

Metode cromatografice de analiză



Principii fundamentale

Analiza chimică cromatografică este un domeniu al analizei instrumentale, care include mai multe metode de separare și totodată de analiză calitativă și cantitativă a componentelor probei analizate.

Cromatografia s-a dezvoltat inițial ca metode sau tehnici de separare.



Principii fundamentale

- În toate variantele, separarea precede analiza (**calitativă și cantitativă** a compușilor separați)
- separarea se realizează prin repetarea, de un număr foarte mare de ori, a echilibrului de distribuție a soluțiilor între două *faze*:
 - *fază staționară* (fixa) – aflată într-un tub numit coloană sau pe o suprafață plană;
 - *faza mobilă* (*eluent*) - aflată în mișcare, se deplasează prin golurile primei faze.

Analiza chimică cromatografică

- 1901, botanistul rus Tsvet a separat pigmenții vegetali pe o coloana umplută 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 configuratia sistemului cromatografic



A - *Clasificarea în funcție de mecanismul separării*

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



B - Clasificarea în funcție de natura fazelor cromatografice

- **Faza mobila:**

- gazoasa
- lichida.

- **Faza staționara:**

- Solida
- lichida - care trebuie fixata pe un suport solid corespunzător, în general un material poros



Tipuri de metode cromatografice in functie 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)



C - Clasificarea în funcție de configurația sistemului cromatografic

- **1. Cromatografie pe coloana** - faza fixa este depusa într-o coloana verticala
 - 1.1. Cromatografie pe coloane clasice (cu umplutura)
 - 1.2. Cromatografie pe coloane capilare
 - **OBS: Diametru coloana 1.1 >>>> 1.2**
- **2. Cromatografie planara** - faza fixa este depusa pe o suprafața plana)
 - 2.1. Cromatografie în strat subțire
 - 2.2. Cromatografie pe hârtie

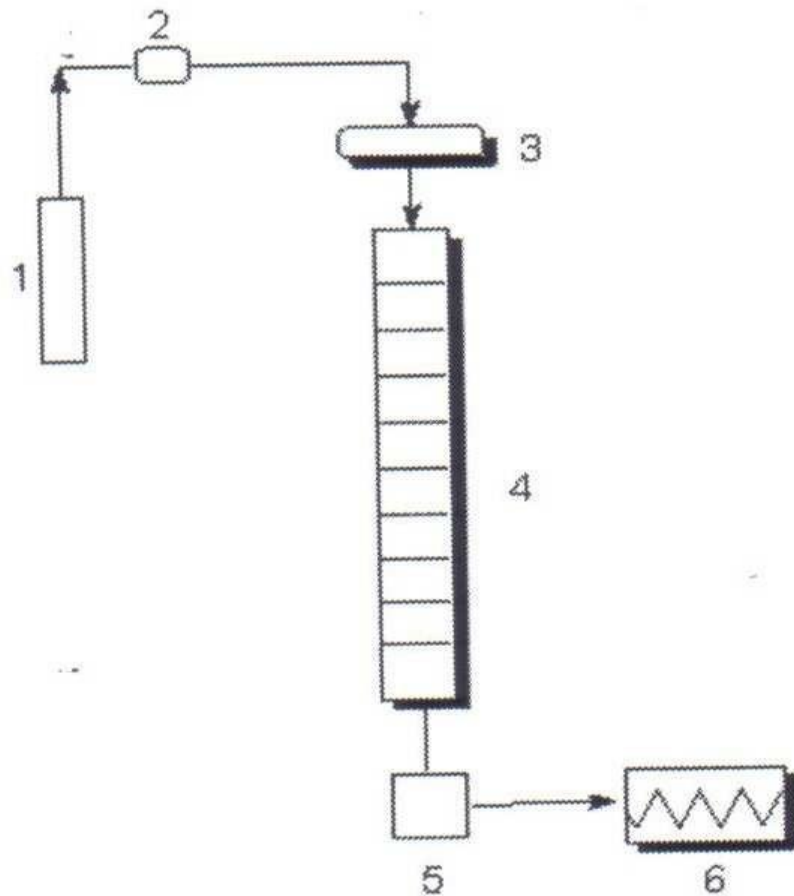


FAZELE procedeeelor cromatografice

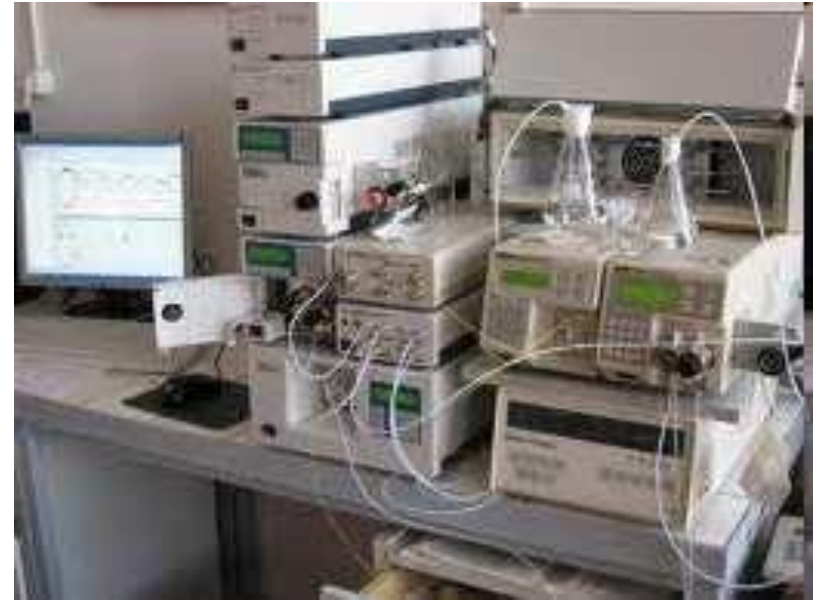
Procedeele cromatografice includ următoarele **faze**, indiferent de tipul metodei:

1. prepararea fazei staționare (in coloana sau pe placa)
2. introducerea probei
3. trecerea probei (dizolvata sau sub forma de gaz) peste faza staționară
4. separarea componentelor pe faza staționara
5. colectarea componentilor amestecului prin eluare (preluare) cu solvenți (gaz sau lichid) potriviți
6. analiza calitativă
7. analiza cantitativă

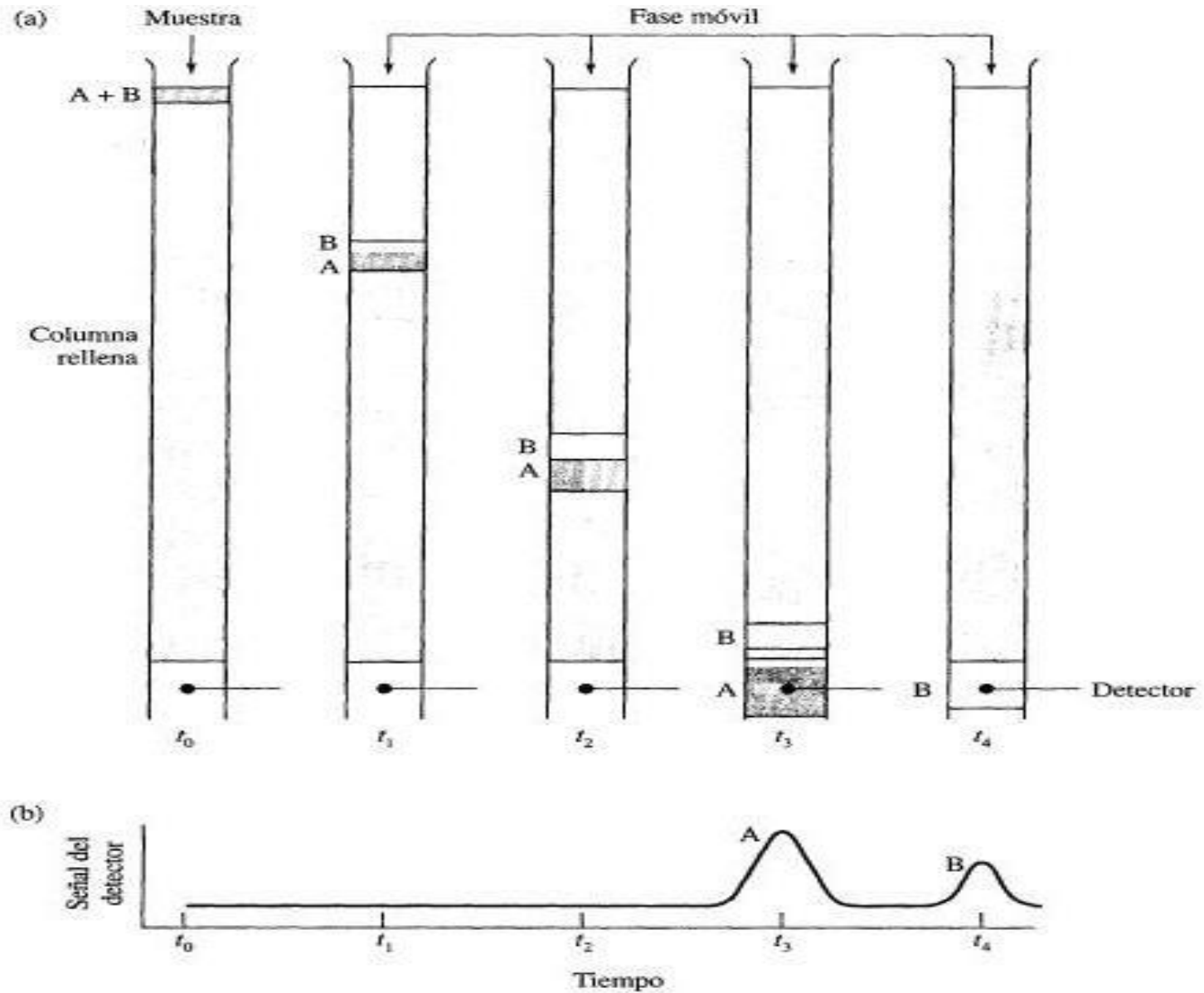
Schema de principiu a unui cromatograf

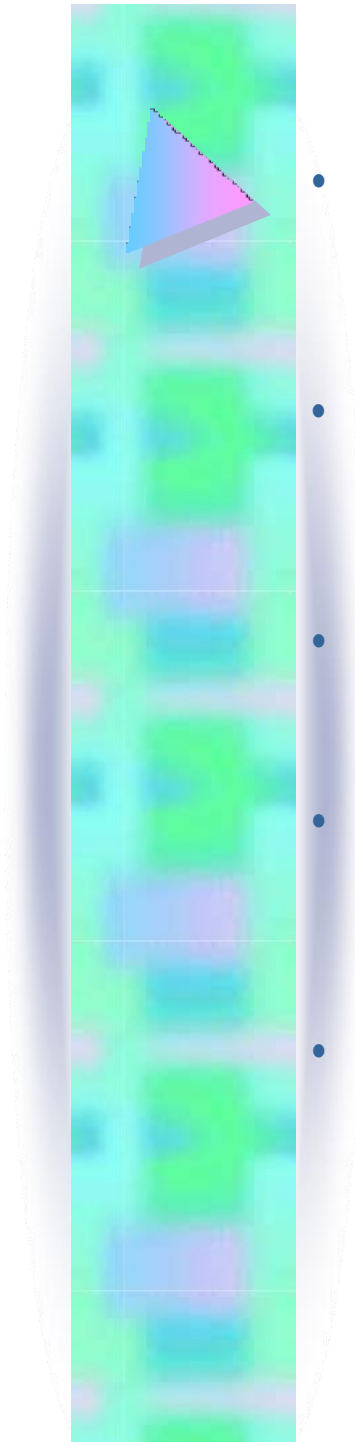


- 1 - rezervor faza mobila
- 2 - dispozitiv de reglare si
masurare a debitului
- 3 - dispozitiv de introducere a
probei
- 4 - coloana cromatografica
- 5 - detector
- 6 - înregistrator sau integrator



Dinamica procesului cromatografic





- Faza solidă este introdusă într-un tub cilindric închis la partea de jos printr-un dop de vată de sticlă sau un disc poros.
- La partea superioară se introduce proba care conține doi compuși A și B dizolvanți într-o cantitate cât mai mică de solvent (momentul t_0).
- Începe introducerea fazei mobile și cei doi componenți migrează diferit în coloană.
- Momentul t_1 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_2 .

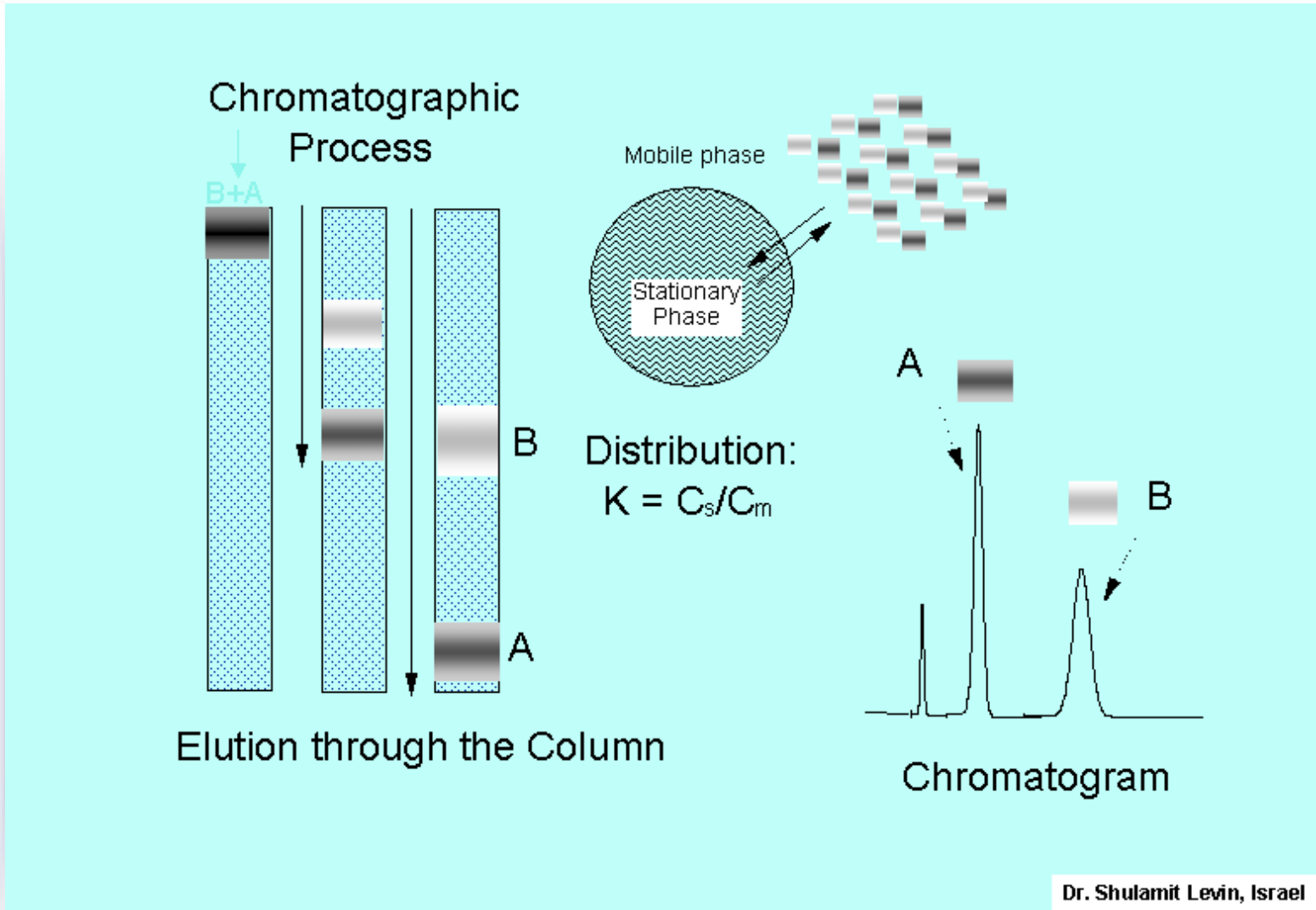
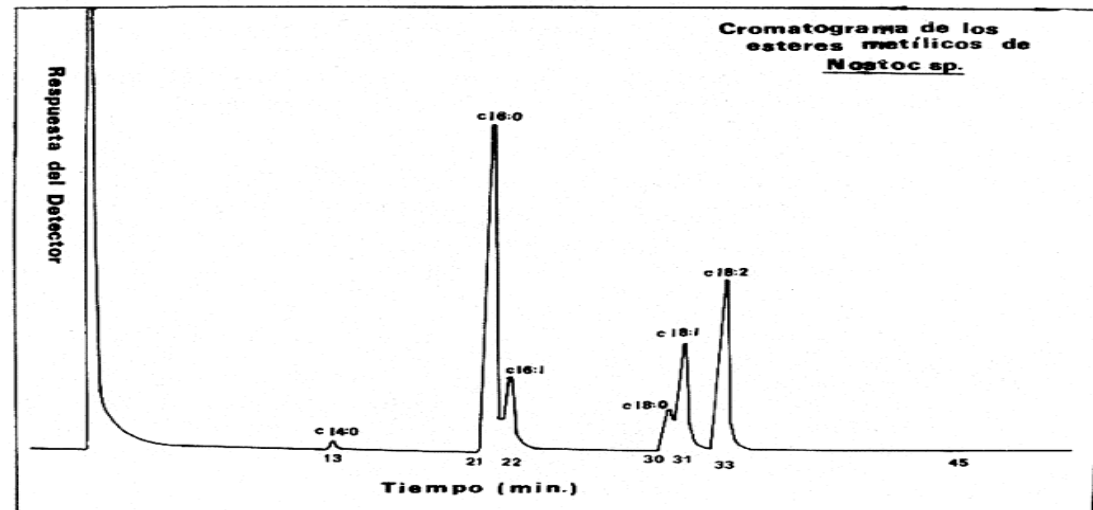
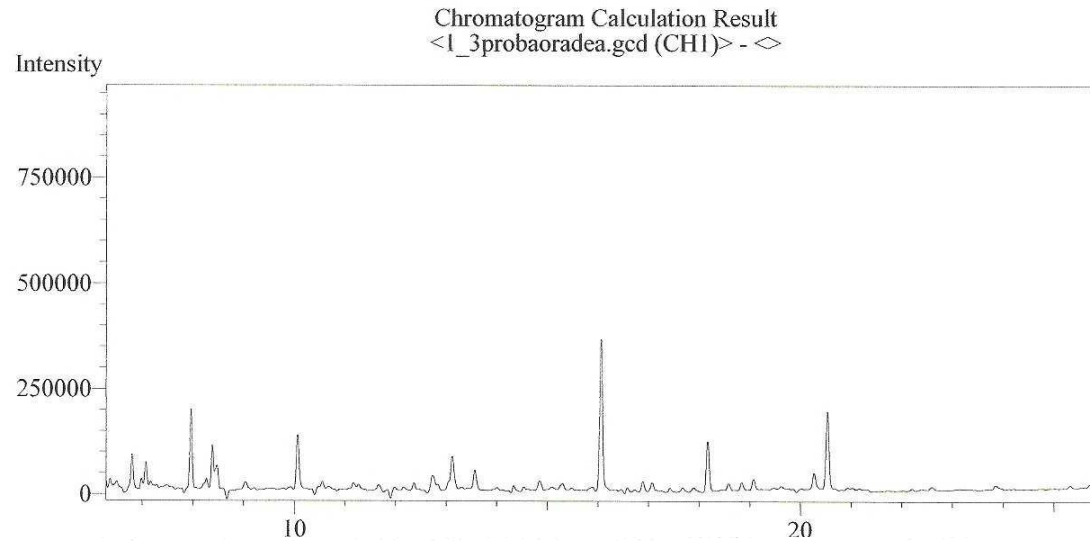
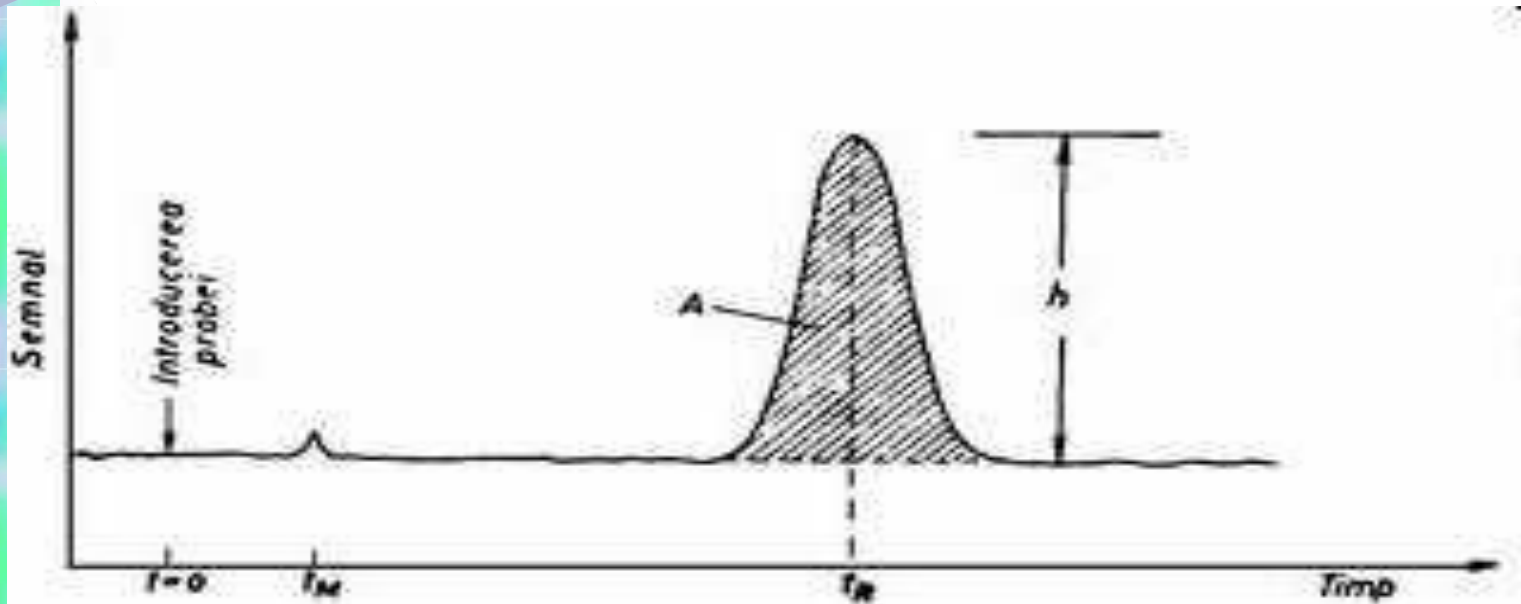


Diagrama care reprezintă rezultatul analizei cromatografice se numește **cromatograma**

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



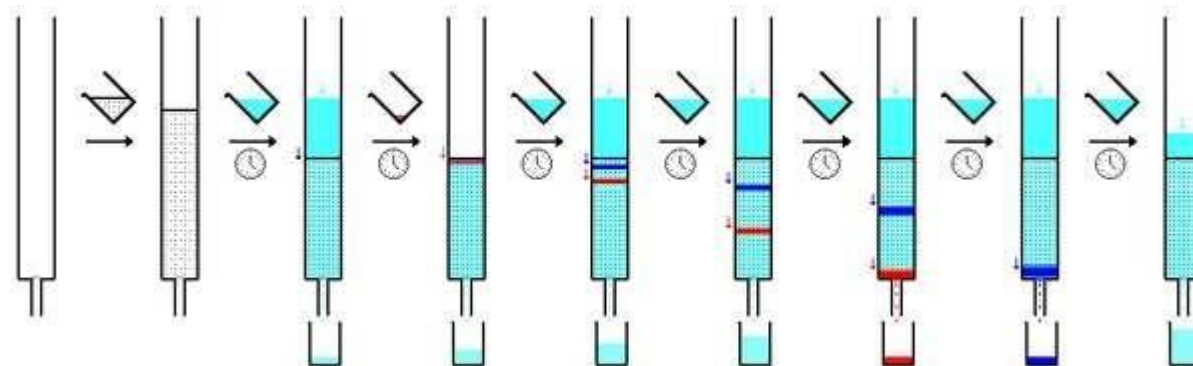
Elemente de bază ale cromatogramei




1. **Picurile cromatografice**
2. **Timpul de retenție, t_R - mărime caracteristică 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 (**in prezent utilizată numai pentru preparare/purificare probe**);





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

Principalele tehnici cromatografice

1. **Cromatografia în strat subțire (CSS)**
2. **Cromatografie de gaz (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 fixa – strat subțire de material solid deșus pe un suport plan
 - Faza mobilă – lichida (singular sau amestecuri)



Faza fixa

- Silicagel
- Oxid de aluminiu
- Kieselgur

Faza mobila

- 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;
- Reproductibilitatea rezultatelor.

Dezavantaje:

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



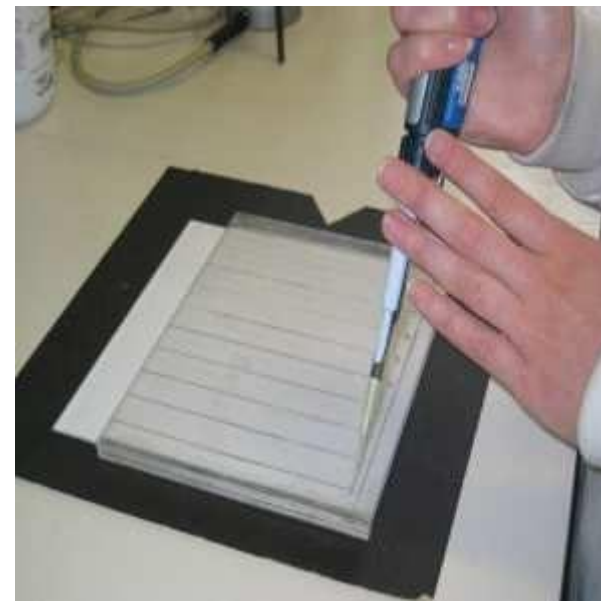
Etape

- **Aplicarea probei (spotare)**
- **Developare**
- **Relevarea componentelor amestecului**
- **Determinare calitativa**
- **Determinare cantitativa**

Mod de lucru

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

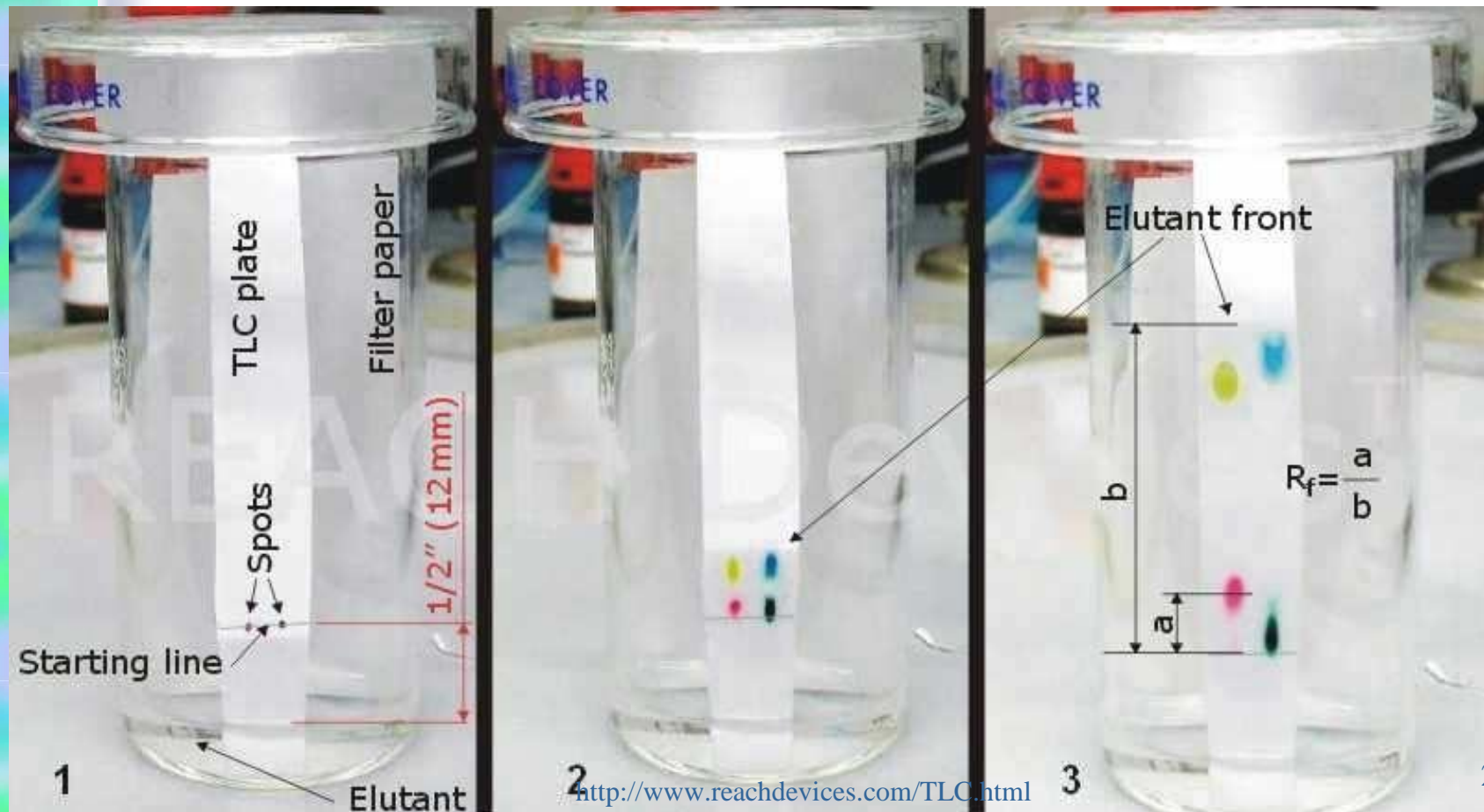
1. Spotare (spot = pata) - la o distanță de circa 1,5 cm de marginea plăcii se aplică o cantitate foarte mică de amestec al substanțelor ce urmează a fi separate → microseringi



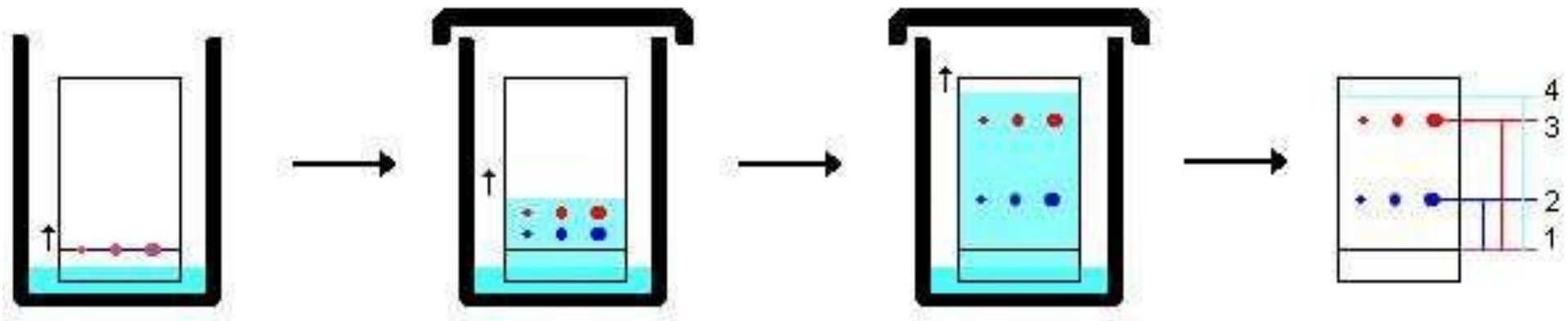
<http://www.virtual-labs.leeds.ac.uk/brewing/TLCtheory.php>



- Developare: se imersează 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 particulele 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

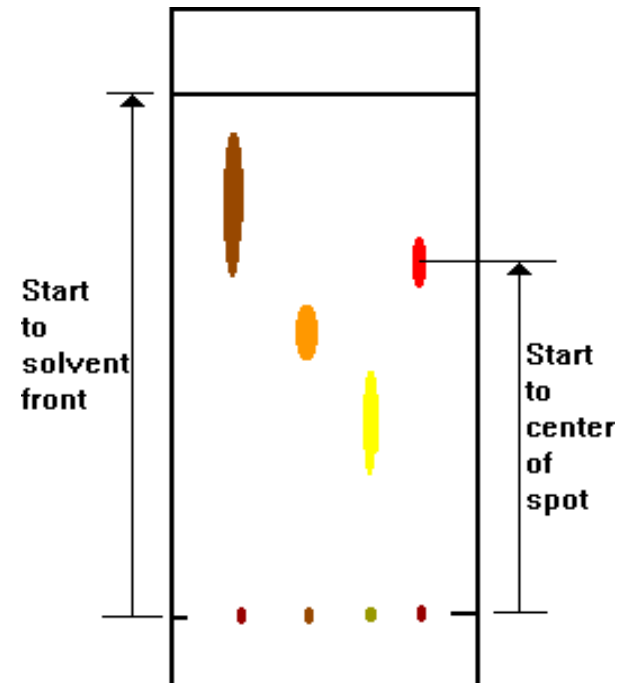


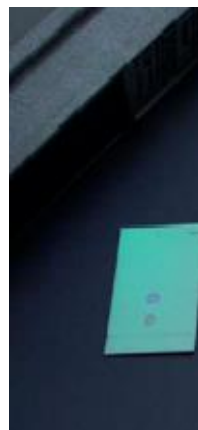
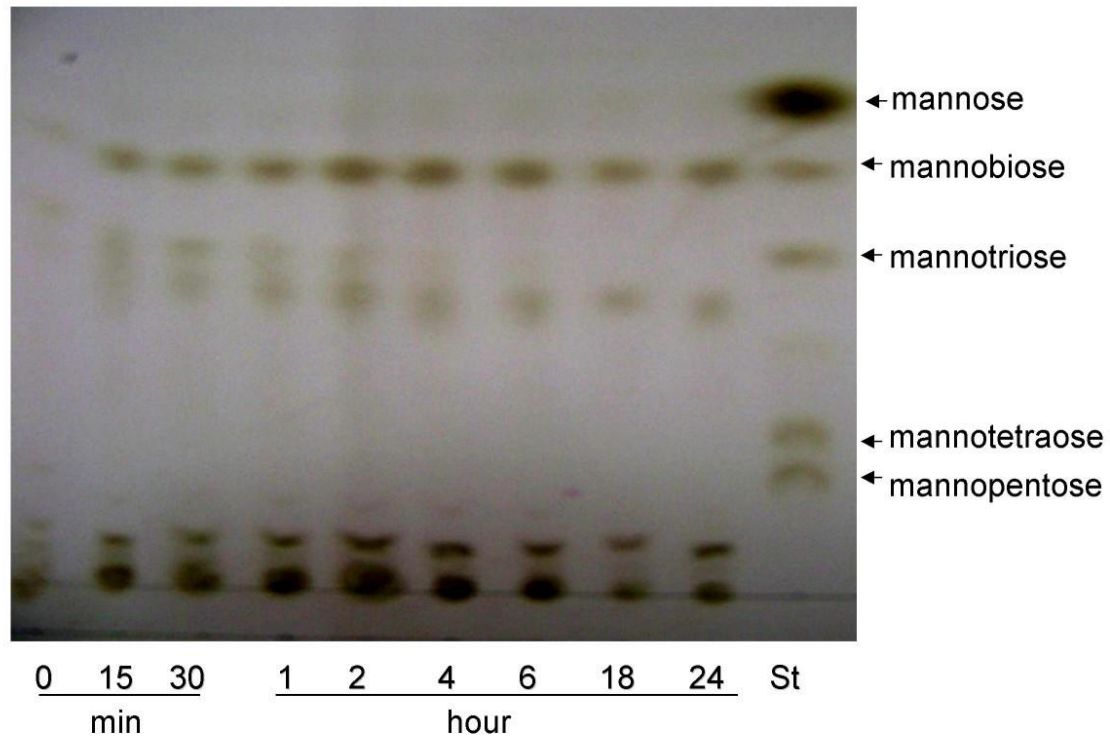
<http://www.bio-rad.com/en-za/applications-technologies/chromatography>

Determinarea calitativa

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

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





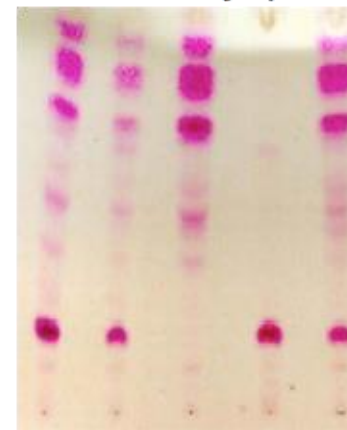
RF Value

0.92 →
 0.88 →
 0.89 →

0.24 →



Lipids sprayed with H₂SO₄ in ethanol





Determinarea cantitativă

1. Direct pe placa

1. Metoda comparării vizuale – semicantitativă
2. Metoda densitometrică

2. După eluția substanței din adsorbant

1. Spectrofotometrie UV-VIS;
2. Colorimetrie;
3. GC;
4. Voltametrie.



Metoda gaz cromatografică (GC)

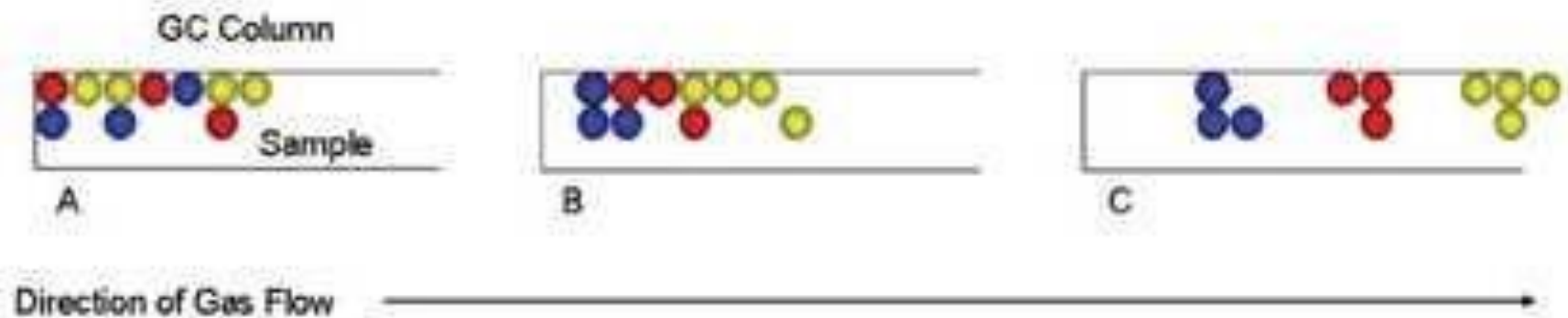
Principiul metodei

- 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 fixa.

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.

1



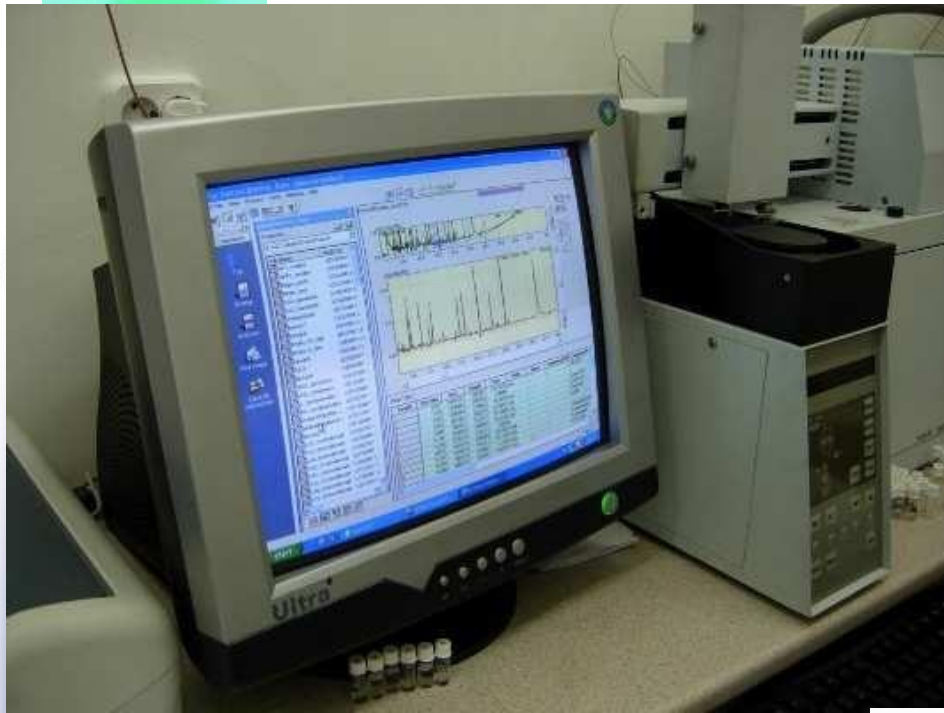


***Faza mobilă* → gaz**

hidrogenul, heliul, azotul sau argonul

Faza fixa

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





Coloane cromatografice

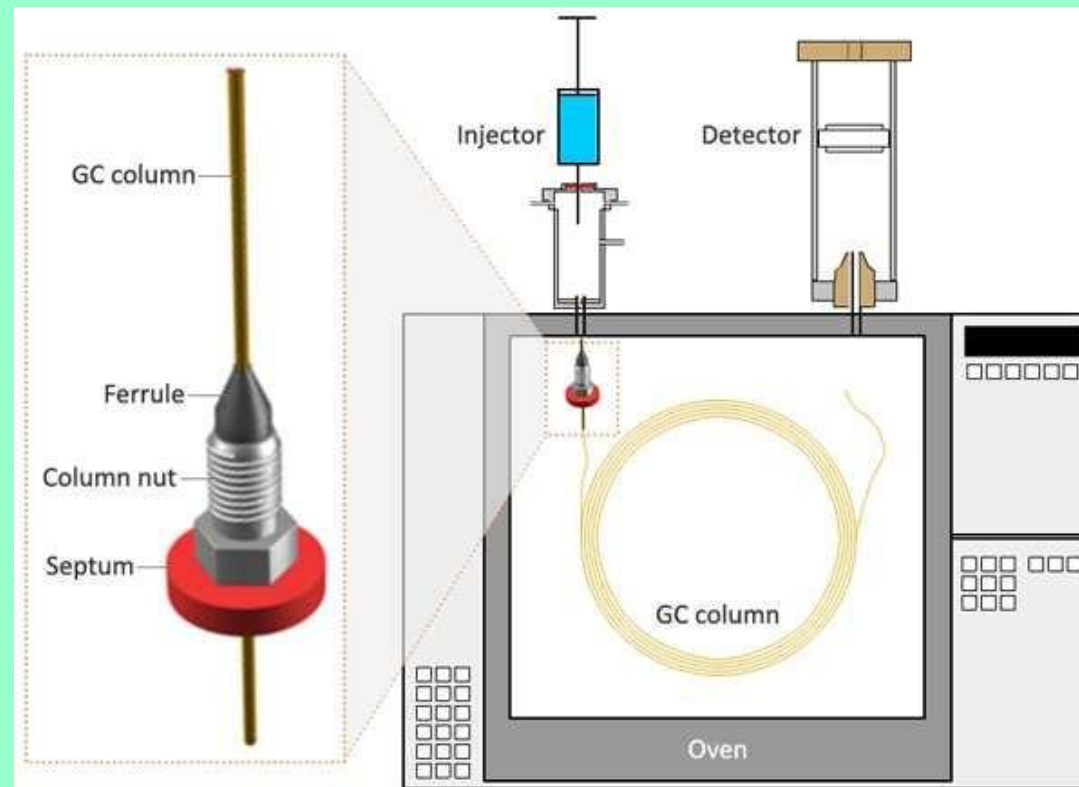
- coloane cu umplutură
- coloane capilare – cele mai eficiente



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. detector universal care permit
înregistrarea sigură a tuturor
componentelor probei

– *Ex: Detectorul cu ionizare în flacără (FID), catarametrul.*

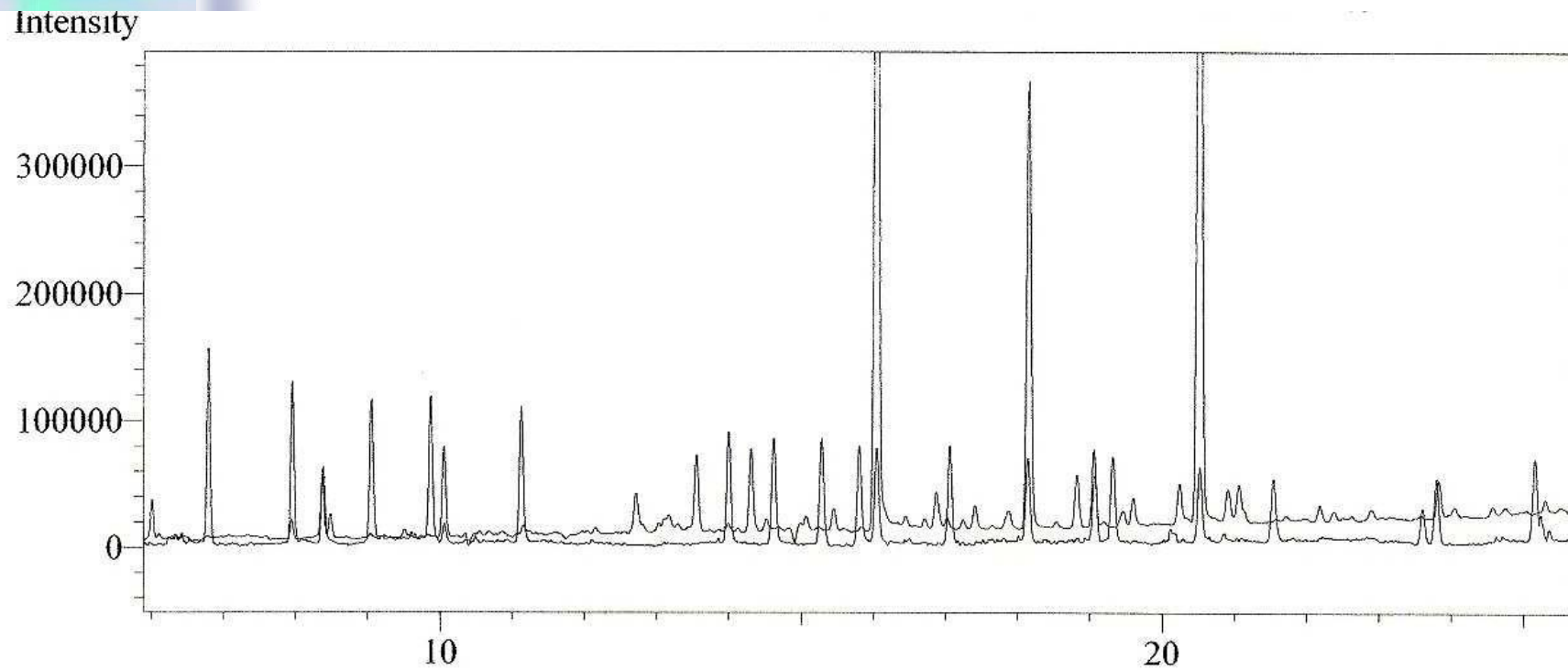
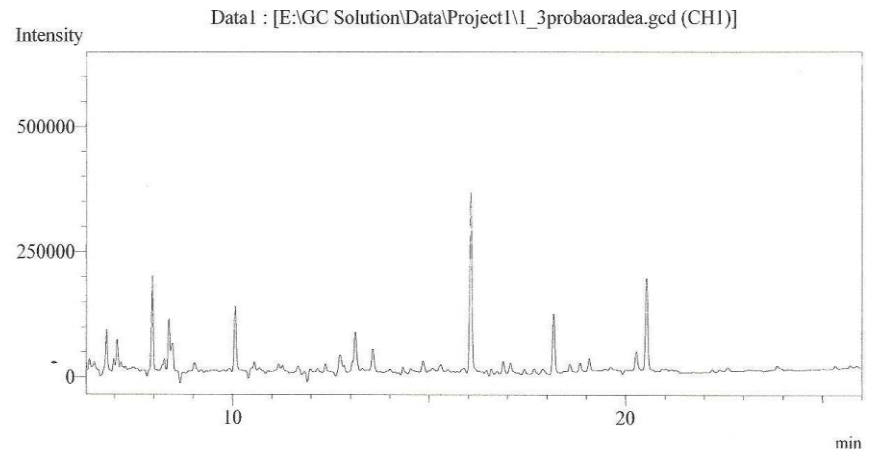
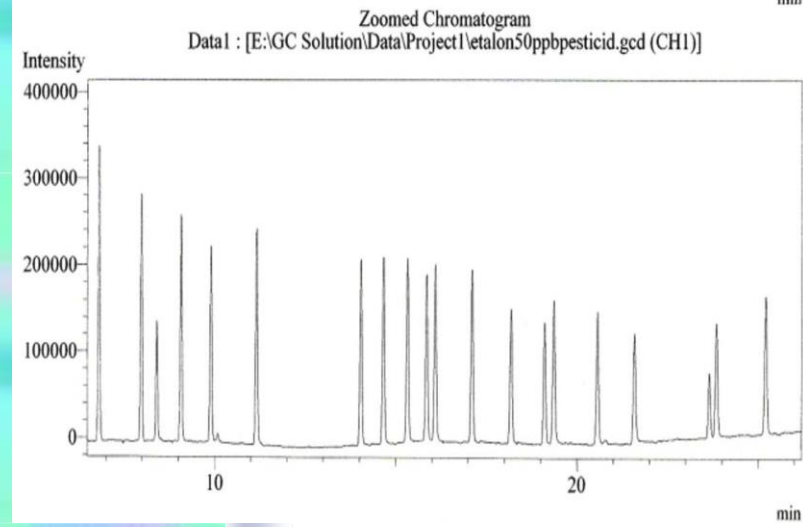
2. detectori specifici, care răspund doar
la anumite tipuri de molecule

– *Ex: Detectorul cu captura de electroni (ECD)*



Analiza cromatografica

- **Analiza calitativa** – pe baza comparării timpilor de retenție înregistrați pentru compușii din proba și pentru etaloane cunoscute.
- **Analiza cantitativa** – 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 refera la o gama extinsa de sisteme cromatografice care au în comun faptul ca utilizează o faza mobila lichida.



Avantaje (fata de GC)

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



Principiul metodei

- este analog cu cel de la 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 rând componentele amestecului.



Tehnici ale cromatografiei de lichide

- **cromatografia de adsorbție lichid-solid (LSC)**
- **cromatografia de repartiție 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 efluentului coloanei*

Ex: detectoarele de indice de refracție

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

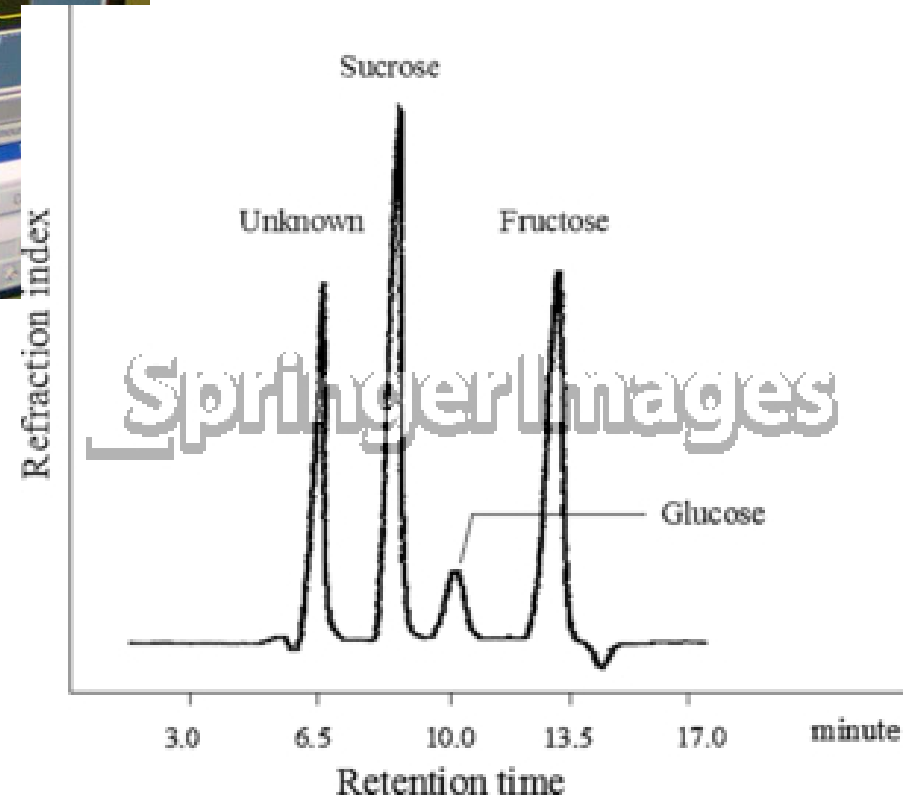
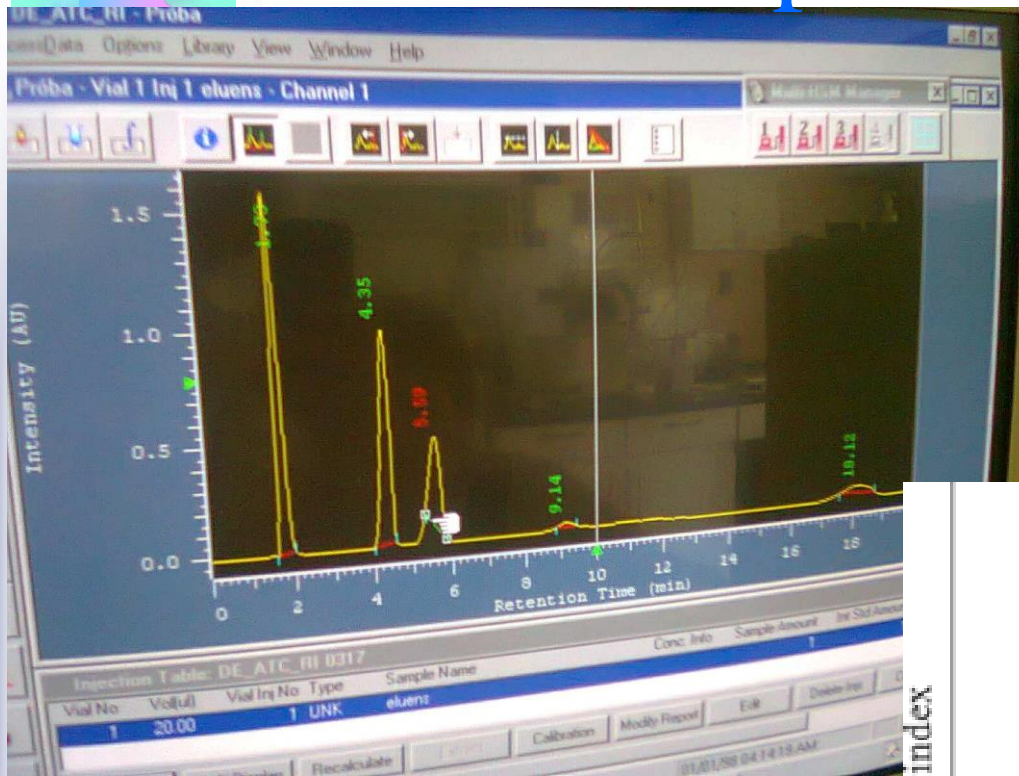
Ex: detectoarele spectrofotometrice

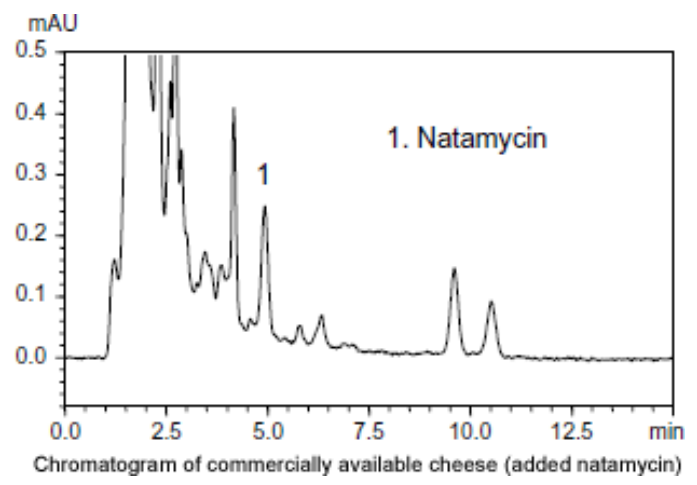
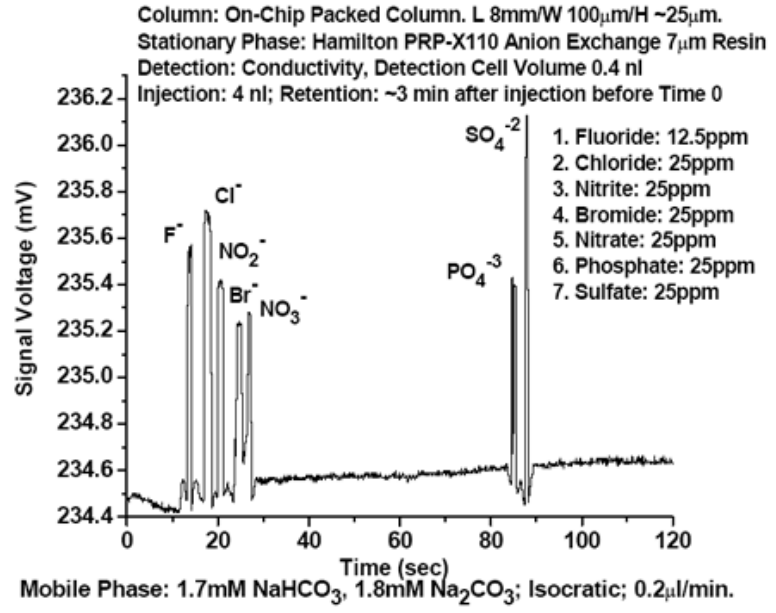
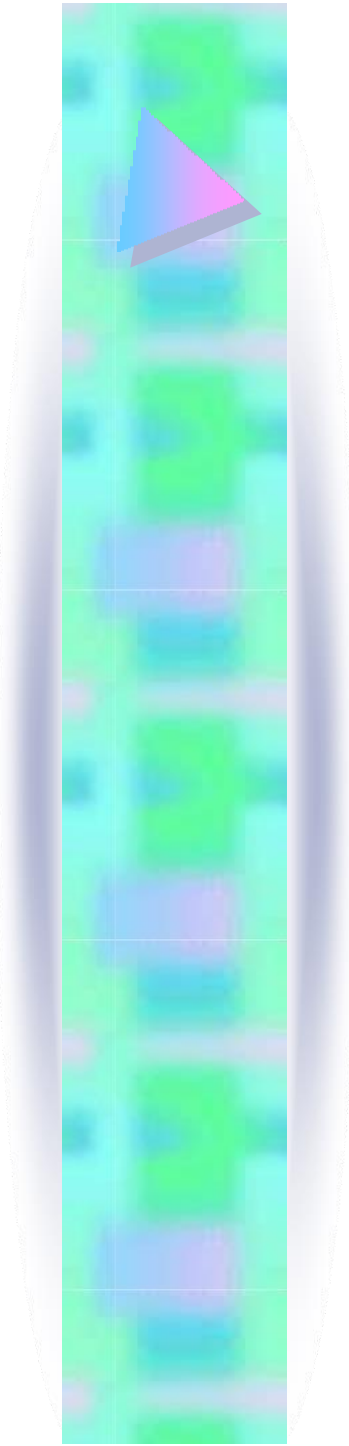


Analiza LC – ca și la GC

- **Analiza calitativă** – pe baza comparării timpilor de retenție înregistrați pentru compușii din proba 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







Aplicații ale metodelor cromatografice

- **Compenți majori: glucide, lipide, aminoacizi;**
- **Compenți minori: enzime, vitamine, antioxidanți naturali;**
- **Substanțe adăugate (aditivi alimentari): coloranți, antioxidanți, conservanți;**
- **Contaminanți 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 determinări calitative/cantitative.
2. Cel mai des se clasifică în funcție de natura fazelor cromatografice.
3. Fazele procesului cromatografic sunt aceleași indiferent de tehnica aplicata.
4. Semnalul analitic se numește cromatograma și ea este compusă dintr-o succesiune de picuri caracterizate de timpul de retenție (volum de retenție), înălțime și arie (în cazul cromatografiei cuplate cu detector masspectrometric este indicată masa molară a fracției ionice respective).
5. Cele mai utilizate tehnici cromatografice sunt:
 1. Cromatografia în strat subțire TLC
 2. Cromatografia de gaze GC
 3. Cromatografia de lichide LC



6. Detectarea compușilor separați se face în mod specific, în funcție de proprietățile acestora

7. În toate tehnicile cromatografice


- ▶ **Determinările calitative se bazează pe compararea timpilor de retenție ale etaloanelor cu cele din probe**
- ▶ **Determinările cantitative se bazează pe compararea ariilor (înălțimii) picurilor identificate în probă cu cele ale unor etaloane de concentrație cunoscută**

8. Tehnicile cromatografice au aplicații complexe în controlul calității produselor farmaceutice, alimentare, industria chimică, prelucrării petrolului etc.



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 în dependență de mecanismul de separare, natura fazelor cromatografice, *configurația sistemului cromatografic***
5. **Dați minim câte doua ex de aplicare a CSS/CG/LC în domeniul controlului calității diferitor produse**
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 la 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 calitativa/cantitativă în determinările CSS?**
 - 13. Care este faza fixă și cea mobilă la CG?**
 - 14. Care este principiul determinării CG?**



15. Pe ce se bazează determinarea calitativa/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 calitativa/cantitativă în determinările cromatografice de lichide?