

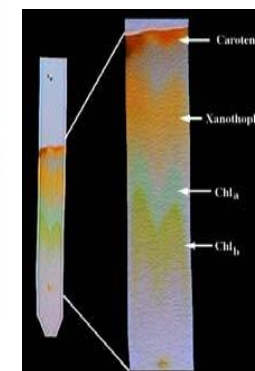
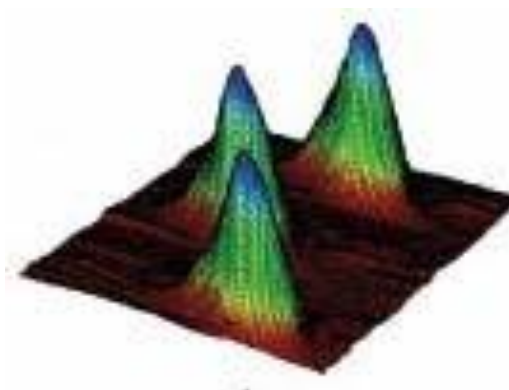
Analiza cromatografică. Generalități. Clasificarea metodelor cromatografice

Aspecte generale

- botanistul rus Mihail Semionovici Tswett - „părintele” cromatografiei, prin studiul fenomenului de adsorbție în coloane cu umplură, dezvoltat în jurul anilor 1900
- pe o coloană împachetată, cercetătorul separa extracte din pigmenții frunzelor, precum clorofila și xantofil spiriloxantina
- separa „carotenul” (zonă galben roșie), xantofilul (zonă galbenă) (carotinoida oxigenată la C_{40}) și clorofila (zonă verde) pe o coloană umplută cu inulină ($C_6H_{10}O_5 \cdot H_2O$, o polizaharidă solubilă, alcătuită din grupări fructoză, ce apare în diferite plante ca rezervă de hrană)
- folosește ligroina ca solvent (un amestec de hidrocarburi cu p.f. 70-120 °C)
- cromatografie (grecescul „**chroma**” pentru culoare și „**graphein**” pentru scriere)

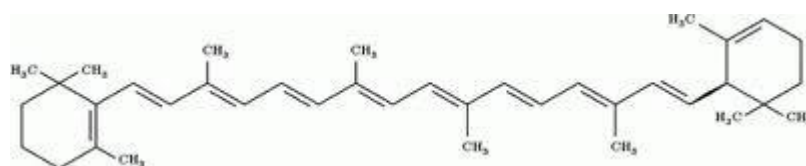


Mikhail Semionovich Tswett, (1872–1919), părintele cromatografiei



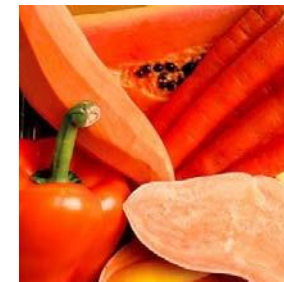
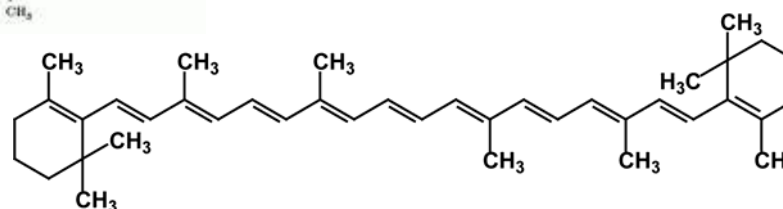
Aspecte generale

- pas important înregistrat în 1931 când Kuhn (laureat al premiului Nobel în 1938) și Lederer au separat în scop preparativ **carotenul din morcovi** (morcovi roșii) în două hidrocarburi **alfa și beta caroten ($C_{40}H_{56}$)**, prin adsorbție pe coloane umplute cu oxid de aluminiu

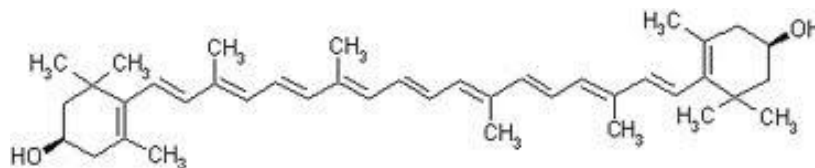


alfa-caroten

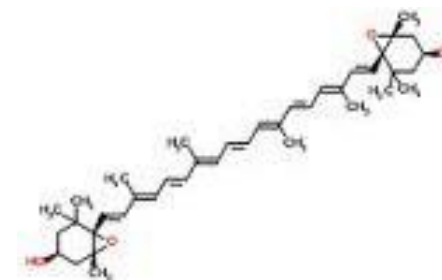
beta-caroten



- în aceeași perioadă, Winterstein separa pe o coloană cu umplură de $CaCO_3$ (cu diametru de 7 cm) două xantofile, **violaxantina** (pigment xantofilic de culoare portocalie care protejează plantele de eventualele distrugerii foto-oxidative) și **luteina** (carotenoid natural cu acțiune antioxidantă)



luteina



violaxantina

Aspecte generale

- 1903 Tjett: Fenomenul de adsorbție în coloană cu umplutură
- 1931 Kuhn, Lederer, Winterstein: Primele separări semnificative din punct de vedere preparativ
- 1937 Tiselius: Electroforeza soluțiilor libere într-un tub
- 1938 Izmailov, Shraiber: Cromatografia în strat subțire (TLC)
- 1941 Martin, Synge: Cromatografia de partitie/repartiție (liquid chromatography, LC)
- 1944 Consden, Gordon, Martin: Cromatografia pe hârtie (planar chromatography, PC)
- 1949 Spedding, Tompkins: Cromatografie de schimb ionic (ionic exchange chromatography, IEC)
- 1952 James, Martin: Cromatografia de gaze (gas chromatography, GC)
- 1957 Galay: Cromatografia de gaze cu coloane capilare (CGC)
- 1959 Parath, Fladin: Gel cromatografia - gel filtrarea
- 1966 Piel: Cromatografia de lichide de înaltă performanță (high performance (pressure) liquid chromatography, HPLC)
- 1969 Klesper: Cromatografia de fluide supercritice (supercritical fluid chromatography, SFC)
- 1981 Nakagawa: Cromatografia electrocinetică

Aspecte generale

Clasificarea metodelor cromatografice în funcție de natura fazelor

1. Clasificarea în funcție de mecanismul separării:

- 1.1. Cromatografie de adsorbție;
- 1.2. Cromatografie de repartitie;
- 1.3. Cromatografie de schimb ionic;
- 1.4. Cromatografie de excluziune;
- 1.5. Cromatografie de afinitate.

2. Clasificarea în funcție de natura fazelor cromatografice:

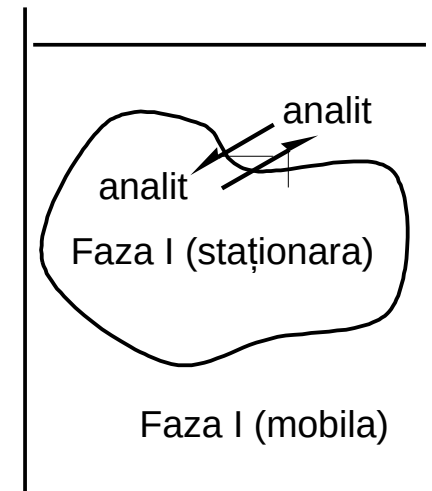
- 2.1. Cromatografie de gaze:
 - 2.1. Gaz-lichid (GLC);
 - 2.2. Gaz-solid (GSC).
- 2.2. Cromatografie de lichide:
 - 2.1. Lichid-lichid (LLC);
 - 2.2. Lichid-solid (LSC);
- 2.3. Cromatografie cu fluide supercritice (SFC).

3. Clasificarea în funcție de configurația sistemului cromatografic

- 3.1. Cromatografie pe coloană:
 - 3.1.1 Cromatografie pe coloane clasice (cu umplutură);
 - 3.1.2 Cromatografie pe coloane capilare:
- 3.2. Cromatografie planara:
 - 3.2.1 Cromatografie în strat subțire;
 - 3.2.2 Cromatografie pe hârtie.

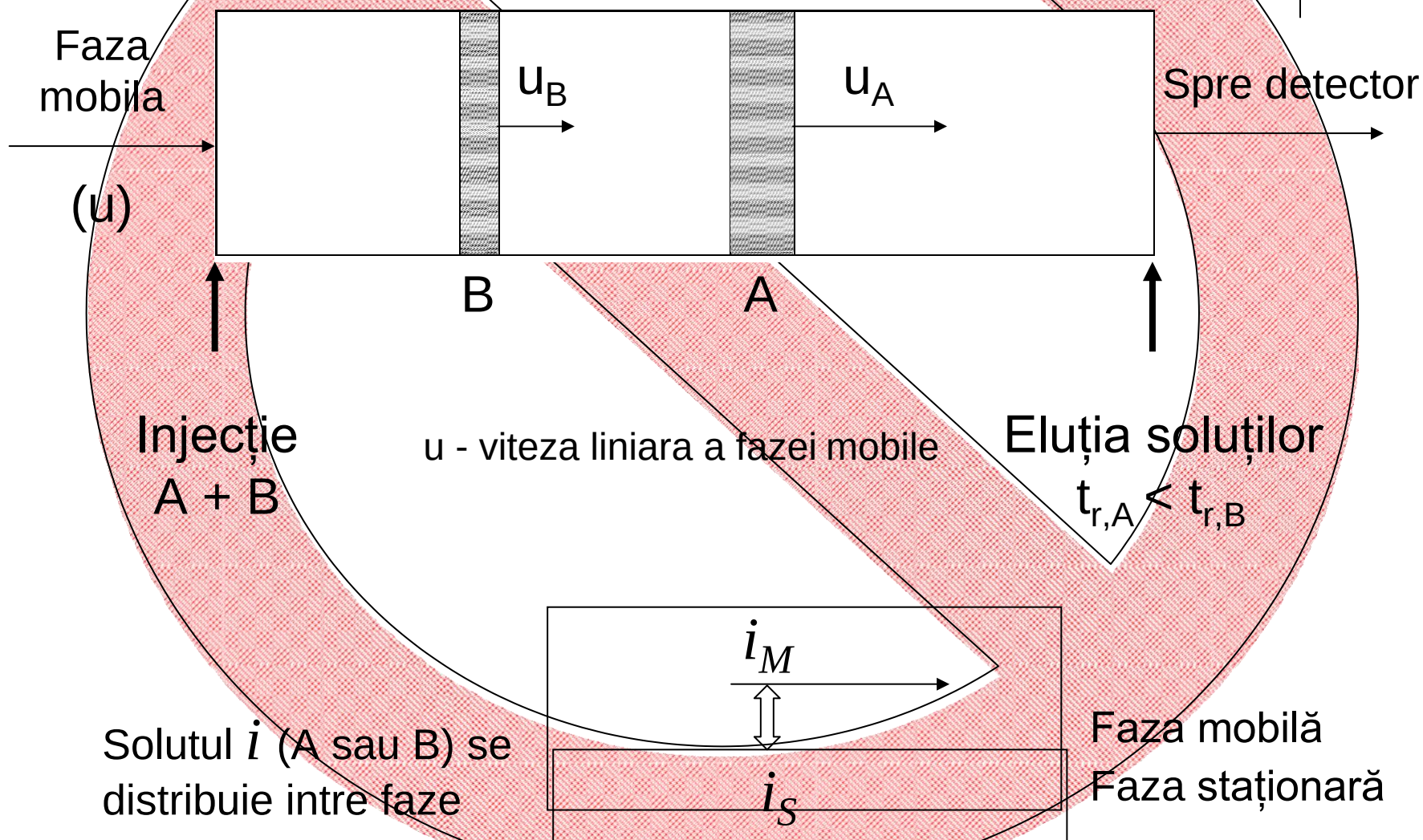
Distribuția solutului (analitului) între două faze

- Distribuția solutului (analitului) între faze - concept de bază în cromatografie
- Dezvoltarea conceptelor termodinamice care guvernează separarea cromatografică are la bază folosirea noțiunilor de:
 - **fază staționară** (sa fie sub formă de solid, gel sau lichid legat pe suprafața unui solid)
 - **fază mobilă** (să fie lichid sau gaz)
- **Cea de-a treia fază este analitul (Solutul)**
- Inceperea **procesului de partiție/distribuție a analitului** între fazele mobilă și staționară



Distribuția analitului între fazele aflate în contact.

Procesul de distribuție a solutului/analitului



Distribuția solutului (analitului) între două faze

Coeficient de distribuție (partiție/repartiție) notat K_D

$$K_D = C_S / C_M$$

C_S denotă concentrația solutului în faza staționară

C_M - concentrația solutului în faza mobilă

La **distribuția** solutului **determinată pe criterii statistice** K_D **are întotdeauna valoare unitară**

Procesul este însoțit de procesele chimice suplimentare ale celor două faze și, din acest motiv, **K_D este diferit de valoare 1**

Pentru sistemele în care **solutul are afinitate mare pentru faza staționară**, K_D poate avea valori mari ($K_D > 1$)

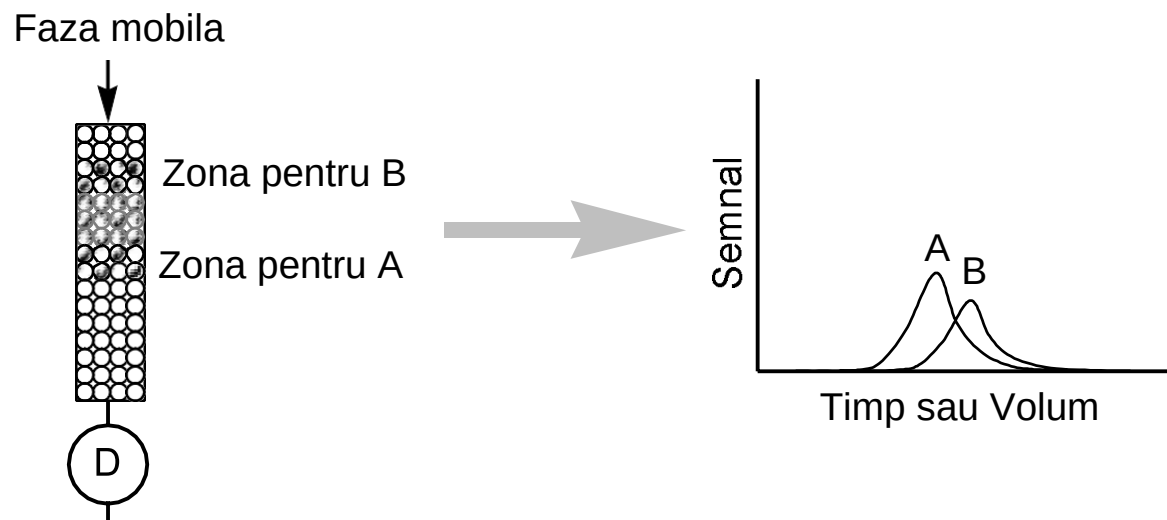
Pentru sistemele în care **solutul preferă faza mobilă**, K_D ia valori foarte mici ($K_D < 1$)

Separarea cromatografică a solutului (analitului)

Echilibrul - timpul mediu petrecut de o moleculă de solut în una din cele două faze

Analizii A și B, caracterizați de $K_{DA} < K_{DB}$, ► analitul A față de B va petrece o fracție mai mică a timpului în faza staționară

Ambii analiți eluează din coloană și funcție de viteza de deplasare din faza staționară se pot obține **separări parțiale sau picuri suprapuse**



Separarea cromatografică a două specii A și B. $K_{DB} > K_{DA}$ și de aceea B este eluat cu întârziere față de A.

Tipuri de izoterme și forma picurilor în cromatografie

Procesul de separare cromatografică - **echilibre interfazice succesive**

Valorile lui K_D - estimate cu ușurință atunci când **se cunosc coeficienții de activitate** pentru un domeniu larg de concentrații al analitului în ambele faze

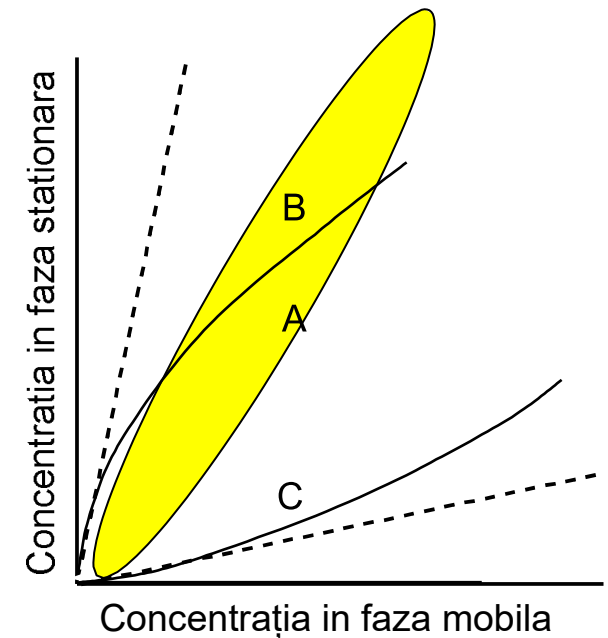
Informația care reiese din izotermele de distribuție valabile:

Izotermele de distribuție caracterizează procesul de separare și descriu modul în care coeficientul de distribuție K_D (C_S/C_M) variază la echilibru

Tipuri de izoterme si forma picurilor în cromatografie

Izoterma - funcția care raportează concentrațiile unui sistem multicomponent între două faze la temperatură constantă

- **comportarea ideală liniară** (coloana cromatografică străbătută cu o viteză independentă de concentrația analitului în cele două faze; $K_D = 1$)
- **izoterme neliniare de tip convex sau concav** (constanta de distribuție depinde de concentrația solutului în faza mobilă)
- **izotermele neliniare convexe:** viteza de străbatere a coloanei mai mare la concentrații mici ($K_D > 1$)
- **izotermele neliniare concave:** viteza este mai mică la concentrații mici ($K_D < 1$)



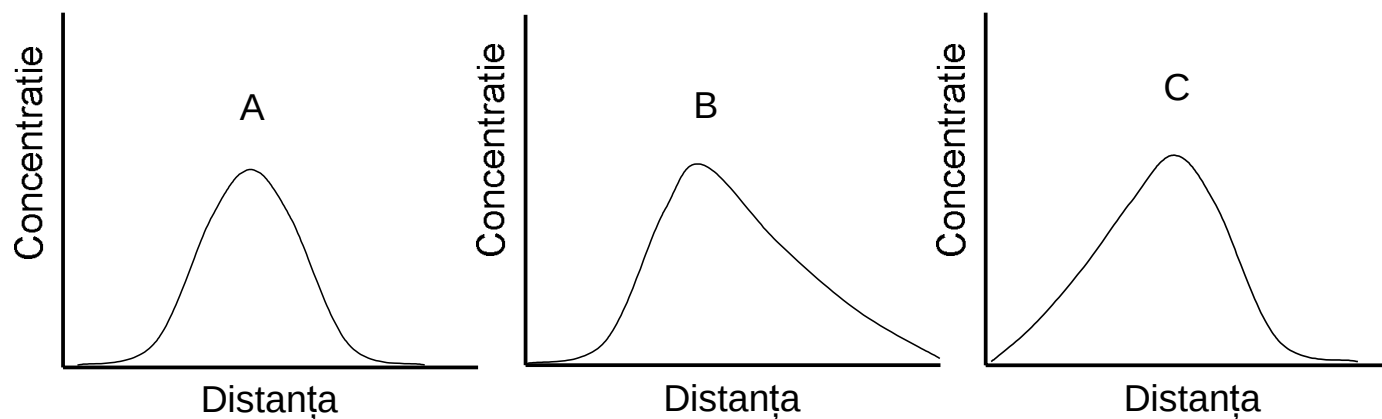
Tipuri de izoterme pentru distribuția unei specii între două faze.

Tipuri de izoterme si forma picurilor în cromatografie

La eluția unui amestec de componenți ce prezintă mobilități cromatografice apropiate și izoterme de distribuție curbe (convexe) apar dificultăți comparativ cu un amestec ce prezintă izoterme liniare

Dificultăți:

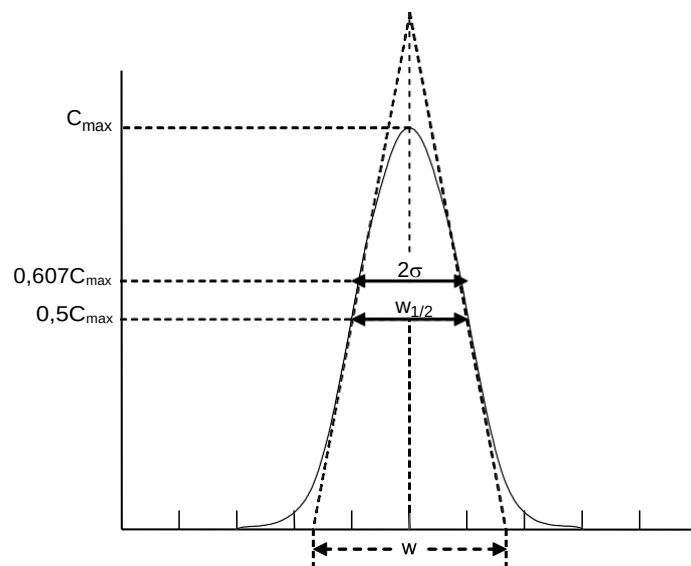
- dispersie mai mare a zonelor cromatografice
- suprapunerea parțială a zonelor
- lărgirea exagerată a benzilor (anvelopare)



Picuri distorsionate. Profilul concentrației unui analit de-a lungul coloanei funcție de distanța parcursă de la intrarea în coloană. A, profil pentru K_D constant. B, profil pentru izoterma de tip B. C, profil pentru izoterma de tip C.

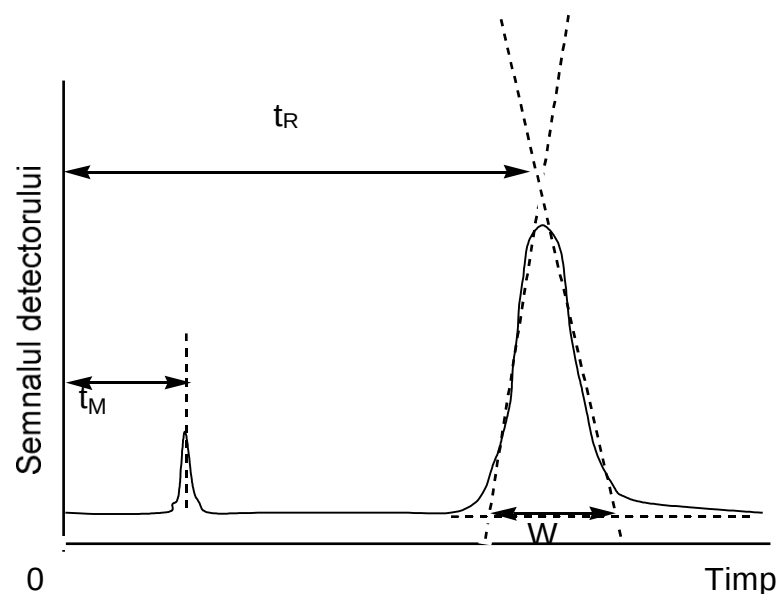
Distribuția benzilor cromatografice. Lărgirea benzilor cromatografice

- Lățire sau lărgirea picurilor - **proces inevitabil în cromatografie**
- **De nedorit** atunci când se are în vedere separarea unor picuri multiple
- **Picurile oblice sunt nedorite**
- Cu cât izoterma este mai convexă (concavă), cu atât efectul va fi mai pronunțat și mai dăunător
- Examinarea picurilor dintr-o cromatogramă reliefează **similarități cu o curbă de distribuție Gaussiană**



Diverse metode de a determina deviația standard din curba Gaussiană: $w_{1/2} = 2,354\sigma$; $w = 4\sigma$.

Informații ce se pot obține dintr-o cromatogramă

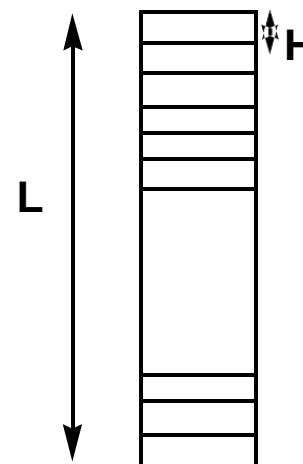


Profilul unei cromatograme obținută prin reprezentarea grafică a dependenței semnalului înregistrat funcție de timpul de înregistrare a cromatogramei
 w – lățimea picului la baza

- **Parametrii cantitativi**
 - înălțimea picului (h)
 - aria picului cromatografic (A) iar
- **Parametrii calitativi**
 - timpii de retenție ($t_R = L/v$ unde L este lungimea coloanei și v este viteza de eluție a unui component)
 - volumele de retenție
- Timpul mort, t_M , este timpul necesar eluentului sau unui component nereținut de faza staționară să ajungă la detector
- Timpul de reținere (retenție), t_R , reprezintă timpul necesar componentului să ajungă la detector

Informații ce se pot obține dintr-o cromatogramă

- Alți parametri specifici separărilor cromatografice includ eficiența și selectivitatea coloanelor cromatografice care se determină în funcție de:
 - N – numărul talerelor teoretice
 - H - înălțimea unui taler teoretic
 - α – factorul de selectivitate
- N, H sunt mărimi caracteristice dispersiei zonelor cromatografice**
- $N = L/H$
- H are semnificația unei lungimi din coloană, pe care se realizează echilibrul complet al componentului în cele două faze
- Estimarea lui H se poate face din:
 - teoria talerelor teoretice:** $H = L/N$
 - din teoria cinetică:**
 - $$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$
 - A, B, C – constante;
 - u – viteza liniară de deplasare a fazei mobile sau eluentului;
 - A – contribuția difuziei turbulente;
 - B – contribuția difuziei moleculare longitudinale;
 - C – contribuția transferului de masă între faze.



Tratarea ipotetică a unei coloane.

Caracteristica generală a parametrilor unei cromatograme



A faza mobilă ↔ A faza staționară

- **Coefficientul de partiție**

$$K_D = \frac{C_S}{C_M}$$

- **Timpul de retenție**

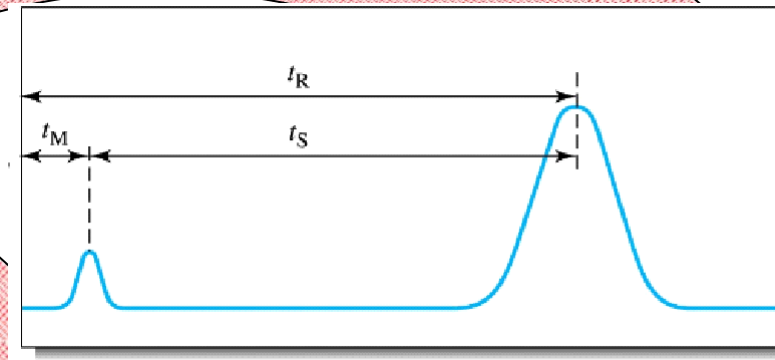
- parametrul calitativ care redă timpul necesar după efectuarea injectiei pentru ca picul analitului să ajungă la detector (t_R)
 - **Timpul mort** - timpul necesar speciilor nereținute de coloană să ajungă la detector (t_M)
- **Viteza liniară medie v** (deplasarea analitului prin coloană)

$$v = \frac{L}{t_R}$$

- **Viteza liniară medie u** (deplasarea moleculelor fazei mobile)

$$u = \frac{L}{t_M}$$

- L - lungimea coloanei



Caracteristica parametrilor cu care se operează

- **Factorul de capacitate k_A'**
- parametru important folosit pentru descrierea vitezelor de migrare a analiților prin coloană
- funcție de tipul cromatografiei implicate, de adsorbție, de schimb ionic, de excluziune sterică, factorul a fost denumit coeficient de adsorbție, de distribuție ionică, respectiv de difuziune.
- pentru o specie oarecare A, factorul de capacitate k_A' este definit prin relația:

$$k_A' = \frac{K_A V_S}{V_M}$$

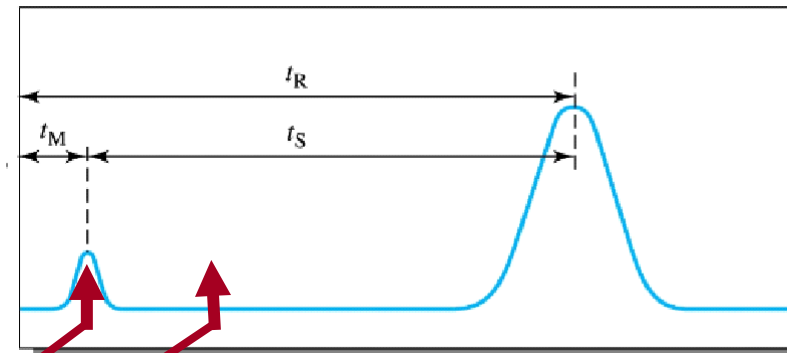
$$v = u \times \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S} = u \times \frac{1}{1 + C_S V_S / C_M V_M} = u \times \frac{1}{1 + K V_S / V_M}$$

$$v = u \times \frac{1}{1 + k_A'}$$

- factor de capacitate mare indică o reținere mai puternică în coloană a unui component
- cuprinși între 1 și 5

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} \times \frac{1}{1 + k_A'}$$

$$k_A' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$



$$k' = 0$$

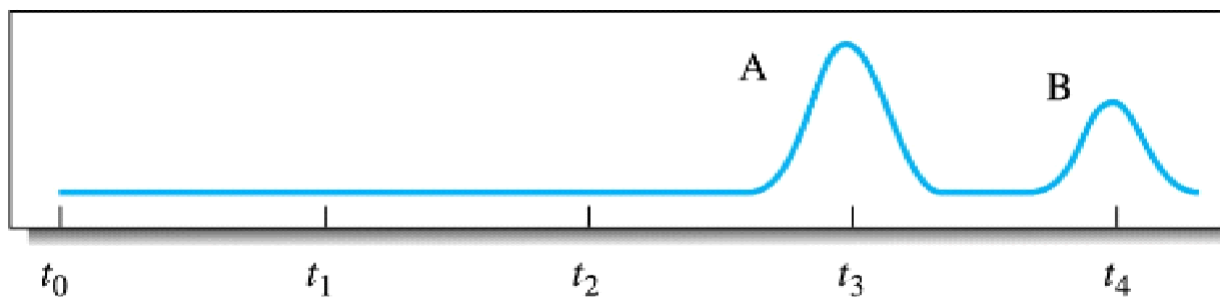
$$k' > 1$$

Overview pentru parametrii cu care se operează



- **Factorul de separare (selectivitate) α**

- descrie diferențele ce apar între vitezele de migrare specifice componentelor
- trebuie să fie întotdeauna mai mare decât 1
- este definit prin raportul dintre coeficientul de partiție dintre componenta mai slab reținută (B) și coeficientul de partiție pentru specia mai puternic reținută sau mai lent eluată (A)



$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M}$$

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

$$k'_A = \frac{t - t_M}{t_M}$$

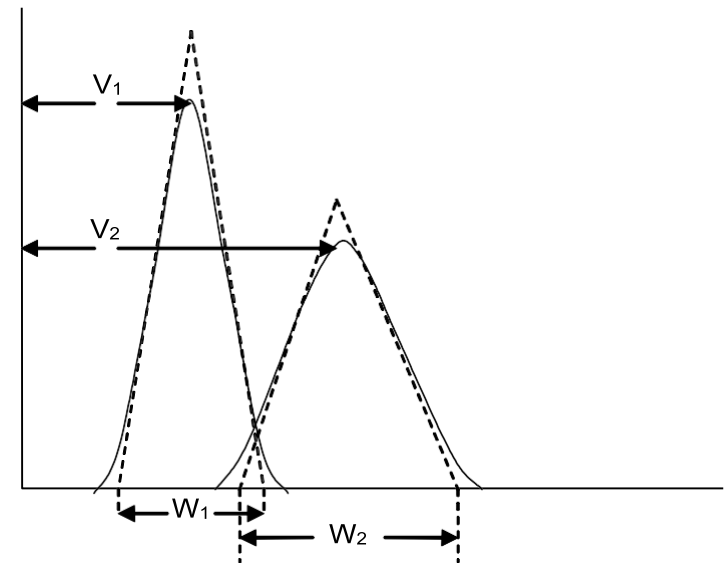
$$\alpha = \frac{t_{R(B)} - t_M}{t_{R(A)} - t_M}$$

Caracteristica parametrilor cu care se operează

Rezoluția (R)

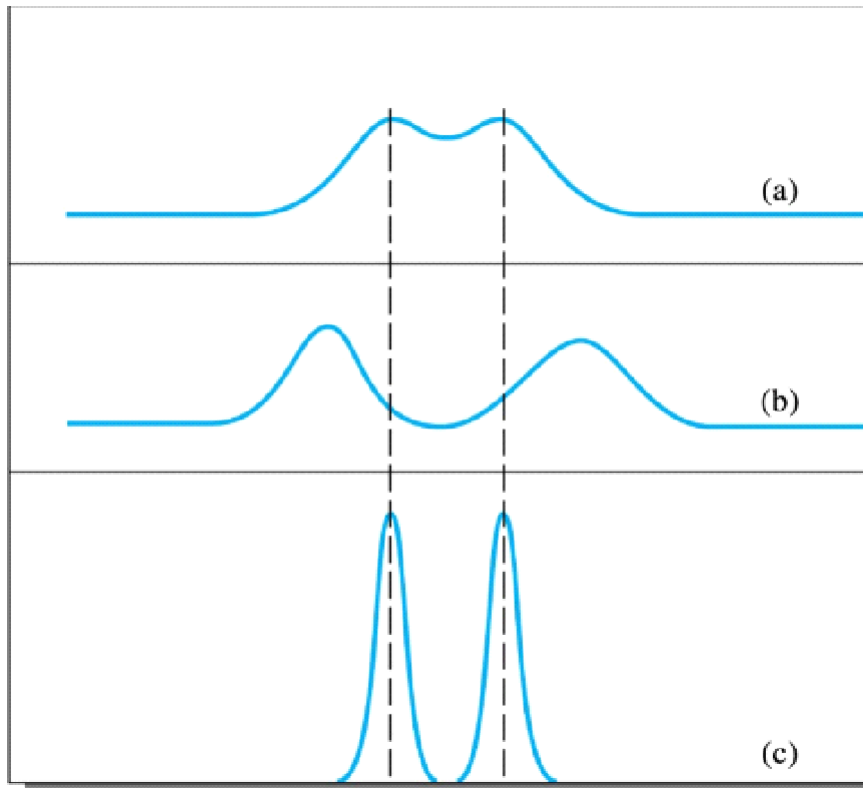
- termenul cel mai adesea utilizat pentru a descrie calitatea separării cromatografice
- furnizează o măsură cantitativă a capacității coloanei de a separa doi analiți
- V_1 și V_2 sunt volumele de eluent folosite pentru eluția a doi analiți adiacenți
- w_1 și w_2 sunt lățimile picurilor la bază, determinate prin trasarea tangentelor la punctele de inflexiune ale picurilor ($\Delta Z = t_{R2} - t_{R1}$)

$$R_s = \frac{\Delta Z}{W_A/2 + W_B/2} = \frac{2 \cdot \Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$



Rezoluția la separarea a doi analiți printr-o coloană cromatografică.

Rezoluția și eficiența în separările cromatografice

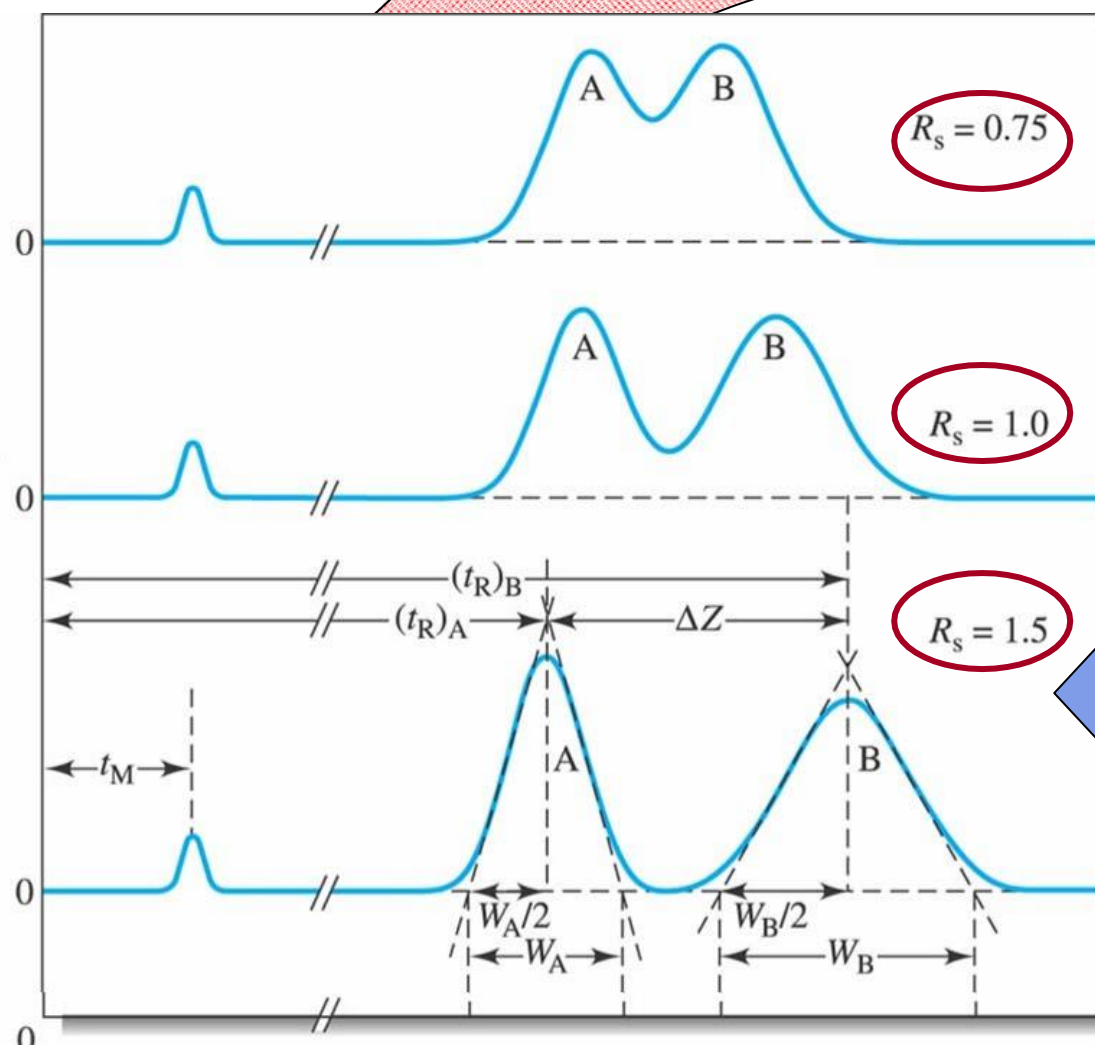


Eficiența scăzută
Rezoluție slabă

Eficiența crescută
Rezoluție bună

Picurile sunt rezolvate (separate) în totalitate atunci când nu se suprapun
Eficiența este o măsură a capacității coloanei de a separa (rezolva) două picuri

Rezoluție și suprapunerea picurilor



$$R_s = \frac{\Delta t_R}{\bar{w}}$$

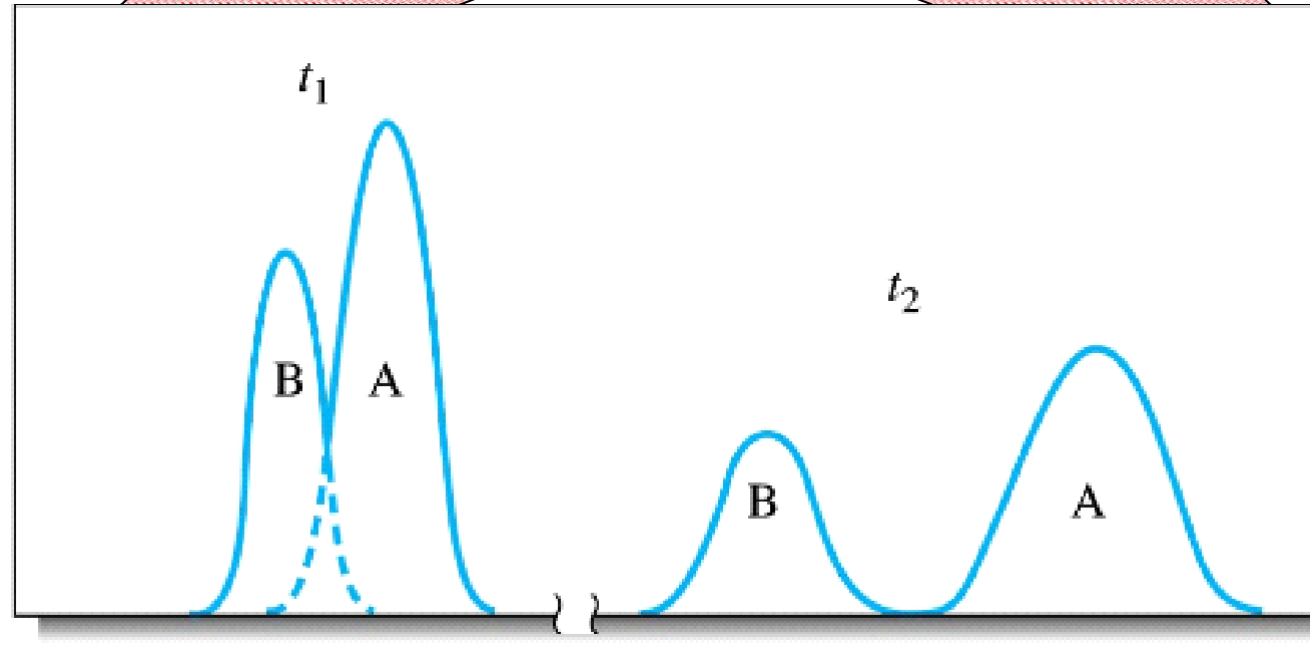
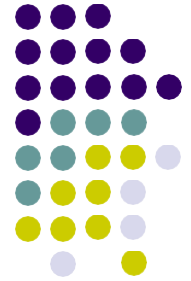
$$R_s = \frac{t_{R(B)} - t_{R(A)}}{0,5(w_{(A)} + w_{(B)})}$$

Rezoluție
 $R_s \geq 1.5$

Rezoluții ≥ 0.8 sunt necesare pentru a obține arii de încredere ale picurilor cromatografice



Migrarea soluțiilor și lărgirea benzilor



Odată cu migrarea soluțiilor prin coloana

- are loc separarea
- intervine efectul de lărgire a benzilor cromatografice

Dacă efectul de lărgire este marcant, este posibil ca separarea să nu aibă loc.
De aceea, efectul de lărgire trebuie minimizat.

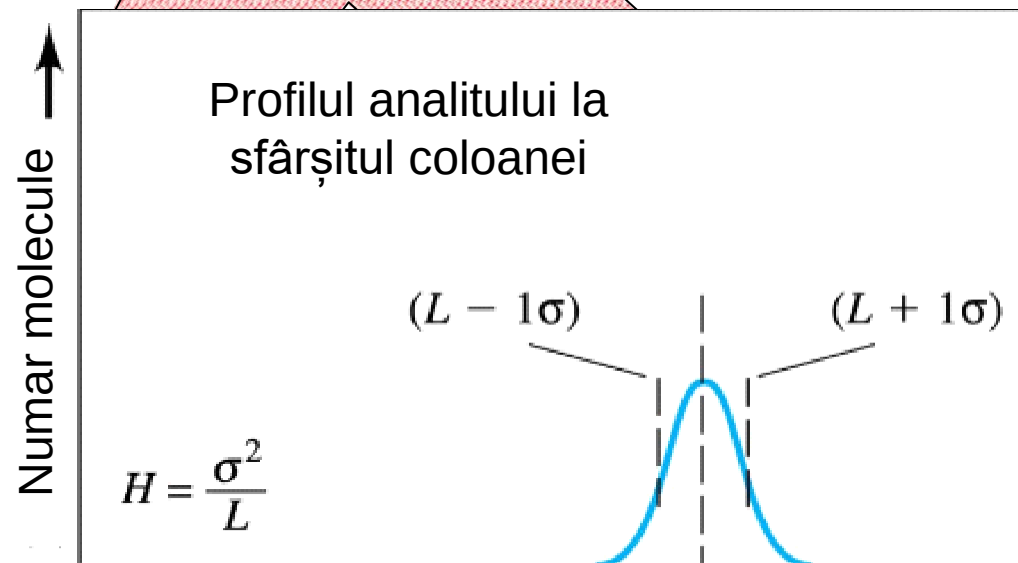
Eficiența coloanei sau înălțimea unui taler, H

Dispersia pe unitatea de lungime



Dispersare: Împrăștiere.

Deviația standard (σ) este o măsură a dispersiei



Înălțimea unui taler

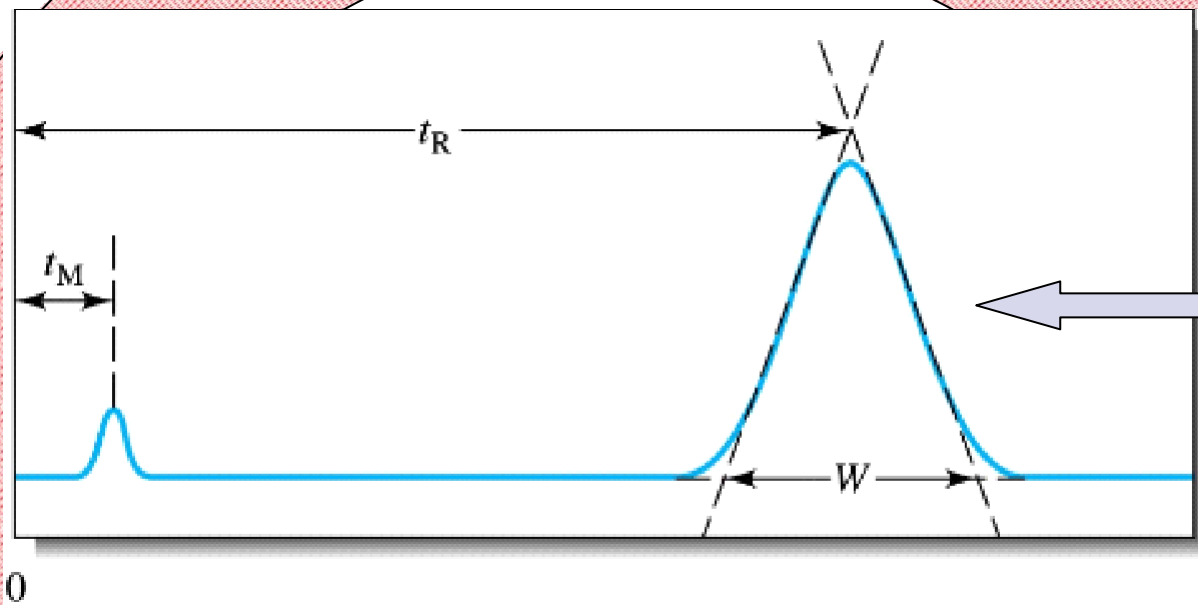
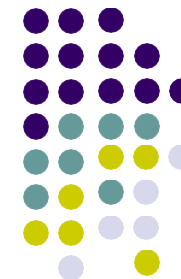
$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$



Pentru a minimiza efectul de lărgire:

- minimizarea dispersiei (σ)
- minimizarea lui H

Calculul numărului de talere si a înălțimii unui taler



Punct de
inflexiune

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2$$

$$H = \frac{L}{N}$$

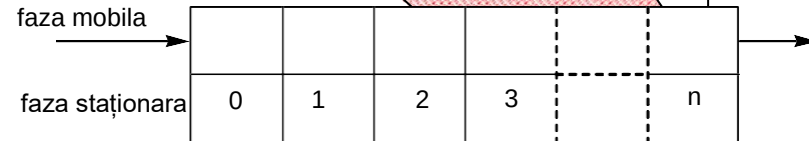
t_r si w trebuie sa aibă aceleași unități (timp sau distanța)

Teorii care guvernează separările cromatografice

- **Teoria talerelor**
- **Teoria cinetică**
- Eficiența coloanelor cromatografice crește odată cu creșterea numărului talerelor și odată cu scăderea înălțimii talerului
- Eficiența, în termeni de număr de talere, poate varia de la câteva sute la câteva sute de mii, în timp ce, înălțimea unui taler poate varia de la câteva zeci la o mie μm , sau chiar dimensiuni mai mici.

Teoria talerelor

- Nu reprezintă o teorie cromatografică propriu-zisă
- Este mai mult o adaptare analogică pentru procesul cromatografic
- A fost dezvoltată de către Martin și Syng



Sistemul anterior prezentat include o serie de talere pe parcursul cărora conținutul fazei mobile din talerul 0 este transferat în talerul 1, ulterior 2, în timp ce conținutul corespunzător fazei staționare rămâne stabil. Se poate considera o moleculă care se află în talerul 0. După echilibrare, faza mobilă din talerul 0 este transferată în talerul 1 cu o probabilitate p . Cu alte cuvinte, se poate spune că un transfer va permite deplasarea moleculei printr-un număr de p talere astfel încât, numărul etapei (M) în care molecula se află cu cea mai mare probabilitate după un număr de r transferuri va fi dat de relația

- $M = r \times p$. Pentru un număr mare de molecule, talerul M este talerul în care concentrația moleculelor va fi maximă.
- **Limitări ale teoriei talerelor:**
 - are capacitate redusă de a prezice valori reale
 - poate oferi o relație de legătură credibilă între lărgimea benzii și lungimea acesteia
 - nu poate furniza o modalitate de prezicere a mărimii dispersiei
 - nu pot fi prezise efectele modificării unor variabile cum ar fi debitul sau dimensiunea particulei, întrucât nu se țin cont de acești factori
- **Avantaj - simplitatea abordării**

Teoria cinetică și variabile cinetice care afectează lărgirea benzilor



- **Cauze care conduc la lărgirea benzilor:**

- echilibrul de distribuție al solutului între faze nu se stabilește instantaneu în toate punctele coloanei
- apar modificări în structura solidelor din faza staționară datorită diferențelor dintre faza mobilă și faza staționară
- curgerea fazei mobilă are loc în mod întâmplător prin canale de lungimi diferite și direcții diferite antrenând moleculele de solut cu viteze diferite (proprii cromatogramelor ideale)
- faza staționară solidă reține o parte din faza mobilă care rămâne fixată în micropori, participând în final la procesul de separare
- distribuția fazei staționare lichide sub formă de filme neuniforme în jurul granulelor de suport (solid inert)
- Eficiența unei coloane cromatografice poate fi aproximată de expresia
- $H = B/u + C_s u + C_M u$ (ecuația lui Van Deemter)
- **Eficiența coloanei controlată prin:**
 - **diametrul particulelor umpluturii**
 - **diametrul coloanei**

Contribuțiile
coeficienților
transferului de masă la
înălțimea talerelor, H.

