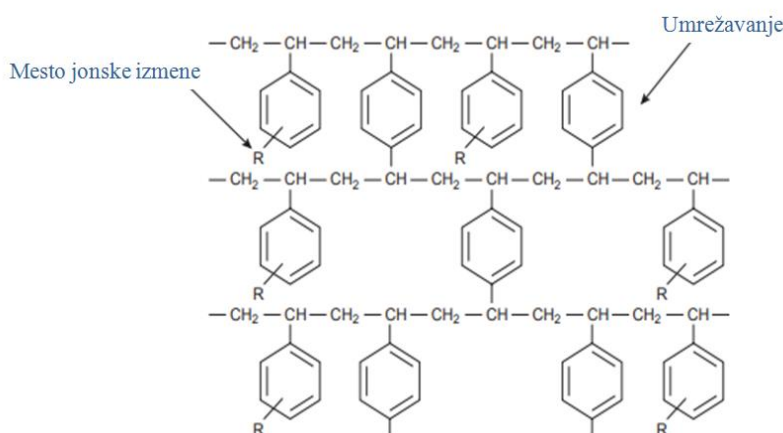
**Vrste stacionarne faze.** Za razliku od kolona čije pakovanje je na bazi silike koja se koristi u HPLC, organski polimeri se pretežno upotrebljavaju kao materijal za pakovanje kolona u HPIC. Ovi materijali pokazuju mnogo veću stabilnost prema ekstremnim pH-vrednostima. Iako se kolone u HPLC mogu koristiti samo u opsegu pH između 2 i 8, jonski izmenjivači na bazi organskih polimera su stabilni u alkalnoj sredini. Bez obzira na to, razvijeno je i nekoliko jonskih izmenjivača na bazi silicijuma,



a koji pokazuju mnogo veću hromatografsku efikasnost u poređenju sa organskim polimerima. Jonski izmenjivači su nerastvorne, čvrste supstance koje sadrže fiksirane jonske vrste i odgovarajuće vezane kontrajone suprotnog naelektrisanja. Pomenuta dva jona se drže zajedno zahvaljujući energiji rešetke ili hemijskoj vezi. Kontrajoni se mogu zameniti drugim kontrajonom koji ima isto naelektrisanje. Kada se jonski izmenjivač postavi u vodenu sredinu, koja sadrži elektrolit, izmenjivač se sastoji tada iz tri faze: čvrstog polimernog matriksa, rastvora „zarobljenog” između čestica izmenjivača i slobodnog rastvora između čestica izmenjivača. Mreža polimera deluje kao semipermeabilna membrana između dve tečne faze. Kontrajoni na jonoizmenjivaču se slobodno kreću i izmenjuju se sa kontrajonima istog naelektrisanja iz rastvora elektrolita.

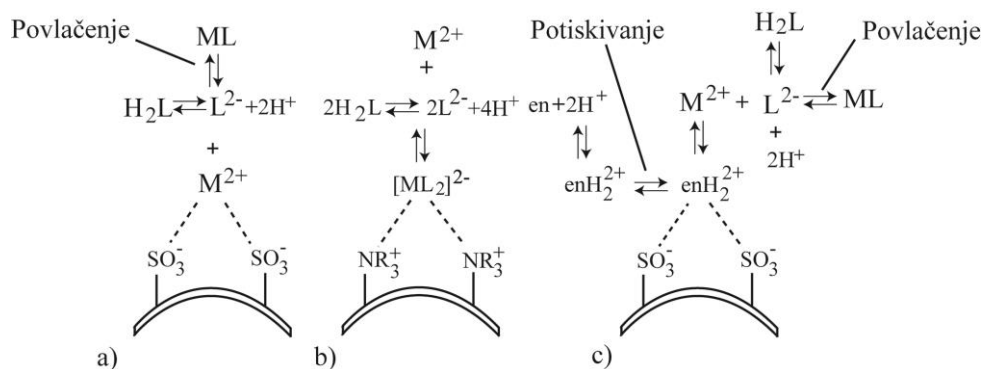
Kapacitet jonske izmene smole je definisan kao broj mesta za jonsku izmenu po ekvivalentu mase pakovanja kolona i utiče na efikasnost hromatografske analize kroz količinu uzorka. Obično se izražava u mili ekvivalentu po gramu smole. Uopšteno, to znači da se vremena zadržavanja jona analita povećavaju sa povećanjem kapaciteta jonske izmene smole. Ovaj efekat se može delimično nadoknaditi korišćenjem mobilne faze sa većom jonskom jačinom.

Na slici 4.2 je prikazana struktura smole of umreženog stiren-divinilbenzena, gde se umrežavanjem molekuli drže zajedno. U zavisnosti od vrste jonske funkcionalne grupe, R, zavisi vrsta izmenjivača. Ako je R,  $-\text{SO}_3\text{H}$  u pitanju je jako kiseo katjonski izmenjivač, ako je R,  $-\text{COOH}$  grupa u pitanju je slabo kiseli katjonski izmenjivač, zatim ako je R,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{OH}$  grupa u pitanju je jako bazna anjonska izmenjivačka smola i ako je R,  $-\text{NH}_3\text{OH}$  grupa, onda je u pitanju slabo bazna anjonska izmenjivačka smola.



**Slika 4.2.** Struktura umreženog stiren-divinilbenzena modifikovanog u cilju dobijanja jonoizmenjivačke smole. Jonske funkcionalne grupe, R, su uglavnom u *para* položaju i ne moraju biti vezane za svaki molekul stirena

Sa razvojem neorganske hemijske tehnologije, upotreba neorganskih materijala se znatno povećala. Stacionarne faze se dele na katjonske i anjonske. Kao što je već rečeno, jako kiseli katjonski izmenjivači sadrže  $\text{SO}_3^-$  grupu, dok jako bazni anjonski izmenjivači sadrže  $\text{NR}_3^+$  grupe. Slabo kiseli i slabo bazni jonoizmenjivači uglavnom sadrže  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{PO}_3\text{H}_2$ ,  $-\text{OH}$  ili  $-\text{SH}$ , odnosno  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHR}$  ili  $\text{NR}_2$  grupe. Mogućnost njihove primene kao izmenjivača zavisi od njihove disocijacije, a samim tim i od pH-vrednosti sredine. Mobilne faze koje se upotrebljavaju su obično rastvori na bazi vode (u koje se u nekim slučajevima dodaju organski modifikatori) koji sadrže kiseline, baze ili soli koji čine kontrajone, a koji se takmiče sa analitima za jonska mesta na stacionarnoj fazi. Analiza jona prelaznih i teških metala može se izvesti izmenom sa katjonom, anjonom i mešovitom razmenom. Pošto su koeficijenti selektivnosti za ove jone vrlo slični, razdvajanje se izvodi dodavanjem slabog ili jakog helatnog agensa u mobilnu fazu, tako da nastaju sekundarne ravnoteže koje povećavaju razlike u naelektrisanju, veličini, hidrataciji analita i selektivnosti prema stacionarnoj fazi. Slika 4.3 prikazuje ravnoteže koje nastaju na katjonskom ili anjonskom izmenjivaču između katjona, dodatnog liganda i katjona mobilne faze.



**Slika 4.3.** a) i c) Sekundarna hemijska ravnoteža u katjonskoj ili b) anjonskoj izmenjivačkoj hromatografiji. Metalni jon  $M^{2+}$  kao takav ili kao anjonski kompleks: a) katjonska izmena, ligand ( $L^{2-}$ ) ima efekat povlačenja ka katjonu analita ( $M^{2+}$ ) preko reakcije kompleksiranja, b) anjonska izmena, deprotonovani ligand ( $L^{2-}$ ) se takmiči (potisni efekat) sa anjonskim kompleksom ( $[ML_2]^{2-}$ ) i c) katjonska izmena, povlačenje i potiskivanje liganda i konkurentnog katjona  $M^{2+}$

**Anjonska izmena.** Stacionarne faze koje se koriste u anjonskoj IEC ne samo da se razlikuju u vrsti materijala, već se mogu klasifikovati i prema različitim veličinama pora i kapacitetima za jonsku izmenu. Naime, nezavisno od vrste materijala, anjonski izmenjivači sa visokim kapacitetima za izmenu jona imaju malu primenu, s obzirom da se neorganski anjoni moraju eluirati mobilnom fazom sa visokom jonskom jačinom. To čini detekciju primenom konduktometra veoma teškom, ako ne i nemogućom. U ovom slučaju se umesto konduktometra, može primenjivati ili amperometrijska ili fotometrijska detekcija nakon derivatizacije eluata. Znatno veću primenu imaju anjonski izmenjivači sa niskim kapacitetom izmene i to su: anjonski izmenjivači na bazi polimera (stiren/divinilbenzen kopolimeri, polimetakrilat, polivinilske smole), anjonski izmenjivači sa lateksom, anjonski izmenjivači na bazi silike, umreženi polimeri modifikovani cikličnim polietrima, ili anjonski izmenjivači na bazi alumine.

Vrsta mobilne faze koja se upotrebljava za anjonsku izmenu zavisi uglavnom od detekcionog sistema koji se primenjuje. Pošto se u mnogim slučajevima neorganski i organski anjoni detektuju merenjem

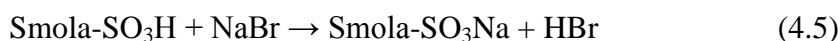
provodljivosti, mobilne faze koje se upotrebljavaju mogu se klasifikovati u dve grupe. Prvu grupu čine mobilne faze za detekciju provodljivosti sa hemijskim prigušivanjem šuma eluata, a drugu grupu čine mobilne faze za detekciju provodljivosti sa elektronskom kompenzacijom provodljivosti mobilne faze. Mobilne faze prve vrste uključuju soli slabih kiselina, koje imaju nisku provodljivost nakon hemijske modifikacije u prigušivačkom sistemu. Kao mobilne faze ove vrste upotrebljavaju se: natrijum-fenolat, smeša natrijum-karbonata i natrijum hidrogenkarbonata, aminokiseline, *N*-supstituisana aminoalkilsulfonska kiselina, natrijum-hidroksid, tetraboratni-joni, kao i aromatične aminokiseline. Mobilne faze druge vrste treba da imaju nisku provodljivost da bi se omogućila detekcija provodljivosti anjona. Kao mobilne faze ove vrste upotrebljavaju se: benzoati, ftalati, *o*-sulfobenzoati, aromatične karboksilne kiseline, kao i kalijum-hidroksid. Klasifikacija mobilne faze u dve gore pomenute grupe je neophodna samo u okviru primene konduktometra kao detektora. Izbor mobilne faze je mnogo jednostavniji kada se upotrebljavaju spektrofotometrijski ili amperometrijski detektor. U fotometrijskoj detekciji dostupan je veliki broj eluata, a moraju se uzeti u obzir fotometrijska svojstva jona mobilne faze, kao i njihove hemijske karakteristike. Alkalne soli fosforne kiseline, sumporne kiseline i perhlorne kiseline pokazale su se kao dobar izbor, jer dobro propuštaju UV zračenje. U oblasti amperometrijske detekcije, izbor mobilne faze je mnogo veći. Koncentracija elektrolita u mobilnoj fazi mora biti 50–100 puta veća od koncentracije jona analita. Mobilna faza deluje kao potporni elektrolit koji, smanjujući otpor pokretne faze, osigurava da pad napona ostane nizak. Hloridi, hlorati i perhlorati alkalnih metala i alkalni hidroksidi i karbonata su odgovarajući potporni elektroliti.

***Prigušivački sistemi u anjonskoj izmeni.*** Prigušivački sistemi se upotrebljavaju kod osetljive detekcije jona merenjem njihove električne provodljivosti. Funkcija pomenutog sistema je hemijsko smanjenje provodljivosti koja potiče od mobilne faze (šum) pre ulaska u ćeliju detektora. Stoga se prigušivač može smatrati delom detektorskog sistema. U najjednostavnijem obliku, sistem prigušivanja sastoji se od kolone koja sadrži jako kiselu katjonsku izmenjivačku smolu u protonovanom obliku. Funkcija ove prigušivačke kolone ilustrovana je analizom hloridnih i

bromidnih anjona. Posle razdvajanja ovih anjona sa mobilnom fazom kao što je natrijum-hidrogenkarbonat na jednom od opisanih anjonskih izmenjivača, eluat iz kolone se prosleđuje kroz prigušivačku kolonu pre ulaska u ćeliju detektora. Proces je prikazan reakcijama 4.3–4.5. Naime, prema reakciji 4.3 slabo disosovana ugljenična kiselina nastaje izmenom jona natrijuma iz natrijum-hidrogenkarbonata sa protonima iz katjonskog izmenjivača:



Slično, natrijum-hlorid i natrijum-bromid se prevode u odgovarajuće kiseline prema reakcijama 4.4 i 4.5.

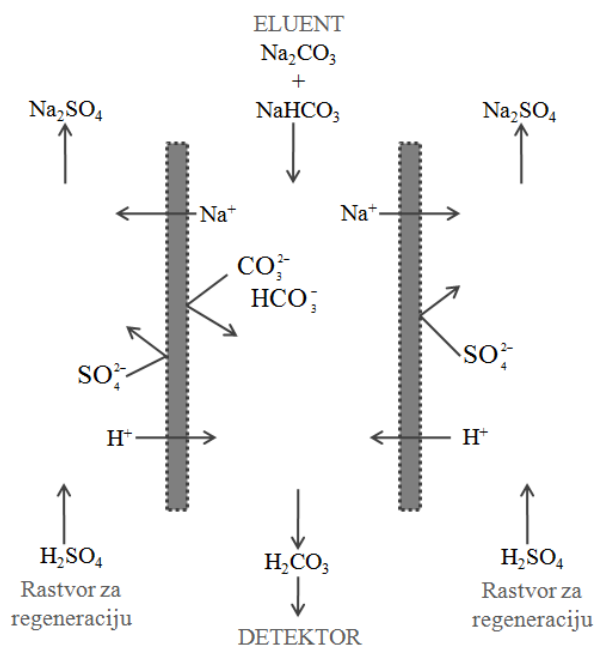


Dakle, elektrolit iz mobilne faze se prevodi u vodu, a analizirani anjoni se prevode u odgovarajuće kiseline. Kao rezultat prigušivanja, mineralne kiseline sa jakom provodljivošću u prisustvu slabo disosovane ugljenične kiseline ulaze u ćeliju detektora i jednostavno se detektuju.

Prednost prigušivačke metode je njena velika osetljivost. Pored toga, povećava se i specifičnost ove metode usled mogućnosti hemijske modifikacije mobilne faze i uzorka u ispitivanom sistemu. Dakle, primenom prigušivačke kolone usled izmene katjona iz eluenta i uzorka sa protonima dovodi do toga da detektor provodljivosti registruje samo anjone koji potiču iz uzorka.

Nedostatak prigušivačkih kolona je potreba za periodičnom regeneracijom. Isto tako, veličina čestica jonoizmenjivačke smole i zapremina šupljina na prigušivačkoj koloni utiču na kvalitet razdvajanja, jer oba parametra utiču na širenje pikova na hromatogramu. Ukupna zapremina prigušivačke kolone treba da bude što manja da se spreči mešanje već razdvojenih signala. Međutim, uzimajući u obzir kapacitet razmene, ukupna zapremina prigušivačke kolone treba da bude što veća. Oba zahteva se ne mogu ispuniti, pa dimenzija prigušivačkih kolona uvek predstavlja kompromis između kapaciteta izmene i širenja pika. U poslednje vreme se

sve više upotrebljavaju **membranski prigušivački sistemi** pored opisanih konvencionalnih prigušivačkih kolona. Naime, navedeni nedostaci prigušivačkih kolona mogu se eliminisati upotrebom prigušivačkih šupljih vlakana koja se kontinuirano regenerišu. Na slici 4.4 prikazano je prigušivačko šuplje vlakno za anjonsku izmenu.

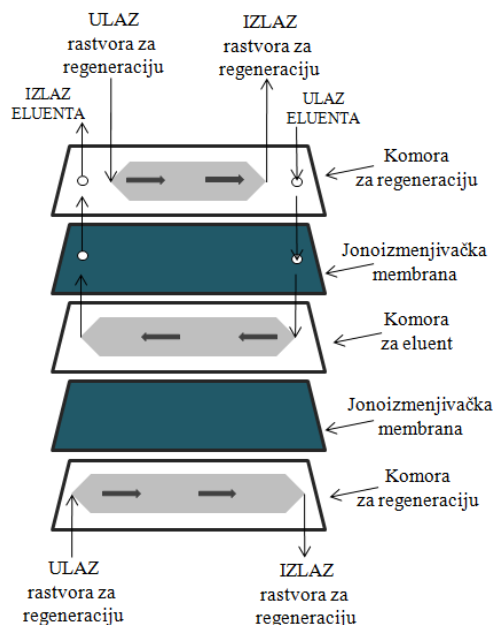


**Slika 4.4.** Šematski prikaz prigušivačkog šupljeg vlakna u anjonskoj izmeni

Naime, prigušivačka vlakna pogodna za anjonsku jonoizmenjivačku hromatografiju deluju kao katjonski izmenjivači, katjoni mobilne faze se izmenjuju sa protonima u rastvoru za regeneraciju. Pokretačka sila za difuziju protona kroz membranu obezbeđena je njihovom naknadnom reakcijom sa hidrogenkarbonatom u cilju formiranja ugljenične kiseline. Da bi održali jonsku ravnotežu, katjoni difunduju u rastvor za regeneraciju. Kao što je prikazano na slici 4.4, mogu se razlikovati tri različita regiona i to prvi gde mobilna faza ulazi u prigušivačko vlakno (katjonski izmenjivač u obliku natrijuma), zatim region dinamičke ravnoteže u kome se dešavaju reakcije prigušivanja i region regeneracije gde mobilna faza napušta prigušivačko vlakno (katjonski izmenjivač u obliku vodonika). Jednom

uspostavljena dinamička ravnoteža se održava sve dok se relevantni radni uslovi ne promene.

Iako su prigušivački sistemi veoma efikasni u pogledu povećanja osetljivosti, njihova primena ograničava izbor mobilne faze i njene koncentracije. Stoga je cilj razvoja nove generacije prigušivača bio da se dizajnira sistem koji će predstavljati kombinaciju pozitivnih osobina pakovanih prigušivačkih kolona i prigušivačkih šupljih vlakana i to je postignuto uvođenjem **mikromembranskih prigušivača**. Naime, mikromembranski prigušivači poput prigušivačkih šupljih vlakana, zasnivaju se na principu neprekidne regeneracije, ali imaju mnogo viši kapacitet izmene. Značajan napredak postignut je u daljem smanjenju zapremine šupljina, koje u slučaju mikromembranskih prigušivača iznose samo 50  $\mu$ l. Dalje poboljšanje ogleđa se u samom rukovanju sistemom. Dok membrane u prigušivačkom šupljem vlaknu stare i treba ih često menjati, mikromembranski prigušivač se praktično ne mora menjati ako se slede uputstva za upotrebu. Na slici 4.5 je prikazana struktura „sendvič” mikromembranskog prigušivača. Mobilna faza prolazi kroz komoru za ispiranje koja se nalazi u sredini, dok tok regeneracije protiče kroz dve povratne komore. Katjoni mobilne faze se ovde mnogo efikasnije transportuju do susedne membrane nego što je u slučaju primene prigušivačkog šupljeg vlakna. Najveći napredak u primeni jonske hromatografije, a koji je omogućen razvojem mikromembranskih prigušivača je uvođenje gradijente tehnike eluiranja sa naknadnom detekcijom provodljivosti. Dakle, u ovom prigušivačkom sistemu mobilna faza i prigušivački rastvor se kreću u suprotnim pravcima, sa svake strane permeabilne jonoizmenjivačke membrane. U slučaju analize anjona, membrana je na bazi katjonskog izmenjivača, a u slučaju analize katjona, membrana je na bazi anjonskog izmenjivača. Na primer, ako je potrebno ukloniti jone natrijuma iz mobilne faze, kiselina za regeneraciju protiče kroz prigušivački deo sistema. Joni Na iz mobilne faze se izmenjuju sa vodonikovim jonima iz membrane i nakon toga migriraju kroz membranu i dalje se izmenjuju sa vodonikovim jonima iz rastvora za regeneraciju.



**Slika 4.5.** Šematska struktura mikromembranskog prigušivača u anjonskoj izmeni

**Katjonska izmena.** Sistem za razdvajanje i određivanje katjona ekvivalentan je sistemu koji se upotrebljava za analizu anjona. Sastoji se od katjonskog izmenjivača niskog kapaciteta i prigušivačke kolone koja sadrži smolu za anjonsku izmenu sa jakom bazom u obliku hidroksida. Umesto prigušivačke kolone u savremenim uređajima upotrebljavaju se membranski prigušivači. Kao i u slučaju anjonske analize, primena prigušivačkog sistema nije neophodan preduslov za određivanje katjona pomoću konduktometra kao detektora.

Reakcija izmene sa katjonom, M, koji se nalazi na stacionarnoj fazi katjonskog izmenjivača može se prikazati na sledeći način (reakcija 4.6 i 4.7):





Dakle, kiselina iz mobilne faze se konvertuje u vodu, a analizirani katjoni se prevode u odgovarajuće hidrokside. Razdvajanje katjona zasniva se na njihovim različitim afinitetima prema stacionarnoj fazi. Kao i u slučaju anjonskih izmjenjivača, katjonski izmjenjivači se klasifikuju prema vrsti materijala od koga je sačinjen nosač (skelet). Iako se organski polimeri najčešće koriste u proizvodnji katjonskih izmjenjivača, to nije neophodno, s obzirom na to da se razblažene kiseline upotrebljavaju kao sredstvo za eluiranje prilikom katjonskih razdvajanja, te nije neophodna stabilnost tokom celog opsega pH-vrednosti koji je karakterističan za organske polimere. Zbog toga se upotrebljavaju katjonski izmjenjivači na bazi silicijuma, koji pokazuju značajno veću hromatografsku efikasnost. Kao katjonski izmjenjivači mogu da se koriste izmjenjivači na bazi polimera (stiren/divinilbenzen kopolimeri, polimetakrilat, polivinilske smole), katjonski izmjenjivači na bazi lateksa, kao i katjonski izmjenjivači na bazi silike.

Kao što je rečeno, u anjonskoj HPIC, vrsta mobilne faze koja će se primeniti zavisi od metode detekcije, međutim, to nije slučaj u katjonskoj izmjenjivačkoj hromatografiji. Za razdvajanje alkalnih metala, amonijum-jona i malih alifatičnih amina, kao mobilna faza obično se upotrebljavaju mineralne kiseline (hlorovodonična ili azotna kiselina), nezavisno od toga da li se detekcija merenjem provodljivosti izvodi sa ili bez prigušivačkog sistema. Organske mobilne faze nisu baš česte u katjonskim izmenama. Divalentni katjoni poput zemnoalkalnih metala ne mogu se eluirati razblaženim mineralnim kiselinama, budući da pokazuju mnogo veći afinitet prema stacionarnoj fazi na bazi jako kiselog katjonskog izmjenjivača. Međutim, povećanje koncentracije kiseline u mobilnoj fazi je nemoguće iz dva razloga. Prvi razlog je što je u sistemu bez prigušivača izuzetno visoka provodljivost mobilne faze i to bi onemogućilo osetljivo detektovanje jona zemnoalkalnih metala pomoću konduktometra kao detektora. Drugi razlog je da se u sistemu sa prigušivačem ne može obezbediti potrebno smanjenje šuma. Mikromembranski prigušivač u kombinaciji sa mešavinom 2,3-diaminopropionske i hlorovodonične kiseline se koristi za razdvajanje zemnoalkalnih metala. Pored toga, za eluiranje teških i prelaznih metala koriste se slabe organske kiseline kao kompleksirajući agensi. Pošto se metali razdvajaju kao anjonski ili neutralni

kompleksi, vrsta i koncentracija organske kiseline zavisi od postupka razdvajanja.

***Prigušivački sistemi u katjonskoj izmeni.*** Prvobitno su u katjonskoj jonoizmenjivačkoj hromatografiji upotrebljavane prigušivačke kolone koje sadrže jonoizmenjivačku smolu. Funkcija prigušivačke kolone detaljno je opisana na primeru anjonske izmene. Isto tako, svi nedostaci prigušivačke kolone u okviru anjonske izmene važe i u katjonskoj analizi. Pored toga, funkcija izmene prigušivačke kolone, koja je obično u obliku hidroksida, zasniva se na pretvaranju slabo baznih katjona u odgovarajuće slobodne baze. Na primer, amonijum-joni se prevode u slobodnu bazu  $\text{NH}_3$ . Prema tome, slabo bazni katjoni mogu interagovati sa anjonskom smolom prigušivačke kolone, što dovodi do znatno dužeg vremena zadržavanja. Kao što je ranije rečeno, na širenje pika u HPLC značajno utiče veličina čestica smole. Tako se širenje pika u prigušivačkoj koloni smanjuje sa smanjenjem prečnika čestica upotrebljene smole. Slično tome, zapremina šupljina na prigušivačkoj koloni treba da bude što manja da bi se smanjili efekti širenja pika. Stoga bi optimalna prigušivačka kolona trebala da ima vrlo malu zapreminu i vrlo mali prečnik čestica na jonoizmenjivačkoj smoli, što je veoma teško. Danas se konvencionalne prigušivačke kolone veoma retko upotrebljavaju. Kao i u slučaju anjonske izmene, nedostaci prigušivačke kolone su prevaziđeni primenom prigušivačkih šupljih vlakana. U okviru katjonske izmene, membrana sadrži kvaternerne amonijumove baze u obliku hidroksida za razmenu anjona koji su prisutni kao kontraioni za hidroksidne jone. Dinamička ravnoteža se uspostavlja u stalnim radnim uslovima, tako da se detekcija odvija nesmetano. Pored prigušivačkih šupljih vlakana upotrebljavaju se i, već opisani, mikromembranski prigušivači.

#### **4.5.2. Jon-ekskluziona hromatografija**

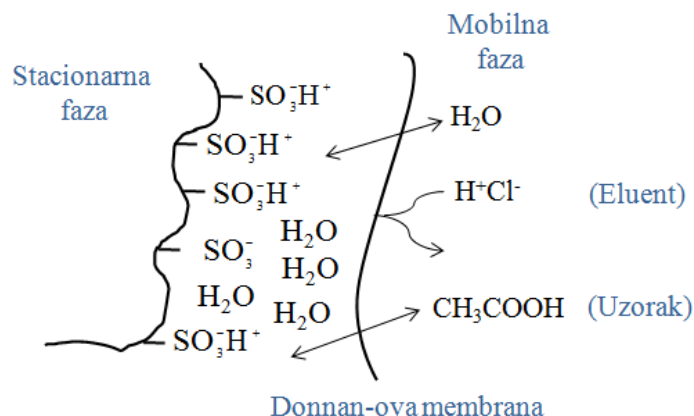
Jonoizmenjivači mogu da zadržavaju slabe elektrolite ili neelektrolite procesom koji ne podrazumeva jonsku izmenu. HPICE se upotrebljava za razdvajanje slabih neorganskih i organskih kiselina. Pored toga, može se koristiti za razdvajanje alkohola, aldehida, aminokiselina i ugljenih hidrata.

Potpuno disosovane kiseline se ne zadržavaju na stacionarnoj fazi i eluiraju se kao jedan pik. Međutim, nedisosovana jedinjenja mogu da difunduju u pore smole i ovom slučaju se razdvajanje zasniva na nejonskim interakcijama između mobilne i stacionarne faze i razlikuje se za pojedine analite usled razlika u njihovim mogućnostima da se raspodeljuju između dve faze. Slabo jonizovane kiseline se razdvajaju na katjonskim izmenjivačima visokog kapaciteta, slabo jonizovane baze se razdvajaju na anjonskim izmenjivačima, dok se nejonizovana jedinjenja mogu razdvajati i na katjonskim i na anjonskim izmenjivačima. Faktori koji utiču na kretanje analita kroz kolonu su stepen jonizacije (više jonizovana jedinjenja se brže kreću), interakcija između analita i rastvarača koji se nalazi između čestica stacionarne faze, zatim polarna interakcija između analita i jonskih grupa na stacionarnoj fazi, kao i interakcija između analita i polimera stacionarne faze.

Detekcija se obično izvodi merenjem električne provodljivosti. U kombinaciji sa prigušivačkim sistemom, ova metoda detekcije je superiorna u odnosu na sve druge metode, kao što su indeks refrakcije ili UV detekcija na kratkim talasnim dužinama, s obzirom na specifičnost i osetljivost metode.

Kolone u HPICE sadrže potpuno sulfonovanu katjonsku izmenjivačku smolu. Mehanizam razdvajanja koji se javlja na navedenoj stacionarnoj fazi zasnovan je na tri fenomena: Donnan-ova ekskluzija, sterna ekskluzija i adsorpcija. Postupak razdvajanja na jon-ekskluzionoj koloni dat je na slici 4.6, gde je prikazana površina jonoizmenjivačke smole sa povezanim grupama sulfonske kiseline.

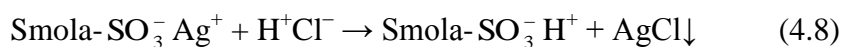
Kada čista voda prođe kroz kolonu, formira se hidratizirani sloj oko grupa sulfonske kiseline. Prema ovom modelu razdvajanja, hidratizirani sloj može da propusti samo nedisosovana jedinjenja i rastvor mobilne faze. Potpuno disosovane kiseline, kao što je hlorovodonična kiselina, koja se koristi kao mobilna faza, ne mogu da prodru u ovaj sloj zbog negativno naelektrisanog jona hlorida. Stoga se takvi joni ne zadržavaju na stacionarnoj fazi.



**Slika 4.6.** Šematski prikaz procesa razdvajanja na koloni u okviru HPICE

Izbor stacionarne faze, kao i mobilne faze za HPICE je relativno ograničen. Kao stacionarna faza obično se koristi potpuno sulfonovani katjonski izmjenjivač na bazi polistiren/divinilbenzena u protonovanom obliku. Procenat divinilbenzena, izražen kao stepen umrežavanja, posebno je važan u pogledu zadržavanja organskih kiselina. U zavisnosti od stepena umrežavanja, ove kiseline mogu difundovati u stacionarnu fazu u većem ili manjem stepenu, što utiče na dužinu zadržavanja na stacionarnoj fazi. Danas se upotrebljavaju stacionarne faze koje imaju čestice malih prečnika u opsegu od 5 do 15  $\mu\text{m}$ , koji omogućavaju brze difuzione procese. U većini slučajeva se kao mobilna faza koristi čista dejonizovana voda. U nekim slučajevima, na primer za određivanje organskih kiselina, upotrebljavaju se mineralne kiseline kao mobilna faza. Ako se katjonski izmjenjivač na bazi srebra koristi kao prigušivač, onda se u ovom slučaju kao mobilna faza upotrebljava hlorovodonična kiselina.

U HPICE se takođe upotrebljavaju prigušivački sistemi čija uloga je da hemijski smanje provodljivost kiseline koja se upotrebljava kao mobilna faza. Do razvoja modernih membranskih prigušivača, upotrebljavale su se prigušivačke kolone koje su sadržavale katjonsku smolu u obliku srebra. Sa razblaženom hlorovodoničnom kiselinom kao mobilnom fazom, reakcija prigušivanja se može prikazati na sledeći način (reakcija 4.8):



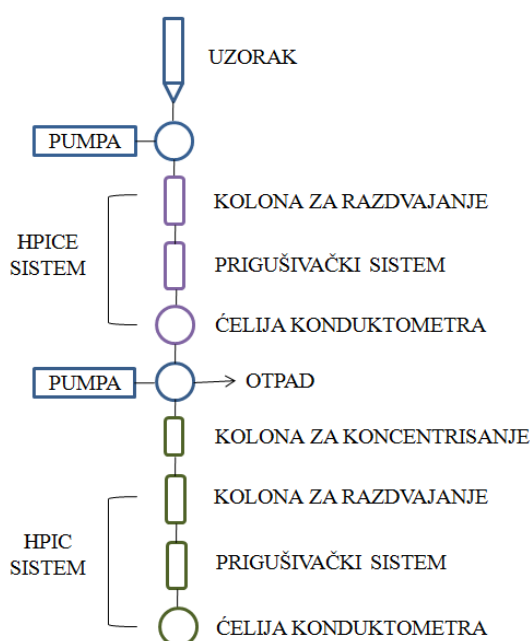
Organske kiseline koje se analiziraju na ovaj način se ne talože sa srebrom i stoga do ćelije kondukometra dolaze nepromenjene. Ova vrsta prigušivanja primenom prigušivačke kolone ima niz nedostataka, koji se ogledaju u tome da sa povećanjem stvaranja srebro-hlorida u prigušivačkoj koloni raste pritisak i posledično se javlja širenje pikova na hromatogramu. Signali se mogu proceniti samo upoređivanjem površina pika sa referentnim jedinjenjima poznatih koncentracija. Zatim, teoretski je moguća periodična regeneracija prigušivačke kolone sa koncentrovanim rastvorom amonijum-hidroksida. Međutim, to nema nikakvog smisla jer zahteva mnogo vremena. Isto tako, kontinualna regeneracija prigušivačke kolone, koja se koristi veoma dugo u okviru anjonske izmene, nije bila moguća sa prigušivačkim kolonama u okviru jon-ekskluzione hromatografije.

Da bi se prevazišli gore nabrojani nedostaci razvijena je katjonska izmenjivačka membrana. Ova membrana omogućava kontinualnu regeneraciju i sastoji se od sulfonovanog polietilenskog derivata. Otporna je na organske rastvarače, koji se mešaju sa vodom i pokazuje visoku propusnost za kvaternerne amonijumove baze, kao što je tetrabutilamonijum-hidroksid. Naime, u regenerisanom stanju, membrana je u obliku tetrabutilamonijum-jona. Oksonijum-joni organskih kiselina koji prolaze kroz unutrašnjost membrane zamenjuju se sa tetrabutilamonijum-jonima u prigušivačkoj reakciji. Zbog različitih provodljivosti oksonijum i tetrabutilamonijum-jona, so koja nastaje kao proizvod prigušivanja ima značajno nižu provodljivost od odgovarajućeg oblika kiseline. U zoni dinamičke ravnoteže odvija se reakcija neutralizacije između  $\text{H}^+$  i  $\text{OH}^-$ -jona da bi nastala voda kao proizvod prigušivanja. Voda napušta prigušivač zajedno sa viškom tetrabutilamonijum-hidroksida.

U jon-ekskluzionoj hromatografiji upotrebljavaju se i mikromembranski prigušivači, čiji sistem odgovara sistemu opisanom u slučaju anjonske i katjonske HPIC.

Kuplovanje HPIC i HPICE se izvodi radi poboljšanja selektivnosti hromatografskog razdvajanja neorganskih i organskih kiselina u složenim matriksima. Kuplovani sistem je prikazan na slici 4.7. Uzorak prvo nailazi

na jon-ekskluzionu kolonu koja je pakovana katjionskim izmenjivačem i na njoj se odvija prvo razdvajanje slabo kiselih analita, dok jako disosovani analiti putuju u sledeću jonoizmenjivačku kolonu, koja je pakovana anjonskim izmenjivačem. Slabo disosovani analiti se nakon prigušivačkog sistema detektuju konduktometrom, dok se jako disosovani analiti nakon razdvajanja u drugoj koloni, takođe nakon prolaska kroz prigušivački sistem detektuju konduktometrijski.



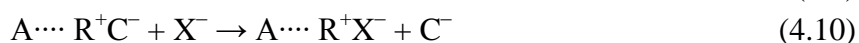
**Slika 4.7.** Šematski prikaz kuplovanja jonoizmenjivačke i jon-ekskluzivne hromatografije

### 4.5.3. Jon-par hromatografija

IPC predstavlja korisnu alternativu IEC. Selektivnost razdvajanja se postiže odabirom mobilne faze, tako da se mogu razdvojiti i anjonska i katjonska jedinjenja. Ova univerzalnost pomogla je da IPC dostigne značajnu primenu. Predstavlja tipičan primer hromatografskog procesa čije razdvajanje se zasniva na uspostavljanju sekundarne ravnoteže. Najčešće, ovaj tip hromatografskog razdvajanja podrazumeva upotrebu HPLC

stacionarne faze (obično reverzno-fazne) sa vodenom mobilnom fazom koja sadrži reagens za uparivanje jona i organski modifikator. Reagensi za uparivanje jona su negativno ili pozitivno naelektrisani organski molekuli sa neorganskim kojonom. Među reagensima za uparivanje jona, za anjonske ili katjonske analite koriste se alkilamonijum ili alkanske sulfonatne soli. Postoji nekoliko predloženih mehanizama koji opisuju razdvajanje kod IPC. Jedan od mehanizama se zasniva na tome da tokom eluiranja neutralni jonski parovi nastaju hidrofobnim interakcijama između analita i reagensa za uparivanje jona. Pored toga, predloženo je da se reagens za uparivanje jona, zbog hidrofobnog dela, adsorbuje na površini stacionarne faze i da na taj način nastaju mesta za izmenu jona između kontraiona i analita. Takođe, pretpostavlja se da se molekuli reagensa za uparivanje jona adsorbuju na površini stacionarne faze i da se barijera potencijala neutrališe drugim slojem kontraiona. Analit difunduje kroz pomenutu barijeru i gradi jonski par sa reagensom za uparivanje i na taj način se analiti razdvajaju usled razlika u njihovom afinitetu ka jonima na stacionarnoj fazi.

Ako se pretpostavi da su sve vrste u mobilnoj fazi disosovane, a rastvarač je većinom voda koja favorizuje disocijaciju, ravnoteža koja opisuje zadržavanje jona analita na reverznoj stacionarnoj fazi, A, može se opisati reakcijama 4.9 i 4.10 za razdvajanje analita,  $X^-$ , u prisustvu katjonskog reagensa,  $R^+C^-$ , ili reakcijama 4.11 i 4.12 za razdvajanje analita,  $X^+$ , u slučaju primene anjonskog reagensa,  $R^-M^+$ :



Prethodno prikazane reakcije predstavljaju uprošćen proces IPC. Međutim, to je i dalje korisno jer su svi parametri koji utiču na razdvajanje analita identifikovani. Isto tako, predstavlja osnov za semikvantitativno predviđanje ponašanja i optimizacije jednog IPC razdvajanja.

Na retenciju i selektivnost u IPC utiče nekoliko eksperimentalnih promenljivih, uključujući vrstu, hidrofobnost i koncentraciju reagensa za uparivanje jona, jonsku jačinu, koncentraciju organskog modifikatora i

adsorptivna svojstva stacionarne faze. Povećavanje hidrofobnosti i koncentracije reagensa za uparivanje jona dovodi do povećanja njegove koncentracije na stacionarnoj fazi i do većeg zadržavanja analita. Na formiranje kompleksa sa jonima utiče modifikacija jonske jačine usled takmičenja između jona mobilne faze i analita. Zadržavanje analita smanjuje se sa povećanjem koncentracije organskog modifikatora, jer su hidrofobne interakcije između reagensa za uparivanje jona, jona i stacionarne faze smanjene.

IPC se obično izvodi na dva načina: (1) uvođenjem reagensa za uparivanje jona unutar mobilne faze i izvođenjem razdvajanja analita odgovarajućom mobilnom fazom; (2) preliminarnom modifikacijom reverzno-fazne kolone sa reagensom za uparivanje jona i korišćenjem te kolone kao kolone za izmenu jona.

Eluiranje katjona se uglavnom postiže kompleksiranjem sa ligandom (npr. limunskom, vinskom, oksalnom i  $\alpha$ -hidroksiizobuternom kiselinom) i jonskim uparivanjem negativno ili pozitivno naelektrisanih kompleksa sa reagensom za uparivanje jona. Velika prednost primene ove tehnike ogleda se u mogućnosti promene selektivnosti sistema uz pomoć velikog broja parametara, ali isto tako pomenuto postaje i nedostatak kada se efekat svakog parametra mora uzeti u obzir tokom dizajniranja mehanizma za uparivanje jona.

Analogno sa jonoizmenjivačkom i jon-ekskluzionom hromatografijom, šum eluata se mora smanjiti primenom odgovarajućih prigušivačkih sistema i u IPC, da bi se postigla osetljiva detekcija konduktometrom.

#### **4.5.4. Elektrostatička jonska hromatografija**

Prema ovoj vrsti jonske hromatografije, primenom amfoternih surfaktanata i cviterjona, koji se koriste kao mobilna faza za razdvajanje nukleotida i stacionarne faze na bazi cviterjonskog silicijuma, omogućava se istovremeno razdvajanje organskih katjona i anjona. Mehanizam ove metode se zasniva na tome da se analiti i kontraioni kombinuju stvarajući na taj način jonske parove i razdvajanje se zasniva istovremenim



interakcijama elektrostatskog privlačenja i odbijanja sa naelektrisanom stacionarnom fazom.

#### **4.5.5. Helataciona jonska hromatografija**

Helataciona jonska hromatografija ili, u novije vreme, helataciona jonska hromatografija visoke efikasnosti, uglavnom se odnosi na analizu jona metala i na analizu metala u tragovima u slučaju uzorka sa visokim jonskim jačinama, gde se jonska i IPC ne mogu primeniti, jer su mesta za jonsku izmenu zauzeta jonima soli, ili je mehanizam uparivanja jona modifikovan. Stacionarna faza se sastoji od skeleta (polimerni materijali ili silika) na koji je hemijski vezana helatna grupa ili je prekrivena ligandom koji je trajno ili dinamički vezan na površini. Trajno vezivanje znači da se kolona priprema propuštanjem rastvora (npr. voda-metanol) koji sadrži odgovarajući ligand koji se adsorbuje na nosaču. Kolona se zatim ispira (vodom odgovarajuće pH-vrednosti) da bi se uklonili molekuli liganda koji se nisu adsorbovali, kao i neadsorbovani joni metala, i nakon toga se ponovo ispira kiselim rastvorom. Dinamičko vezivanje je slično kao i u IPC, samo se umesto reagensa za uparivanje jona, mobilnoj fazi dodaje helatni reagens. Mehanizam razdvajanja primenom ove vrste hromatografije uključuje formiranje koordinacionih veza, kao i proces jonske izmene između jona metala i grupa na stacionarnoj fazi. Termodinamika i kinetika formiranja/disocijacije kompleksa su ključni faktori razdvajanja. Da bi se osiguralo da je koordinacija preovladavajući mehanizam, koriste se mobilne faze velike jonske jačine (npr. 0,5–1,0 mol/L  $\text{KNO}_3$ ), a pH-vrednost postaje osnovni parametar za promenu razdvajanja.

#### **4.6. DETEKTORI**

Detekcija u IC zavisi u velikoj meri od prirode eluenta (sastav i koncentracija), analita, kao i potrebne osetljivosti. Idealne karakteristike detektora su sledeće: visoka osetljivost, linearni odnos između koncentracije i signala, stabilan i nizak šum, kao i velika brzina odgovora. Najčešće se u slučaju kada je jonska jačina mobilne faze mala u IC upotrebljava detektor koji se zasniva na merenju provodljivosti. Ipak, postoje sistemi u kojima

ovakva vrsta detekcije nije primenljiva, npr. za vrste sa niskom specifičnom provodljivošću ili za vrste (metali) koje se mogu istaložiti tokom klasične detekcije sa prigušivačkom kolonom. Među tehnikama koje se mogu koristiti kao alternativa konduktometrijskoj detekciji su, kao što je spomenuto: spektrofotometrija, amperometrija i spektroskopija (atomska apsorpciona i atomska emisiona) ili spektrometrija (ICP–MS i MS).

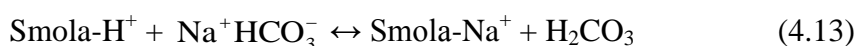
**Konduktometar kao detektor.** Merenje provodljivosti se može smatrati univerzalnim načinom detekcije neorganskih i organskih jona analita nakon hromatografskog razdvajanja. Konduktometri kao detektori su jednostavni uređaji, koji mogu imati veoma male zapremine na mrtvom vremenu, omogućavaju veoma brze odgovore, jednostavni su za upotrebu, daju reproduktivne i tačne rezultate. Ova vrsta detekcije obuhvata neprigušivačke, kao i prigušivačke sisteme. Kvalitet konduktometra kao detektora je povećan primenom prigušivačkih sistema. Sa poboljšanim prigušivačkim sistemima i mogućnošću kontrolisanja temperature, proširena je oblast primene detektora provodljivosti. Detekcija sa neprigušenom provodljivošću daje signal koji predstavlja zbir provodljivosti jona analita, njegovog kojona i smanjenje kontrajona mobilne faze koji ostaje na koloni. Promena provodljivosti tokom analize analita je funkcija ograničavajuće koncentracije i jonske provodljivosti analita i jona mobilne faze. Za potpuno disosovane analite i/ili mobilne faze, čiji stepen disocijacije zavisi od pH, signal je proporcionalan koncentraciji analita i raste kako se povećava stepen jonizacije analita u mobilnoj fazi.

Nepriugušivačka detekcija se primenjuje kao direktno ili indirektno merenje, u zavisnosti od hemijskih svojstava mobilne faze i analita. Direktni način se koristi sa mobilnim fazama koje imaju znatno nižu provodljivost od jona analita. Povećanje osetljivosti dobija se kao posledica smanjenja jonizacije mobilne faze. Ključan faktor ove metode je upotreba jona izmenjivača niskog kapaciteta, što s druge strane omogućava upotrebu veoma razblažene mobilne faze. Suprotno tome, mobilne faze sa visokom provodljivošću (npr. NaOH) su odgovarajuće u slučaju indirektno detekcije provodljivosti, gde je provodljivost analita znatno manja od provodljivosti mobilne faze i eluiranje analita prati negativna promena provodljivosti.

Prigušivačka detekcija je najčešći način detekcije i razlikuje se od

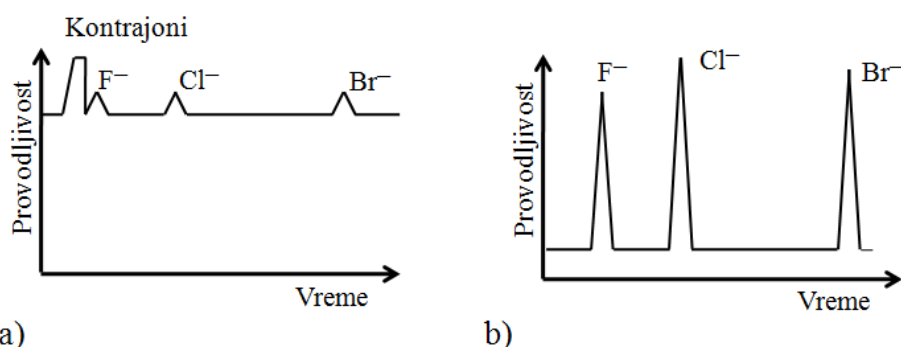
prethodno opisane neprigušivačke detekcije usled primene prigušivačke kolone, čija je funkcija smanjenje provodljivosti mobilne faze pre ulaska u ćeliju detektora, kao i povećanje signala analita. Prva prigušivačka kolona je bila kolona u obliku  $H^+$  ili  $OH^-$  i predstavljala je osnov na kojem je izgrađen jonski hromatograf.

Primena prigušivačke kolone može se opisati reakcijama 4.13 i 4.14:



gde je  $A^-$  analit, a  $\text{NaHCO}_3$  je mobilna faza.

Rezultat navedenog je da se primenom  $H^+$ -jona, detekcija analita poboljšava usled smanjenja provodljivosti mobilne faze i povećanja količine analita zamenom  $\text{Na}^+$ -jona sa jonima  $H^+$ , koji imaju veću jonsku provodljivost. Takođe, ako se u sistem mogu dodati  $OH^-$ -joni, prigušivačka tehnika se može primeniti i za razdvajanje na katjionskim izmenjivačima. Na slici 4.8a je prikazan primer hromatograma koji je rezultat analize anjona na anjonskoj izmenjivačkoj smoli, u prisustvu jako provodne mobilne faze i primenom konduktometra kao detektora. Pokušaj da se poveća hromatografski pik je onemogućen usled visoke provodljivosti mobilne faze i efekta odnosa signal/šum. Ako se smanji doprinos provodljivosti mobilne faze (slika 4.8b) onda se odnos signal/šum značajno povećava i granica detekcije se poboljšava. Najčešći način da se ovo postigne je primena već opisane prigušivačke kolone.



**Slika 4.8.** Signal dobijen: a) bez prigušivačkog sistema i b) u prisustvu prigušivačkog sistema

**Spektrofotometar kao detektor.** Spektrofotometrijska detekcija se može podeliti na direktnu, indirektnu i direktnu nakon posle-kolonske derivatizacije. Direktna detekcija se može upotrebljavati za one analite koji apsorbuju u UV ili vidljivom delu spektra (npr.  $\text{Br}^-$ ,  $\text{BrO}_3^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  itd.). Neki joni metala, kao što su Au, Pt i Pd, mogu se direktno detektovati kao hlorokompleksi, dok se prelazni, teški i zemnoalkalni metali pre razdvajanja moraju kompleksirati sa odgovarajućim ligandom i nakon toga se direktno detektuju, ili se nakon razdvajanja mogu detektovati procesom posle-kolonske derivatizacije. Poslednji način detekcije zahteva uređaj (pumpa ili sistem pod pritiskom) za uvođenje reagensa posle kolone (hromofor) i reakcionu zavojnicu da bi se osigurao kraj reakcije derivatizacije. Idealan posle-kolonski reagens treba da bude univerzalan za što veći broj jona metala. Pored toga, treba da je stabilan i da gradi visoko apsorbujuće komplekse sa jonima metala. Indirektna detekcija se zasniva na apsorpciji jona mobilne faze (npr.  $\text{NO}_3^-$ , ftalat, benzoat, metilbenzilamin). U ovom slučaju, mobilna faza treba da ima veću moć apsorpcije od analita. Ovaj način detekcije ima ograničenu primenu, jer su granice detekcije često neadekvatne.

**Amperometrijska detekcija.** Ovaj vid detekcije se zasniva na primeni potencijala između dve elektode koje se nalaze u eluatu i meri se promena struje koja je posledica oksidacije analita na anodi ili redukcije na katodi. Primenjeni potencijal mora biti takav da se poveća signal koji potiče od analita i istovremeno smanji signal koji potiče od interferirajućih jona. Načini rada koji se upotrebljavaju u amperometrijskim tehnikama za detekciju u protočnim sistemima se odvijaju pri konstantnom potencijalu, gde se struja meri u neprekidnom režimu, pri pulsnom potencijalu uz uzorkovanje struje u određenim vremenskim intervalima (pulsna amperometrija) ili pri pulsnom potencijalu sa integracijom struje u određenim vremenskim intervalima (integrisana pulsna amperometrija). Amperometrijske tehnike detekcije se uspešno primenjuju za detekciju ugljenih hidrata, kateholamina, fenola, cijanida, jodida, amina itd.

*Maseni spektrometar kao detektor.* Jonska hromatografija u kombinaciji sa masenom detekcijom ima veliki značaj zbog izuzetno velike potrebe za određivanje novih kontaminanata sa visokom osetljivošću. Usled razvoja softvera ova kombinacija metoda je značajno pojednostavljena.

## LITERATURA

1. Abramović, B., Mikroanaliza, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1995.
2. Haddad, P.R., Jackson, P.E., Shaw, M.J. Developments in suppressor technology for inorganic ion analysis by ion chromatography using conductivity detection, *Journal of Chromatography A*, 1000 (2003) 725–742.
3. Harvey, D., *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill Higher Education, USA, 2000.
4. Pietrzyk, D.J., *Ion Chromatography by HPLC*, u: E. Katz, R. Eksteen, P. Schoenmakers, N. Miller (ur.), *Handbook of HPLC*, drugo izdanje, Taylor & Francis e-Library, New York, 2005, str. 413–462.
5. Sarzanini, C., Concetta Bruzzoniti, M., *Ion Chromatography: Modes for Metal Ions Analysis*, u: D. Corradini (ur.), *Handbook of HPLC*, drugo izdanje, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2011, str. 385–410.
6. Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R., *Principles of Instrumental Analysis*, Thomson Brooks/Cole, Belmont, 2007.
7. Smith, R.E., *HPLC of Ions: Ion-Exchange Chromatography*, u: E. Katz, R. Eksteen, P. Schoenmakers, N. Miller (ur.), *Handbook of HPLC*, drugo izdanje, Taylor & Francis e-Library, New York, 2005, str. 365–411.
8. Statler, J., *Ion Chromatography*, u: F. Settle (ur.) *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall, USA, 1997, str. 199–220.
9. Weiss, J., *Ion Chromatography*, drugo izdanje, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (Federal Republic of Germany) and VCH Publishers, Inc., New York, (USA), 1995.

---

# 5. SUPERKRITIČNA FLUIDNA HROMATOGRAFIJA

---

- 5.1. Uvod
- 5.2. Delovi superkritičnog fluidnog hromatografa
  - 5.2.1. Pumpe
  - 5.2.2. Injekcioni sistem
  - 5.2.3. Reduktori
  - 5.2.4. Detektori
- 5.3. Kolone
- 5.4. Mobilna faza
- 5.5. Faktori koji utiču na vreme trajanja analize
- 5.6. Poređenje SFC sa HPLC i GC
- 5.7. Oblasti primene SFC

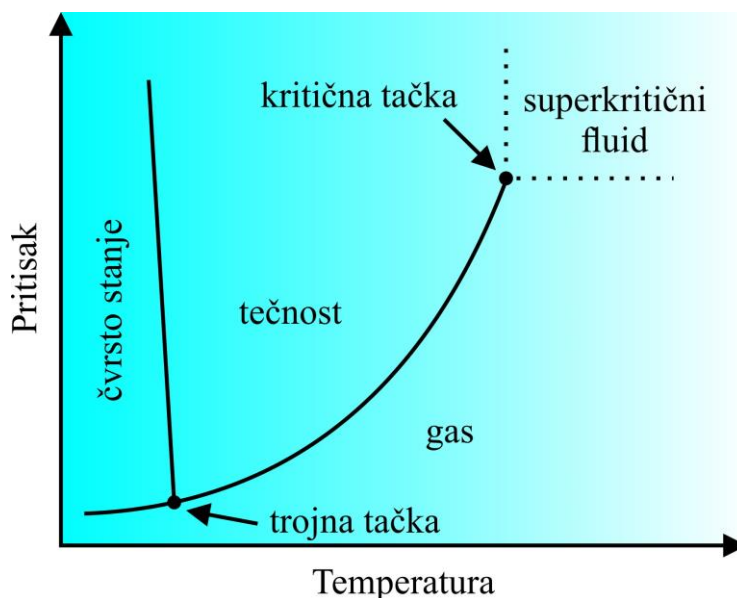
LITERATURA

---

## 5.1. UVOD

Bez obzira na značaj i primenu, GC i HPLC tehnike ne mogu biti iskorišćene za razdvajanje i analizu svih tipova uzoraka. Kada se koristi sa kapilarnim kolonama, GC omogućava efikasno razdvajanje sa odličnom rezolucijom. Međutim, kao što je spomenuto, primena GC je ipak ograničena na analizu lako isparljivih jedinjenja na sobnoj temperaturi ili neisparljivih jedinjenja koja se nakon derivatizacije prevode u stabilne isparljive derivate pogodne za analizu. S druge strane, HPLC može biti iskorišćena za razdvajanje šireg spektra jedinjenja u rastvoru, međutim neki od najčešće korišćenih detektora (UV, fluorescentni i elektrohemijski) nisu univerzalni i ne odgovaraju svim tipovima uzoraka, za razliku od FID koji se takođe često koristi u GC.

SFC predstavlja odgovarajuću alternativu za GC i HPLC tehnike. Mobilna faza u SFC je tokom analize na temperaturi i pritisku koji prevazilaze kritičnu tačku, zbog čega nije ni u gasovitom, ni u tečnom agregatnom stanju, nego je superkritični fluid (slika 5.1).



Slika 5.1. Fazni dijagram za superkritični fluid

Kritični parametri mobilne faze zavise od van der Waals-ovih interakcija. Vrednosti odabranih parametara superkritičnog fluida su između vrednosti gasa i tečnosti (tabela 5.1).

**Tabela 5.1.** Tipične vrednosti odabranih parametara za gas, tečnost i superkritični fluid\*

Faza	Gustina (g/mL)	Viskoznost (g mL/s)	Difuzioni koeficijent (cm <sup>2</sup> /s)
Gas	0,001	0,0001	0,1
Superkritični fluid	0,1–1	0,0001–0,001	0,0001–0,001
Tečnost	1	0,01	< 0,00001

\*Zaokruženo na najbliži faktor 10

Gustina superkritičnog fluida je mnogo bliža gustini tečnosti, nego gustini gasova, zbog čega se mobilna faza kod SFC ponaša više kao tečna mobilna faza kod HPLC, nego kao gasna mobilna faza kod GC. Superkritični fluidi imaju viskoznost koja je slična viskoznosti gasova, što znači da mogu da se pomeraju kroz kapilaru ili kroz pakovane kolone bez potrebe da se primenjuje visok pritisak koji se sreće kod HPLC instrumenta. Vreme trajanja analize i rezolucija prilikom SFC analiza, iako nisu tako dobri kao kod GC analize, imaju bolje karakteristike nego u slučaju HPLC tehnike.

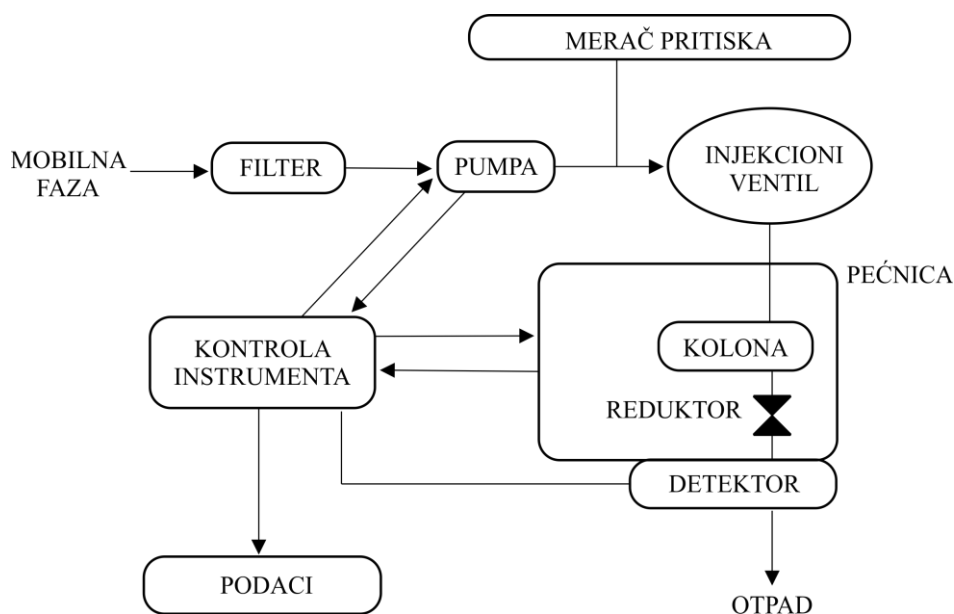
SFC kao tehnika u hromatografiji je prvi put zabeležena 1962. godine, međutim nije se razvijala sve do osamdesetih godina dvadesetog veka kada su se pojavili prvi komercijalni instrumenti. Danas se prilikom SFC analize primenjuju dobro razvijene metode, iako još nije postala uobičajena tehnika za analizu.



## 5.2. DELOVI SUPERKRITIČNOG FLUIDNOG HROMATOGRAFA

Komercijalni instrumenti za SFC se nude kao posebna rešenja ili kao dodatni delovi za već postojeće HPLC i GC instrumente. Šematski dijagram osnovnog sistema za SFC je prikazan na slici 5.2.

Varijacije kod SFC uređaja, u odnosu na HPLC i GC, se prvenstveno odnose na vrstu kolone koja se primenjuje (kapilarna ili pakovana) i detektor koji se koristi u zavisnosti od primenjene mobilne faze. Pored toga, važan dodatak je reduktor koji održava neophodnu vrednost pritiska. Razdvajanje komponenata smeše, primenom gradijentne tehnike, je vrlo slično gradijentnoj analizi primenom HPLC, s tim što se gradijent postiže promenom pritiska tokom vremena. Pored toga, rezultujuća promena u gustini mobilne faze utiče na efikasnost razdvajanja. Detekcija može biti postignuta primenom standardnih HPLC ili GC detektora.



Slika 5.2. Šematski dijagram sistema za SFC

### 5.2.1. Pumpe

Najvažnija komponenta SFC instrumenta je pumpa, koja služi ne samo za održavanje pogodnog i preciznog protoka mobilne faze, nego zajedno sa reduktorom obezbeđuje neophodan pritisak kako bi mobilna faza ostala superkritični fluid pod precizno definisanim eksperimentalnim uslovima. Pored pritiska, precizno i tačno definisana temperatura, sa tačnošću od  $\pm 1$  °C, je takođe jedan od ključnih parametara prilikom SFC analize. Mobilna faza obično ulazi u pumpu u tečnom stanju iz cilindra koji je pod pritiskom, zatim se unosi na kolonu gde se zagreva do superkritičnog stanja. Pumpa je dizajnirana tako da je otporna na visok pritisak rastvarača (sve do 60 MPa, pa i više). Koriste se špric pumpe zapremine od 1 do 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , ili recipročne pumpe zapremine od 1 do 10  $\text{mL}/\text{min}$ , u zavisnosti od toga da li se koriste kapilarne ili pakovane kolone. Sistemi dualnih pumpi, takođe mogu biti iskorišćeni, kao što je to slučaj kod HPLC. Špric pumpe omogućavaju kontinualan protok fluida, što je veoma važno prilikom SFC analize. Međutim, ograničena zapremina rastvarača je veliki nedostatak pomenutih pumpi, pored toga što moraju da se dopunjuju prilikom analize. Recipročne pumpe nemaju korak dopune, ali zahtevaju uređaj za prigušivanje pritiska i hlađenje, kako bi se sprečilo nakupljanje pare u samom instrumentu. Pored toga, recipročne pumpe su manje pogodne za kapilarne kolone i programiranje pritiska, u odnosu na špric pumpe.

### 5.2.2. Injekcioni sistemi

Unošenje uzorka u sistem za SFC se zasniva na rotacionom sistemu ventila pod visokim pritiskom koji se često sreće kod HPLC instrumenta. Injektor se obično nalazi na sobnoj temperaturi, a uzorci se unose uobičajeno rastvoreni u organskom rastvaraču. Uzorak se unosi u kolo za uzorkovanje pri ambijentalnim uslovima, a zatim se nakon podešavanja ventila u injekcionu poziciju, unosi u kolonu pod visokim pritiskom. Razvijene su i tehnike koje uključuju direktno unošenje uzorka iz superkritičnog ekstrakcionog sistema. Na konvencionalnim pakovanim kolonama, čiji je

prečnik 1 mm i veći, direktno injektovanje je obično vrlo jednostavno. Problemi se javljaju usled nekompatibilnosti uzorka sa mobilnom fazom.

Kapilarne kolone kod SFC analiza, kao i kod HPLC i GC instrumenta sa mikrokolonama, su problematične kada se injektuje uzorak. Osnovni problemi u vezi sa injeksionim uređajima za kapilarne kolone su:

- Pomeranje pika i smanjenje rezolucije,
- Loša reproduktivnost i
- Smanjena osetljivost (čak i sa visoko osetljivim detektorom u slučaju malih količina uzorka).

Pored toga, kapilarne kolone imaju vrlo malu zapreminu. Tipična kolona, dužine od 20 m sa unutrašnjim prečnikom od 0,05 mm, ima zapreminu od samo 100  $\mu$ L zbog čega zapremina uzorka mora da bude prilično mala kako bi se sprečilo smanjenje efikasnosti kolone. Komercijalni rotacioni injeksioni ventili sa zapreminom uzorkovanja od 60 nL su takođe dostupni. Međutim, problem koji se javlja je često začepljenje kolone.

Glavni pristupi rešavanja navedenih nedostataka podrazumevaju upotrebu uređaja za razdvajanje i filtriranje rastvarača, često sa upotrebom tehnika koncentrisanja uzorka. Promena pritiska je najpopularniji mehanizam za koncentrisanje uzorka u SFC. Direktno injektovanje može biti ostvareno injeksionim ventilom pri niskom pritisku mobilne faze, praćeno brzim porastom pritiska kako bi se postigla tražena gustina rastvora.

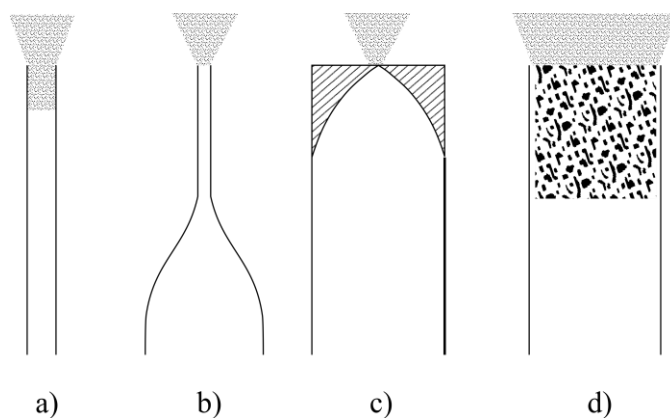
### **5.2.3. Reduktori**

Kako bi se održali uslovi za postojanje i protok superkritičnog fluida duž kolone, reduktor se postavlja duž putanje protoka fluida. Njegova pozicija u sistemu zavisi od tipa detektora koji se primenjuje. U slučaju detektora koji zahtevaju gušću mobilnu fazu, npr. optički detektori, reduktor se postavlja nakon detektora. U suprotnom, postavlja se između kolone i detektora, npr.

kod plamenih detektora. Na ovaj način se postiže kontrola protoka i pritiska, kao i brza dekompresija do atmosferskog pritiska, neposredno pre detekcije. Način na koji se vrši dekompresija je od izuzetne važnosti ukoliko se koriste plameni detektori. U ovom slučaju reduktor, ne samo da kontroliše prenos eluata od superkritične faze do gasne faze, nego održava i efikasnost rada kolone bez kondenzacije uzorka.

Idealan reduktor ne postoji, ali ako bi postojao on bi bio inertan, prilagodljiv, lako zamenljiv i efikasan za sve tipove uzoraka. Linearni reduktor (slika 5.3a) generiše linearni gradijent pritiska. Oni su zadovoljavajući za analite malih molekulskih masa i uobičajno se kombinuju sa detektorima sa gasnom fazom. Prilikom analize polarnih analita i analita veće molekulske mase može doći do pojave magličastih čestica koje ulaze u detektor, kao rezultat molekulske asocijacije i kondenzacije analita tokom dekompresije, što dovodi do pojave „lažnih pikova” na hromatogramu.

Drugi tipovi reduktora (slika 5.3b–d) rešavaju problem „lažnih pikova” tako što obezbeđuju da se vrši brza dekompresija, pri čemu je vrh reduktora zagrejan da bi se izbegla kondenzacija analita.



**Slika 5.3.** Različiti protočni reduktori: a) linearni, b) konusni, c) integralni i d) frit

#### 5.2.4. Detektori

Skoro svaki detektor, koji je u sastavu HPLC i GC instrumenata, koristi se ili se njegova primena razmatra prilikom SFC analize. Jedna od glavnih prednosti SFC sistema je dijapazon dostupnih detektora. Do sada su se najviše koristili UV i FID detektori. Glavni nedostatak UV detektora je ograničena osetljivost.

FID detektor se koristi uz mobilne faze koje ne podležu jonizaciji tokom detekcije. FID se lako koristi i nema nekih posebnih problema prilikom SFC analize, zbog čega je jedan od najčešće korišćenih detektora. FID omogućuje osetljivu, univerzalnu detekciju većine organskih jedinjenja i gotovo da nema odziv u slučaju CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O i SF<sub>6</sub>, kao mobilnih faza. U opštem slučaju nekompatibilan je sa drugim mobilnim fazama i mešanim mobilnim fazama koje sadrže organske modifikatore, osim sa mravljom kiselinom. Često se koristi sa metanolom koncentracije do 1%.

Takođe, SFC tehnika može da bude povezana sa MS i FTIR detektorima, kao i ECD i FPD. Komercijalni SFC-MS instrumenti su trenutno dostupni sa kolonama prečnika od 1 mm ili manje, maseni spektrometar na bazi hemijske jonizacije omogućava granice detekcije koji su superiorni u odnosu na elektronsku jonizaciju. Pored toga, EI zahteva visoko razblaženi dekompresovani fluid.

U slučajevima kada se koristi FTIR, CO<sub>2</sub> je posebno koristan kao mobilna faza s obzirom da može biti kondenzovan u hladnom zaustavnom delu i transparentan je prema IR zračenju u vrlo važnoj oblasti spektra koja odgovara istezanju C-H veze. Kao alternativna mobilna faza može da se koristi ksenon, s obzirom da je praktično transparentan u širokom delu spektra.

### 5.3. KOLONE

Dve različite vrste kolona se koriste za SFC analizu, kapilarne i pakovane kolone (slika 2.14, tabela 5.2).

Tehnologija izrade kolona kod SFC je vrlo slična načinu izrade kolona kod HPLC i GC instrumenata. Za GC instrumente se obično koriste kapilarne kolone, dok se za HPLC koriste pakovane kolone. Međutim, kod SFC stacionarne faze moraju biti stabilnije nego kod HPLC ili GC sistema, zbog visokih temperatura na kojima se izvode analize. Stacionarna faza je neutralno jedinjenje koje deluje kao izvor „trenja” za određene molekule u uzorku dok prolaze kroz kolonu. Kombinacija svojstava stacionarne i mobilne faze značajno utiče na rezoluciju i vreme trajanja analize.

**Tabela 5.2.** Kolone koje se koriste prilikom SFC analize

Parametar	Pakovane kolone			Kapilarne kolone
	Konvencionalne	Uskokanalne	Mikro	
Unutrašnji prečnik (mm)	4,6	1,0	< 0,5	0,025–0,1
Dužina (cm)	10–30	10–30	50–150	100–5000
Materijal kolone	Nerđajući Čelik	Nerđajući čelik	Kvarcno staklo	Kvarcno staklo
Debljina filma (µm)	–	–	–	0,05–0,5
Veličina čestica (µm)	3–10	3–10	3–10	–
Stacionarna faza	Hemijski vezan silicijum	Aluminijum	Polimerne smole	Polisiloksan
Pad pritiska (MPa)	7	–	–	0,01

Ukoliko se, prilikom rada, uporede pakovane i kapilarne kolone mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Pakovane kolone obezbeđuju veću brzinu analize nego kapilarne kolone,
- Brzina protoka mobilne faze je veća kod pakovanih kolona, nego kod kapilarnih kolona u slučaju SFC,
- Kapacitet pakovanih kolona je mnogo veći u poređenju sa kapilarnim kolonama i
- Kapilarne kolone mogu obezbediti veći broj teorijskih platoa u odnosu na pakovane kolone za isti pad pritiska.

Problemi koji se javljaju su zajednički i za HPLC, GC i SFC instrumente. Ipak, kapilarne kolone se više koriste za SFC sisteme nego za GC sisteme. Naime, u slučaju kapilarnih kolona kontrola pritiska se lakše postiže i to zbog manjeg pada pritiska u sistemu.

#### **5.4. MOBILNA FAZA**

Svojstva jedinjenja niske polarnosti sa umerenim kritičnim svojstvima (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, SF<sub>6</sub>, ksenon, etan, propan, pentan) su veoma dobro istražena kao mobilna faza kod SFC analize. Uobičajene mobilne faze i njihovi odabrani kritični parametri dati su u tabeli 5.3.

Kombinacija mobilne faze niske polarnosti sa relativno polarnom stacionarnom fazom omogućava da većina SFC analiza ima normalnu faznu raspodelu ili adsorpciju. Kod takvih sistema, u odsustvu specifičnih interakcija, vreme eluiranja je u funkciji molekulske mase i polarnosti jedinjenja. Veći i polarniji molekuli se duže zadržavaju na koloni, što značajno utiče na vreme trajanja analize.

Zbog velikog broja razloga, CO<sub>2</sub> je fluid koji se najčešće koristi prilikom SFC analize. Njegovi kritični parametri (tabela 5.3) se relativno lako postižu i održavaju. Niska kritična temperatura omogućuje da temperatura rada može da bude svega 40 °C, što je veoma pogodno prilikom analize termolabilnih uzoraka. Kritičan pritisak od 7,3 MPa u kombinaciji sa kritičnom gustinom od 0,448 g/mL, omogućuje postizanje visoke gustine mobilne faze na pritiscima manjim od 40 MPa. Pored pomenutih pogodnih

kritičnih svojstava, CO<sub>2</sub> nije toksičan, zapaljiv, korozivan (sem u kombinaciji sa vodom), inertan je prema većini supstanci i ne ometa većinu drugih detekcionih tehnika (posebno u slučaju FID). Takođe, CO<sub>2</sub> ima širok opseg gustina pri normalnim uslovima, što omogućava maksimalnu mogućnost optimizacije rastvaranja. Pored svega navedenog, CO<sub>2</sub> visoke čistoće je lako dostupan po niskim cenama. Tip detektora koji se koristi ima najveći uticaj na nivo čistoće koji se traži. Prilikom primene FID uređaja bilo koja ugljovodonična nečistoća dovodi do povećanja šuma. Pod takvim uslovima, zahteva se CO<sub>2</sub> vrlo visoke čistoće, više od 99,9995%, dok je CO<sub>2</sub> regularne čistoće od 99,8% pogodan za korišćenje u slučaju UV detektora. Međutim, primena CO<sub>2</sub> ima ograničenje usled reakcija sa nekim aminima (primarni i sekundarni amini sa  $pK_b > 9$ ), pri čemu nastaju urea i karbamati.

**Tabela 5.3.** Karakteristike odgovarajućih mobilnih faza za SFC

Jedinjenje	Tačka ključanja (°C)	Kritični parametri		
		$T_c$ (°C)	$P_c$ (MPa)	$\rho_c$ (g/mL)
CO <sub>2</sub>	-78,5	31,3	7,38	0,448
N <sub>2</sub> O	-89	36,5	7,23	0,457
SF <sub>6</sub>	-	45,5	3,76	0,230
NH <sub>3</sub>	-33,4	132,3	11,27	0,240
Metanol	64,7	240,5	7,99	0,272
Etanol	78,4	243,4	6,38	0,276
Izopropanol	82,5	235,3	4,76	0,273
Etan	-88	32,4	4,89	0,203
<i>n</i> -propan	-44,5	96,8	4,25	0,220
<i>n</i> -butan	-0,05	152,0	3,80	0,228
<i>n</i> -pentan	36,3	196,6	3,37	0,232
Etoksietan	34,6	193,6	3,68	0,267
Ksenon	-107,1	16,6	5,89	1,105
Acetonitril	82	274,8	47,7	0,253
H <sub>2</sub> O	100	374,1	217,6	0,322

1 atm =  $1,01 \times 10^5$  Pa



Kritična svojstva i hromatografsko ponašanje N<sub>2</sub>O su vrlo slični CO<sub>2</sub>. Sposobnost rastvaranja uzorka im je vrlo slična, primećene su samo minorne razlike u selektivnosti. Njegova osnovna primena se ogleda u analizi primarnih i sekundarnih amina, što je ograničenje kod CO<sub>2</sub> kao mobilne faze.

Alkani su manje pogodni kao mobilna faza, u poređenju sa CO<sub>2</sub>. Kompatibilni su sa detektorom, međutim oni ispoljavaju različite karakteristike rastvorljivosti. Za nepolarne rastvore, oni su obično jači rastvarači i u nekim slučajevima pokazuju značajno veću razliku u selektivnosti u odnosu na CO<sub>2</sub>. Homologi *n*-alkani, od etana do pentana, imaju kritična svojstva koja ih čine pogodnom mobilnom fazom u SFC analizi. Selektivnost može da se menja tako što se biraju različiti članovi homologog niza, zbog čega se za rad mogu odabrati različiti pritisci i temperature.

Druge mobilne faze, kao što su halougljenici, ksenon i SF<sub>6</sub> imaju specijalnu primenu. Grupno razdvajanje ugljovodonika na alifatične, olefinske i aromatične frakcije je analizirano primenom SF<sub>6</sub>. Ksenon se pokazao kao vrlo dobar rastvarač sa boljim superkritičnim svojstvima. Pored toga, transparentan je u IR oblasti.

Polarni fluidi mogu imati odgovarajuću snagu rastvaranja, međutim u tim slučajevima se postavlja pitanje bezbednosti tokom njihove primene. Mogući rastvarači su dati u nizu povećanja polarnosti: HBr < HCl < CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> < H<sub>2</sub>S < SO<sub>2</sub> < CH<sub>3</sub>Br < NOCl < NH<sub>3</sub> < NO<sub>2</sub>.

Amonijak se čini kao dobar izbor kada se radi o jednokomponentnim fluidima za SFC analize, ali njegova upotreba je ograničena s obzirom da je visokotoksičan, korozivan i reaktivan, a pod određenim uslovima je zapaljiv i eksplozivan.

Primena SFC tehnike veoma zavisi od mogućnosti analize polarnih analita. Termolabilni analiti i neisparljivi molekuli visokih molekulskih masa imaju polarne funkcionalne grupe, što značajno otežava analizu.

Zbog komplikacija koje nastaju usled primene jednokomponentnih polarnih rastvarača, organski modifikatori se koriste da bi poboljšali jačinu

rastvarača niske polarnosti, kao što je to slučaj sa CO<sub>2</sub>. Modifikatori, u koncentracijama manjim od 2%, imaju minimalan uticaj na rastvorljivost uzorka u superkritičnoj mobilnoj fazi. Primarno se koriste da bi maskirali interakcije između molekula uzorka i dostupnih silanolnih grupa na površini stacionarne faze. Pri višim koncentracijama modifikatora moguće je podesiti jačinu rastvarača i selektivnost mobilne faze promenom prirode i stepena intermolekulskih interakcija između rastvorka i rastvarača. Modifikator treba da bude dobar rastvarač analita. Pored toga, primena modifikatora utiče i na vreme trajanja analize ukoliko se koriste pakovane kolone, dok je njihov uticaj zanemarljiv ukoliko se koriste kapilarne kolone. Modifikovani superkritični fluidi podrazumevaju:

- CO<sub>2</sub> dopiran sa metanolom, izopropanolom, dihlormetanom, tetrahidrofuranom, dimetilsulfoksidom i acetonitrilom,
- Trifluormetan dopiran sa amonijakom i
- Pentan dopiran sa benzenom, izopropanolom i dihlormetanom.

Alifatični alkoholi su najpopularniji modifikatori. Snaga modifikatora se povećava sa povećanjem dužine ugljeničnog lanca.

Metanol se pokazao kao izuzetno dobar modifikator CO<sub>2</sub>, ali se na ovaj način eliminiše mogućnost primene FID detektora. Voda je takođe razmatrana kao modifikator CO<sub>2</sub> jer ne doprinosi šumu FID analize, ali su smeše CO<sub>2</sub> i vode korozivne.

Oblast delovanja SFC može biti proširena i na druge načine. kao što je npr. dodavanje jonsparujućih reagenasa CO<sub>2</sub> mobilnoj fazi koji poboljšavaju razdvajanje SFC tehnike, na taj način što uključuju i jonske i jonizujuće analite. Selektivnost se može ostvariti uvođenjem sekundarnih hemijskih ravnoteža u fluidni sistem. Međutim, njihova primena nije još detaljno istražena.

Metode dodavanja modifikatora su preuzete od HPLC tehnike, gde je upotreba mešanih mobilnih faza česta.

## **5.5. FAKTORI KOJI UTIČU NA VREME TRAJANJA ANALIZE**

Vreme trajanja analize kod SFC zavisi od temperature, pritiska, vrste mobilne faze i sastava stacionarne faze. Navedeni faktori su kompleksni i interaktivni i tokom vremena se menjaju, pa se stoga njihovo ponašanje ne može tako lako predvideti. Vreme trajanja analize najviše zavisi od:

- Pripreme uzorka,
- Izboru superkritičnog fluida,
- Pritiska,
- Temperature i
- Gradijentnog profila.

Prilikom analize SFC uzorak mora da bude rastvorljiv u rastvaraču koji je manje polaran nego metanol (dielektrična konstanta manja od 33) s obzirom da CO<sub>2</sub>, kao najčešće korišćena mobilna faza, ima malu polarnost i ne može lako eluirati polarne uzorke. Međutim, ovaj problem se uspešno rešava dodavanjem odgovarajućih modifikatora u mobilnu fazu.

## **5.6. POREĐENJE SFC SA HPLC I GC**

Jasno je da SFC poseduje izuzetan potencijal kao jedna od hromatografskih tehnika. Prednosti nad HPLC analizom su:

- Kraće vreme trajanja analize, budući da superkritične tečnosti imaju nisku viskoznost, znatno je manji pad pritiska i mogu se koristiti kapilarne kolone i

- Razdvajanje je efikasnije zbog velike difuzije superkritičnog fluida. Više interakcija dovodi do boljeg odvajanja komponenata u kraćem vremenskom periodu.

Takođe, SFC pokazuje i određene prednosti nad GC analizom:

- Nije potrebna derivatizacija, u većini slučajeva, jer nema potrebe da se većina polarnih grupa prevodi u nepolarne,
- Lakše se analiziraju termički labilna jedinjenja sa visokom rezolucijom, jer mogu da pruže bržu analizu na nižim temperaturama i
- Moguće je analizirati molekule veće molekulske mase zbog bolje rastvorljivosti uzorka u superkritičnom fluidu.

Kao opšti nedostatak SFC se može navesti nemogućnost analize vrlo polarnih rastvora, zbog relativno nepolarne mobilne faze (CO<sub>2</sub>).

## 5.7. OBLASTI PRIMENE SFC

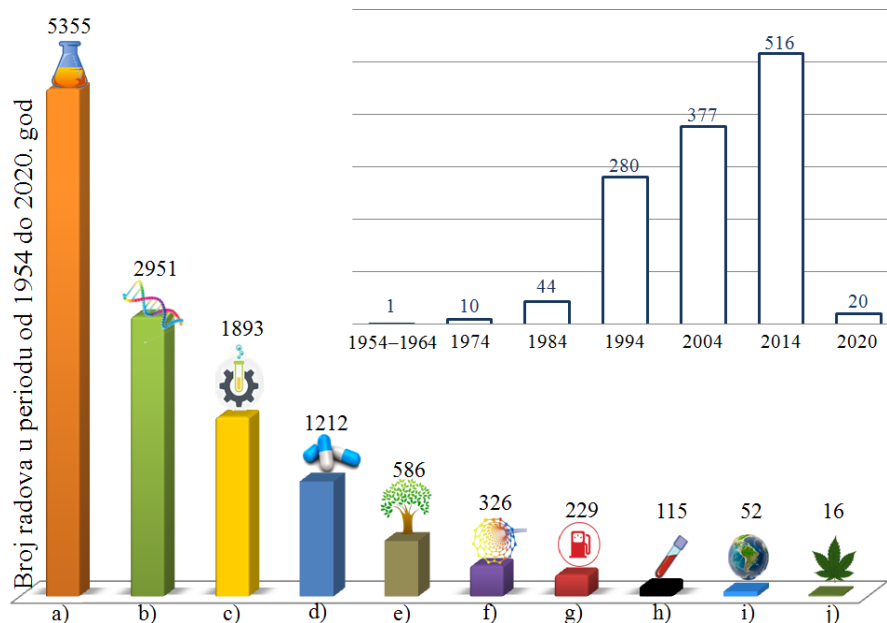
SFC, koja koristi CO<sub>2</sub> pod pritiskom kao glavnu komponentu mobilne faze, je poznata već nekoliko decenija ali se interesovanje za ovu hromatografsku tehniku značajno povećalo poslednjih godina.

Primena SFC se često završavala samo kao tehnika ekstrakcije za pripremu uzoraka. Razvoj savremenih instrumenata koji mogu da obezbede zahtevanu robusnost i osetljivost metode značajno su doprineli razvoju i primeni SFC. Štaviše, smanjenje dužine kolona i pojava sub-2 µm čestica u stacionarnim fazama favorizovali su razvoj i primenu ultra performansi SFC (eng. *Ultra High Performance Supercritical Fluid Chromatography*, UHPSFC), omogućavajući brže analize i bolju rezoluciju, ali bez ograničenja viskoznih tečnosti koje se susreću kod UHPLC. Najnoviji instrumenti su omogućili da granice između SFC i HPLC nestaju.

Najmoderniji instrumenti su obezbedili prelazak sa jedne metode na drugu, čak i u okviru jedne analize. Kuplovanje sa masenom spektrometrijom je takođe učestalije i otvorilo je put novoj primeni. SFC se često koristi u:

- Industriji prilikom analize boja, izocijanata, oligosaharida, polisaharida, poliestara, pesticida, surfaktanata, polimera/aditiva,
- Biohemiji pri analizi antibiotika, zloupotrebi lekova, masnih kiselina/lipida, prostaglandina, steroida i
- Analizi fosilnih goriva prilikom frakcionisanja nafte i njenih derivata, ugljovodoničnih analiza i simulirane destilacije (slika 5.4).

U suštini, SFC se primenjuje tamo gde HPLC i GC daju loše rezultate. Vrlo često se SFC koristi zbog odsustva UV apsorbujućih hromofora u analitu, što komplikuje HPLC detekciju. Pored toga, niska termička stabilnost i isparljivost odabranih jedinjenja otežavaju GC analizu, dok bi se morao uložiti značajan trud za razvoj HPLC tehnike. Najvažnija prednost superkritičnog fluida, kao mobilne faze, je poboljšanje rezolucije bez produžavanja vremena trajanja analize ili povećanja dužine kolone.



**Slika 5.4.** Broj radova u indeksnoj bazi SCOPUS<sup>2</sup> iz odabranih oblasti primene SFC: a) hemija, b) biohemija, genetika i molekularna biologija, c) hemijski inženjering, d) farmakologija, toksikologija i lekovi, e) zaštita životne sredine, f) nauka o materijalima, g) energija, h) imunologija i mikrobiologija, i) geonauke i planetologija i j) multidisciplinarne nauke. Insert: broj publikovanih radova za odabrane godine

## LITERATURA

- Berger, D., 2007. Supercritical fluid chromatography (SFC): a review of technical developments. *LC GC Europe* 20, 164–166.
- Berger, T.A., 2015. Instrumentation for analytical scale supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1421, 172–183.
- Cammann, K., Kleibohmer, W., 1990. Supercritical fluid chromatography of polychlorinated biphenyls on packed columns. *Journal of Chromatography A* 522, 267–275.
- Harvey, D., *Modern Analytical Chemistry*, poglavlje 12, McGraw-Hill Companies, Inc., The United States of America, 2000, str. 596–597.
- <https://www.scopus.com/> (pristupljeno 05. 01. 2020.)

<sup>2</sup> TITLE-ABS-KEY(Supercritical Fluid Chromatography OR SFC)

6. <https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrom.htm> (pristupljeno 04. 01. 2020).
7. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Book%3A\\_Physical\\_Methods\\_in\\_Chemistry\\_and\\_Nano\\_Science\\_\(Barron\)/03%3A\\_Principles\\_of\\_Gas\\_Chromatography/3.04%3A\\_Supercritical\\_Fluid\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/03%3A_Principles_of_Gas_Chromatography/3.04%3A_Supercritical_Fluid_Chromatography) (pristupljeno 04. 01. 2020).
8. Laboureur, L., Ollero, M., Touboul, D., 2015. Lipidomics by supercritical fluid chromatography. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 13868–13884.
9. Pinkston, J.D., Stanton, D.T., Wen, D., 2004. Elution and preliminary structure–retention modeling of polar and ionic substances in supercritical fluid chromatography using volatile ammonium salts as mobile phase additives. *Journal of Separation Science* 27, 115–123.
10. Saito, M., 2013. History of supercritical fluid chromatography: instrumental development. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 115, 590–599.
11. Schoenmakers, P.J., Uunk, L.G.M., 1987. Supercritical fluid chromatography – recent and future developments. *European Chromatography News* 1, 14–18.
12. Taylor, L.T., 2009. Supercritical fluid chromatography for the 21<sup>st</sup> century, *Journal of Supercritical Fluids* 47, 566–573.
13. Welch, C.J., Wu, N., Biba, M., Hartman, R., Brković, T., Gong, X., Helmy, R., Schafer, W., Cuff, J., Pirezada, Z., Zhou, L., 2010. Green analytical chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* 29, 667–680.
14. West, C., 2018, Current trends in supercritical fluid chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, 6441–6457.

---

# 6. EKSKLUZIONA HROMATOGRFIJA

---

- 6.1. Uvod
  - 6.2. Istorijski aspekt
  - 6.3. Princip rada
  - 6.4. Delovi ekskluzionog hromatografa
  - 6.5. Struktura i osobine stacionarne faze
  - 6.6. Određivanje apsolutne molekulske mase
- LITERATURA
-



## 6.1. UVOD

Ekskluziona hromatografija (eng. *Exclusion Chromatography*, EC) je tehnika koja je posebno primenljiva u analizi molekula koji imaju velike molekulske mase. Predstavlja izuzetno važnu tehniku za karakterizaciju makromolekula (određivanje molekulskih masa) u kojoj se molekuli razdvajaju prema njihovoj veličini. Ova tehnika je pronašla primenu u karakterizaciji i frakcionaciji prirodnih organskih materija u vodama. Analiza primenom EC je relativno jednostavna i koristi se standardna instrumentacija za HPLC. Osnovni delovi instrumenta su pumpa, kolona, detektor (diferencijalni refraktometar, spektrofotometrijski detektor i dr.) i sistem za sakupljanje i obradu podataka. Pakovanje kolone se sastoji od poroznih sfernih čestica (3 do 20  $\mu\text{m}$ ). Zadržavanje u EC se zasniva na razdvajanju makromolekula između mobilne i stacionarne tečne faze.

Važno je napomenuti da prema ovoj metodi nema ni hemijskih ni fizičkih interakcija između analita i stacionarne faze, što je posebno razlikuje od ostalih tehnika razdvajanja. Opseg makromolekulskih veličina koje se mogu razdvojiti određenom kolonom zavisi od veličine (ili raspodele veličina) pora. Dobijeni hromatogram u ekskluzionoj hromatografiji predstavlja zavisnost odgovora detektora (osetljivog na koncentraciju ili molekulsku masu) od vremena eluiranja.

## 6.2. ISTORIJSKI ASPEKT

Mnogi odnosi između makromolekulskih svojstava i vrednosti molekulskih masa ( $M$ ) i/ili raspodele molekulskih masa bili su prepoznati od ranih 60-ih godina XX veka. Međutim, nije postojala nijedna pogodna metoda kojom bi se odredila raspodela molekulskih masa polimera u jednom eksperimentu. Da bi se rešio pomenuti nedostatak, John Moore iz kompanije Dow Chemical Company iz Teksasa je razvio tehniku koju je nazvao gel-propusnom hromatografijom. Njegov rad, „Gel-propusna hromatografija. I. Nova metoda za raspodelu molekulske mase složenih polimera” objavljen je 1964. godine. Moore-ovo istraživanje zasnovano je na ranijim istraživanjima Wheaton-a i Bauman-a, kao i Porath-a i Flodin-a. Godine 1953. istraživači su primetili razdvajanje nejonskih supstanci tokom

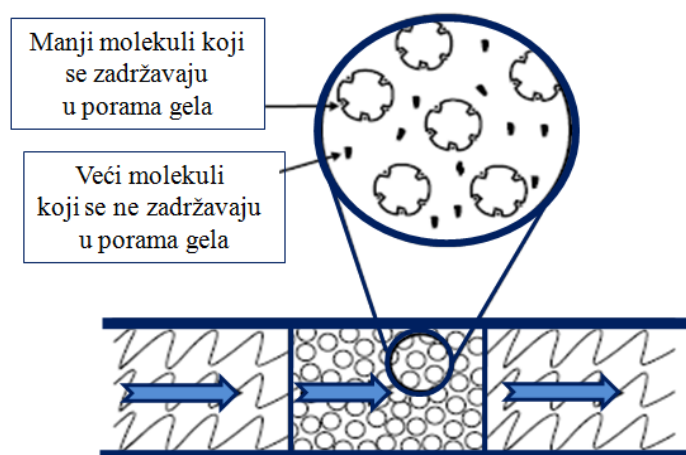
prolaska kroz jonoizmenjivačku kolonu, što je ukazalo na to da bi razdvajanje molekula na osnovu veličine moglo da bude moguće u vodenom rastvoru. Ovu vrstu razdvajanja demonstrirali su 1959. godine Porath i Flodin, koji su koristili kolone pakovane umreženim hidrofilnim gelom polidekstrina, da bi se izvršilo razdvajanje različitih makromolekula rastvorljivih u vodi, a na osnovu veličine molekula. Ova tehnika je označena kao gel-filtriranje. Iako su i hidrofobni gelovi takođe razvijeni za razdvajanje jedinjenja od biološkog značaja, činjenica da je bubrenje gelova moguće samo u vodenoj sredini, ograničila je njihovu primenu na razdvajanje supstanci rastvorljivih u vodi. U svom pionirskom radu, Moore je kolone punjene stiroil/divinilbenzen gelovima povezo sa diferencijalnim refraktometrom, koji je posebno dizajniran od strane James Waters-a. Upotrebljeni refraktometar imao je optičku ćeliju manju od one koja je bila dostupna na tržištu u to vreme, kao i kontinualan protok uzorka i mogućnost rada na temperaturama do 130 °C. Moore je pokazao da bi pravilnom kalibracijom gel-propusne hromatografije mogla da se odredi i raspodela molekulskih masa, kao i  $M$  vrednosti sintetičkih polimera, što je bilo veoma potrebno u industriji polimera.

Stariji pojmovi gel-propusna hromatografija i gel-filtriranje su usklađeni pod zajedničkim nazivom SEC. Postoji nekoliko dobrih razloga za to:

- Eluiranje i u GPC i u GFC odvija se uobičajenim mehanizmom za razdvajanje na osnovu veličine molekula,
- Iako je većina kolona koje se upotrebljavaju u okviru ekskluzione hromatografije pakovana umreženim gelovima, isto toliko kolona je punjeno materijalima poput poroznog silicijuma i glinice i odnedavno monolitima i
- GPC se odnosi na analize primenom organskih rastvarača, dok GFC podrazumeva izvođenje analiza u vodenoj sredini.

### 6.3. PRINCIP RADA

SEC se zasniva na razdvajanju molekula uzorka prema veličini i obliku molekula, propuštanjem rastvora kroz kolonu ili preko površine koja sadrži umreženi polimerni gel. Skelet stacionarne faze predstavlja porozni polimerni matriks, čije pore su u potpunosti popunjene rastvaračem (stacionarna faza), a koji će se upotrebljavati kao mobilna faza. Veličina pora je veoma značajna, jer od nje zavisi razdvajanje molekula uzorka. Sa protokom mobilne faze veći molekuli prolaze kroz kolonu bez zadržavanja u porama stacionarne faze, a manji molekuli se zadržavaju različito vreme, u zavisnosti od prodiranja u gel stacionarne faze (slika 6.1).

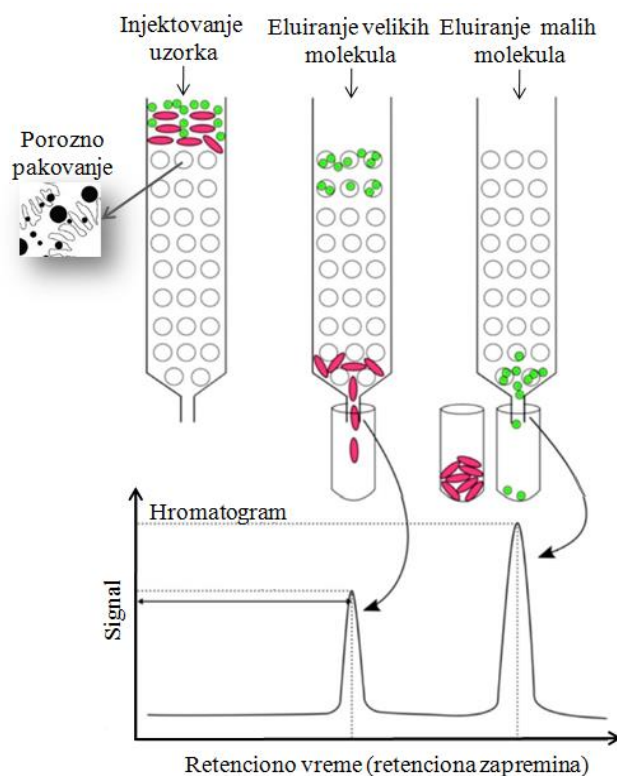


**Slika 6.1.** Mehanizam razdvajanja molekula na stacionarnoj fazi prilikom kretanja uzorka kroz u kolonu u SEC. Strelica prikazuje smer kretanja rastvarača

Molekuli koji se ne zadržavaju na stacionarnoj fazi imaju vrednost raspodele 0, dok oni molekuli koji imaju dimenzije koje omogućavaju zadržavanje u porama gela, imaju vrednost raspodele 1. Retenciona zapremina,  $V_r$  je karakteristična vrednost za svaku komponentu smeše i određuju se iz vrednosti raspodele.

Na slici 6.2 ilustrovan je proces razdvajanja komponenata smeše primenom SEC. Kao što se može videti, prvo veći molekuli uzorka izlaze iz

kolone, dok se manji molekuli rastvora eluiraju kasnije iz kolone. Prva slika kolone prikazuje ubrizgavanje (unošenje) uzorka na vrh kolone. Na drugoj slici kolone prikazano je razdvajanje na osnovu veličine i može se videti da veći molekuli uzorka migriraju kroz kolonu brže od manjih molekula. Veći molekuli ne ulaze u pore stacionarne faze i samim tim provode više vremena u pokretnoj fazi, dok manji molekuli ulaze u pore stacionarne faze. Kao rezultat toga, manji molekuli uzorka se duže zadržavaju u koloni, a veliki molekuli se eluiraju iz kolone i bivaju detektovani. Na trećoj slici kolone, mali molekuli se eluiraju iz kolone. U realnim uzorcima sintetičkih polimera, uglavnom je prisutan veliki broj različitih veličina molekula, koji se ne mogu razdvojiti na pojedinačne pikove na hromatogramu. Umesto toga, hromatogram pomenutog složenog uzorka polimera je obično širok pik, pri čemu vrste koje se ranije eluiraju predstavljaju molekule velikih molekulskih masa, a vrste koje se kasnije eluiraju predstavljaju molekule manjih molekulskih masa.



**Slika 6.2.** Prikaz procesa razdvajanja primenom SEC

Rastvor uvek ima istu  $V_r$  za određenu vrstu stacionarne faze (gela). Efikasnost razdvajanja praktično ne zavisi od promene temperature i protoka, jer se razdvajanje odvija selektivnom difuzijom unutar jedne tečne faze. Prava raspodela je proces ravnoteže koji uključuje prenos rastvora između dve faze koje se ne mešaju. Za rastvore čija molekulska veličina ili masa spada u opseg veličina pora gela, tj. za raspodele čije su vrednosti između 0 i 1,  $V_r$  je približno linearna funkcija logaritma molekulske mase. Molekuli koji se ne zadržavaju u porama gela, izlaze iz sistema sa  $V_r$  koja je jednaka  $t_0$  kolone. Zatim, molekuli koji se zadržavaju u porama gela eluiraju se retencionom zapreminom koja je jednaka zbiru zapremina na mrtvom vremenu i zapremini rastvarača koji ispunjava pore gela. Kolona u SEC se kalibriše eluiranjem supstanci poznatih molekulskih masa. Efikasnost razdvajanja se određuje na osnovu širine pika, jer su retencione zapremine konstantne. Eluirane komponente se detektuju praćenjem fizičkih osobina mobilne faze, kao što su indeks refrakcije, apsorpcija UV zračenja ili skupljanjem i analizom posebnih frakcija.

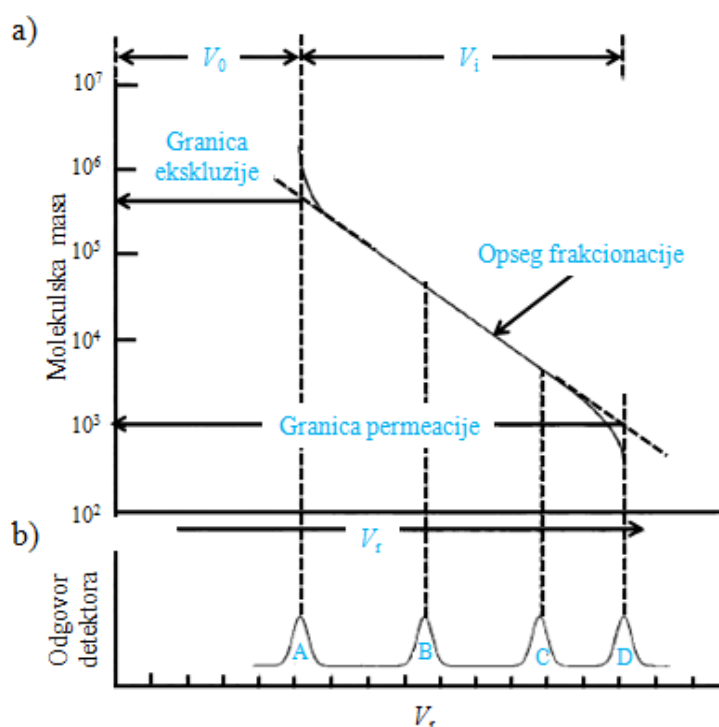
Hromatogram, kao rezultat analize u SEC predstavlja zavisnost odgovora detektora (signal) od retencionog vremena (zapremine) (slika 6.2). Dobijeni rezultati se obrađuju tako da se vreme eluiranja ili retenciono vreme transformiše u retencionu zapreminu  $V_r$ , a  $V_r$  se transformiše u molekulska masu, dok se odgovor detektora prevodi u koncentraciju. Tokom procesa eluiranja, kao što je već rečeno, veliki makromolekuli ne prodiru u pore stacionarne faze i putuju kroz tzv. intersticijalnu zapreminu kolone  $V_0$  i napuštaju kolonu prvi. Makromolekuli manjih molekulskih masa prodiru u pore stacionarne faze i bivaju eluirani na većim  $t_r$ . Kada je veličina makromolekula relativno mala u odnosu na prosečnu veličinu pora, makromolekul će slobodno difundovati u pore i izvan pora i eluirati se na ukupnoj zapremini mobilne faze ( $V_u$ , jednačina 6.1):

$$V_u = V_0 + V_{i0} \quad (6.1)$$

gde je  $V_{i0}$  ukupna zapremina pora.

Na slici 6.3 prikazano je razdvajanje makromolekula na osnovu molekulskih masa. Naime, granica ekskluzije na slici 6.3 je maksimalna molekulska masa komponente koja može da prođe u pore pakovanja kolone.

Sve komponente koje imaju veće molekulske mase se ne zadržavaju u koloni i čine pik A. Ispod granice permeacije, komponente potpuno ulaze u pore i čine pik D. Sa smanjenjem molekulske mase od granice ekskluzije, komponente provode sve više vremena u porama pakovanja kolone i samim tim sporije se kreću. To predstavlja opseg frakcionacije gde nastaje razdvajanje komponenata, pri čemu nastaju pojedinačni pikovi B i C (slika 6.3).



**Slika 6.3.** a) Kalibraciona kriva za gel (ekskluzionu) kolonu i b) hromatogram na kom pik A predstavlja sve komponente koje imaju molekulske mase veće od ekskluzionog limita, pikovi B i C su komponente unutar selektivnog permeacionog regiona i D su komponente koje imaju molekulske mase manje od permeacionog limita

SEC se koristi za određivanje molekulske mase, kao i raspodele molekulskih masa. Molekulska masa i pomenuta raspodela veoma su važni podaci prilikom karakterizacije polimera, s obzirom na to da od njih u

velikoj meri zavise fizičke osobine samih polimera. Kada se jednom odredi molekulska masa određenog polimera, SEC se dalje može upotrebljavati u kontroli kvaliteta tokom sinteze polimera. Svi sintetički, kao i većina prirodnih polimera, se razlikuju od malih molekula i ne mogu se okarakterisati jednom molekulskom masom, jer oni poseduju raspodelu molekulskih masa. Kao i u slučaju bilo koje druge statističke raspodele, raspodela molekulskih masa se karakteriše serijom srednjih vrednosti od kojih su najčešće srednja molekulska masa po brojnoj zastupljenosti ( $M_n$ ), srednja molekulska masa po masenoj zastupljenosti ( $M_w$ ), srednja  $z$  vrednost ( $M_z$ ) i srednja viskozimetrijska vrednost molekulske mase ( $M_v$ ). Srednje vrednosti se predstavljaju jednačinama 6.2–6.4:

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} = \frac{\sum_i W_i}{\sum_i W_i / M_i} = \frac{\sum_i h_i}{\sum_i h_i / M_i} \quad (6.2)$$

$$M_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i} = \frac{\sum_i W_i M_i}{\sum_i M_i} = \frac{\sum_i h_i M_i}{\sum_i M_i} \quad (6.3)$$

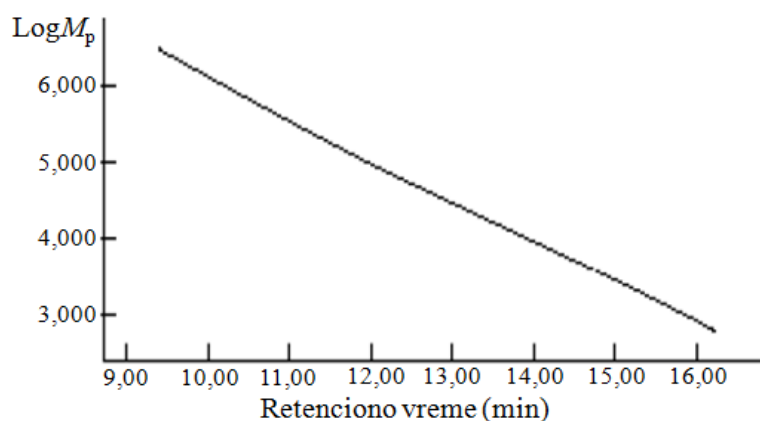
$$M_z = \frac{\sum_i N_i M_i^3}{\sum_i N_i M_i^2} = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i W_i M_i} = \frac{\sum_i h_i M_i^2}{\sum_i h_i M_i} \quad (6.4)$$

gde su  $N$  i  $W$  broj, odnosno masa molekula koji imaju molekulska masu  $M_i$ .

Treća jednačina u nizu predstavlja način kako se srednje vrednosti mogu dobiti iz hromatograma.  $h_i$  predstavlja visinu pika, a  $M_i$  je molekulska masa molekula koji se detektuje kao  $i$ -ti inkrement.

Prevođenje ose koja predstavlja  $V_r$  u osu molekulske mase (kalibracija) može se uraditi na više načina, uključujući poziciju pika, univerzalnu kalibraciju, standarde, kao i određivanje stvarne molekulske mase. U metodi određivanja pozicije pika, niz dobro okarakterisanih standarda određenih molekulskih masa ( $M_p$ ) se ubrizgava u sistem i određuje se njihovo retenciono vreme. Grafik zavisnosti  $\log M_p$  od retencionog vremena je prikazan na slici 6.4. Za određivanje apsolutnih molekulskih masa, kalibracija na osnovu pozicije pika ima ograničenu primenu, jer postoji nekoliko komercijalno dostupnih standarda i da bi

kalibracija molekulske mase bila validna, sastav i topologija standarda i nepoznatog uzorka moraju biti isti.



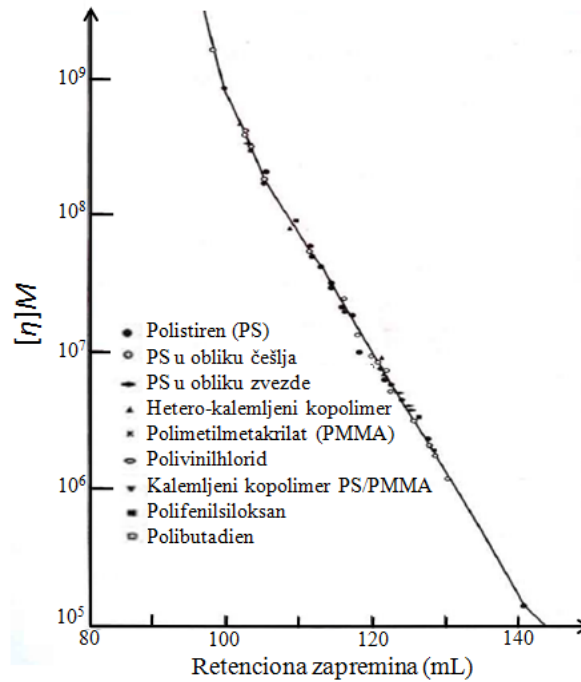
**Slika 6.4.** Primer kalibracione krive za 17 molekulskih masa polistirena

U SEC razdvajanje makromolekula zavisi više od hidrodinamičke zapremine nego od njihove molekulske mase. Imajući to u vidu, koristi se kalibracija bazirana na zavisnosti hidrodinamičke zapremine ( $[\eta]M$ ) od retencione zapremine  $V_r$ , gde  $[\eta]$  predstavlja unutrašnju viskoznost. Ovakva kriva naziva se „univerzalna” kalibraciona kriva (slika 6.5).

Postoje dva načina primene „univerzalne” kalibracione krive za određivanje apsolutne molekulske mase. U slučaju kada je  $V_r$  nekog ispitivanog polimera poznato, može se očitati vrednost  $[\eta]M$  direktno sa kalibracione krive. Vrednost molekulskih masa se može odrediti ako je  $[\eta]$  takođe izmereno za svaki retencioni inkrement primenom viskozimetra. Ova metoda je pogodna kod procene molekulskih masa novih polimera. Takođe, ona koriguje razlike koje potiču iz hidrodinamičkih zapremina kada se porede  $M$  nekoliko polimera, a samo jedan od njih (npr. polistiren) se koristi za kalibraciju. Pored toga, u pokušaju da se poboljša metoda „univerzalne” kalibracione krive predložena je metoda po kojoj se kombinuje „univerzalna” kalibraciona kriva i Mark-Houwink-ova jednačina. Na datoj zapremini eluiranja, dva polimera, A i B, treba da imaju iste hidrodinamičke zapremine  $[\eta]M$  (jednačina 6.5):



$$[\eta]_A M_A = [\eta]_B M_B \quad (6.5)$$



**Slika 6.5.** „Univerzalna” kalibraciona kriva dobijena iz merenja različitih standarda polimera

Mark-Houwink-ova jednačina je prikazana prema jednačini 6.6:

$$[\eta] = kM^\alpha \quad (6.6)$$

gde su  $k$  i  $\alpha$  konstante koje zavise od sastava nosača (polimera), temperature i rastvarača.

Kombinovanjem jednačina 6.5 i 6.6 dobija se jednačina 6.7:

$$\log M_B = \frac{1}{1 + \alpha_B} \log \frac{k_A}{k_B} + \frac{1 + \alpha_A}{1 + \alpha_B} \log M_A \quad (6.7)$$

Iz jednačine 6.7 sledi izraz 6.8:

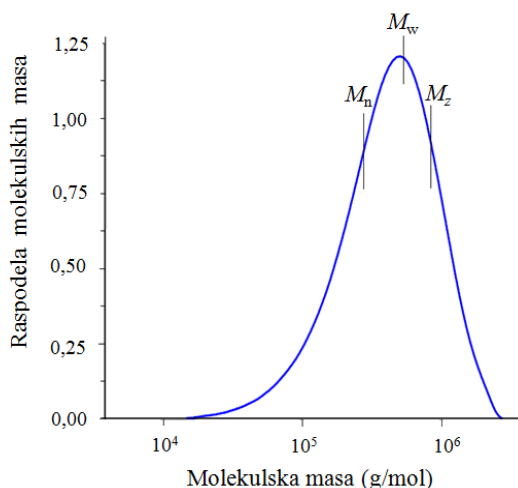
$$\log M_B = A + B \log M_A = A + BC V_r \quad (6.8)$$

gde je  $C$  nagib kalibracione krive  $\log M_A = CV_r$ , oznaka A odnosi se na standard, a oznaka B se odnosi na ispitivani uzorak.

Ako su vrednosti  $k_A$  i  $\alpha_A$  za standardni polimer, kao i  $k_B$  i  $\alpha_B$  za uzorak poznati iz literature,  $M_B$  se može odrediti za ispitivani uzorak iste vrste iz podataka za  $V_r$ . Iz kalibracione krive ( $\log M_A = CV_r$ ) se može odrediti nagib  $C$ . Ukoliko  $k$  i  $\alpha$  nisu poznati iz literature, mogu se odrediti prema jednačini 6.6 merenjem standarda poznatih molekulskih masa.

U slučaju savremenih modela ekskluzionih hromatografa apsolutna molekulaska masa analiziranog polimera se može odrediti primenom detektora koji su osetljivi na molekulsku masu i tada nije potrebna „univerzalna” kalibracija. Primer jednog takvog detektora je detektor na bazi rasejanja svetlosti. Po ovom pristupu, detektor meri  $M$  za svaku eluiranu frakciju.

U slučaju disperznih ili polidisperznih polimera srednje vrednosti molekulskih masa su u odnosu  $M_z > M_w > M_n$ , dok je u slučaju monodisperznih polimera  $M_z = M_w = M_n$ . U nastavku će diskusija biti fokusirana na situaciju u kojoj je  $M_z$  karakteristično za veće molekulske mase,  $M_n$  za manje, a  $M_w$  je u srednjem regionu. Na slici 6.6 je prikazan primer raspodele molekulskih masa za disperzni, linearni polistiren.



**Slika 6.6.** Raspodela molekulskih masa i srednje vrednosti  $M$  za linearni polistiren.  $M_n = 2,77 \times 10^5$  g/mol,  $M_w = 5,38 \times 10^5$  g/mol,  $M_z = 8,29 \times 10^5$  g/mol i  $M_w/M_n = 1,94$

S obzirom na to da je z-prosečna molekulska masa i obično se nalazi u području raspodele molekulskih masa polimera sa dugačkim lancima, pomenuta srednja vrednost može dati informacije o karakteristikama obrade polimera, kao što su dužina trajanja fleksibilnosti i krutosti materijala. Nasuprot tome,  $M_n$  polimera, koja se nalazi u području raspodele molekulskih masa malih molekula, može dati informaciju o krhkosti i poroznosti materijala. Bez obzira na različitost srednjih molekulskih masa, polimeri sa vrlo različitom raspodelom molekulskih masa mogu imati identične srednje vrednosti  $M_n$ ,  $M_v$  i  $M_z$ . Pored toga, određena obrada i svojstva poput istezanja, tvrdoće i čvrstoće mogu se povećavati sa povećanjem  $M$ , ali se smanjuju sa sužavanjem raspodele molekulskih masa. Imajući u vidu značaj raspodele molekulskih masa, uvek bi trebalo izvesti određivanje pomenute raspodele zajedno sa ispitivanjem  $M$  vrednosti polimera.

Za razblažene rastvore u ravnoteži, raspodela je povezana sa razlikom standardne slobodne Gibsove energije ( $\Delta G^\circ$ ) između faza pri konstantnoj temperaturi i pritisku (jednačine 6.9 i 6.10):

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (6.9)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (6.10)$$

gde  $K$  predstavlja koeficijent raspodele,  $R$  gasna konstanta,  $T$  apsolutna temperatura i  $\Delta H^\circ$  i  $\Delta S^\circ$  su promene standardne entalpije, odnosno entropije između faza.

S obzirom na to da se u okviru gel (ekskluzione) hromatografije upotrebljavaju kolone punjene materijalima koji ne reaguju sa analitom, što odgovara  $\Delta H^\circ \approx 0$ , razdvajanje po ovoj metodi se zasniva na promeni entropije između faza, kao što je prikazano u jednačini 6.11:

$$K \approx e^{\Delta S^\circ/R} \quad (6.11)$$

gde su  $K$  koeficijent raspodele, koji odgovara odnosu prosečne koncentracije rastvora unutar pora pakovanja kolone i koncentracije rastvora izvan pora. Iz tog razloga je kretanje rastvora analita ograničeno na

unutrašnjost pora, a eluiranje rastvora u SEC je povezano sa smanjenjem konformacione entropije rastvora, koja odgovara negativnim vrednostima  $\Delta S^\circ$ .

Jednačina 6.11 ukazuje da je razdvajanje rastvora u SEC nezavisno od promene temperature. Iako je nađeno da veličina polimera u rastvoru, a samim tim i njihova retenciona zapremina imaju malu temperaturnu zavisnost, to ne utiče na mehanizam kojim se pomenuti analiti razdvajaju. Entropijska priroda razdvajanja u SEC je potvrđena malim razlikama u vrednosti  $K$  sa promenom temperature za veliki broj mono-, di- i oligosaharida u vodenoj i nevodenoj sredini (tabela 6.1).

**Tabela 6.1.** Temperaturna zavisnost  $K$  za odabrane oligosaharide

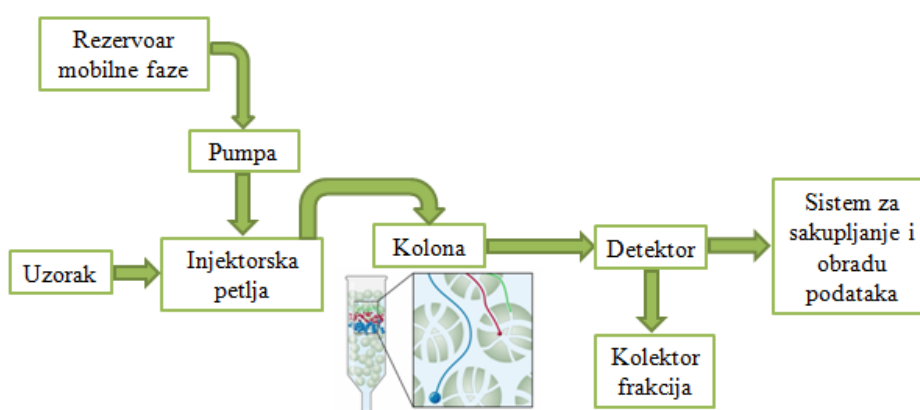
Oligosaharidi	$K$	
	25 °C	37 °C
Maltoza	0,683	0,675
Maltoheptoza	0,430	0,415
Celobioza	0,657	0,648
Celopentoza	0,431	0,419
Izomaltoza	0,626	0,613
Izomaltoheptoza	0,356	0,341
Laminariboza	0,657	0,643
Laminariheptoza	0,369	0,354

Rastvarač H<sub>2</sub>O, pH-vrednost 7,4, protok 1 mL/min

Kao što je rečeno u uvodnom delu, pomoću proširene van Deemter-ove jednačine izražene su različite mogućnosti doprinosa kolone širenju pika u SEC (jednačina 1.14). Od parametara koji se mogu podešavati u cilju optimizacije rezolucije u SEC obično se podešavaju samo dužina (ili broj) kolona, brzina protoka i veličina čestica materijala koji se upotrebljavaju kao pakovanje kolone. Ograničenja se javljaju u slučaju velikih makromolekula, koji imaju tendenciju da se razgrade tokom prolaska kroz kolonu. U takvim slučajevima se često koriste mali protoci i pakovanja velikih dimenzija, čime se smanjuje rezolucija radi očuvanja uzorka.

#### 6.4. DELOVI EKSKLUZIONOG HROMATOGRAFA

U okviru SEC najčešće se upotrebljavaju staklene kolone kod kojih se razdvajanje izvodi usled sile teže, zatim staklene, metalne ili najlonske cevi za sisteme pod pritiskom. Pored kolona za razdvajanje, deo aparature predstavlja injektor sa petljom, pumpe za proizvodnju visokog pritiska, kolektor frakcija, detektor i sistem za obradu rezultata (slika 6.7).



**Slika 6.7.** Šematski prikaz osnovnih delova instrumenta za gel (ekskluzionu) hromatografiju

Kolone u SEC se pune suspenzijom gela i odgovarajućeg rastvarača. Uzorak pre unosa na kolonu treba da bude prečišćen od bilo koje supstance koja može da se jako adsorbuje na gelu. Masa i koncentracija uzorka nisu važne sve dok ne utiču na viskoznost. Naime, ako je viskoznost uzorka oko dva puta veća od viskoznosti mobilne faze, to dovodi do smanjenja rezolucije. U SEC se primenjuje izokratsko eluiranje i razvoj hromatograma je relativno jednostavan, tj. komponente se eluiraju sa smanjenjem molekulske mase i/ili veličine. Dužina kolone ( $L$ ), veličina čestica i homogenost punjenja kolone utiču na rezoluciju kolone. Dok performansa kolone raste sa  $\sqrt{L}$ , dužina kolone koja može da se koristi je ograničena sa kompresibilnošću gela.

Rezolucija se može povećati sa smanjenjem veličina čestica gela do neke mere, jer se na taj način smanjuje protok. Pored toga, homogenost

kolone je od izuzetnog značaja, jer usled nehomogenosti punjenja kolone dolazi do nastanka asimetričnih pikova na hromatogramu.

Pumpe su neophodan deo hromatografa, jer one treba da obezbede konstantan protok rastvora tokom analize, bez obzira na njegovu viskoznost.

Upotrebljavaju se detektori na bazi indeksa prelamanja osetljivi na koncentraciju, UV ili IR apsorpcije. Diferencijalni refraktometar se koristi kao univerzalni detektor za merenje srednjih molekulskih masa, kao i raspodele molekulskih masa polimera, a zasniva se na merenju indeksa prelamanja ili razlike u indeksu prelamanja čistog rastvarača i analita, pri čemu je odgovor detektora proporcionalan koncentraciji analita. UV apsorbujući detektori daju informaciju o sastavu polimera. Pored navedenog, upotrebljavaju se detektori na bazi rasejanja svetlosti i to rasejanja svetlosti pod malim uglom (*eng. Low Angle Light Scattering, LALS*) i višegaonog rasejanja svetlosti (*eng. Multi Angle Light Scattering, MALS*), koji omogućavaju određivanje apsolutne molekulske mase, a u sprezi sa viskozimetrom dobija se informacija o strukturi polimera.

## 6.5. STRUKTURA I OSOBINE GELOVA

Razdvajanje u SEC zavisi od karakteristika i prirode pora stacionarne faze. Gelovi koji se upotrebljavaju kao nosači stacionarne faze moraju biti hemijski inertni, mehanički stabilni sa česticama uniformne veličine i pažljivo formiranom poroznom strukturom.

Opseg razdvajanja je određen opsegom veličina pora u datom gelu. Širok opseg veličina pora daje prilično lošu rezoluciju, dok uzak opseg, iako daje poboljšanu rezoluciju, ima ograničenje u primeni. Hemijska stabilnost komercijalno dostupnih gelova je dobra, međutim nisu postojani u jako kiselim i jako baznim sredinama. U sistemima gde se primenjuju visoki pritisci, neophodno je da gelovi imaju dobru fizičku stabilnost. Dve vrste gelova se najčešće upotrebljavaju, a to su kserogelovi i aerogelovi. Kserogelovi su klasični gelovi, koji se sastoje od umreženih polimera koji nabubre u prisustvu rastvarača i na taj način nastaje porozna struktura, gde se pore nalaze između lanaca polimera u matriksu. Kada se ukloni rastvarač, gel u većini slučajeva biva uništen, mada u nekim slučajevima sa novim dodatkom rastvarača može biti obnovljen. S druge strane, aerogelovi su

rigidni materijali u čiju poroznu strukturu prodire rastvarač, ali ako se rastvarač ukloni materijal se neće uništiti. Primeri za ovu vrstu gelova su porozno staklo i porozna silika. Pored toga, postoji i kserogel-aerogel hibrid, čiji primer je polistiren. Oni predstavljaju kombinaciju osobina kserogelova i aerogelova, tj. imaju rigidnu strukturu, ali bubre u odgovarajućem rastvaraču u određenoj meri. Dakle, gelovi mogu biti hidrofilni za razdvajanje komponenata u vodenoj sredini ili u drugim polarnim rastvaračima, kao i hidrofobni, kada se razdvajanje odvija primenom nepolarnih ili slabo polarnih rastvarača. Agar, škrob, poliakrilamid, kao i polimeri dekstrani, sadrže hidroksilne ili amidne grupe i stoga su hidrofilni. Pomenuta jedinjenja nabubre u vodenoj sredini, kao i u rastvaračima kao što su etilen-glikol i dimetilformamid. Hidrofobni gelovi napravljeni su umrežavanjem polistirena sa divinil-benzenom i na taj način podsećaju na jonoizmenjivačke smole, ali bez jonskih grupa. Kao rezultat toga, mogu da adsorbuju relativno nepolarne rastvarače, kao što su tetrahidrofuran, benzen, hloroform i cikloheksanon. Gelovi na bazi dekstrana mogu postati hidrofobni primenom procesa acilacije ili alkilacije hidroksilnih grupa. Pomenutim procesom umrežavanja nastaje trodimenzionalna mreža koja čini gelove nerastvorljivim. Promenom stepena umrežavanja može se kontrolisati opseg veličina pora i na taj način se mogu dobiti gelovi koji će moći da razdvoje uzorke u različitim opsezima molekulskih masa. Pored navedenog, porozno staklo i silika-gelovi sa kontrolisanim veličinama pora su kruti i nekompresibilni i posebno su korisni u sistemima u kojima se mobilna faza kreće pod pritiskom, kao što je HPLC.

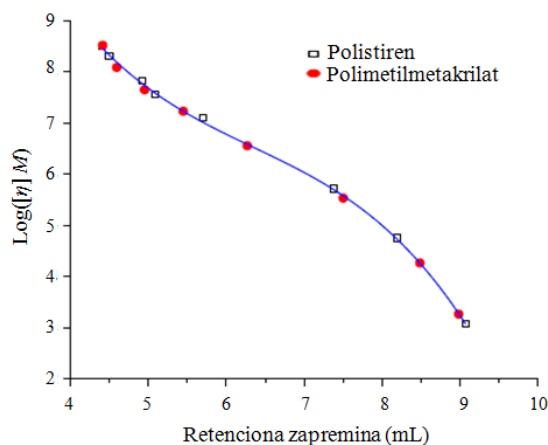
## **6.6. ODREĐIVANJE APSOLUTNE MOLEKULSKE MASE**

Prosečne vrednosti molekulskih masa i raspodele se najčešće dobijaju konstruisanjem kalibracionih krivih na osnovu standarda relativno uskih disperziteta (ili, povremeno, dobro okarakterisanih „širokih” standarda) i korišćenjem sistema koji se sastoje od jednog detektora, osetljivog na koncentraciju (najčešće diferencijalni refraktometar). U većini slučajeva,

standardi sadrže malo, ako ih ima, hemijskih i/ili strukturnih sličnosti sa samim analitima.

SEC sa detekcijom rasipanja svetlosti može se smatrati referentnim postupkom za dobijanje prosečnih vrednosti molekulskih masa i raspodele. Da bi se uporedili rezultati dobijeni primenom SEC sa detekcijom rasipanja svetlosti sa rezultatima SEC sa diferencijalni refraktometrom kao detektorom, primenjuje se metoda kalibracione krive.

Grubišić, Rempp i Benoit su prikazali kako se konstruiše kalibraciona kriva koja predstavlja zavisnost retencione zapremine od logaritma proizvoda unutrašnje viskoznosti i molekulske mase ( $V_r$  u odnosu na  $\log([\eta]M)$ ) (slika 6.8) koja je nezavisna od hemijskih osobina i strukture standarda. Tako da ako se konstruiše univerzalna kalibraciona kriva sa lako dostupnim, dobro okarakterisanim standardima kao što je linearni polistiren, onda se to može primeniti, pod istim eksperimentalnim uslovima kao što je korišćeno za dobijanje krive, na analite sa različitim hemijskim osobinama i/ili strukturom, kao što su razgranati polistireni, polimetilmetakrilati i dr. Velika prednost primene „univerzalne” kalibracije je bila u tome što su prosečne vrednosti molekulskih masa i raspodele dobijeni primenom ove krive „apsolutni”, odnosno nezavisni od standarda. Međutim, šira primena ove metode je morala da sačeka do uvođenja komercijalnog viskozimetra.



**Slika 6.8.** „Univerzalna” kalibraciona kriva za linearni polistiren i polimetilmetakrilat



Sa uvođenjem sistema koji sadrže oba detektora, diferencijalni refraktometar i viskozimetar, viskozimetar meri specifičnu viskoznost,  $\eta_{SP}$  a refraktometar meri koncentraciju,  $c$ . Unutrašnja viskoznost  $[\eta]$  definisana je jednačinom 6.12:

$$[\eta] \equiv \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{SP}}{c} \quad (6.12)$$

gde odnos signala dobijenog iz viskozimetra i refraktometra omogućava kontinualno merenje unutrašnje viskoznosti. Dostupnost robusnog, komercijalno dostupnog viskozimetra omogućila je implementaciju koncepta prethodno opisane „univerzalne” kalibracije i prema tome, određivanje apsolutnih prosečnih vrednosti molekulskih masa i raspodele širokog spektra polimera.

Ako imamo slučaj dva polimera sa istom monomernom jedinicom i sa istom molekulskom masom, npr. dva polistirena iste molekulske mase i ako je jedan polimer linearan, a drugi razgranat, razgranati polimer će zauzimati manju hidrodinamičku zapreminu u rastvoru u odnosu na linearni polimer. Shodno tome, unutrašnja viskoznost razgranatog polimera biće niža od viskoznosti linearnog polimera. Na taj način, određivanje unutrašnje viskoznosti daje ne samo apsolutne podatke o molekulskoj masi, već i kvalitativne, pa čak i kvantitativne podatke o razgranatosti polimera i o tome kako se ovaj parametar menja u funkciji molekulske mase, informacije koje obično nisu dostupne iz eksperimenata SEC koristeći samo jedan detektor osetljiv na koncentraciju. Koncept „univerzalne” kalibracije pokazao se prilično robusnim, sa nekoliko izuzetaka koji su ustanovljeni tokom godina. Čak se uspešno primenjuje i u slučajevima veoma složenih struktura, kao što su polimeri i dendrimeri. Ono što treba naglasiti je da „univerzalna” kalibraciona kriva važi samo za određenu kolonu ili set kolona, u određenom rastvaraču, na određenoj temperaturi i protoku. Ako se bilo koji od ovih parametara promeni, mora se konstruisati nova

„univerzalna” kalibraciona kriva za nove eksperimentalne uslove. Iako je viskozimetar veoma značajan detektor u SEC, sa pojavom detektora rasipanja svetlosti, konstrukcija i primena „univerzalnih” kalibracionih kriva se smanjila. Pomenuti detektor se zasniva na merenju rasutog zračenja pod određenim uglom od strane razblaženog rastvora polimera u odnosu na zračenje odbijeno od čistog rastvarača.

Povezivanjem SEC sa dva detektora, detektorom rasipanja svetlosti i diferencijalnim refraktometrom omogućava se određivanje različitih srednjih vrednosti molekulskih masa polimera, kao i raspodele molekulskih masa polimera, bez potrebe za konstruisanjem kalibracione krive. Međutim, primena detektora rasipanja svetlosti ima određene nedostatke koji se ogledaju u tome da se njegovom primenom ne dobijaju informacije o veličini molekula, kao i da je osetljiv na nečistoće od kojih se zračenje odbija. Ovo je dovelo do uvođenja detektora višeugaonog rasipanja svetlosti. Na ovaj način meri se rasuto zračenje, istovremeno iz većeg broja uglova, primenom fotodioda koje okružuju ćeliju detektora. Takođe, primenom ovog detektora se određuje i veličina molekula.

## LITERATURA

1. Braithwaite, A., Smith, F.J., *Chromatographic Methods*, peto izdanje, Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, 1996.
2. Fifield, F.W., Kealey, D., *Principles and Practice of Analytical Chemistry*, peto izdanje, Blackwell Science Ltd, Oxford, 2000.
3. Harvey, D., *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill Higher Education, USA, 2000.
4. <https://bitesizebio.com/29685/determine-molecular-weight-gel-filtration-chromatogram/> (pristupljeno 22. 01. 2020).
5. Kenkel, J., *Analytical Chemistry for Technicians*, treće izdanje, CRC Press LLC, Boca Raton, 2003.
6. Meunier, D.M., *Molecular Weight Determinations*, u: F. Settle (ur.) *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall, USA, 1997, str. 853–866.
7. Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R., *Principles of Instrumental Analysis*, Thomson Brooks/Cole, Belmont, 2007.
8. Striegel, A.M., *Size-exclusion chromatography*, u: S. Fanali, P.R. Haddad, C.F. Poole, M.-L. Riekkola (ur.), *Liquid Chromatography, Fundamentals and Instrumentation*, drugo izdanje, Elsevier, Amsterdam, 2017, 245–273.

---

# 7. AFINITETNA HROMATOGRAFIJA

---

- 7.1. Uvod
- 7.2. Osnovne komponente afinitetne hromatografije
- 7.3. Različiti tipovi afinitetne hromatografije
  - 7.3.1. Bioafinitetna hromatografija
  - 7.3.2. Imunoafinitetna hromatografija
  - 7.3.3. Boja-ligand i biomimetička afinitetna hromatografija
  - 7.3.4. Metal jon imobilisana afinitetna hromatografija
  - 7.3.5. Analitička afinitetna hromatografija
- 7.4. Primena afinitetne hromatografije

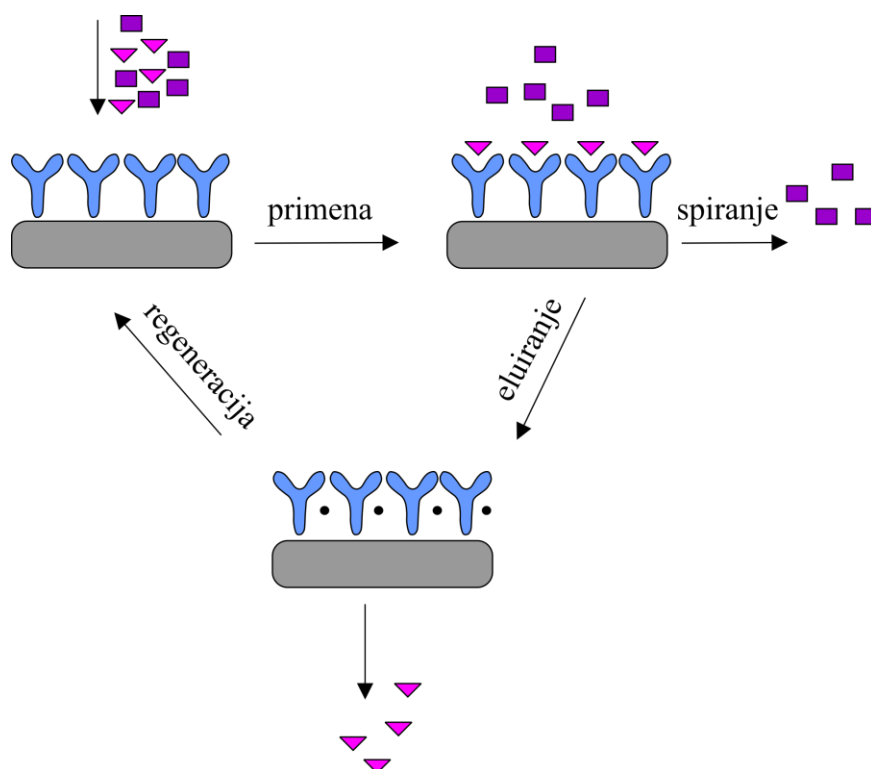
LITERATURA

---

## 7.1. UVOD

Hromatografska tehnika kod koje se biološki agens koristi kao stacionarna faza u koloni predstavlja AC. Mogućnost ove tehnike, da selektivno veže i razdvoji komponente uzorka, se zasniva na specifičnim i reverzibilnim interakcijama bioloških sistema, kao što je vezivanje hormona za receptor ili antitela za antigen.

Kako bi se razvila tehnika analize zasnovana na AC najpre je neophodno jednu od bioloških vrsta imobilisati na čvrstu podlogu, kao stacionarnu fazu, kao što su agarozne perle ili silikatne čestice. Imobilisani agens koji se naziva afinitetni ligand deluje kao stacionarna faza za afinitetnu kolonu. Drugo interagujuće jedinjenje se zatim injektuje na afinitetnu kolonu u prisustvu pufera koji omogućava da se ispitivano jedinjenje veže za odgovarajući ligand (slika 7.1).



Slika 7.1. Šematski prikaz opšteg principa AC analize

Nakon što se nezadržane komponente uzorka speru sa kolone, zadržani analit se eluira sa kolone odgovarajućim puferom. Ukoliko se zadržano jedinjenje vezalo slabom, ili srednjom jačinom, za ligand moguće je odgovarajući pufer iskoristiti za eluiranje ispitivanog jedinjenja pri izokratskim uslovima. Ovakav pristup se naziva i slaba AC. Kako se analizirano jedinjenje eluira, sakuplja se i dalje analizira odabranim *online* ili *offline* detektorom. Kolona se tada regeneriše ponovnom primenom pufera pre nego što se sledeći uzorak injektuje.

## 7.2. OSNOVNE KOMPONENTE AFINITETNE HROMATOGRAFIJE

Uspeh bilo kog AC razdvajanja zavisi od izbora liganda imobilisanog na koloni. Spisak uobičajenih liganada koji se koriste u AC je dat u tabeli 7.1.

Afinitetni ligandi se mogu podeliti u dve grupe: 1) visoko specifični ligandi i 2) opšti ligandi. Visoko specifični ligandi su vezujući agensi koji zadržavaju samo jedno ili nekoliko sličnih jedinjenja. Ovi ligandi se koriste kada je cilj izolovanje ili razdvajanje specifične komponente uzorka. Primeri visoko specifičnih liganada podrazumevaju antitela za vezujuće antigene, supstrate ili inhibitore za razdvajanje vezujućih enzima i jedan niz nukleinske kiseline za zadržavanje komplementarnih sekvenci DNK ili RNK. Opšti ligandi su vezujući agensi koji zadržavaju grupu strukturno sličnih molekula. Primeri opštih liganada su:

- Lektini i boronati za vezivanje agenasa sa ugljenim hidratima,
- Neke vrste boja za retenciju enzima i proteina i
- Proteini A ili G za vezivanje imunoglobulina.

Kada se planira AC analiza, jedan od najvažnijih koraka je odabir čvrste podloge koja se koristi za vezivanje liganda. Ovaj materijal treba da ima nisku specifičnost vezivanja za komponente uzorka, a u isto vreme da bude pogodan za modifikaciju, hemijsku aktivaciju i vezivanje liganda.

Takođe, treba da izdrži pritiske i brzine protoka koji će biti korišćeni pri razdvajanju.

**Tabela 7.1.** Odabrani ligandi koji se koriste u AC

Biološki ligandi	Ispitivana jedinjenja
Antitela	Antigeni (lekovi, hormoni, peptidi, proteini, virusi i ćelijske komponente)
Inhibitori, kofaktori i koenzimi	Enzimi
Lektini	Šećeri, glikoproteini i glikolipidi
Nukleinske kiseline	Delovi nukleinskih kiselina i proteini
Protein A/G	Antitela
Nebiološki ligandi	Ispitivana jedinjenja
Boronati	Šećeri, glikoproteini i jedinjenja koja sadrže diole
Triazidne boje	Proteini i enzimi koji vezuju nukleotide
Metal-jon helati	Aminokiseline, peptidi i proteini koji vezuju metalne jone

U tradicionalnim afinitetnim kolonama agarozna se često koristi kao stacionarna faza. Ovaj materijal se sastoji od polimernih lanaca koji čine D-galaktoza i 3,6-anhidro-L-galaktoza. Drugi tipičan polisaharid koji se koristi je celuloza. Kolone sa odabranim afinitetnim ligandima kao stacionarnim fazama se koriste i prilikom HPLC analize, što je rezultovalo novom tehnikom – AC visoke efikasnosti (eng. *High Performance Affinity Chromatography*, HPAC) ili tečnom AC visoke efikasnosti (eng. *High Performance Liquid Affinity Chromatography*, HPLAC). Stacionarne faze u HPLAC analizi podrazumevaju upotrebu silikatnih čestica, modifikovanih polistirena, silikatnih monolita i monolita na bazi organskih jedinjenja. Upotreba afinitetnih liganada sa monolitima je poznata kao afinitetna monolit hromatografija (eng. *Affinity Monolith Chromatography*, AMC).

Dostupno je nekoliko tehnika za vezivanje afinitetnog liganda na hromatografsku kolonu. Ove tehnike podrazumevaju i nekovalentne i nespecifične metode imobilizacije. Tehnike nespecifične imobilizacije podrazumevaju fizičku adsorpciju afinitetnog liganda. Biospecifična adsorpcija je oblik nekovalentne imobilizacije koja koristi vezivanje između dva afinitetna liganda, od kojih je jedan prethodno vezan za kolonu, a drugi je adsorbovan na prvi ligand i vezuje ispitivano jedinjenje. Primer ovakvog pristupa je upotreba imobilisanog A ili G proteina za adsorpciju antitela za pripremu imunoafinitetne kolone. Kovalentna imobilizacija podrazumeva hemijsko vezivanje liganda na hromatografsku kolonu. Kod ove tehnike materijal unutar kolone mora prvo biti aktiviran za vezivanje liganada. Nekoliko funkcionalnih grupa može biti iskorišćeno za kovalentnu imobilizaciju: amino, karboksilne, sulfhidril, hidroksilne ili aldehidne grupe. Drugi način za vezivanje afinitetnog liganda uključuje kulonske interakcije ili koordinacione komplekse, kao i zarobljavanje.

Pufer koji se koristi za afinitetnu kolonu treba da ima odgovarajuću pH-vrednost i jonsku jačinu da bi podržao vezivanje između imobilisanog liganda i ispitivanog jedinjenja. Mobilna faza je takođe pufer, ali koji sprečava vezivanje ispitivanog jedinjenja sa ligandom. Ovo eluiranje može biti ostvareno promenom pH-vrednosti, jonske jačine ili količine organskog rastvarača u mobilnoj fazi. Takav pristup, koji se naziva nespecifično eluiranje, se često koristi kod bioanalitičkih tehnika za brzo uklanjanje ispitivanog jedinjenja sa afinitetne kolone. Pored toga, konkurentni agens može biti dodat u mobilnu fazu da izmesti ispitivano jedinjenje iz kolone vezivanjem za ligand ili da spreči njihovu dalju interakciju. Ova tehnika se naziva biospecifično eluiranje. Iako je biospecifično eluiranje sporije nego nespecifično, korisno je kada je potrebno primeniti uklanjanje i afinitetno prečišćavanje odgovarajućeg jedinjenja bez ometanja drugih procesa u sistemu.

### 7.3. RAZLIČITI TIPOVI AFINITETNE HROMATOGRAFIJE

Danas 95% svih tehnika koje se baziraju na AC koriste agaroza-sefaroza nosač. U razvijenim tehnikama analize kao nosači su korišćeni polisaharidi, modifikovani polisaharidi, različiti oblici silicijuma i u manjoj meri polistiren.

#### 7.3.1. Bioafinitetna hromatografija

Bioafinitetna hromatografija (eng. *Bioaffinity Chromatography*, BAC) je hromatografska tehnika koja podrazumeva upotrebu biološkog agensa kao stacionarne faze. Prvi put je korišćena 1910. godine za prečišćavanje  $\alpha$ -amilaze korišćenjem nerastvornog skroba. BAC se sada uobičajeno koristi kao tehnika prečišćavanja brojnih jedinjenja. Zbog toga što se mnogi biološki agensi nalaze u prirodi, BAC je jedna od najraznovrsnijih tipova AC. Nekoliko primera bioloških agenasa koji se mogu koristiti kao ligandi kod BAC su dati u tabeli 7.1. Mnogi od ovih agenasa su komercijalno dostupni u imobilisanoj formi za upotrebu kod afinitetnih kolona.

Prečišćavanje enzima je bila prva primena BAC, međutim i danas se koristi u ove svrhe. Ligandi koji se koriste prilikom BAC analiza za prečišćavanje i razdvajanje enzima su enzimski inhibitori, koenzimi i lektini. Lektini su neimuni sistemski proteini koji se vezuju za specifične ugljovodonične grupe. Pored navedenih liganada, imunoglobulini su vezivni proteini koji se koriste u BAC. Nukleinske kiseline i polinukleotidi se takođe koriste kao vezivni agensi. Ova kombinacija predstavlja tehniku koji se naziva DNK afinitetna hromatografija.



### 7.3.2. Imunoafinitetna hromatografija

Imunoafinitetna hromatografija (eng. *Immunoaffinity Chromatography*, IAC) je specifičan tip BAC koja koristi antitela ili molekule povezane sa antitelima kao stacionarnu fazu. Kolone koje se koriste kod IAC imaju jako i selektivno vezivanje antitela i ispitivanih antigena. Ovo svojstvo, kao i mogućnost da produkuju antitela, u odnosu na širok dijapazon ispitivanih jedinjenja, su doveli do toga da IAC postane popularna tehnika za prečišćavanje i analizu uzoraka u različitim kompleksnim smešama.

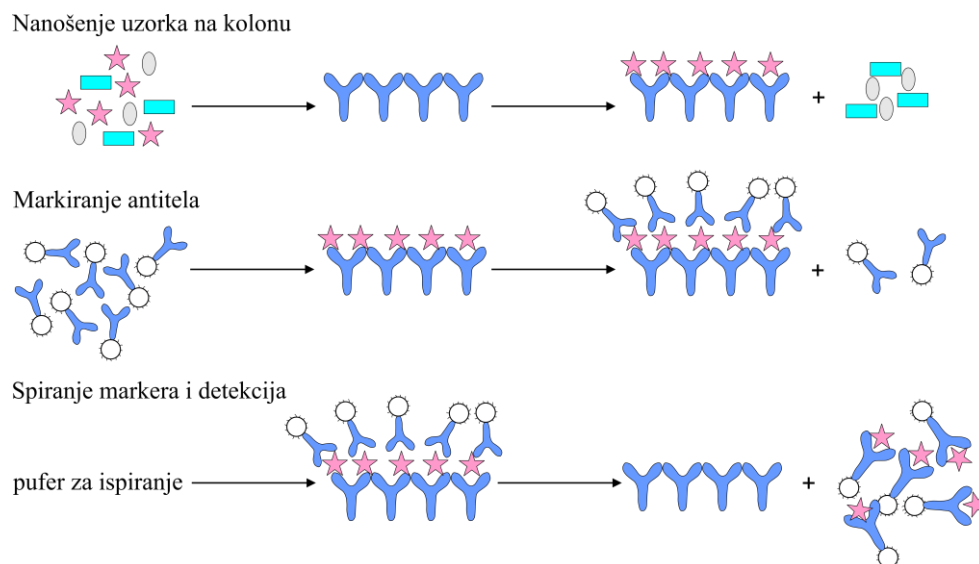
Najčešća tehnika koja se koristi kod IAC je *on/off* eluiranje (slika 7.1). U ovom slučaju uzorak se injektuje u kolonu pod takvim uslovima da ispitivano jedinjenje ima jak afinitet prema antitelima koja su imobilisana na koloni. Analit i slična jedinjenja se zadržavaju u koloni IAC pod ovim uslovima, dok se ostale komponente uzorka samo spiraju sa kolone. Spiranje ispitivanog jedinjenja sa kolone se postiže primenom odgovarajućeg pufera kao mobilne faze.

Proteini, glikoproteini, ugljeni hidrati, lipidi, bakterije, virusne čestice, droge i jedinjenja iz životne sredine su izolovani primenom IAC. Glavna prednost ovog pristupa je njegova brzina i jednostavnost, posebno kada je IAC deo HPLC sistema. Primena antitela, ili odgovarajućih agenasa, u koloni sa HPLC se naziva IAC visokih performansi (eng. *High Performance Immunoaffinity Chromatography*, HPIAC). Primena HPIAC ili IAC za selektivno uklanjanje i obogaćivanje ispitivanog jedinjenja iz uzorka se često naziva i imunoekstrakcija. Upotreba ovih tehnika za uklanjanje supstance koja ometa analizu naziva se imunodeplecija (npr. veliki protein koji ometa analizu tragova proteina).

Hromatografski imunoeseji predstavljaju još jednu vrstu IAC. Ova tehnika koristi imobilisana antitela ili antigene u koloni kako bi se sprovedi različiti kompetitivni ili nekompetitivni imunoeseji. Detekcija kod ovih tehnika podrazumeva upotrebu označenog antitela ili analita, ili pak označenog analoga, da bi se indirektno izmerila količina ispitivanog jedinjenja u uzorku (slika 7.2).

Detekcija u takvim esejima može biti zasnovana na merenju fluorescencije, hemiluminescencije, elektrohemijske aktivnosti, radioaktivnosti ili termičkih osobina.

Nekoliko formata je dostupno za kompetitivni imunoesej u IAC ili HPIAC. Simultano injektovanje podrazumeva injektovanje ispitivanog jedinjenja i označenog analoga u isto vreme na kolonu gde je imobilisano antitelo. Kod sekvencijalnog injektovanja prvo se injektuje uzorak, a zatim sledi injektovanje označenog analoga. Izmešteni imunoeseji podrazumevaju adsorpciju velike količine označenog analoga na koloni koja sadrži imobilisano antitelo, što je praćeno izmeštanjem izvesne količine analoga nakon injekcije uzorka.



**Slika 7.2.** Hromatografski imunoesej baziran na sendviču, ili dvostranom imunometrijskom formatu

Simultano i sekvencijalno injektovanje uzoraka, na imunoesej, je iskorišćeno za analizu ljudskog seruma albumina, IgG, teofilina, kafeina i antrazina. Imunoeseji sa izmeštanjem su iskorišćeni za analizu kokaina, benzoelgonina, di- i trinitrotoluena, kao i kortizola.

Nekompetitivni imunoeseji se takođe koriste prilikom IAC ili HPIAC analiza. Postoje dva osnovna tipa nekompetitivnih imunoeseja: 1) imunoeseji sa jednim mestom i 2) sendvič imunoeseji, ili imunoeseji sa dva

mesta. Imunoeseji sa jednim mestom podrazumevaju inkubiranje uzorka sa poznatim viškom označenog antitela koji je specifičan za ispitivano jedinjenje. Ova smeša se dalje unosi na kolonu koja sadrži imobilisani analog ispitivanog jedinjenja. Kolona se koristi da zarobi nevezanu količinu označenog antitela, dok u isto vreme dozvoljava antitelima da budu vezana za ispitivano jedinjenje i da prođu kroz kolonu bez zadržavanja. Ovaj tip analize se koristi kod merenja digoksina, tiroksina,  $17\beta$ -estradiola i albumina.

Sendvič imunoeseji podrazumevaju korišćenje dva antitela koja mogu simultano da budu vezana za isto jedinjenje. Jedno antitelo je imobilisano na IAC koloni i koristi se za ekstrakciju ispitivanog jedinjenja iz uzorka. Drugo antitelo je označeno za detekciju i ono je pomešano sa uzorkom pre analize ili je primenjeno na kolonu pre nego što je ispitivano jedinjenje vezano za IAC kolonu. Vezivanje ispitivanog jedinjenja za dva antitela formira sendvič kompleks kao što je to prikazano na slici 7.2. Nakon formiranja kompleksa, mobilna faza u vidu pufera se propušta kroz kolonu da disosuje ispitivano jedinjenje i označeno antitelo. Na osnovu merenja količine označenog antitela, koje je direktno proporcionalno količini ispitivanog jedinjenja, dobijaju se informacije o sadržaju uzorka. Sendvič imunoesej baziran na IAC se koristi za analizu albumina, IgG i paratiroidnih hormona.

### **7.3.3. Boja-ligand i biomimetička afinitetna hromatografija**

Sintetičke boje i hlorotiazid biomimetički ligandi se koriste u AC, pri prečišćavanju enzima i proteina. Boje i biomimetički ligandi su pogodni za imobilizaciju, jeftini su, stabilni i predstavljaju stacionarne faze sa velikim vezivnim kapacitetom. Navedena svojstva čine ove ligande interesantnim za razvijanje tehnika kojima se ispituju velike količine jedinjenja. Pored toga, koriste se za razvoj lekova baziranih na proteinima i za ispitivanje velikog broja proteina. Boja-liganad AC često koristi boje triazina za prečišćavanje albumina i ostalih krvnih proteina, kao i enzima i farmaceutskih proteina.

Da bi se povećala efikasnost boja-ligand prečišćavanja koristi se boja-ligand hromatografija zaštićena polimerom. Kod ove tehnike,

stacionarna faza se tretira vodorastvorljivim polimerom da bi se sprečile nespecifične interakcije između proteina i boja. Ova tehnika se često koristi za prečišćavanje enzima. Druge primene boja-ligand AC podrazumevaju, uklanjanje toksičnih makromolekula iz bioloških tečnosti kao što su prion, proteini, HIV virus i hepatitis B.

Takođe, postoje sve veći interesi za upotrebu kompjuterske i kombinatorne hemije kod tehnika poznatih kao biomimetička AC. Razvijanje novih tehnika na bazi AC, za prečišćavanja farmaceutskih proteina, se postiže poboljšanom interakcijom boja-ligand i ispitivano jedinjenje.

#### **7.3.4. Metal-jon imobilisana afinitetna hromatografija**

Metal-jon imobilisana afinitetna hromatografija (eng. *Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography*, IMAC) je takođe poznata i kao metal-helatna afinitetna hromatografija (eng. *Metal-Chelate Affinity Chromatography*, MCAC). Ova tehnika je predložena 1975. godine i zasnovana je na specifičnim interakcijama koje se odvijaju između imobilisanog metalnog jona i nekih aminokiselina, kao što su histidin, triptofan ili ostaci cisteina kod proteina ili peptida. IMAC analiza je postala veoma važna za prečišćavanje metaloproteina, proteina označenih histidinom i fosforilisanih proteina. Oblasti primene IMAC su: proteomika, rad sa rekombinantnim proteinima i dijagnostika bolesti.

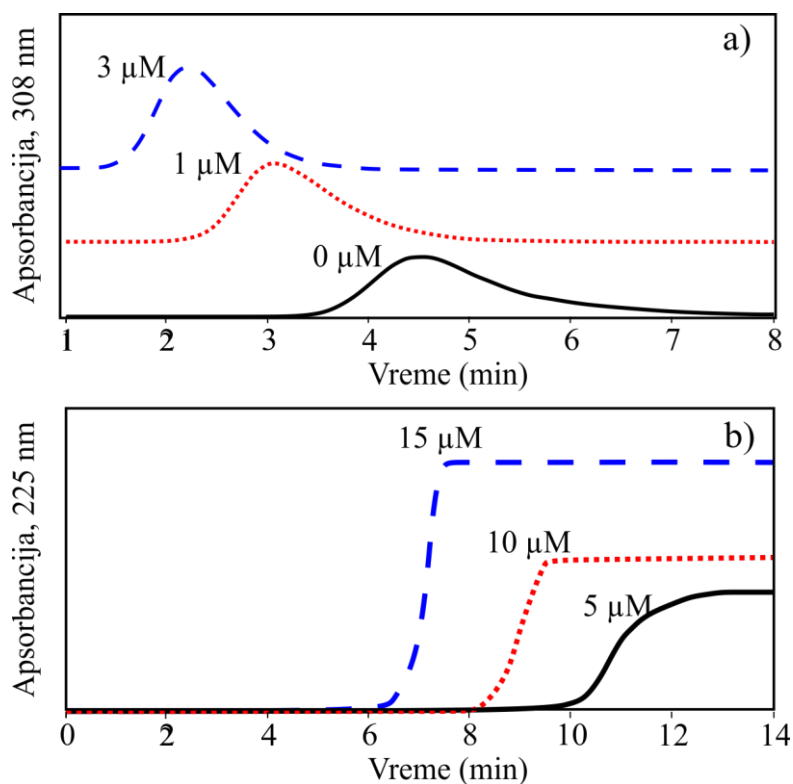
Stacionarna faza IMAC se sastoji iz imobilisanog helatnog liganda kompleksiranog sa metalnim jonom. Helatni ligand je kovalentno vezan za kolonu preko odgovarajućeg nosača i koristi se da zarobi metalni jon putem koordinacionih veza. Agaroza je iskorišćena kao prvi nosač kod IMAC pristupa, a trenutno se koriste nosači na bazi silicijuma, kriogelova, monolita silicijuma i polimetakrilata.

Teški metalni joni preferiraju vezivanje jedinjenja koja sadrže fosfor, alifatični azot i kiseonik, dok neki metalni joni vezuju jedinjenja sa sumporom.

### 7.3.5. Analitička afinitetna hromatografija

Termin analitička afinitetna hromatografija (eng. *Analytical Affinity Chromatography*, AAC) i kvantitativna afinitetna hromatografija (eng. *Quantitative Affinity Chromatography*, QAC) se odnosi na hromatografsku analizu primenom afinitetne kolone za dobijanje informacija o termodinamici, kinetici ili mehanizmu bioloških reakcija. Jedan pristup za ovaj tip istraživanja je zonsko eluiranje. Retenciono vreme i eluacioni profil ispitivanog jedinjenja se koriste za dobijanje informacija o interakciji između analita i liganda. Ova tehnika je prvi put korišćena 1973. godine za istraživanje reakcija laktat-sintetaze i stafilokok-nukleaze. Od tada je zonsko eluiranje iskorišćeno za ispitivanje enzim-inhibitor vezivanja, protein-protein interakcija, kao i lek-protein interakcija. Primena zonskog eluiranja podrazumeva poređenje relativnih afiniteta liganda karakterističnih za uzorke. Analiziranjem promena koje se dešavaju kao posledica različitih uslova reakcije (npr. promena pH-vrednosti i temperature) određuje se jačina interakcija uzorka i liganda, kao i broj i mesta na kojima je uzorak vezan za ligand.

Tokom AAC analize, primenom izmeštanja i kompetitivnog vezivanja (slika 7.3a), tačno određena koncentracija kompetitivnog agensa se unosi u mobilnu fazu. Retenciono vreme analita zavisi od koncentracije kompetitivnog agensa, sposobnosti analita i kompetitivnog agensa da se vežu za ligand i relativne količine aktivnog liganda koji je prisutan u koloni. Na ovaj način moguće je izmeriti ravnotežne konstante za ligand sa ispitivanim jedinjenjem i kompetitivnim agensom.



**Slika 7.3.** Tipičan hromatogram dobijen AAC tokom a) zonskog eluiranja albumina kompetitivnom tehnikom i b) frontalne analize glimeprama

Frontalna analiza, takođe poznata kao frontalna afinitetna hromatografija (eng. *Frontal Affinity Chromatography*, FAC), je još jedna tehnika koja se koristi kod AAC. U slučaju ove tehnike, rastvor koji sadrži poznatu koncentraciju ispitivanog jedinjenja se kontinualno unosi u afinitetnu kolonu. Kako imobilisani ligand postaje zasićen primenjenim ispitivanim jedinjenjem, dobija se kriva probijanja. Ovaj tip krive je prikazan na slici 7.3b. Količina supstance neophodna da se dostigne kriva probija je u vezi sa koncentracijom ispitivanog jedinjenja, brojem vezivnih mesta u koloni i ravnotežnim konstantama za interakcije između ispitivanog jedinjenja i liganda. Ova tehnika je prvi put korišćena za AC 1975. godine. Glavna prednost frontalne analize, u odnosu na zonsko eluiranje, je mogućnost istovremenog prikupljanja informacija o ravnotežnim konstantama za analit-ligand interakcije i kapacitet vezivanja kolone. Ipak, frontalna analiza zahteva veću količinu ispitivanog jedinjenja u odnosu na zonsko eluiranje.

Kako bi se dobile informacije o interakciji ispitivanog jedinjenja i liganda, razvijene su neke nove tehnike analize ili su modifikovane već postojeće. Pristupi koji su razvijeni za kinetičke studije podrazumevaju tehniku razdvojenog pika, fitovanog pika i analizu raspada pika. Ove tehnike su iskorišćene u analizi brzine: interakcije lekova sa proteinima, vezivanja lektina sa šećerima, interakcije između antitela i antigena ili antitela i proteina. AC se koristi za kinetičke i termodinamičke studije u oblasti hiralnih razdvajanja zasnovanih na enzimskim ili serumskim proteinima kao stacionarnim fazama.

#### 7.4. PRIMENA AFINITETNE HROMATOGRAFIJE

Pored do sada opisanih, mnoge druge tehnike su koristile AC za nova ili poboljšana razdvajanja ili analize. Primer je kombinovana upotreba afinitetnog liganda i kolone sa masenom spektrometrijom sa *online* ili *offline* metodama za kompleksne uzorke. Imunoafinitetne kolone su iskorišćene za predtretman uzoraka kod GC–MS i HPLC–MS analiza. AC može biti *online* kuplovana sa ESI dokle god eluacioni pufer sadrži samo isparljive soli, kao što su amonijum-acetat ili formijat. *Offline* analiza može biti izvedena korišćenjem afinitetne kolone za rad sa MALDI–TOF MS tehnikom za razdvajanje komponenata uzorka sakupljenih kao frakcije i kombinovane sa MALDI matricom. Masena spektrometrija zasnovana na brzom atomskom bombardovanju (eng. *Fast Atom-Bombardment Mass Spectrometry*, FAB MS) takođe može biti iskorišćena sa *online* ili *offline* AC.

Za afinitetnu ekstrakciju plazma antigena, kao predtretman MALDI–TOF MS analize, iskorišćene su nanočestice konjugovane sa antitelima. Eseji zasnovani na nanoprobama su iskorišćeni za robotski skrining malih molekula u serumu, pri čemu je analiza zasnovana na slabim interakcijama između šećera i proteina.

Afinitetne kolone su postale sastavni deo i miniuređaja, kao što su mikroredovi nukleinskih kiselina, proteinski redovi, redovi antitela i upotreba afinitetnih liganada u mikrofluidnim uređajima ili mikrokolonama za kapilarnu elektroforezu ili LC. Mikroredovi su do sada bili korisni u

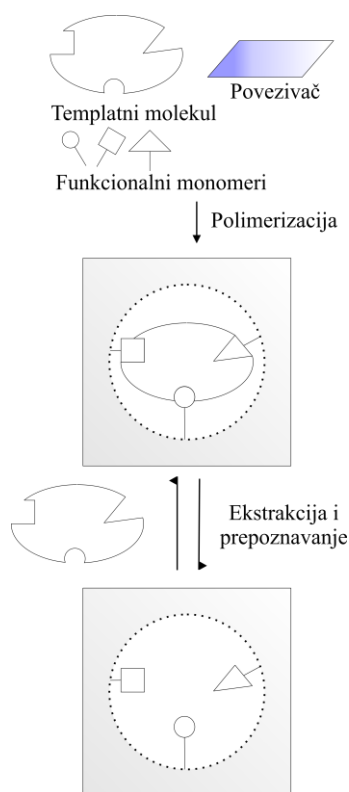
studijama genoma i proteinskih nizova. Ovi sistemi su iskorišćeni sa različitim metodama detekcije kao što su apsorbanacija, fluorescencija, hemiluminescencija, elektrohemijska detekcija i masena spektrometrija.

Još jedna oblast za koju raste interes je kreiranje sintetičkih liganada za afinitetne metode. Polimeri sa imprintovanim molekulima u sebi (eng. *Molecularly Imprinted Polymers*, MIPs) su iskorišćeni kao alternativa za upotrebu kod afinitetnog razdvajanja vezivnih esaja ili biosenzora. Vezivanje i mesta gde se odvija prepoznavanje su formirani tokom pripreme ovih polimera (slika 7.4). Tokom ovog procesa, funkcionalni polimeri formiraju komplekse sa templatom, što je uobičajeno ispitivano jedinjenje. Unakrsno vezivanje monomera kreira polimer ovog templata. Templat se zatim ekstrahuje ostavljajući za sobom samo vezivna mesta koja prepoznaju i zadržavaju ispitivano jedinjenje kada se primene na nosaču. Iako se MIP koriste kod AC, često se mogu koristiti i kod čvrstofazne ekstrakcije. Pored toga, MIP su iskorišćeni i kao mikroanalitički uređaji, kao što je čvrstofazna ekstrakcija riboflavina iz hrane i ekstrakcija hlorotiazid herbicida i njihovih metabolita iz uzoraka životne sredine.

Takođe, novi afinitetni ligandi su i nukleinske kiseline, vrlo selektivne za specifična jedinjenja. Aptameri su nastali razdvajanjem oligonukleotida koji se vezuju za željeno ispitivano jedinjenje iz velike količine nasumično izabranih jednostrukih DNK ili RNK. Ovi oligonukleotidi su zatim obogaćeni u procesu sistematske evolucije liganada eksponencijalnim obogaćivanjem (eng. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*, SELEX).

SELEX proces započinje imobilisanjem proteina ili drugog analita u koloni. Nasumično izabrani oligonukleotidi se zatim propuštaju kroz kolonu, nakon čega se eluiraju i pojačavaju. Dodatno obogaćivanje se odvija na novim kolonama, dokle god se ne dobije aptamer željene selektivnosti i jačine vezivanja. Aptameri su iskorišćeni u AC za prečišćavanje L-selektovanog imunoglobulina jajnih ćelija Kineskog hrčka i razmatraju se za primenu u farmaciji, hemijskoj analizi i biologiji ćelije.





**Slika 7.4.** Šema pripreme molekulske imprintovanog polimera

Aptameri se koriste u mikrofluidnim čipovima za afinitetnu ekstrakciju, razdvajanje i detekciju. Pored toga, aptameri su imobilisani sa monolitima i korišćeni u biosenzorima sa modifikovanim nanočesticama.

## LITERATURA

1. Affinity Chromatography Principles and Methods, Handbooks from GE Healthcare, [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/promo\\_NOT\\_INDEXED/General\\_Information/1/ge-affinity-chromatography.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/promo_NOT_INDEXED/General_Information/1/ge-affinity-chromatography.pdf) (pristupljeno 08. 01. 2020).
2. Bailon, P., Ehrlich, G.K., Fung, W-J., Berthold, W. (ur.), Affinity Chromatography Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, vol. 147, Humana Press, Totowa, New Jersey, United States, 2000.
3. Clonis, Y.D., Labrou, N.E., Kotsira, V., Mazitsos, K., Melissis, S., Gogolas, G., 2000. Biomimetic dyes as affinity chromatography tools in enzyme purification. Journal of Chromatography A 891, 33–44.
4. Firer, M.A., 2001. Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 49, 433–442.

5. Jackson, A., Karle, E.M., Hage, D.S., 2010. Preparation of high capacity supports containing protein G immobilized to porous silica. *Analytical Biochemistry* 406, 235–237.
6. Lowe, C.R., 2001. Combinatorial approaches to affinity chromatography. *Combinatorial Approaches to Affinity Chromatography* 5, 248–256.
7. Mallik, R., Hage, D.S., 2008. Development of an affinity silica monolith containing human serum albumin for chiral separations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 246, 820–830.
8. Ohlson, S., Lundblad, A., Zopf, D., 1988. Novel approach to affinity chromatography using “weak” monoclonal antibodies. *Analytical Biochemistry* 169, 204–208.
9. Pfaunmiller, E.L., Paulemond, M.L., Dupper, C.M., Hage, D.S., 2013. Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 20405, 2133–2145.
10. Pfaunmiller, E.L., Anguizola, J.A., Milanuk, M.L., Carter, N., Hage, D.S., 2016. Use of protein G microcolumns in chromatographic immunoassays: a comparison of competitive binding formats. *Journal of Chromatography B*, 1021, 91–100.
11. Xu, Y., Yang, X., Wang, E., 2010. Review: aptamers in microfluidic chips. *Analytica Chimica Acta* 683, 12–20.
12. Zachariou M, *Methods in Molecular Biology*, Zachariou, M. (ur.), *Affinity Chromatography: Methods and Protocols*, drugo izdanje, Humana Press, Totowa, New Jersey, United States, 2010, str. 1–330.
13. Zheng, X., Li, Z., Beeram, S., Matsuda, R., Pfaunmiller, E.L., Podariu, M., Matsuda, R., Pfaunmiller, E.L., White II, C.J., Carter, N., Hage, D.S., 2014. Analysis of biomolecular interactions using affinity microcolumns: a review. *Journal of Chromatography B* 968, 49–63.

---

# 8. PLANARNA HROMATOGRAFIJA

---

- 8.1. Uvod
- 8.2. Priprema i nanošenje uzorka
- 8.3. Papirna hromatografija
  - 8.3.1. Hromatografski papir
  - 8.3.2. Mobilna faza
- 8.4. Tankoslojna hromatografija (TLC)
  - 8.4.1. Stacionarna faza
  - 8.4.2. Mobilna faza
- 8.5. Razvijanje hromatograma
- 8.6. Detekcija i kvantitativna analiza
- 8.7. Poređenje TLC sa drugim tehnikama hromatografske analize

LITERATURA

---

## 8.1. UVOD

Planarna hromatografija je oblik tečne hromatografije kod koje je stacionarna faza planarna površina, a osim toga svi ostali hromatografski principi su isti kao kod do sada već opisanih hromatografskih tehnika. Kao što je spomenuto, postoje dva oblika planarna hromatografije, PC i TLC. Navedene dve tehnike se razlikuju samo u prirodi stacionarne faze. Kod PC stacionarna faza je papir odgovarajućeg kvaliteta zakačen za nosač, dok je kod TLC stacionarna faza odgovarajući adsorbens fiksiran na čvrstu podlogu.

Prednosti planarne hromatografije u odnosu na ostale hromatografske tehnike su jednostavnost, fleksibilnost i paralelna analiza velikog broja uzoraka. Nedostatak je nemogućnost potpune automatizacije procesa, osetljivost i tačnost kvantitativne analize koja je niža u poređenju sa drugim hromatografskim tehnikama.

## 8.2. PRIPREMA I NANOŠENJE UZORKA

Priprema uzoraka kod planarne hromatografije je identična za PC i TLC analizu. Najpre se uzorak, koji sadrži dovoljnu količinu supstance koja se analizira, rastvara u odgovarajućem rastvaraču (poželjno organskom sa niskom tačkom ključanja), nakon čega se nanosi kao tačka na označeno mesto na planarnoj površini. Za nanošenje uzorka na površinu koriste se mikropipete ili specijalne kapilare od platine i iridijuma.

Ukoliko je potrebno naneti više uzorka na površinu, pre svakog nanošenja uzorka potrebno je osušiti prethodno nanet uzorak. Postupak se ponavlja nekoliko puta, pri čemu se sušenje uzorka, tj. isparavanje rastvarača može ubrzati primenom različitih sušilica. Nanošenje uzorka je proces koji najduže traje u PC zbog čega se radi na njegovoj automatizaciji.

Prilikom analize bioloških materijala ili farmaceutskih preparata, koji sadrže ispitivane komponente u niskoj koncentraciji, jedan od koraka

pripreme uzorka jeste ekstrakcija i koncentrovanje uzorka. Za prečišćavanje i koncentrovanje uzoraka najčešće se koriste komercijalno dostupni kertridži ispunjeni različitim adsorbensima.

Kako bi se smanjila isparljivost analiziranih jedinjenja u uzorku, najčešće se primenjuje proces derivatizacije. Pored toga, derivat ima bolja hromatografska svojstva od polaznog jedinjenja. Kako se za detekciju ispitivanih komponenti često koristi UV spektrometar, cilj derivatizacije može biti i povećanje apsorpcije u UV oblasti ispitivanog jedinjenja. Međutim, pored navedenih prednosti derivatizacija se izvodi samo ako je neophodno, s obzirom da produžava vreme trajanja analize i zahteva pažljivo izvođenje kako ne bi došlo do gubitaka.

### **8.3. PAPIRNA HROMATOGRAFIJA**

Hromatografija na papiru je jedna od najstarijih tehnika razdvajanja i još uvek se koristi. Kao tehniku analize alkaloida prvi put je primenio ruski naučnik Tswett 1903. godine prilikom uspešnog odvajanja mešavine biljnih pigmenata, o čemu je bilo reči u uvodnom delu.

#### **8.3.1. Hromatografski papir**

Inicijalno se običan papir koristio prilikom analize uzoraka primenom papirne hromatografije, međutim sada postoje specijalni papiri za tu namenu. Papiri za papirnu hromatografiju se pripremaju od specijalno prečišćene celuloze sa 98–99%  $\alpha$ -celuloze, 0,3–1,0%  $\beta$ -celuloze, 0,4–0,8% pentosana i < 0,01% mineralnog pepela. Papiri sa navedenim sastavom predstavljaju visoko prečišćenu i reproduktivnu površinu sa odgovarajućom poroznom strukturom, debljinom i uređenjem celuloznih niti.

Uloga papira je mnogo kompleksnija i ne treba da se posmatra samo kao stacionarna faza. Glavni uticaj papira na razdvajanje se ogleda u protoku mobilne faze. Protok se povećava sa smanjenjem viskoznosti

mobilne faze i sa povećanjem temperature. Na fiksnoj temperaturi, protok mobilne faze se kontroliše gustinom i debljinom papira. Smanjenje gustine ili povećanje debljine papira povećava protok. Deblji papiri (do 3 mm debljine) su dobri za razdvajanje kompleksnijih smeša.

Hromatografski papiri se pored debljine, karakterišu i težinom po jedinici površine i indeksom protoka. Na osnovu navedenog, papiri se klasifikuju kao spori, standardni ili brzi, što odgovara stepenu grubosti i gustini celuloznih niti. Standardni papiri su najbolji kompromis između rezolucije i vremena neophodnog za razvijanje hromatograma.

Površina papira može biti modifikovana adsorpcijom komponenata mobilne faze ili hemijskim tretmanima (npr. acilacijom). Najčešći impregnirajući reagensi koji se koriste za poboljšanje efikasnosti hromatografskog razdvajanja su:

- Silikonska ulja za reverzno-fazna razdvajanja,
- Adsorbensi (npr. silika-gel i aluminijum) i
- Tečni jonski izmenjivači.

Proces izbeljivanja, koji se koristi tokom proizvodnje papira, povećava broj karboksilnih grupa u celulozi. Ove blago kisele grupe utiču na slaba jonoizmenjivačka svojstva papira i doprinose boljem razdvajanju. Hemijski modifikovani papiri se pripremaju uglavnom od jonoizmenjivačkih celuloza kao što su karboksimetil- i dietilaminoetil-celuloza.

Hromatografski papiri treba da se čuvaju tako da ne dođu u kontakt sa reagensima iz okoline (npr. amonijak se vezuje za celulozu i utiče na proces razdvajanja).

### 8.3.2. Mobilna faza

Izbor mobilne faze je empirijske prirode. Međutim, na osnovu literaturnih podataka olakšava se odabir odgovarajuće mobilne faze. Uobičajena mobilna faza je smeša koja se sastoji od organske komponente, vode i organskih aditiva, kao što su kiseline, baze i kompleksirajući agensi za modifikaciju rastvorljivosti komponenata uzorka. Odabir mobilne faze može biti ilustrovan sledećim primerom. Polarne organske supstance koje su rastvorljive u vodi više nego u organskim rastvaračima pokazuju vrlo slabu migraciju ukoliko se koristi anhidrovana mobilna faza. Međutim, dodavanje vode mobilnoj fazi doprinosi rastvorljivosti komponenata uzorka, pri čemu se one pomeraju duž papira. Takođe, dodatak sirćetne kiseline u značajnoj meri može da poveća efikasnost razdvajanja komponenata uzorka.

U tabeli 8.1 je dat prikaz najčešće korišćenih rastvarača u PC.

**Tabela 8.1.** Najčešće korišćeni rastvarači u PC

Polarni	Nepolarni
Voda	Fenol
Formamid	<i>n</i> -butanol
Metanol	<i>n</i> -amil-alkohol
Dimetil-sulfoksid	Etil-acetat
Sirćetna kiselina	Dietil etar
Acetonitril	<i>n</i> -butil-acetat
Dimetil-formamid	Hloroform
Etanol	Benzen
Izopropanol	Toluen
Aceton	Cikloheksan
1-propanol	Petrol-etar
2-metilpropan-2-ol	Parafinsko ulje

U kategoriji sistema rastvarača sa stacionarnom vodenom fazom (celuloza za koju je vezana voda), najpopularnija je butanol-sirćetna kiselina-voda (4:1:5), za razdvajanje hidrofilnih supstanci. Ovaj i drugi dvofazni sistemi se pripremaju tako da se komponente zajedno pomešaju u komori za razdvajanje. Obe faze se koriste za zasićenje atmosfere unutar komore, a manje hidrofilna faza služi za razvijanje hromatograma.

Formamid se koristi u kombinaciji sa organskim rastvaračima, kao što su hloroform i toluen za razdvajanje umereno polarnih supstanci. Pre same analize, hromatografski papir se impregnira formamidom u etanolu ili acetonu, u koji se mogu dodati amonijum-formijat ili mravlja kiselina za zakišeljavanje stacionarne faze. Nakon impregnacije hartija se ostavi da visi u vazduhu sve dok rastvarač ne ispari. Hromatogrami se razvijaju sa pogodnim mobilnim fazama, kao što su hloroform, benzen, cikloheksan ili njihove mešavine. Prednosti ove vrste analize u odnosu na vodene sisteme su: širi opseg polarnosti jedinjenja koja se analiziraju, veća efikasnost razdvajanja i pojava obojenih koncentracionih zona ispitivanih jedinjenja, tzv. mrlja, odmah nakon razvijanja hromatograma.

U sistemima sa reverznom fazom, hidrofobni rastvarač ostaje fiksiran na papiru, a hidrofilna pokretna faza prelazi preko njega. Impregnacija može da se primeni na sličan način kako je već opisano. Kerozin ili parafinsko ulje mogu služiti kao stacionarna faza, dok se vodeni alkoholi koriste kao mobilna faza.

#### **8.4. TANKOSLOJNA HROMATOGRAFIJA (TLC)**

Upotreba celuloze kao stacionarne faze kod PC ograničava mogućnosti primene ove tehnike. TLC tehniku su primenili Izmailov i Shraiber još 1938. godine, a prvi put je opisana od strane Kirchner-a i dr. 1951. godine na način na koji se i danas izvodi. Međutim, tehnika je postala popularna tek pošto je Stahl objavio knjigu iz ove oblasti 1962. godine u kojoj je opisao komercijalni uređaj za nanošenje tankog sloja stacionarne faze. Koraci kod TLC analize su:

- Odabir odgovarajuće stacionarne faze,



- Nanošenje uzorka,
- Odabir mobilne faze,
- Razvijanje hromatograma,
- Vizuelizacija i
- Detekcija i kvantifikacija.

#### **8.4.1. Stacionarna faza**

Sastav i stanje stacionarne faze su naznačajniji faktori prilikom TLC analize. Adsorbensi fiksirani na nosaču mogu biti organske ili neorganske prirode. Pored toga adsorbensi se mogu podeliti i prema načinu vezivanja koji preovladava tokom hromatografskog razdvajanja. U tom slučaju postoje adsorbensi pogodni za:

- Adsorpcionu hromatografiju,
- Porenu hromatografiju,
- Jonoizmenjivačku hromatografiju i
- Gel hromatografiju.

Veličina i oblik čestica stacionarne faze mogu značajno da utiču na efikasnost razdvajanja tokom hromatografske analize. Najčešće korišćen adsorbens u TLC je silika-gel. Na tržištu se silika-gel može naći:

- Bez dodataka,
- Sa dodacima veziva,
- Sa fluorescentnim indikatorom i
- Silika-gel visokog stepena čistoće i dr.

Nakon silika-gela, celuloza je najčešće korišćen adsorbens. Svojstva celuloze kod TLC su analogna svojstvima celuloze kod PC. Najčešća razlika je u dužini vlakna, koja su kraća kod TLC. Pored navedenih koriste se još i aluminijum, kalcijum-sulfat, magnezijum-silikat, hidroksiapatit,

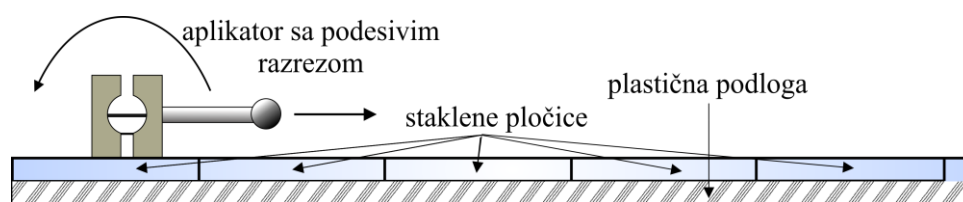
ugalj kao neorganski adsorbens i u kategoriji organskih adsorbenasa su poliamidi, porozni polimer i alginska kiselina.

Obične staklene pločice, kvarcne cevi i transparentne plastike (u UV oblasti) su najpopularniji nosači stacionarne faze.

Vezivne komponente su neophodne za pripremu stabilnih slojeva stacionarne faze. Međutim, prilikom izbora veziva mora se obratiti pažnja da izabrano vezivo ne utiče na proces razdvajanja i dužinu trajanja analize. Gips i različiti polimeri (polivinil-alkohol, polimetakrilat i poliolefin) su najčešće korišćeni prilikom procesa vezivanja stacionarne faze za nosač. Samo mali broj silika-gelova i nekoliko vrsta celuloze ne zahtevaju upotrebu vezivnih supstanci.

Vezivne komponente se pomešaju sa adsorbensom u odgovarajućem rastvaraču. Nakon pripreme homogene smeše nanose se na odgovarajući nosač. Odnos adsorbens – rastvarač (najčešće voda) je određen od strane proizvođača. Ukoliko se kao vezivo koristi gips, nakon dodatka vode, sloj mora da se nanese na nosač u roku od 60 s.

Najčešća tehnika pripreme stacionarne faze je razmazivanje smeše adsorbensa i veziva na nosač, mada može da se primeni i tehnika umakanja nosača u smešu ili tehnika raspršivanja. Stacionarna faza se nanosi u slojevima, pri čemu se slojevi moraju sušiti pre svakog nanošenja. Princip rada komercijalnog instrumenta, za nanošenje slojeva stacionarne faze na nosač, je prikazan na slici 8.1.



**Slika 8.1.** Skica uređaja za nanošenje stacionarne faze na nosač kod TLC

Slično kao kod PC, moguća je impregnacija ploča, tako što se prskaju ili potapaju u rastvor odgovarajućeg sredstva. Takođe, mogu da se urone donjim krajem u rastvor, pri čemu se impregnirajuće sredstvo kapilarnim silama upija do vrha ploče. Nakon impregnacije ploče se suše i kondicioniraju.

Prednost komercijalno dostupnih ploča za TLC je garantovan sastav i uniformnost od strane proizvođača. Dostupne su ploče na staklu, plastici i fleksibilnoj aluminijumskoj foliji. Staklene ploče su inertne i sa njima se lako rukuje. Plastične i aluminijumske ploče i folije se ne mogu slomiti, lagane su i najčešće su najjeftinije rešenje zbog toga što mogu biti proizvedene i u rolnama, pa se mogu seći u željenim dimenzijama. Međutim, neki rastvarači interaguju sa plastičnim slojevima, te zbog toga treba biti obazriv prilikom njihove primene.

#### **8.4.2. Mobilna faza**

Izbor mobilne faze kod TLC zavisi od stacionarne faze i analogan je izboru rastvarača kod papirne ili kolonske hromatografije.

Ukoliko se najčešće korišćeni rastvarači iz tabele 8.1 klasifikuju na osnovu njihove sposobnosti formiranja vodoničnih veza vidimo da se na početku ove serije nalaze rastvarači koji su ili donori ili akceptori elektronskih parova, pri čemu imaju mogućnost formiranja međumolekulskih vodoničnih veza (hidrofilni ili polarni rastvarači). Na kraju serije su hidrofobni, lipofilni ili nepolarni rastvarači. Između navedenih graničnih vrednosti, postoji kontinualni prelaz formiran od strane rastvarača srednje polarnosti. Rastvarači do 2-metilpropan-2-ola se mešaju sa vodom u svim odnosima, dok ostali formiraju dva sloja sa vodom. U većini slučajeva je neophodno odabrati višekomponentnu mobilnu fazu za rad.

Pored osobina rastvarača, od izuzetnog značaja za hromatografsku analizu je i pH-vrednost kako mobilne, tako i stacionarne faze.

#### **8.5. RAZVIJANJE HROMATOGRAMA**

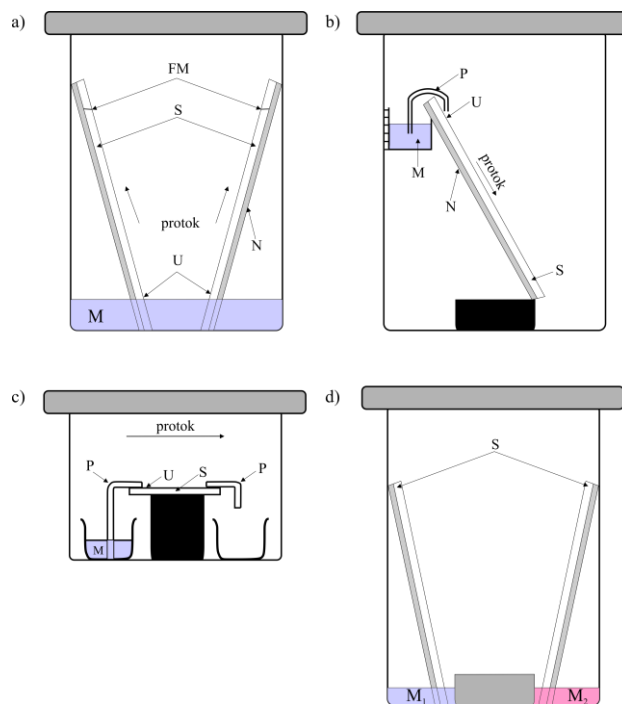
Sledeći korak u PC analizi je izbor komore u kojoj se razvija hromatogram (najčešće staklene, sa poklopcem koji se dobro zatvara). Tokom hromatografskog razdvajanja, komora u kojoj se odvija proces mora da

bude zaštićena od promene temperature, a atmosfera treba bude zasićena parama primenjenog rastvarača.

U zavisnosti od primenjene komore postoje sledeće tehnike analize (slika 8.2a-c):

- Uzlazna,
- Silazna i
- Horizontalna (radijalna).

Najčešće se koristi uzlazna tehnika, u staklenoj komori (slika 8.2a). Mobilna faza pokriva dno komore, ali tako da ne dotiče mesto nanošenja uzorka, pri čemu prolazi kroz stacionarnu fazu zahvaljujući kapilarnim silama noseći sa sobom komponente uzorka u pravcu protoka.

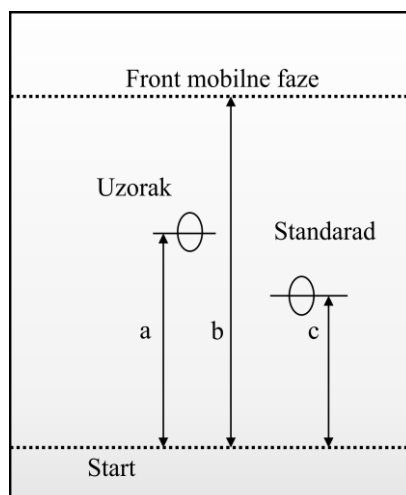


**Slika 8.2.** Četiri tipa aparature za TLC a) uzlazna, b) silazna, c) horizontalna i d) sa dva različita rastvarača. U – početna pozicija uzorka; M – mobilna faza; FM – front mobilne faze; S – stacionarna faza; N – nosač stacionarne faze; P – pamučna gaza

Hromatogram se može razvijati na više načina:

- Sa istim rastvaračem (više puta),
- Sa različitim rastvaračima (razdvajanje jedinjenja koja se razlikuju po svojim osobinama, slika 8.2d) i
- Sa dva rastvarača u istom ili u dva pravca (dvodimenzionalna hromatografska tehnika).

Nakon što rastvarač dostigne odgovarajuću visinu (front rastvarača), hromatografski papir/ploča se uklanja iz posude i suši. Razdvojene komponente su locirane na planarnoj površini, pri čemu se njihov položaj opisuje preko  $R_f$ -vrednosti (slika 8.3, jednačine 8.1 i 8.2).



**Slika 8.3.** Šematski izgled hromatografskog papira ili razvijene ploče s tankim slojem adsorbensa na koju su naneti nepoznati uzorak i poznati standard

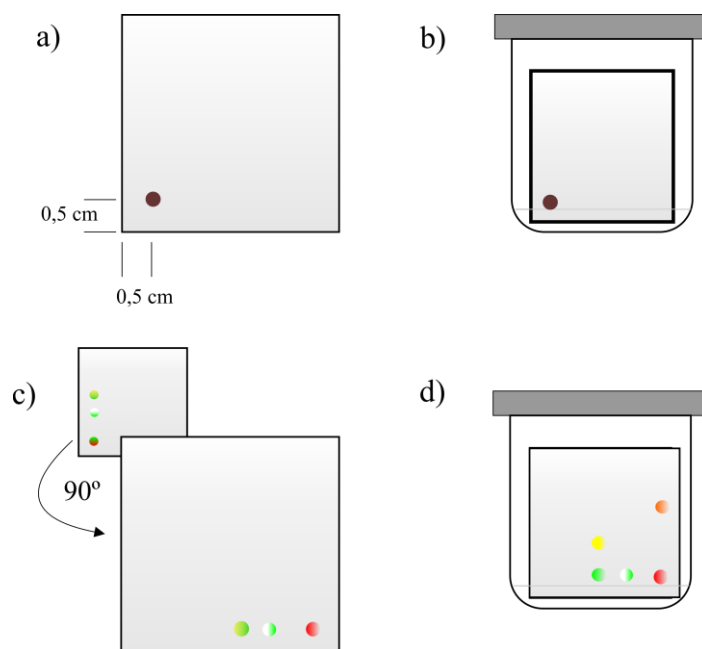
$R_f$ -vrednost je proporcionalna vremenu zadržavanja ispitivanih jedinjenja, a obrnuto proporcionalna frontu rastvarača (jednačina 8.1):

$$R_f = \frac{\text{rastojanje ispitivanog jedinjenja}}{\text{rastojanje mobilne faze}} \times 100 = \frac{a}{b} \times 100 \quad (8.1)$$

Kod PC se eksperimentalni uslovi teško mogu ponoviti, tako da poređenje  $R_f$ -vrednosti nije pouzdano. U skladu sa tim, pored uzorka se na planarnu površinu nanosi i unutrašnji standard ( $R_{us}$ ) i sve  $R_f$ -vrednosti se porede s njim (jednačina 8.2):

$$R_{us} = \frac{\text{rastojanje ispitivanog jedinjenja}}{\text{rastojanje standarda}} \times 100 = \frac{a}{c} \times 100 \quad (8.2)$$

Dvodimenzionalna PC analiza se koristi kod supstanci sa bliskim  $R_f$ -vrednostima (komponente koje se nisu prvobitno razdvojile). Kad se završi razdvajanje u jednom pravcu, papir ili pločica se osuše, okrenu tako da protok (najčešće drugog rastvarača) bude normalan na pravac kretanja prvog rastvarača (slika 8.4).



**Slika 8.4.** Dvodimenzionalna PC

## 8.6. DETEKCIJA I KVANTITATIVNA ANALIZA

Ukoliko su ispitivana jedinjenja obojena, njihove zone se lako mogu obeležiti i izračunati  $R_f$ -vrednosti. Međutim, ukoliko su jedinjenja bezbojna neophodno je primeniti fizičke, hemijske ili biološke metode za određivanje položaja mrlja. Za bojenje mrlja koriste se različite hemijske supstance koje se pomoću raspršivača nanose na ploču. Veoma je važno istaći da se mrlje moraju odmah obeležiti, s obzirom da mogu izbledeti ili čak potpuno nestati nakon izvesnog vremena.

Fizičke metode izazivanja hromatografskih mrlja podrazumevaju apsorpciju vidljive ili UV svetlosti. Veliki broj organskih jedinjenja apsorbuje zračenje na 254 nm, pri čemu se mrlje, koje potiču od ispitivanih komponenata uzorka, pojavljuju na osvetljenoj površini. Neka jedinjenja mogu da ispolje fluorescenciju, nakon hlađenja ili zagrevanja na vrlo niskim/visokim temperaturama.

Prilikom hemijskih metoda vizualizacije reagens se najčešće nanosi raspršivanjem, izlaganjem hromatograma parama ili potapanjem u rastvor. U zavisnosti od reakcije supstanci sa reagensom, metode hemijske detekcije formiraju crne, obojene ili fluorescentne zone na hromatogramu (tabela 8.2). Nakon primene reagensa hromatogram se obavezno suši, nakon čega se mrlje obeležavaju. Najčešće se kao reagensi koriste sumporna kiselina koja većinu organskih supstanci oksiduje i nakon zagrevanja ploče, zone se detektuju kao tamne mrlje. Ninhidrin se koristi za određivanje aminokiselina i amina, dok se pare joda primenjuju u analizi organskih jedinjenja (formiraju komplekse žute do braon boje).

Mrlje ispitivanih jedinjenja su kružnog ili ovalnog oblika, u idealnom slučaju. Međutim, mrlja je najčešće deformisanog oblika sa tzv. repovima. Uzroci ovih deformiteta nisu poznati, međutim hromatogram se može iskoristiti i u ovakvim slučajevima, ukoliko se obezbedi odgovarajuća razdvojenost komponenti.

**Tabela 8.2.** Selektivni reagensi u spreju

Reagens	Boja mrlje	Primena
Pare joda	Braon	Nezasićena organska jedinjenja
2,7-dihlorfluorescein	Žuto-zelena ispod UV svetlosti na 254 nm	Veliki broj organskih jedinjenja
0,1–0,5% bromkrezol zeleno	Žuta	Karboksilne kiseline
50% SbCl <sub>3</sub> u CH <sub>3</sub> COOH	Različite boje	Steroidi, karotenoidi, aliciklični vitamin
0,3% ninhidrin u 1-butanolu sa 3% CH <sub>3</sub> COOH	Roze-ljubičasta	Aminokiseline

PC se prvobitno smatrala kvalitativnom tehnikom, međutim prepoznate su i njene mogućnosti primene u kvantitativnoj analizi. Kirchner i dr. su još 1954. godine opisali ovu tehniku kao kvantitativnu, prilikom određivanja bifenila u citrusnim voćnim proizvodima.

Za razliku od tehnika na kolonama, gde se kvantitativna određivanja odvijaju van hromatografskog sistema, kod PC analize se odvijaju *in situ*. *In situ* metode koriste relaciju između koncentracije i površine, dužine, intenziteta boje, fluorescencije i UV apsorpcije mrlja na hromatogramu. Najjednostavnije je vizuelno poređenje mrlje koja potiče od uzorka sa mrljama od serije standardnih rastvora poznatih koncentracija. Navedena procedura podrazumeva semikvantitativnu analizu. Dok se za kvantitativnu analizu navedeni parametri mrlje procenjuju denzitometrom ili nekim drugim savremenim tehnikama. Kod TLC analize koriste se metode skidanja mrlja, nakon čega se analiza nastavlja drugom tehnikom. Prilikom spektrofotometrijske analize, može doći do rasipanja svetlost i snižavanja



tačnosti određivanja, ukoliko se najfinije čestice adsorbensa pojave u uzorku nakon spiranja ispitivanog jedinjenja u eluat.

### **8.7. POREĐENJE TLC SA DRUGIM TEHNIKAMA HROMATOGRAFSKE ANALIZE**

Moderne tehnike TLC analize potiču iz sedamdesetih godina, nakon komercijalnog uvođenja čestica optimizovanih za brzo i efikasno razdvajanje. Ova verzija TLC se često opisuje kao tankoslojna hromatografija visokih performansi (eng. *High Performance Thinlayer Chromatography*, HPTLC). Termin HPTLC je najpre iskorišćen prilikom primene čestica dimenzija 5  $\mu\text{m}$  u centrifugalnoj TLC analizi, ali se danas koristi za bilo koju TLC tehniku koja kombinuje najmodernije tehnike. HPTLC je prvenstveno rezultat čitavog niza poboljšanja u mnogim aspektima operacija koje čine TLC, pre nego što je to specijalan napredak u oblasti razvoja instrumenata. Konvencionalna TLC i HPTLC su upoređene u tabeli 8.3.

Male dimenzije i uniformna priroda čestica kod HPTLC dovode do veće hromatografske efikasnosti u odnosu na TLC. Pored toga, primenom HPTLC moguće je izvršiti i razdvajanje koje inače nije moguće postići uobičajenom TLC analizom. Iako je brzina mobilne faze niža kod HPTLC, zahtevaju se manje dužine migracija kako bi se dobila ekvivalentna razdvajanja. Tipične dužine migracija kod HPTLC analiza su od 3 do 6 cm, dok su kod TLC te vrednosti od 10 do 15 cm. Vremena razvijanja hromatograma su kod TLC analize za red veličine viša. Granice detekcije su kod HPTLC deset puta niže nego kod konvencionalne TLC analize. Kod HPTLC analize razvoj i snimanje hromatograma su automatizovani. Dimenzije uzorka treba da su što manje ( $< 1,5 \text{ mm}$ ), da bi se postigla optimalna rezolucija i osetljivost.

Kao zaključak, može se reći da je TLC analiza jeftinija. To se prvenstveno odnosi na konvencionalne TLC analize, gde je potreban samo

nosač sa stacionarnom fazom, mobilna faza i pogodna komora za razvoj hromatograma. Analiza hromatograma se postiže vizuelno, nakon primene odgovarajućih reagenasa. U navedenom obliku TLC analiza je jednostavna i robusna tehnika koja može da se iskoristi za analizu širokog spektra jedinjenja. Međutim, TLC tehnika se navodi kao tehnika loše rezolucije i osetljivosti, koja je semikvantitativna. Nasuprot tome, HPTLC analiza zahteva denzitometar i automatizovano nanošenje uzorka, ali je osetljivost analize bolja.

**Tabela 8.3.** Poređenje odabranih parametara kod TLC i HPTLC

Parametar	TLC	HPTLC
Dimenzije nosača (cm)	20×20; 10×20	10×10; 20×10
Debljina (µm)	100–250	100–250
Veličina čestica (µm)	20	5–15
Raspodela	10–60	uska
Broj teorijskih platoa	< 600	< 5000
Visina (µm)	30–60	2–20
Broj razdvajanja	7–10	10–20
Zapremina uzorka (µL)	1–5	0,01–0,2
Prečnik početnih tačaka uzorka (mm)	3–6	1,0–1,5
Prečnik mrlje (mm)	6–15	2–6
Dužina fronta rastvarača (cm)	10–15	3–6
Vreme razvijanja (min)	30–200	3–20
Broj uzoraka na ploči	10	18–36

Mehanizmi razdvajanja u slučaju TLC i HPLC su u osnovi isti. Međutim, kod HPLC su stacionarna i mobilna faza obično u ravnoteži pre uvođenja uzorka u kolonu, dok se kod TLC mobilna faza susreće sa suvim slojem stacionarne faze na početku razdvajanja. Kod TLC analize, protok mobilne faze je rezultat kapilarnih sila i ne može biti kontrolisan, kao što je to slučaj sa HPLC analizom. Jedna od najvažnijih razlika u odnosu na tehnike koje koriste kolone za razdvajanje je u prirodi razdvajanja. Tehnike

sa kolonama su vremenski ograničene, dok kod TLC postoji prostorno ograničenje. Kod HPLC analize, sve komponente prelaze iste dužine ali za različito vreme, dok kod TLC komponente prelaze različite dužine (prostorno su razdvojene) za isto vreme trajanja analize.

Iako TLC analiza nema mogućnost primene poput HPLC ili GC analiza, postoje slučajevi gde se koristi kao adekvatna alternativa.

## LITERATURA

1. Berezkin, V.G., 2008. Development of nontraditional planar-chromatographic methods, *Journal of Planar Chromatography* 21, 325–329.
2. Berezkin, V.G., Khrebtova, S.S., 2013. Thin-layer chromatographic chamber with small and zero gas volume, *Journal of Planar Chromatography* 26, 386–394.
3. Devi, S.U., Latha, E.P., Guptha, C.V.N.K., Ramalingam, P., 2011. Development and validation of HPTLC method for estimation of ziprasidone hydrochloride in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Journal of Analytical Chemistry* 1:2, 41-46.
4. Dzido, T.H., 2001. Effect of temperature on the retention of aromatic hydrocarbons with polar groups in binary reversed-phase TLC, *Journal of Planar Chromatography* 14, 237–254.
5. Gocan, S., 2002. Stationary phases for thin-layer chromatography, *Journal of Chromatographic Science* 40, 538–549.
6. <http://namrataheda.blogspot.com/2016/12/chromatography-paper-chromatography.html> (pristupljeno 10. 01. 2020).
7. <https://timesonline.education/2018/10/26/planar-chromatography/> (pristupljeno 10. 01. 2020).
8. [https://www.chemistryviews.org/details/education/2345141/Tips\\_and\\_Tricks\\_for\\_the\\_Lab\\_Column\\_Troubleshooting\\_and\\_Alternatives.html](https://www.chemistryviews.org/details/education/2345141/Tips_and_Tricks_for_the_Lab_Column_Troubleshooting_and_Alternatives.html) (pristupljeno 10. 01. 2020).
9. Kalász, H., Mincsovics, E., Ram, N., Kuca, K., 2010. Thin-layer chromatography of pyridinium aldoximes using distinct techniques for development, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 33, 922–935.
10. Kirchner, G., Miller, M., Keller, G., 1951. Separation and identification of some terpenes by a new chromatographic technique, *Analytical Chemistry* 23, 420–425.
11. Stahl, E., *Thin-layer Chromatography, a Laboratory Handbook*, drugo englesko izdanje, Springer, Berlin, 1969, str. 1–724.

CIP - Каталогизacija у публикацији  
Библиотеке Матице српске, Нови Сад

543.544(075.8)

**HROMATOGRAFSKE metode analize** [Elektronski izvor] / Daniela Šojić Merkulov ... [et al.]. - Novi Sad : Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, 2021

Način pristupa (URL):

[https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/sojicmerkulov\\_hromatografske\\_metode\\_analize.pdf](https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/sojicmerkulov_hromatografske_metode_analize.pdf). - Opis zasnovan na stanju na dan 13.5.2021. - Nasl. s naslovnog ekrana. - Bibliografija uz svako poglavlje.

ISBN 978-86-7031-563-1

a) Хроматографске методе анализе

COBISS.SR-ID 38483209

