



Metode cromatografice

Prezentare generală



OBIECTIVE GENERALE

- **Prezentarea principiilor fundamentale ale metodelor cromatografice.**
- **Prezentarea generala a tipurilor de metode cromatografice:**
 - CSS
 - GC
 - HPLC



Principii fundamentale

- Cromatografia reprezintă un set de metode analitice care s-au dezvoltat inițial ca și tehnici de separare.



Principii fundamentale

- În toate variantele, separarea precede analiza (**calitativ i cantitativ** a compușilor separați)
- separarea **se realizează prin repetarea, de un număr mare de ori, a echilibrului de distribuție între două faze:**
 - fază **staționară** (fixa) – aflată într-un tub numit coloană sau in plan
 - faza **mobilă** (*eluent*) - aflată în mișcare, se deplasează prin golurile primei faze.



Analiza chimică cromatografică

- 1901, botanistul rus Tvet a separat pigmenti vegetali pe o coloana umpluta cu carbonat de calciu, eluent eterul de petrol.

*chromos = culoare,
graphos = scriere*

Mikhail Tsvet



Mikhail Tsvet

Born	14 May 1872 Asti, Italy
Died	26 June 1919 (age 47)
Nationality	Russia
Fields	botany
Known for	adsorption chromatography



Clasificarea metodelor cromatografice

Criterii diferite:

- A - Clasificarea în funcție de mecanismul separării
- B - Clasificarea în funcție de natura fazelor cromatografice
- C - Clasificarea în funcție de configurația sistemului cromatografic



A - *Clasificarea în funcție de mecanismul separării*

- **1. Cromatografie de adsorbție**
- **2. Cromatografie de repartitie**
- **3. Cromatografie de schimb ionic**
- **4. Cromatografie de excluziune**



B - Clasificarea în funcție de natura fazelor cromatografice

- **Faza mobila:**
 - gazoasa
 - lichida.
- **Faza stationara:**
 - Solida
 - lichida -care trebuie fixată pe un suport solid corespunzător, în general un material poros



Tipuri de metode cromatografice în funcție de natura fazelor

1. Cromatografie de gaze

- 1.1. Gaz-lichid (GLC)
- 1.2. Gaz-solid (GSC)

2. Cromatografie de lichide

- 2.1. Lichid-lichid (LLC)
- 2.2. Lichid-solid (LSC)



ACTIVITATE INDEPENDENTA

- **Denumiti faza mobila si fixa ale metodelor mentionate pe slide-ul anterior**



C - Clasificarea în funcție de configurația sistemului cromatografic

- **1. Cromatografie pe coloana** - faza fixă este depusă într-o coloană verticală
 - 1.1. Cromatografie pe coloane clasice (cu umplutură)
 - 1.2. Cromatografie pe coloane capilare
 - OBS: Diametrul coloanei 1.1 - 1.2 mm
- **2. Cromatografie planară** - faza fixă este depusă pe o suprafață plană)
 - 2.1. Cromatografie în strat subțire
 - 2.2. Cromatografie pe hârtie

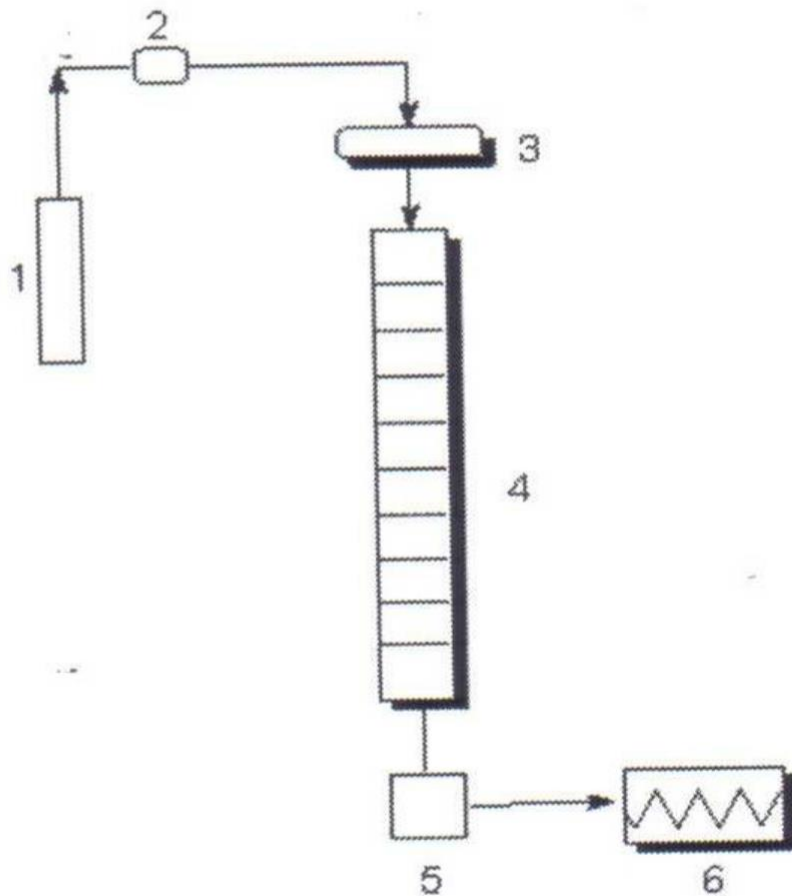


FAZELE procedeeelor cromatografice

Procedeele cromatografice includ următoarele **faze**, indiferent de tipul metodei:

1. prepararea fazei staționare (în coloană sau pe placă);
2. introducerea probei;
3. trecerea probei (dizolvată sau sub forma de gaz) peste faza staționar;
4. separarea componentelor pe faza staționară;
5. colectarea componentelor amestecului prin eluare (preluare) cu solvenți (gaz sau lichid) potriviți;
6. analiza calitativă;
7. analiza cantitativă.

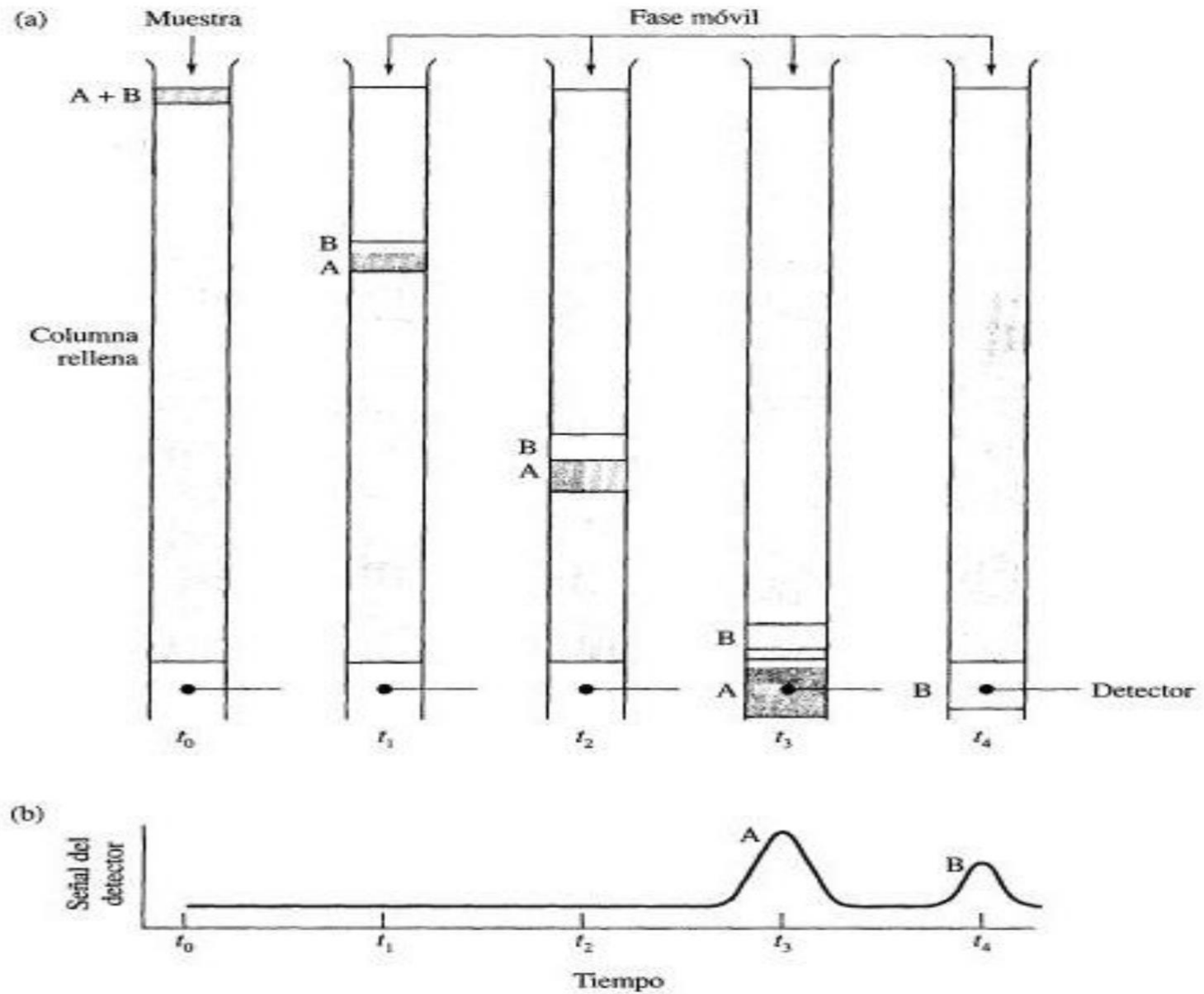
Schema de principiu a unui cromatograf



- 1 - rezervor faza mobila
- 2 - dispozitiv de reglare si
masurare a debitului
- 3 - dispozitiv de introducere a
probei
- 4 - coloana cromatografica
- 5 - detector
- 6 - înregistrator sau integrator

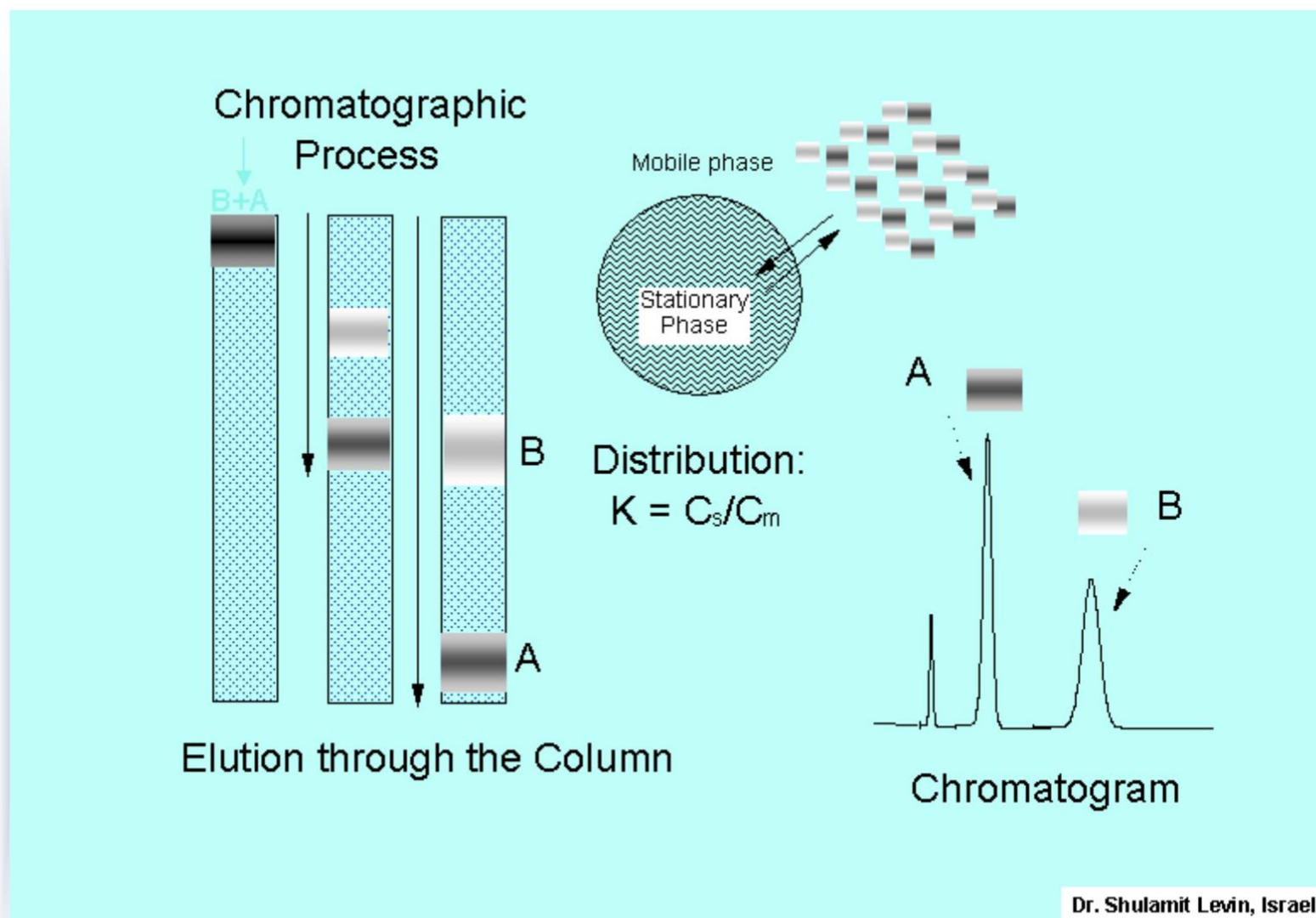


Dinamica procesului cromatografic





- Faza solidă este introdusă într-un tub cilindric închis la partea de jos printr-un dop de vat de sticlă sau un disc poros.
- La partea superioară se introduce proba (Muestra) care conține doi compuși A și B dizolvați într-o cantitate cât mai mică de solvent (momentul t_0).
- Începe introducerea fazei mobile și cei doi componenți migrează diferit în coloană (momentele t_1 și t_2)
- Momentul t_3 corespunzător eluării compusului A se înregistrează pe cromatogramă prin apariția unui pic bine definit de forma clopotului lui Gauss.
- În continuare eluează în același mod și compusul B în momentul t_4 .

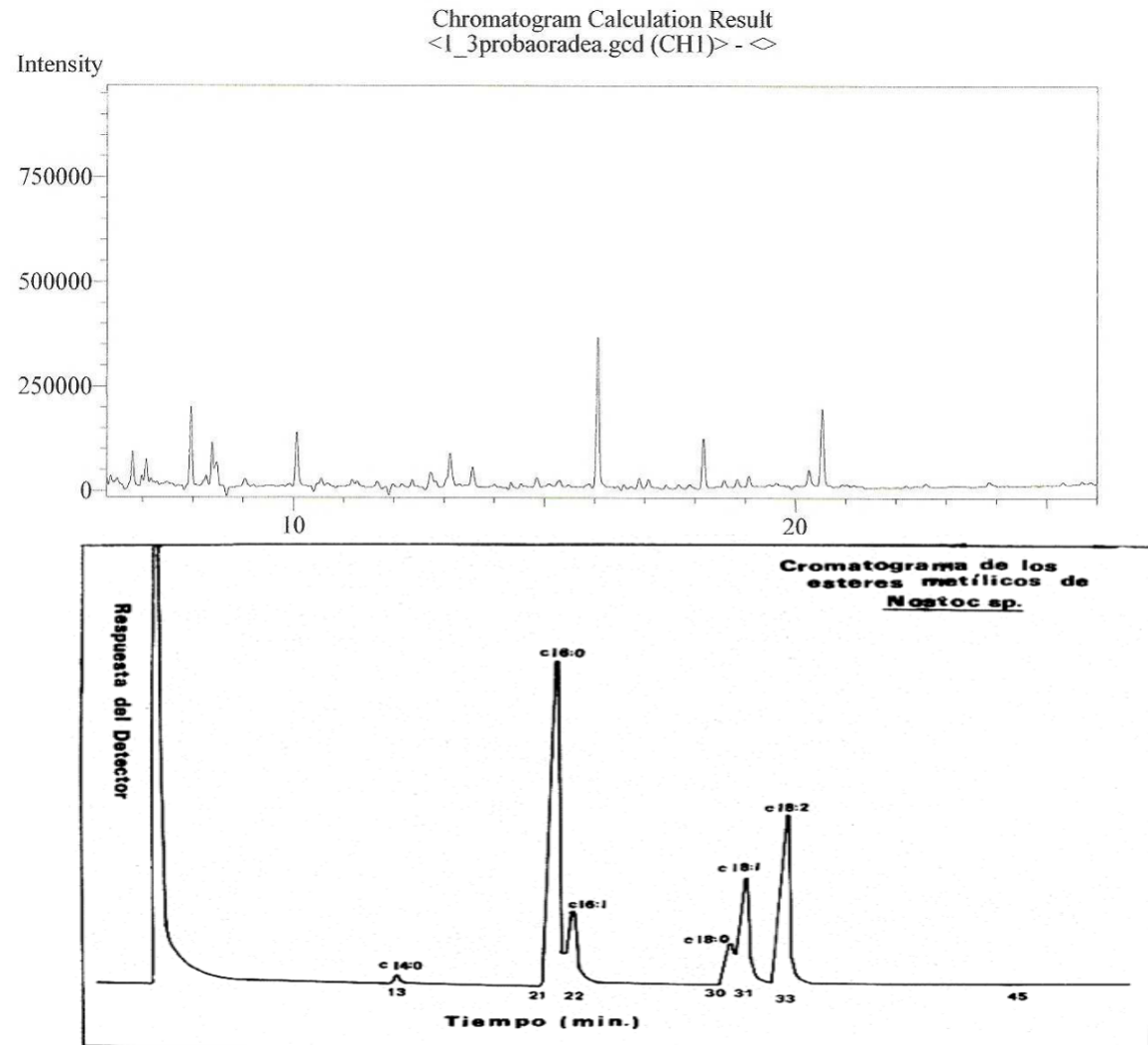


<http://www.forumsci.co.il/HPLC/modes/modes2.htm>

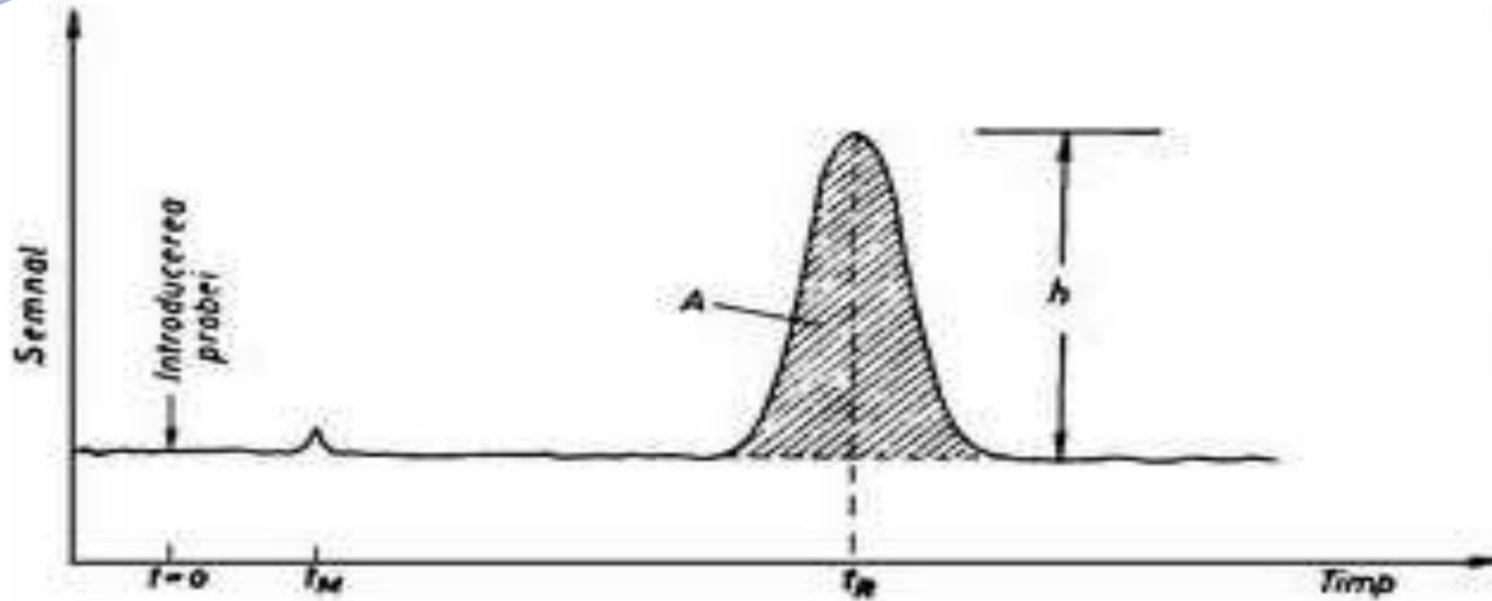


Diagrama care reprezintă rezultatul analizei cromatografice se numeste **cromatogramă**

- este un semnal, funcție de timp sau de volumul de eluent



Elemente de bază ale cromatogramei

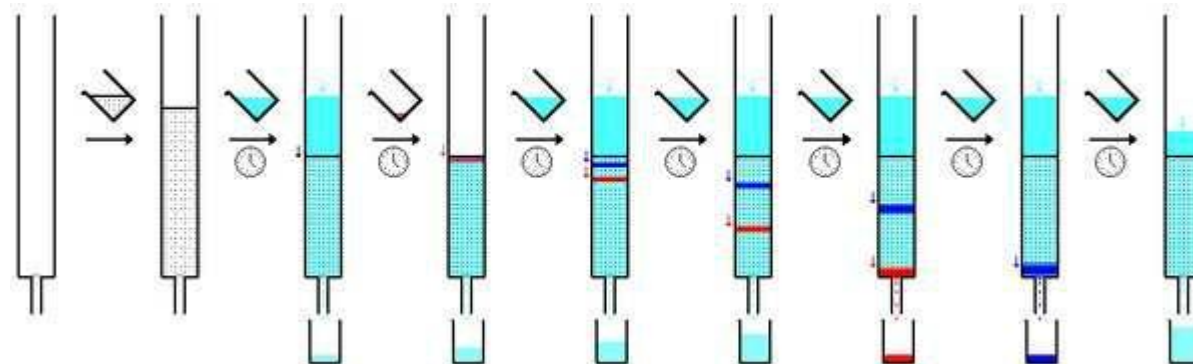


1. *Picurile cromatografice*
2. *Timpul de retenție, t_R - mărimi caracteristice pentru fiecare component al amestecului separat de coloană*
3. *h - înălțimea picului*
4. *A - aria picului*

Analiza calitativă/cantitativă în cromatografie:

- Se poate realiza prin două tipuri de metode:
1. Se colectează fiecare component în vase separate, după care fiecare fracțiune se analizează prin procedee chimice sau instrumentale adecvate (**în prezent utilizată numai pentru preparare/purificare probelor**);

en.wikipedia.org





2. analiza are loc direct în cromatograf, utilizându-se tehnici și detectori specifici – utilizată în practica analitică actuală



Prezentarea principalelor tehnici cromatografice utilizate la control calității

- 1. Cromatografie în strat subțire (CSS)**
- 2. Cromatografie de gaze (CG)**
- 3. Cromatografie de lichide (CL)**



Cromatografia în strat subțire CSS Thin Layer Chromatography TLC

Principiul metodei:

- **Separarea** se bazează pe distribuția componentelor probei între doua faze:
 - Faza fixă – strat subțire de material solid depus pe un suport plan.
 - Faza mobilă – lichidă (singular sau amestecuri).



Faza fixă (staționară):

- **Silicagel;**
- Oxid de aluminiu;
- Kieselgur.

Faza mobilă:

- Amestecuri de solvenți în proporții și concentrații variabile.



Avantaje:

- Rapiditate;
- Cost redus;
- Aplicabilitate la compuși care prezintă instabilitate termică, atât hidrosolubili cât și liposolubili;
- Posibilitatea analizării simultane a mai multor probe;
- Reproducibilitatea rezultatelor.

Dezavantaje:

- Sensibilitate (în general) mai mică decât în cromatografia de gaz sau lichid;
- Necesitatea unei purificări mai avansate;
- Repetabilitate scăzută în cazul unor temperaturi sau umidități ambientale ridicate (risc scăzut în condițiile climatice din țara noastră).



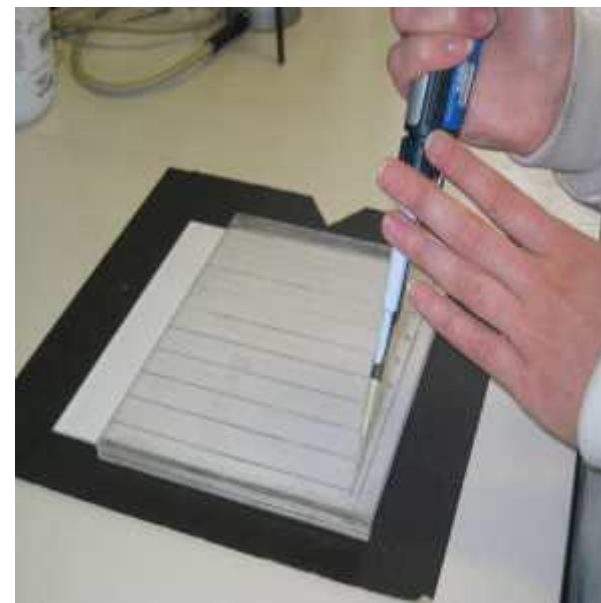
Etape:

- **Aplicarea probei (spotare);**
- **Developare;**
- **Relevarea componentelor amestecului;**
- **Determinare calitativă;**
- **Determinare cantitativă.**

Mod de lucru

- Se folosesc plăci de sticlă de diferite dimensiuni, (20 x 20 cm,) pe care se depune un strat uniform de adsorbant cu grosime de aproximativ 250 μm .(faza staționară)

1. Spotare (spot = pata) - la o distanță de circa 1,5 cm de marginea plăcii se aplică o cantitate foarte mică de amestec al substanțelor ce urmează a fi separate → microseringi

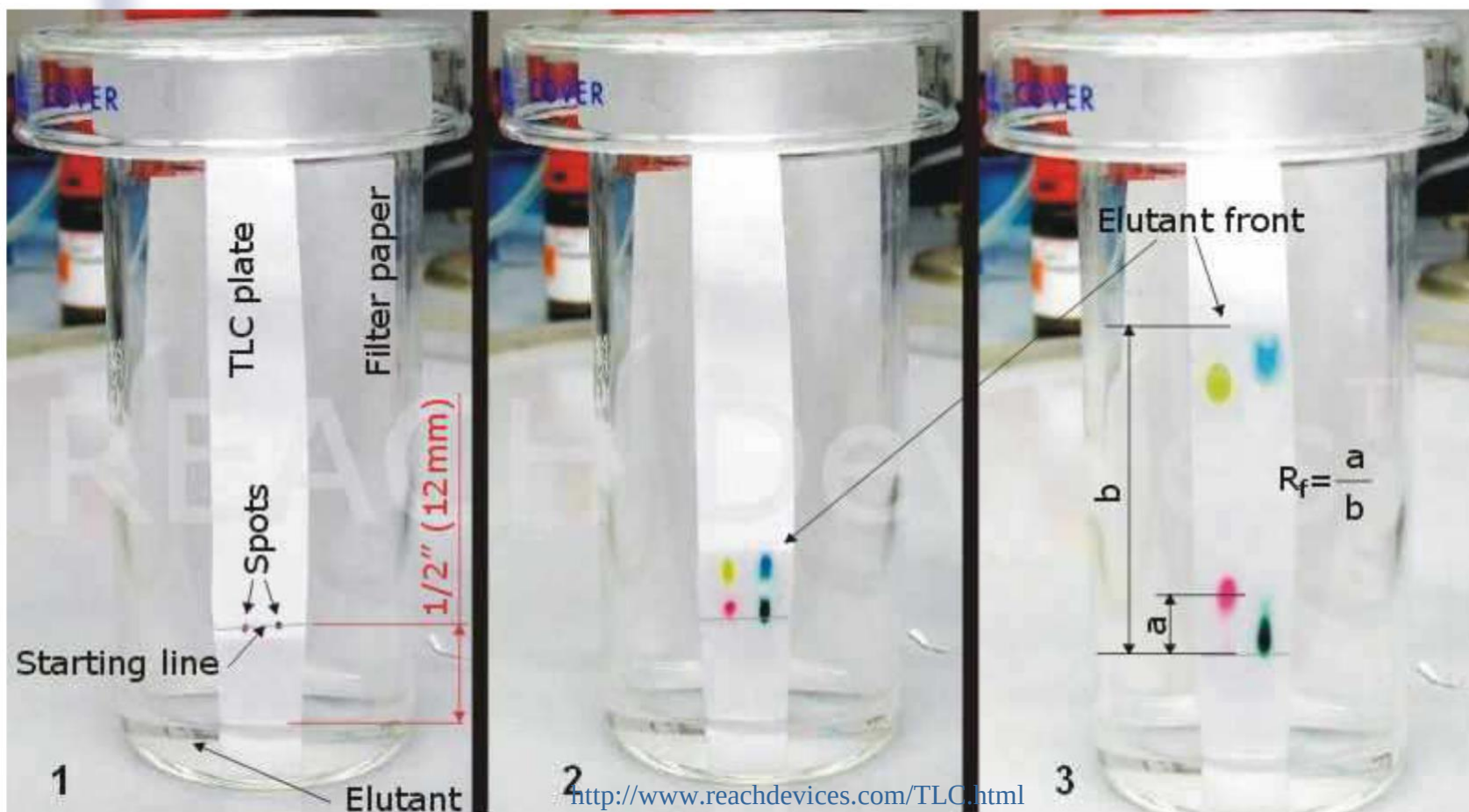


<http://www.virtual-labs.leeds.ac.uk/brewing/TLCtheory.php>

www.hamiltoncompany.com

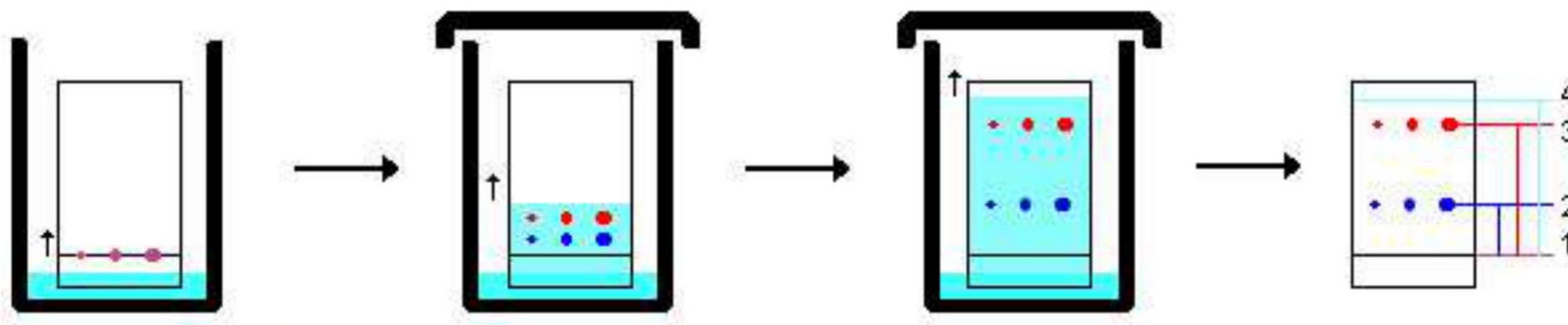


- Developare: se iversează placa într-un vas cu închidere etanșă în care atmosfera este saturată de vapori ai solventului sau ai amestecului de solvenți utilizați pentru separare (faza mobilă).
- In acest mod are loc un proces de migrare al componentelor fazei mobile printre particolele fazei staționare.
- Componentele amestecului migrează diferit, în funcție de modul lor de distribuție între cele două faze.





- Identificare - atunci când frontul dezvoltantului ajunge la extremitatea plăcii, aceasta se scoate, se usucă și se trece la faza de identificare



<http://www.bio-rad.com/en-za/applications-technologies/chromatography>

TLC - Automatizare



<http://www.camag.com/en/home.cfm>

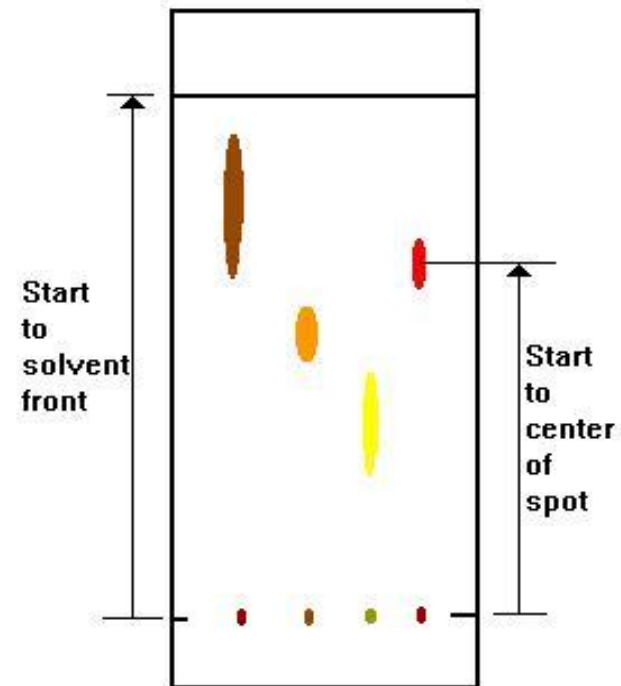


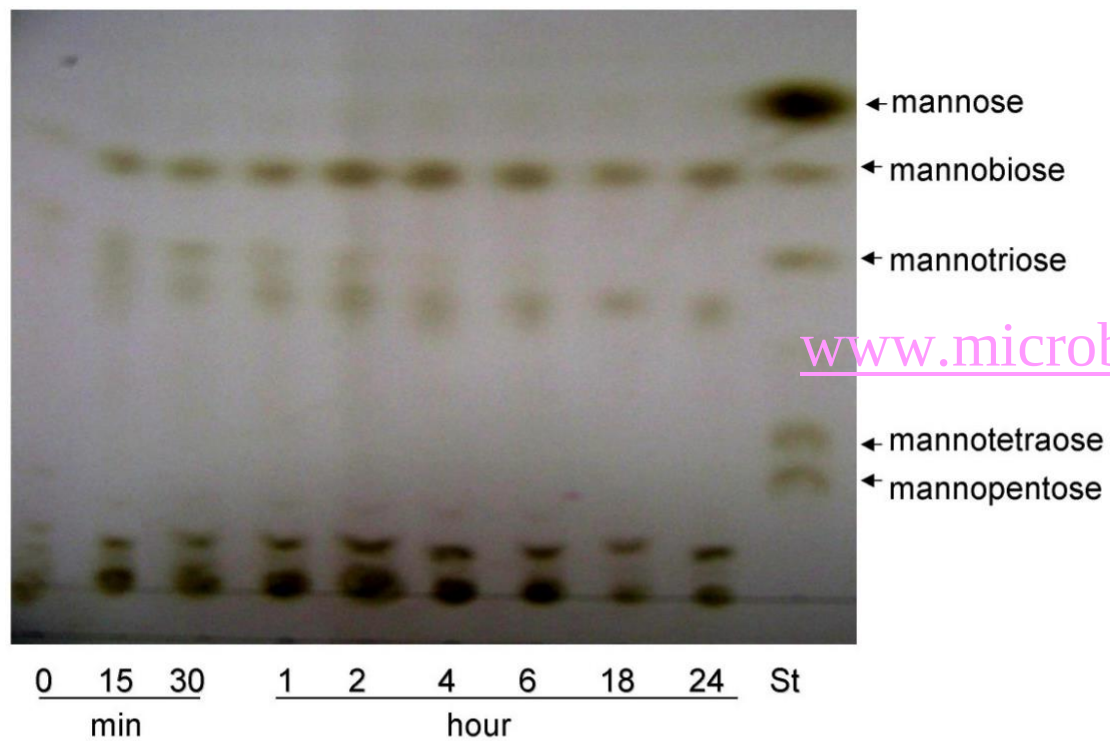


Determinarea calitativa

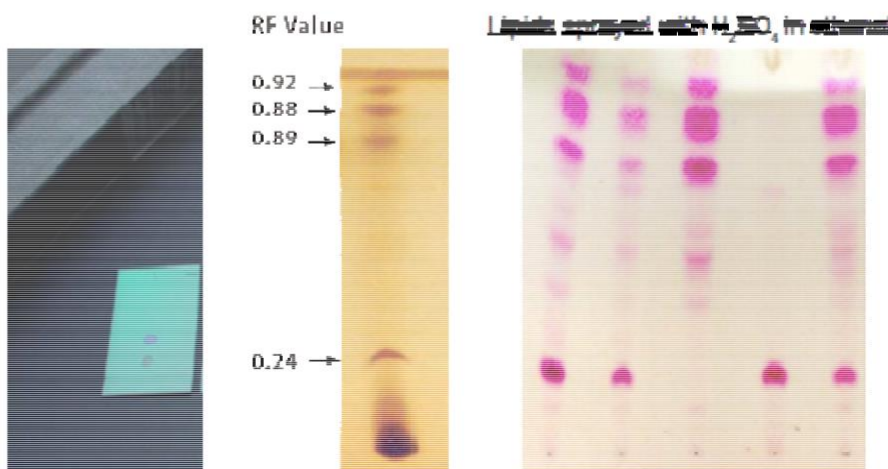
1. Prin reacții chimice specifice, direct pe placă;
2. Prin valoarea **R_f** (*retardation factor*) – măsoară viteza de deplasare pe placă a componentelor față de frontul dezvoltantului
 - R_f - valori 0 - 1
 - Etaloane !!!!

$$R_f = \frac{X_{\text{spot}}}{X_{\text{solvent}}}$$





www.microbialcellfactories.com





Determinarea cantitativă

1. Direct pe placă:

1. Metoda compararii vizuale – semicantitativă;
2. Metoda densitometrică.

2. După eluția substanței din adsorbant:

1. Spectrofotometrie UV-VIS;
2. Colorimetrie;
3. Culonometrie, voltametrie etc.



Metoda gaz cromatografică

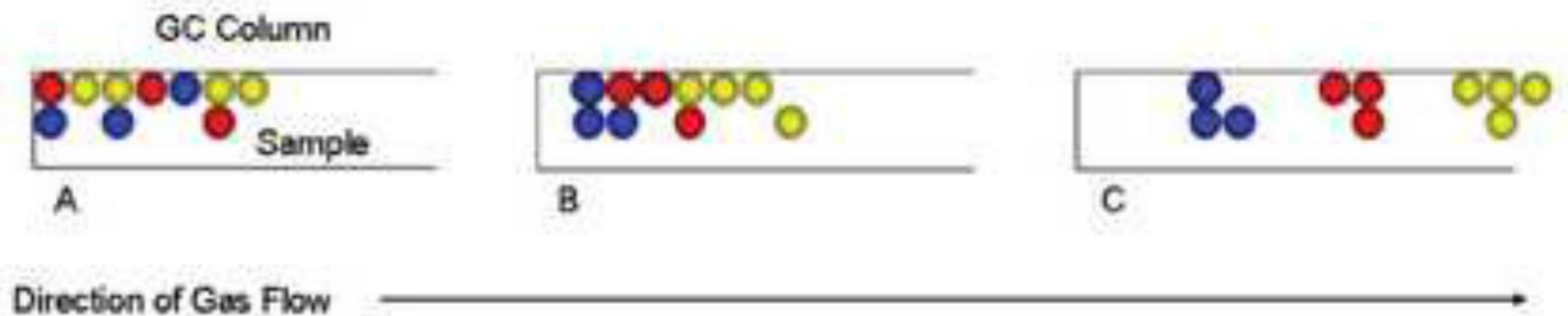
Gas chromatography (GC)

Principiul metodei

- 1 Substanța sau amestecul de substanțe ce trebuie determinate sunt trecute prin injectare, într-o coloană ce conține o **fază staționară** (fixa) și unde se încălzesc la o anumită temperatură, trec în faza gazoasă și se rețin în mod selectiv de către faza fixă.

2- Ulterior prin coloană se trece un gaz care reprezintă faza mobilă și care va elua componentele amestecului

3 -la ieșirea din coloană este amplasat un detector care înregistrează apariția substanțelor sub forma unor picuri ce formează cromatograma.



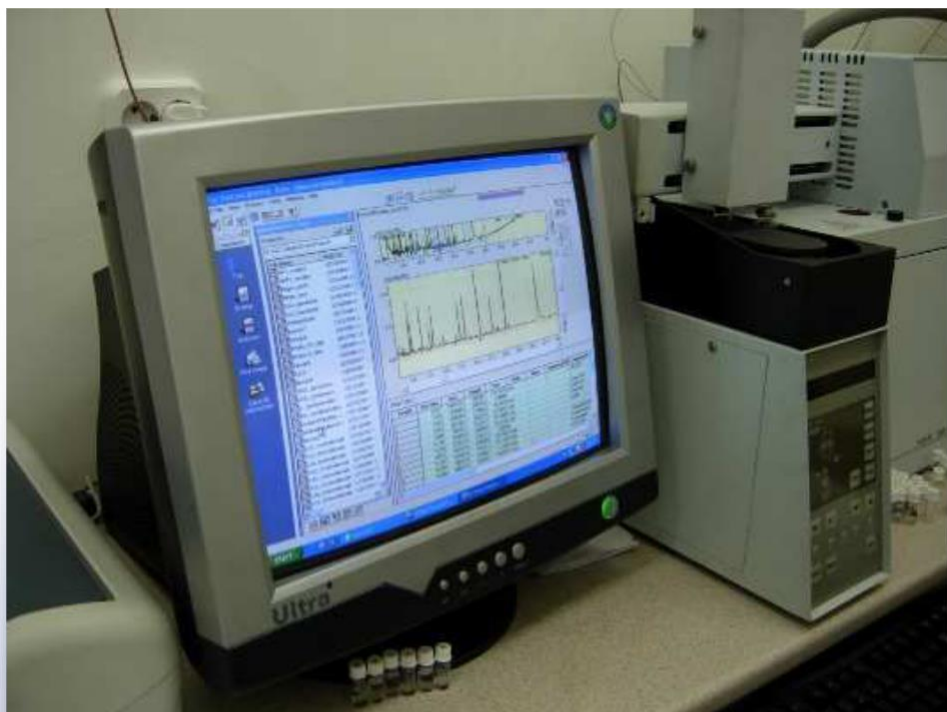


Faza mobilă → gaz

hidrogenul, heliul, azotul sau argonul

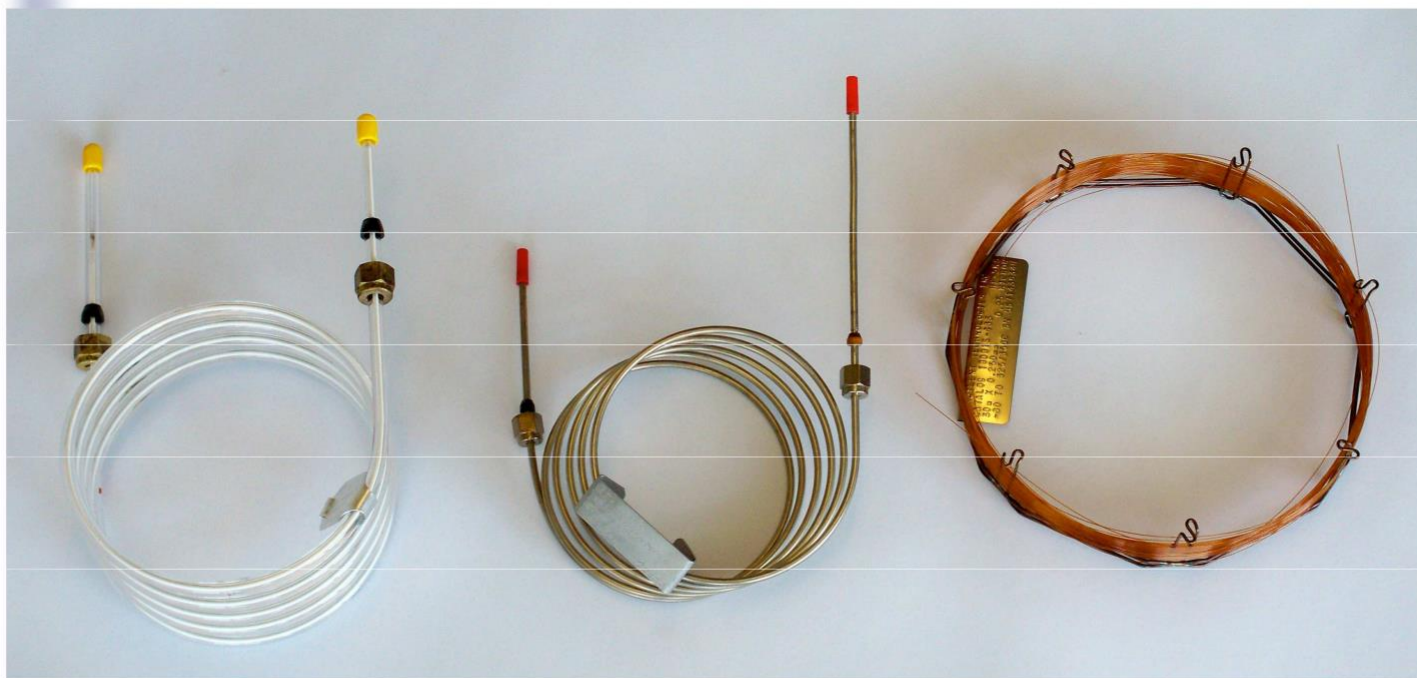
Faza fixa

- DPDV al stării de agregare, fazele stationare sunt:
 - **Solide:** silicagel, alumină
 - Lichide (adsorbite pe substrat solid)



Coloane cromatografice

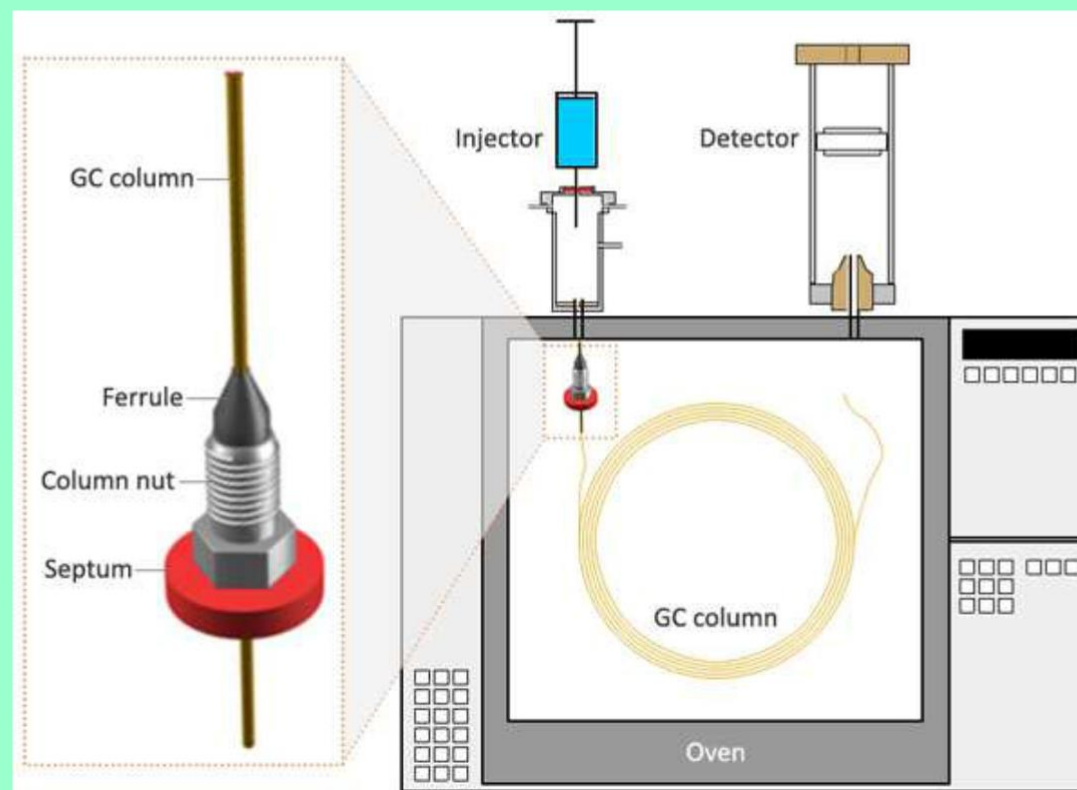
- coloane cu umplutur
- coloane capilare – cele mai eficiente



http://people.whitman.edu/~dunnivfm/C_MS_Ebook/CH2/2_3_3.html

Introducerea probelor

microseringi, volumul probei fiind între 1 și 10 μL la coloanele cu umplură și de 0,1 până la 2 μL la cele capilare





- **Detectori CG**

1. *detectori universali* care permit înregistrarea sigură a tuturor componentelor probei

– *Ex: Detectorul cu ionizare în flacara (FID) sau catarometrul.*

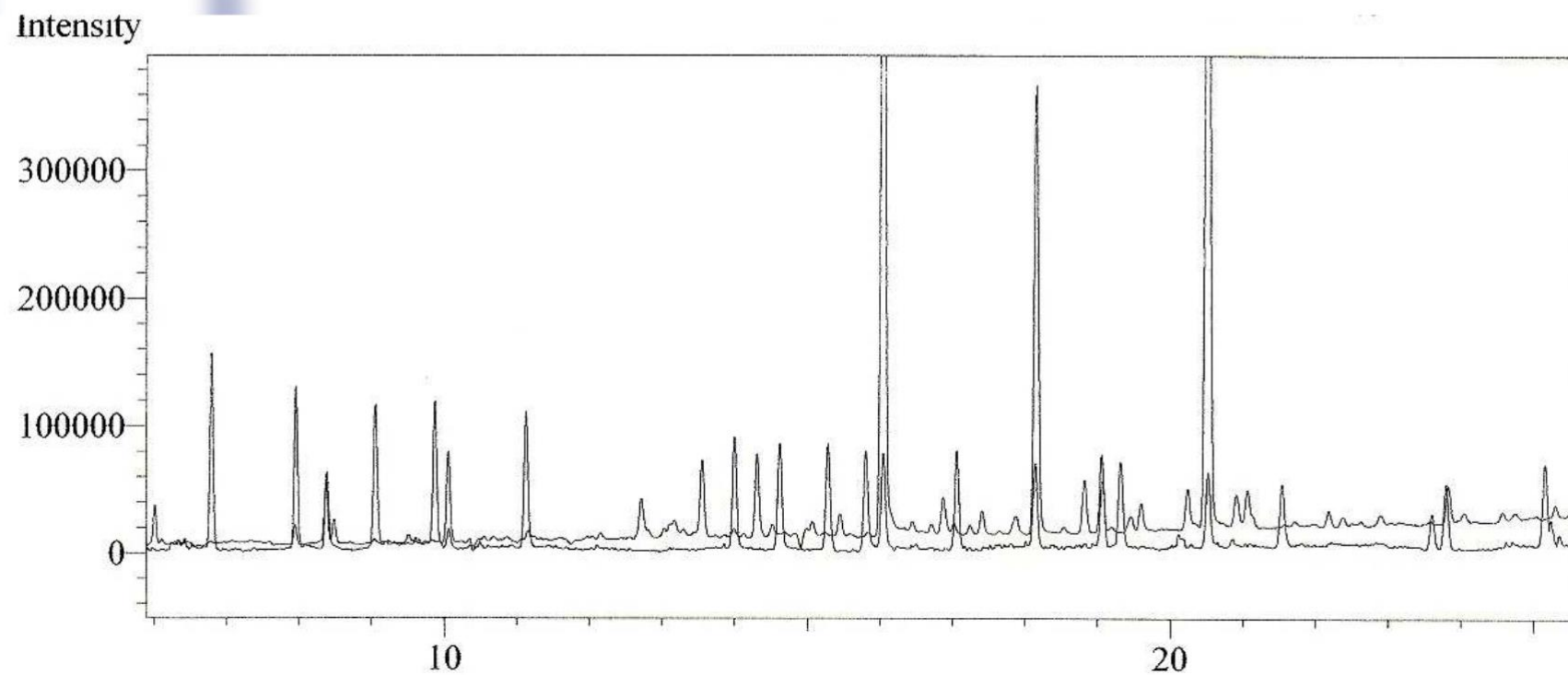
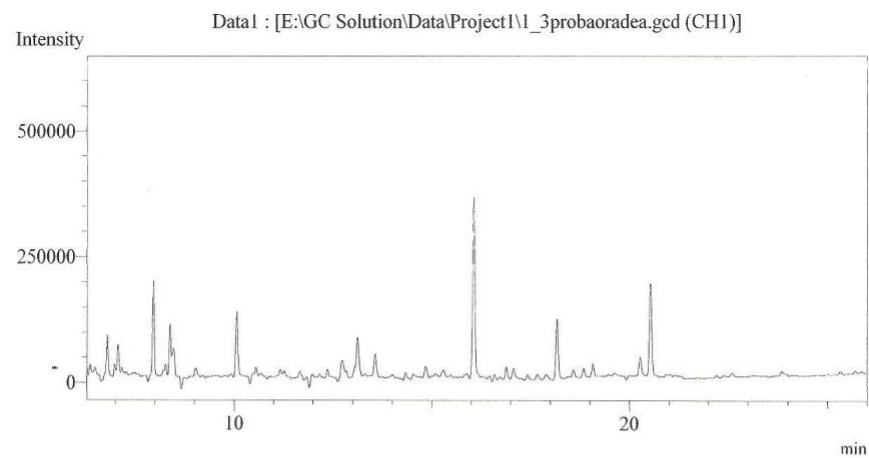
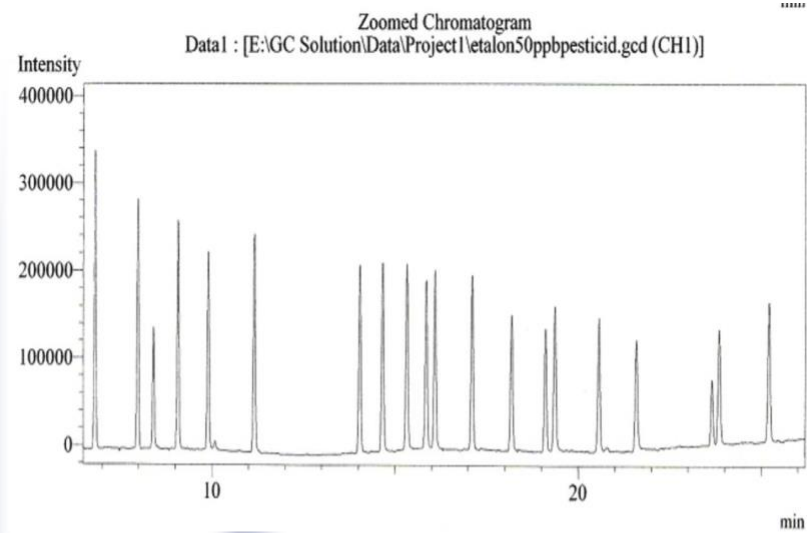
2. *detectori specifici*, care răspund doar la anumite tipuri de molecule

– *Ex: Detectorul cu captură de electroni (ECD).*



Analiza cromatografica

- **Analiza calitativă** – pe baza comparării timpilor de retenție înregistrați pentru compușii din proba și pentru etaloane cunoscute.
- **Analiza cantitativă** – se calculează pe baza ariei cuprinse sub fiecare pic cromatografic (sau înălțimea picului) care este proporțională cu concentrația compusului respectiv.





Metoda cromatografiei de lichide **Liquid chromatography (LC)**

Termenul de cromatografie de lichide se referă la o gamă extinsă de sisteme cromatografice care au în comun faptul că utilizează o fază mobilă lichidă.



Avantaje (fata de GC)

- permite analizarea probelor greu volatile sau instabile termic.
- faza mobila **participă activ** la separare → oferă posibilități suplimentare pentru realizarea unor separări eficiente.



Principiul metodei

- este analog cu cel al GC cu deosebirea că faza mobilă este lichidă.
- Substanța sau amestecul de substanțe ce trebuie determinate sunt trecute sub formă lichidă, prin injectare, într-o coloană ce conține o **fază staționară** (fixa).
- Ulterior prin coloană se trece un lichid sau amestec de lichide care reprezintă faza mobilă și care va elua pe rand componentele amestecului.

Tehnici ale cromatografiei de lichide

- cromatografia de adsorbție lichid-solid (LSC)
- cromatografia de repartitie lichid-lichid (LLC)
- cromatografia ionica (IC)
- cromatografia prin excluziune (SEC)



Detectoare utilizate în LC



- Clasificarea detectoarelor se poate face în două categorii

A - Detectoare care *măsoară modificarea unei proprietăți fizice a eluentului coloanei*

Ex: detectoarele de indice de refracție

B - Detectoare care *măsoară modificarea unei proprietăți a solutului*

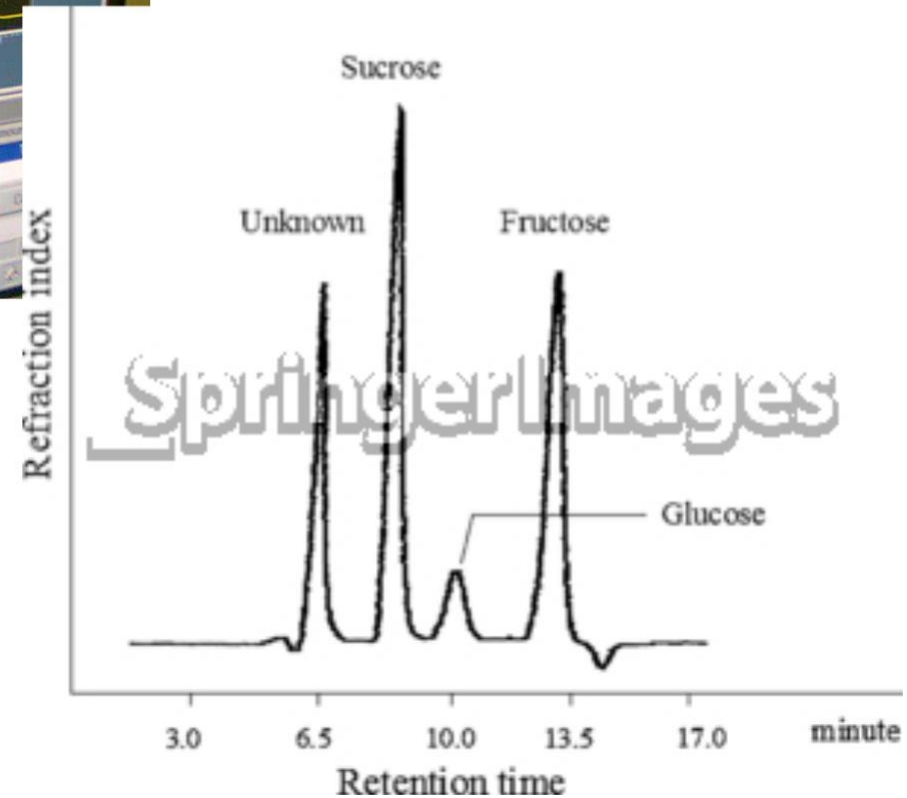
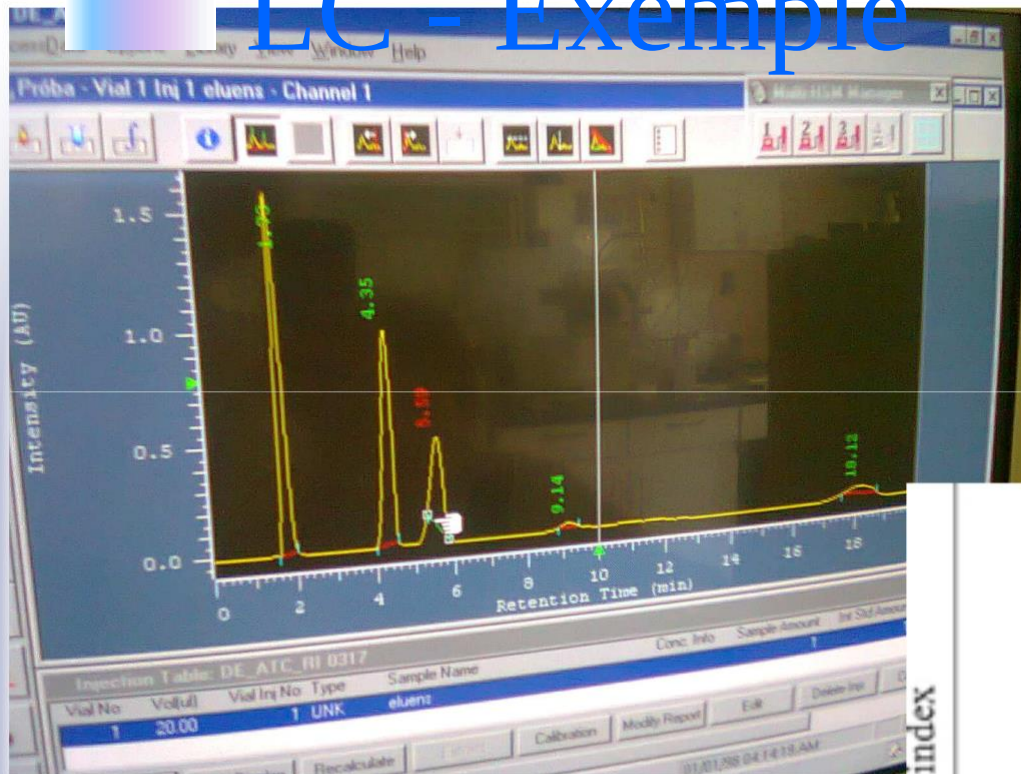
Ex: detectoarele spectrofotometrice



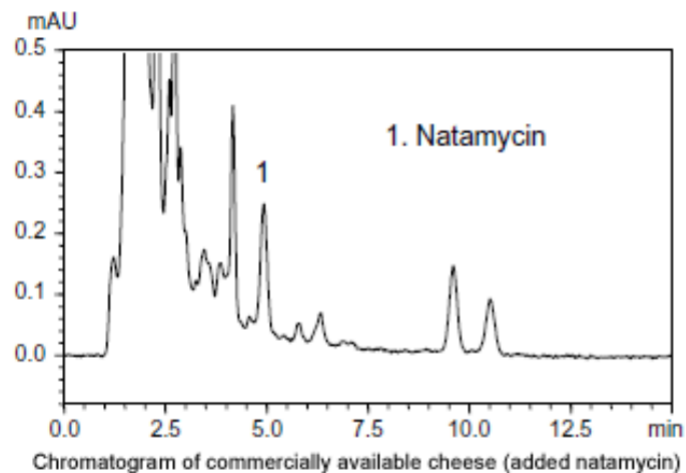
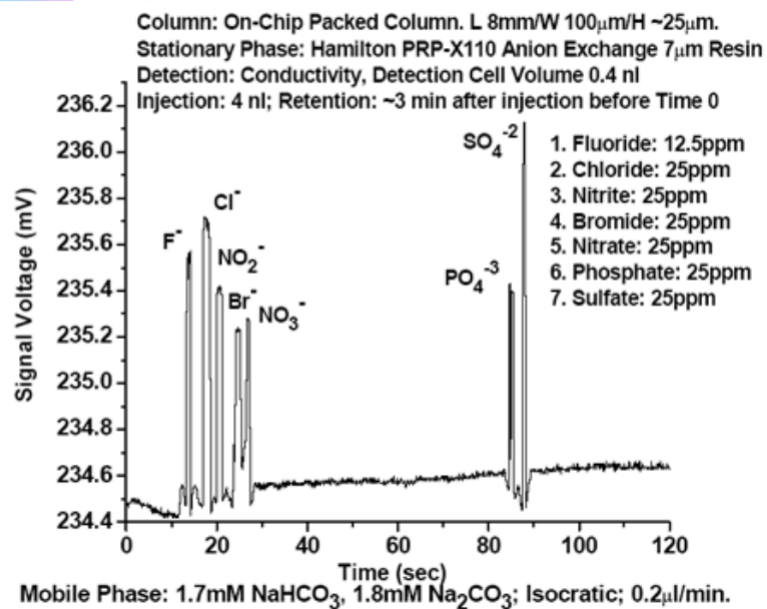
Analiza LC – ca și la GC

- **Analiza calitativă** – pe baza comparării timpilor de retenție înregistrați pentru compușii din probă și pentru etaloane cunoscute.
- **Analiza cantitativă** – pe baza comparării ariilor pentru compușii identificați pozitiv din proba cu aria unor etaloane de concentrații cunoscute

LC - Exemple



www.springerimages.com





Aplicatii ale metodelor cromatografice

- **Componenti majori: glucide, lipide, aminoacizi**
- **Componenti minori: enzime, vitamine, antioxidanti naturali**
- **Substante adaugate (adugate): coloranti, antioxidanti, conservati**
- **Contaminanti alimentari organici: pesticide, micotoxine, dioxine, etc**

Aplicațiile metodelor cromatografice în controlul alimentelor

Denumire metodă	Aplicație
Cromatografie pe hartie	Determinarea calitativă de: aminoacizi, aditivi alimentari
Cromatografie în strat subțire	Componente ale alimentelor: - Carotenoide, vitamine Contaminanți alimentari: - Medicamente, pesticide Aditivi alimentari: - Coloranți, conservanți
Cromatografie de gaze	Componente ale alimentelor: - Grasimi (acizi grași), arome Contaminanți alimentari: - contaminanți organoclorurați (POC și PCB) și organofosforici - HPA (idrocarburi policiclice aromatice), dioxine, furani, acrilamida - Medicamente de uz veterinar
Cromatografie de lichide	Componente ale alimentelor : - Glucide, aminoacizi, vitamine Contaminanți alimentari: - micotoxine



CONCLUZII

1. Metodele cromatografice sunt tehnici de separare urmate de determinari calitative/cantitative
2. Cel mai adesea se clasifica in functie de natura fazelor cromatografice
3. Fazele procesului cromatografic sunt aceleasi indiferent de tehnica aplicata
4. Rezultatul determinarii se numeste cromatograma si ea este compusa dintr-o succesiune de picuri caracterizate de T_r , inaltime si arie
5. Cele mai utilizate tehnici cromatografice sunt:
 1. Cromatografia in strat subtire TLC
 2. Cromatografia de gaze GC
 3. Cromatografia de lichide LC



- 6. Detectarea compusilor separați se face în mod specific, în funcție de proprietățile acestora**
- 7. În toate tehnicile cromatografice**
 - 1. Determinările calitative se bazează pe compararea timpilor de retenție ale etaloanelor cu cele din probe**
 - 2. Determinările cantitative se bazează pe compararea ariilor (În lățimii) picurilor identificate în cele ale unor etaloane de concentrație cunoscut**
- 8. Tehnicile cromatografice au aplicații complexe în domeniul alimentelor**



Test de autoverificare

1. Ce reprezintă cromatografia (în general)?
2. Cum se realizează un proces cromatografic (în general)?
3. Care sunt criteriile după care se clasifică metodele cromatografice?
4. Clasificați metodele cromatografice dpdv al mecanismului de separare/natura fazelor cromatografice/ *configurația sistemului cromatografic*
5. Dați minim câte doua ex de aplicare a CSS/CG/LC în domeniul controlului analitic
6. Care sunt fazele oricărui proces cromatografic?



7. Cum se numește rezultatul unei determinări cromatografice?
8. Ce caracterizează o cromatogramă (elemente de bază)?
9. Care este faza fixă și cea mobilă în CSS (TLC)?
10. Enumerați minim 3 avantaje/dezavantaje ale tehnicii CSS
11. Care sunt etapele unei determinări de tip CSS?
12. Pe ce se bazează determinarea calitativă/cantitativă în determinările CSS?
13. Care este faza fixă și cea mobilă în CG?
14. Care este principiul determinării CG?



- 15. Pe ce se bazează determinarea calitativă/cantitativă în determinările cromatografice de gaze?**
- 16. Care este deosebirea fundamentală între tehnicile cromatografice de lichide și cea de gaze?**
- 17. Care sunt avantajele cromatografiei de lichide față de cea de gaze?**
- 18. Care este principiul de funcționare al tehnicilor cromatografice de lichide?**
- 19. Enumerați tehnici ale cromatografiei de lichide.**
- 20. Pe ce se bazează determinarea calitativă/cantitativă în determinările cromatografice de lichide?**