



Интегрисане академске студије фармације  
Инструменталне методе- Б14

**П6. Инструменталне хроматографске методе.  
Гасна хроматографија.**

**Проф. др Недељко Манојловић**

# Хроматографија



- **Хроматографија** је поступак који омогућава раздвајање, изоловање, идентификацију и одређивање састојака смесе на основу процеса који се дешавају на граници две фазе које се не мешају.
- Идентификација се врши на основу  $R_f$  вредности или ретенционог времена.





- **стационарна фаза** ( може бити порозно или гранулисано чврсто тело, течност, танак слој течности апсорбован на чврстом телу )
- **мобилна** фаза (може бити гас или течност)

Подела према физичком стању фаза:

**а) Течна хроматографија**

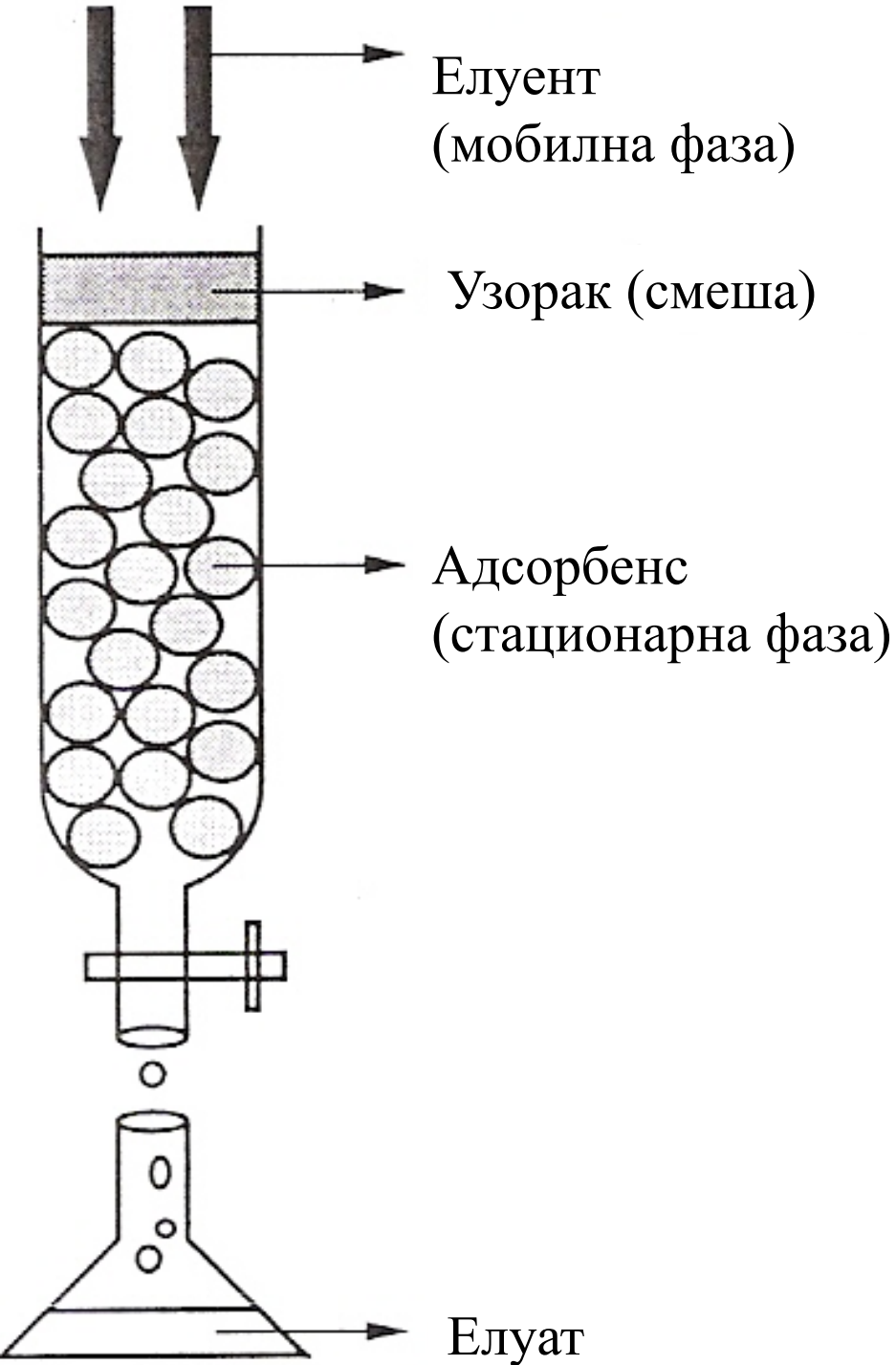
- Адсорпциону (TLC, HPLC)
- Јоноизмењивачка (јонска)
- Ексклизиона
- Подеону (партиципиону)

**б) Гасна хроматографија**

Гас/течно

Гас/чврсто

**в) Суперкритична флуидна хроматографија**

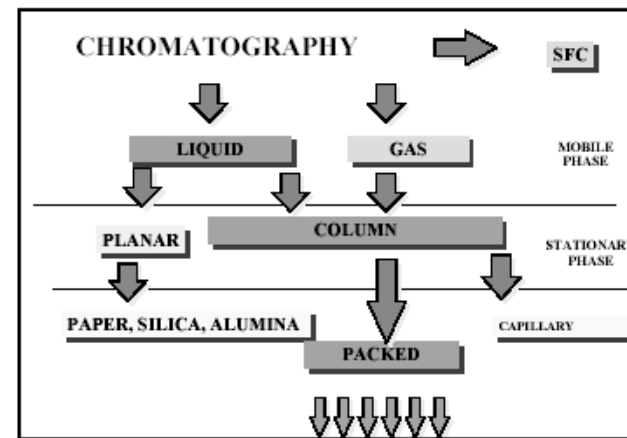
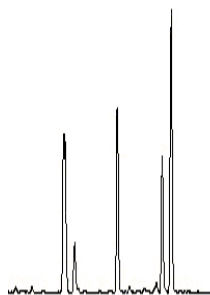
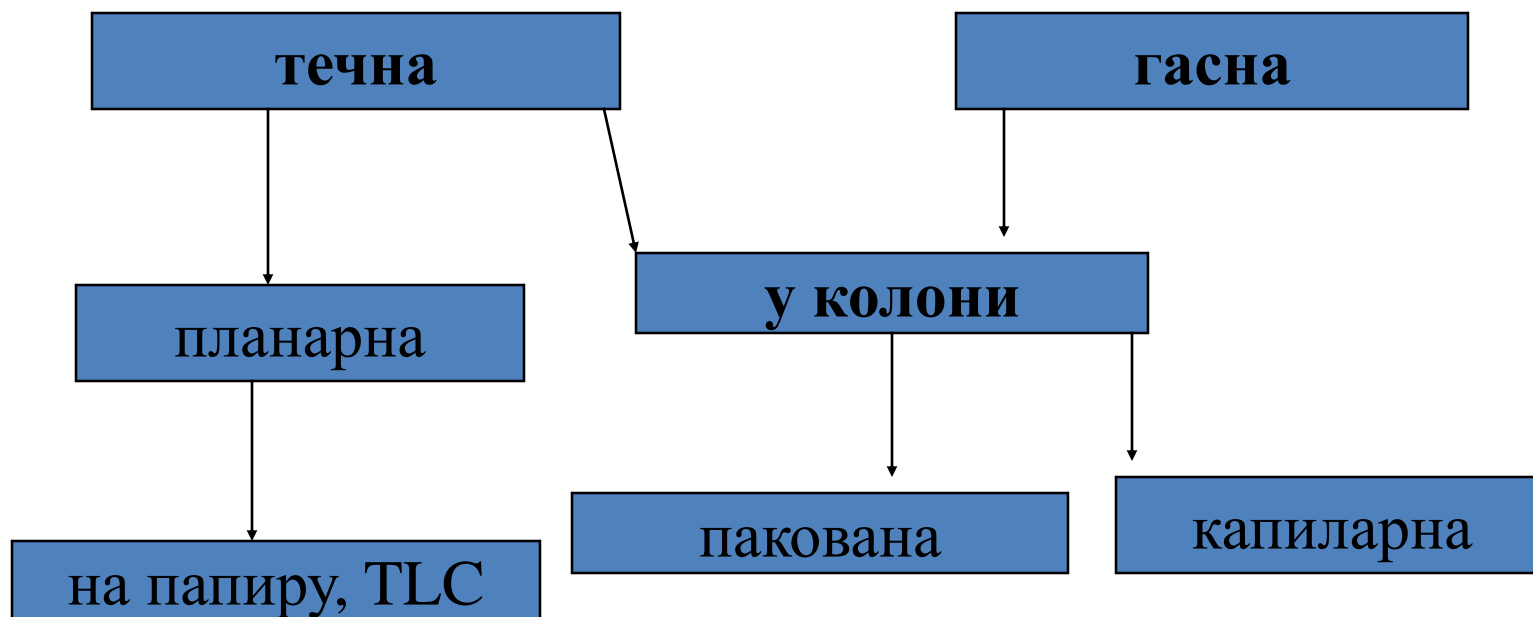


## ***Подеона (партициона) хроматографија***

- подеона хроматографија у  
КОЛОНИ

подеона хроматографија на  
хартји и танком слоју.

- ХРОМАТОГРАФИЈА



# Врсте хроматографија које су највише у употреби



Хроматографија на хартији  
Хроматографија на танком слоју (TLC)  
Дензитометријска TLC хроматографија  
Хроматографија на колони (CC)  
Гасна хроматографија (GH)  
Течна хроматографија (HPLC)

# Хроматографија на танком слоју

- Слој адсорбенса (нпр. силикагел) се наноси на плочу (стаклену или пластичну) или на фолију (алуминијумску или пластичну). Слој мора бити одређене и уједначене дебљине. Само у том случају добијају се репродуктивне  $R_f$  вредности за квалитативну анализу.

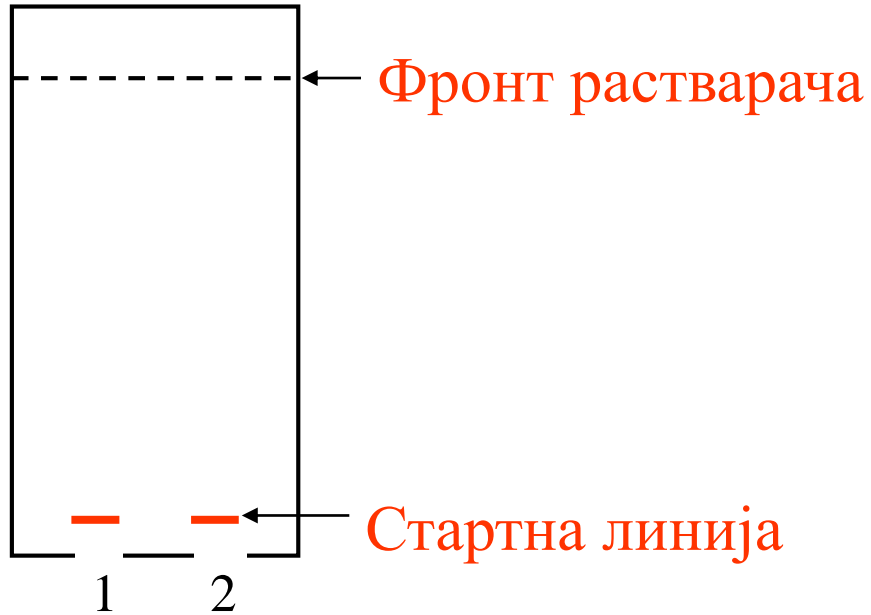


апликатор



распршивач

Капилара за  
наношење узорка



Посуда (када за хроматографију)

Наношење узорка

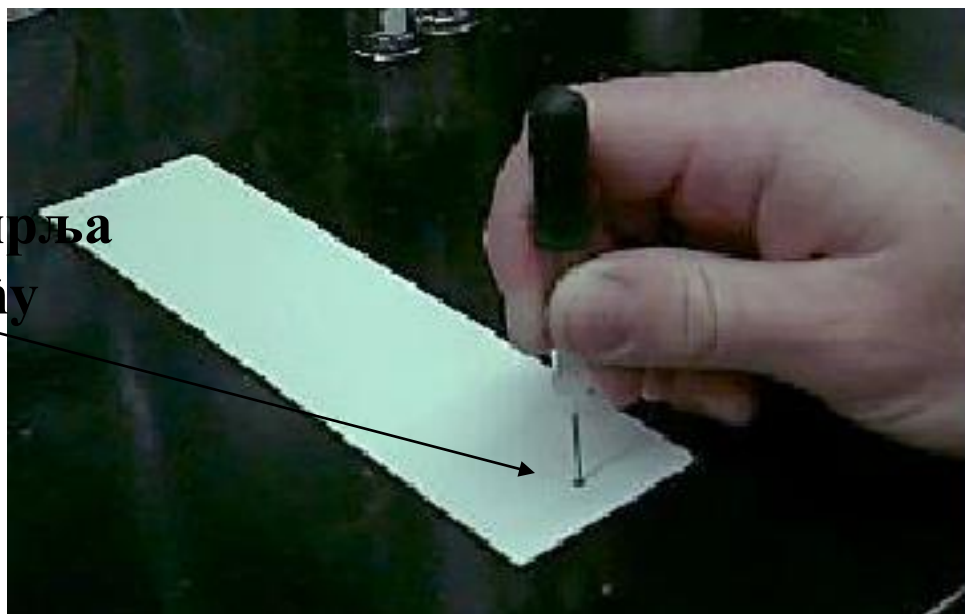
1. Тест раствор стандардних супстанци
2. Узорак

# Хроматографија на танком слоју

Систем  
растварача  
се сипа у каду за  
хроматографију



Наноси се стартна мрља  
на TLC плочу помоћу  
капиларе

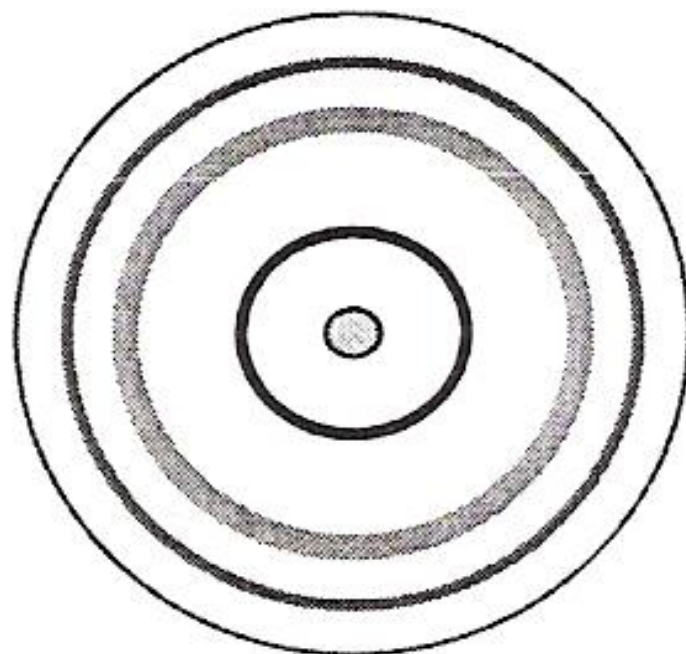
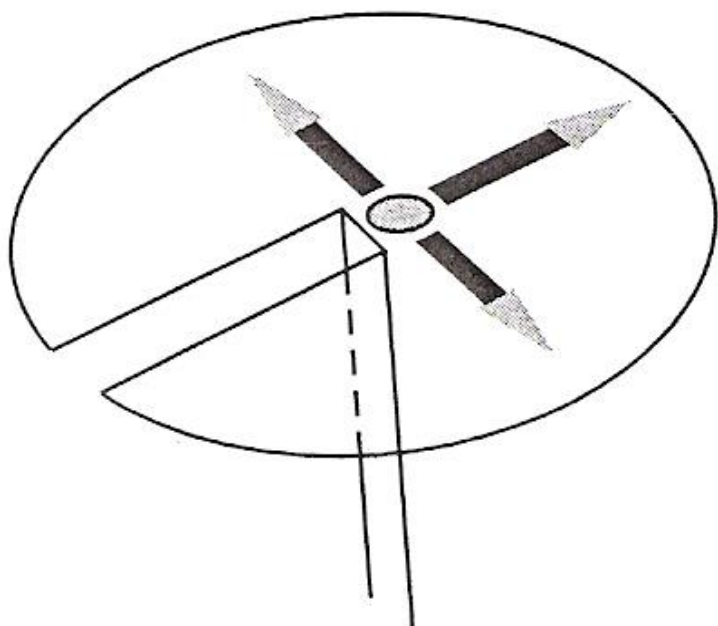


# Подеона хроматографија на хартији

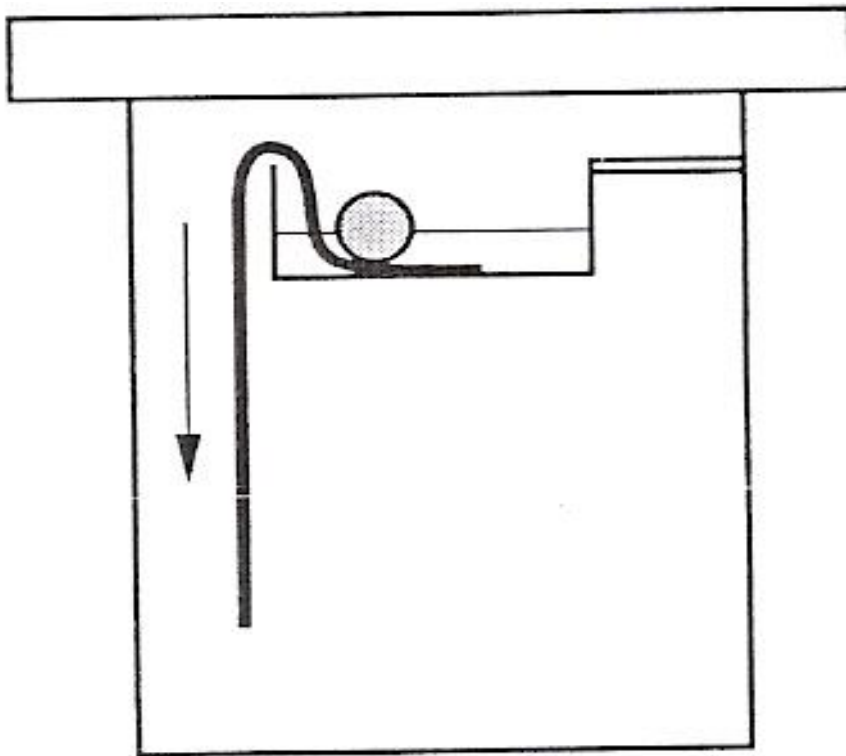
Хартија са нанетом зоном узорка може се поставити у суд тако да растварач пролази хоризонтално, на доле или нагоре.

Према томе разликују се:

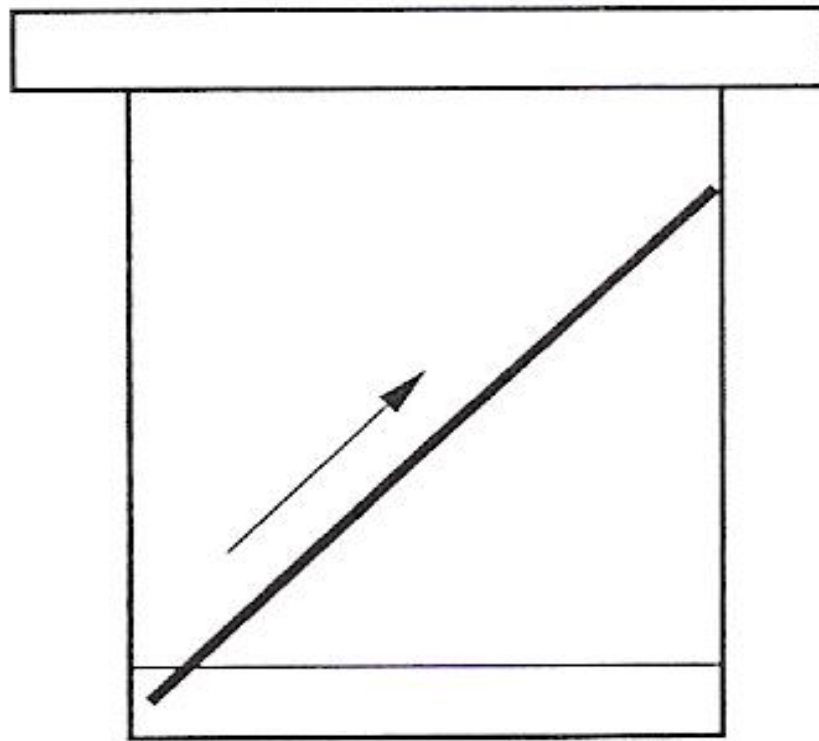
- хоризонтална (кружна)
- силазна и
- улазна техника.



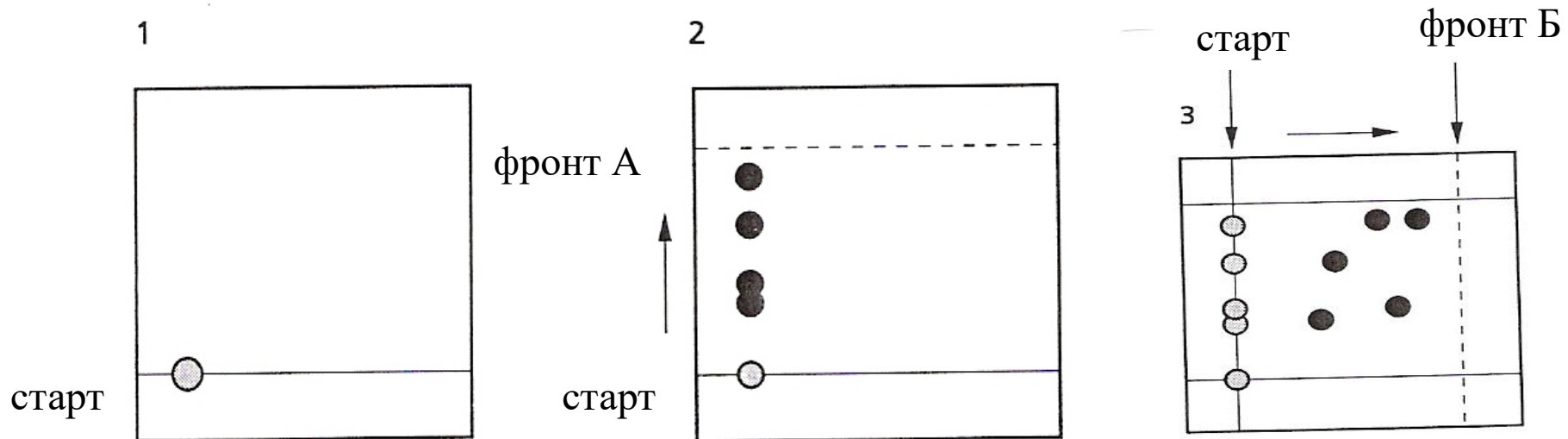
Кружна техника



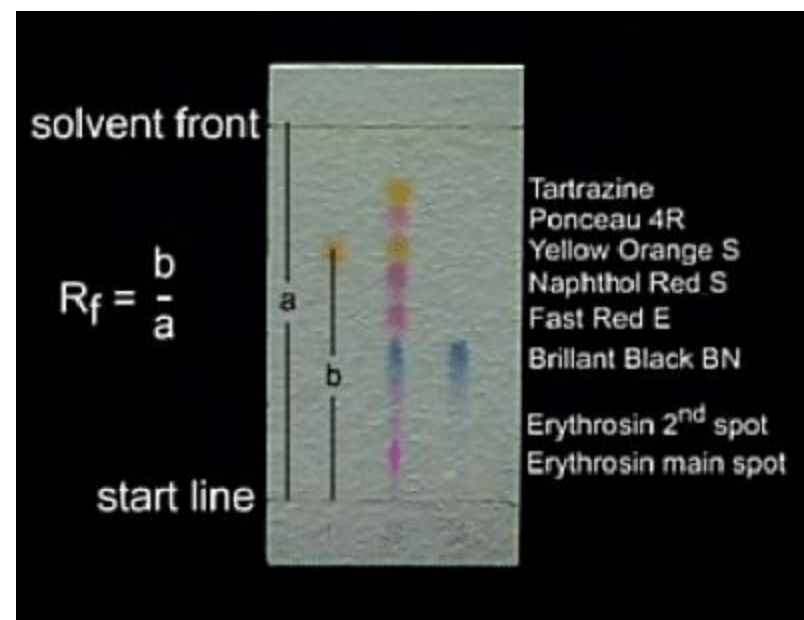
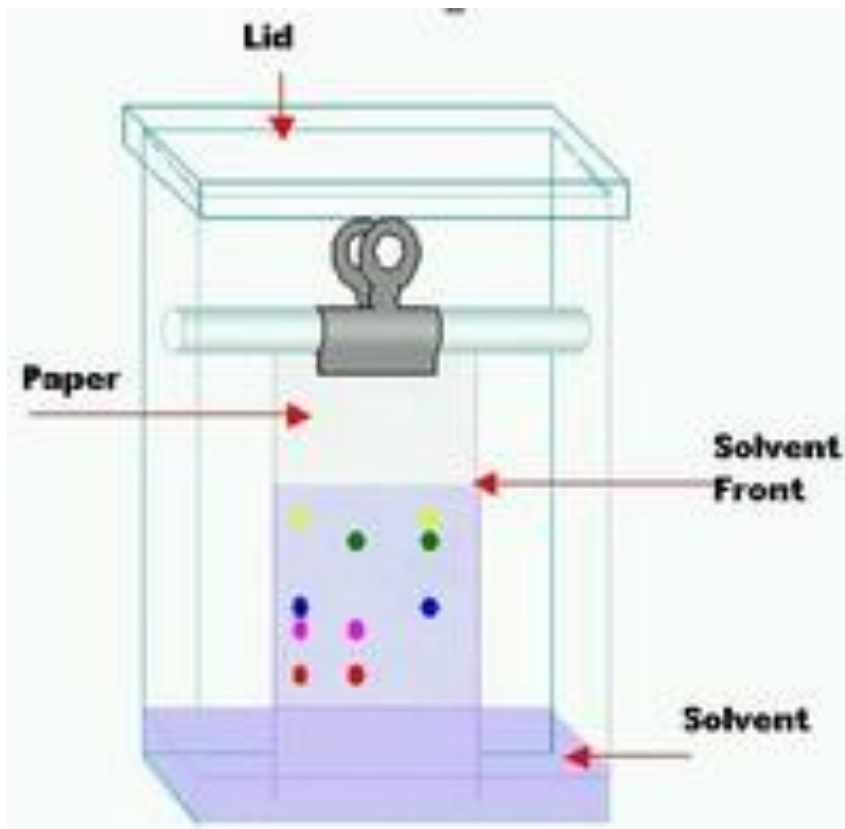
Силазна техника



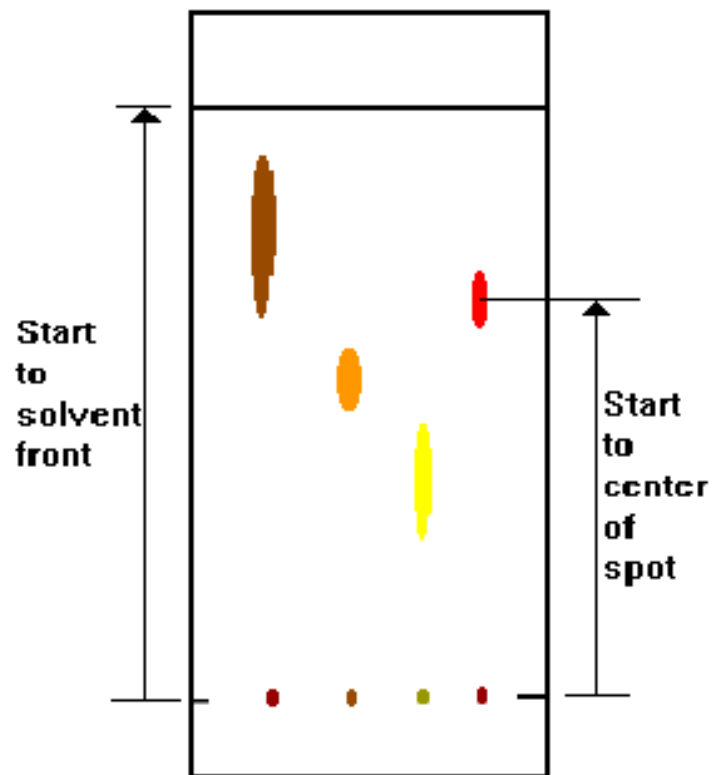
Узлазна техника



Дводимензионална техника

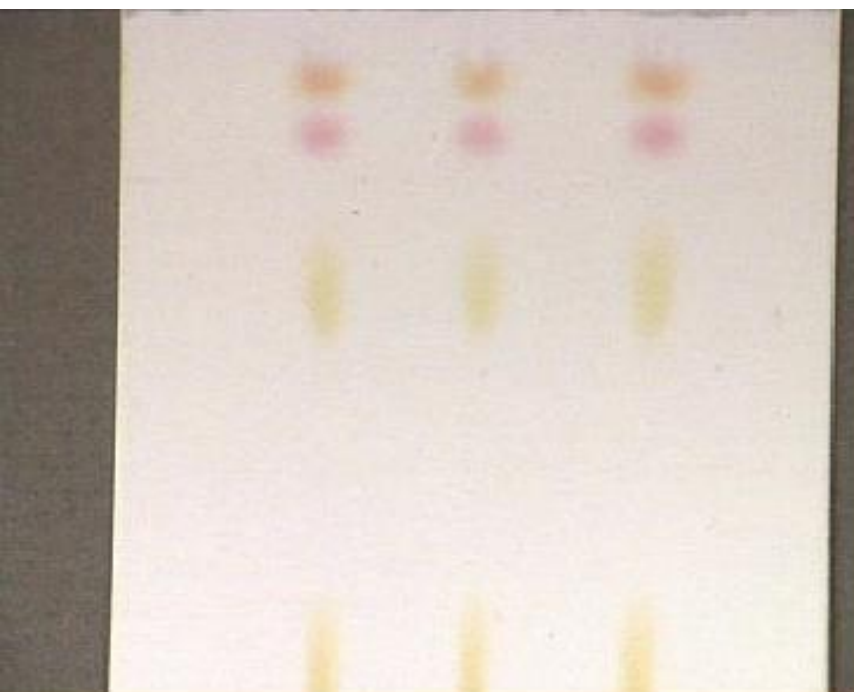


Анализа боја у храни

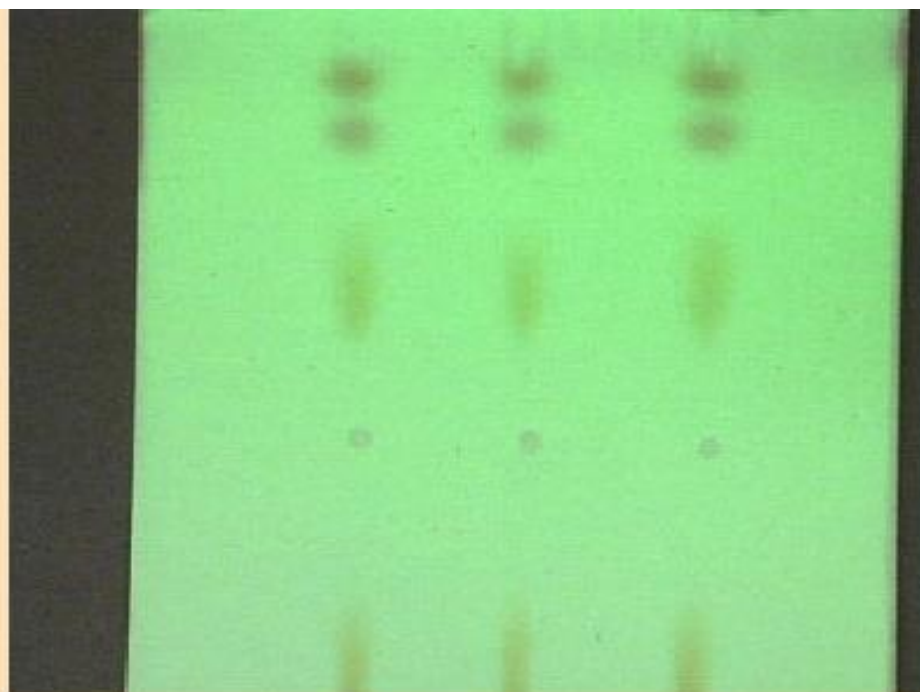


**Хроматографија на хартији**

## Хроматограм након елуирања



## Хроматограм изложен UV зрачењу



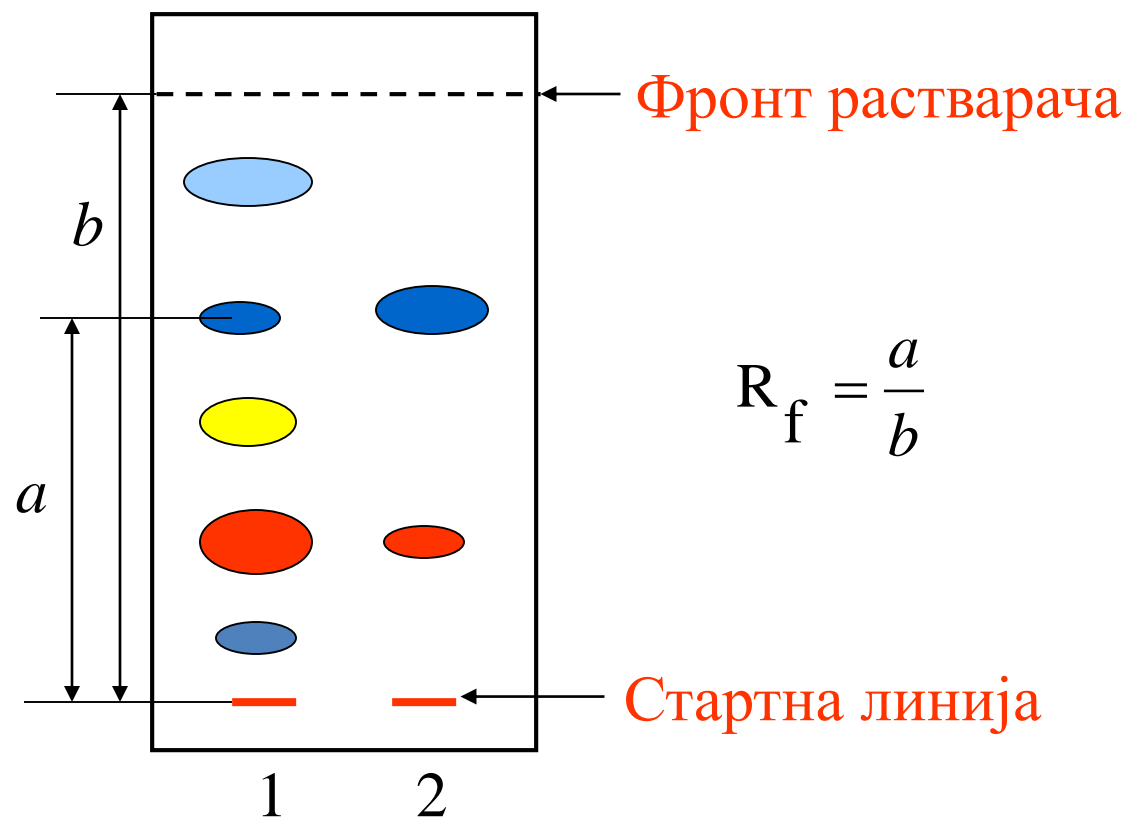
Additional spots become visible when inspecting the TLC plates with UV.

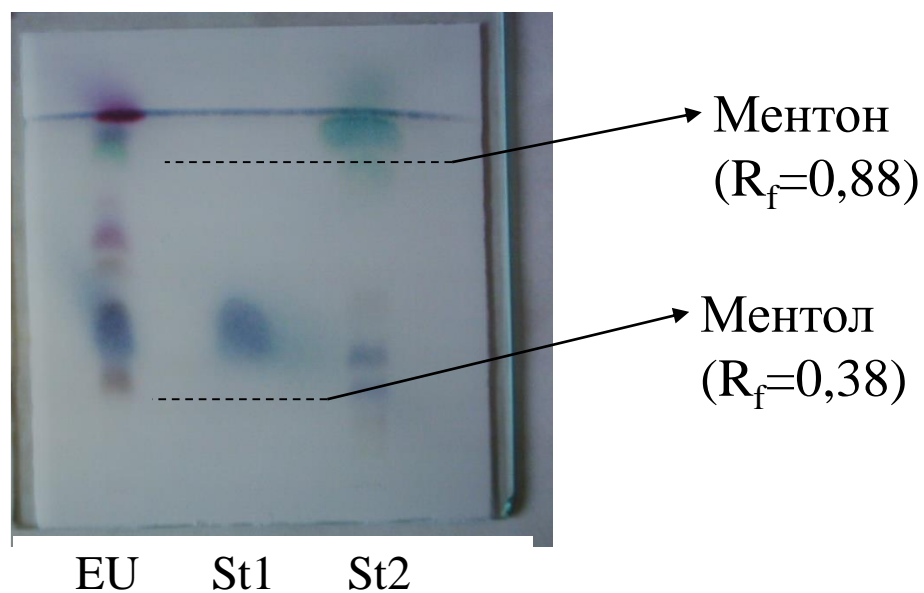


**Врши се одређивање  $R_f$  вредности и њихово поређење са табличним.**

**$R_f$  вредност зависи од мобилне фазе.**

$$R_f = \frac{\text{растојање од стартне линије до средине мрље}}{\text{растојање од стартне линије до фронта растварача}}$$

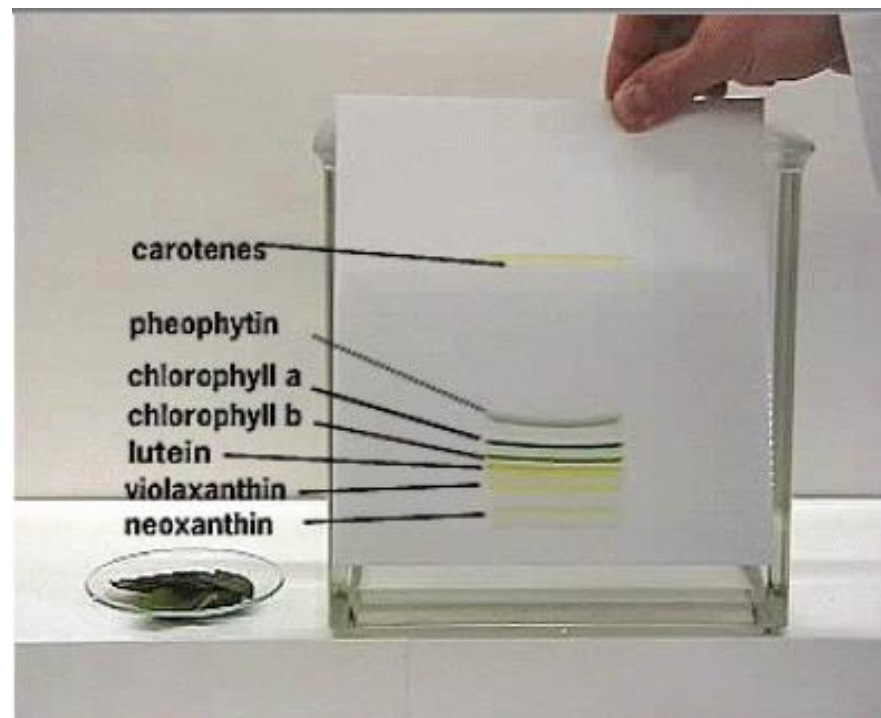




Изглед хроматограма етарског уља нане  
(St1 и St2 – стандарди)



Раздвајање пигмената  
из зеленог лишћа и спанаћа  
TLC хроматографијом



# ИЗАЗИВАЊЕ ХРОМАТОГРАМА

- Флуоресцентне супстанције откривају се помоћу UV лампе, положај зона радиоактивних супстанција одређује се уређајем за мерење радиоактивности.
- У другим случајевима се, за детекцију зона, најчешће користи хемијска метода која се састоји у томе да се осушени хроматограм прска одговарајућим раствором који хемијски реагује са зонама, дајући обојена једињења.

- **Идентификација једињења (квалитативна анализа)**
- Врши се одређивањем  $R_f$  вредности и њиховим поређеним са табличним.
- $R_f$  вредност зависи од мобилне фазе.
- **Квантитативна анализа**
- Врши се директним одређивањем количине супстанце у зони или **екстракцијом једињења** из зоне погодним растварачем.
- Једињења се одређују у издвојеним зонама директно на хартији (*in situ*) **спектрофотометријским методама**, углавном на основу рефлектоване светлости.
- Други начин се односи на хемијско и физичкохемијско одређивање количине супстанције у раствору добијеног екстракта.

## ***HPTLC - Танкослојна хроматографија под високим притиском***

HPTLC метода се користи за раздвајање и за квалитативну или квантитативну анализу смеше супстанци.

*Танкослојна хроматографија под високим притиском*  
За разлику од TLC мобилна фаза се креће **под притиском неког гаса**, најчешће азота. Гас се уводи под одређеним притиском у комору за хроматографисање услед чега долази до знатно бржег кретања мобилне фазе преко слоја адсорбенса.

За извођење HPTLC методе користе се плоче величине 10 x 10 cm, величине честице адсорбенса износи 2-7 $\mu$ m, дебљина слоја 0.15mm, раздаљина од старта до фронта 3-6 cm, запремина узорка око 0.1 $\mu$ l, дијаметар нанетог узорка износи 1.5mm, број нанетих узорака може да буде између 20 и 30, а развијање хроматограма траје 5-15 min.

- За извођење HPTLC методе потребни су одређени технички услови који обухватају специјалне коморе за хроматографисање, аутоматски апликатор за наношење узорка, као и дензитометар за квантитативну анализу.



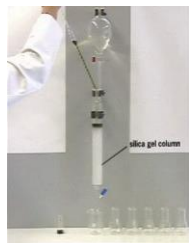
Танкослојна хроматографија нашла је широку примену у **фармацији**. У испитивању и контроли лекова примењује се како у анализи полазних сировина, тако и међупроизвода и финалних производа.

Такође се користи и у **праћењу стабилности лекова**, затим **за одвајање и одређивање активних принципа лекова и њихових деградационих производа** .

Ова метода се може применити и на лек и на биолошки материјал.

**У биохемијским и фармаколошким испитивањима** примењује се за одређивање метаболизма лекова у телесним течностима.

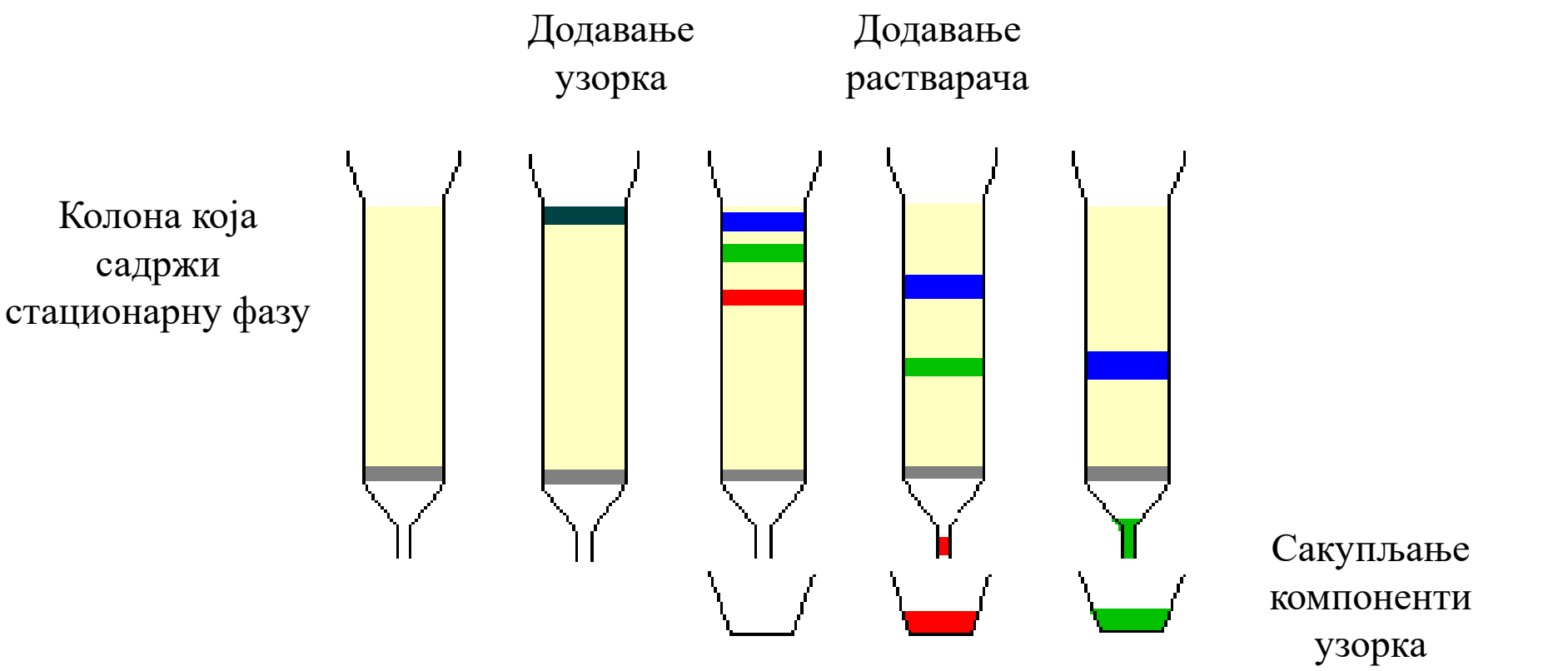
- У анализи животних намирница користи се за одређивање нпр. остатака пестицида, за одвајање и идентификацију аминокиселина или за одређивање боја које се користе као адитиви.
- У токсиколошким анализама користи се за одређивање токсичних супстанци, нпр. инсектицида у различитим материјалима.

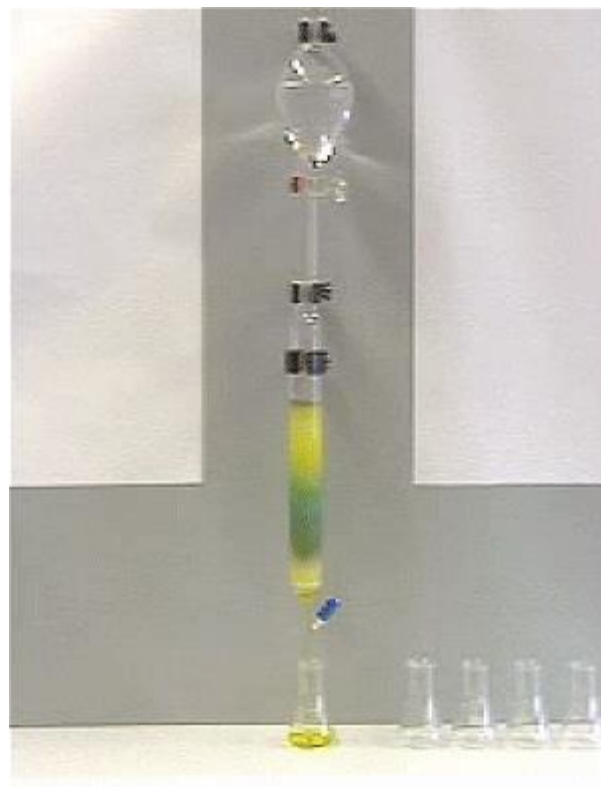
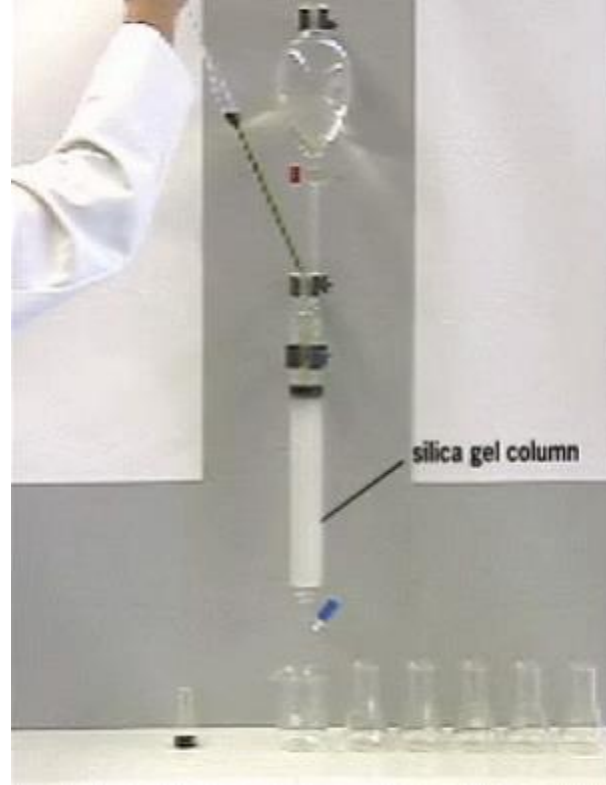


## Хроматографија у колони

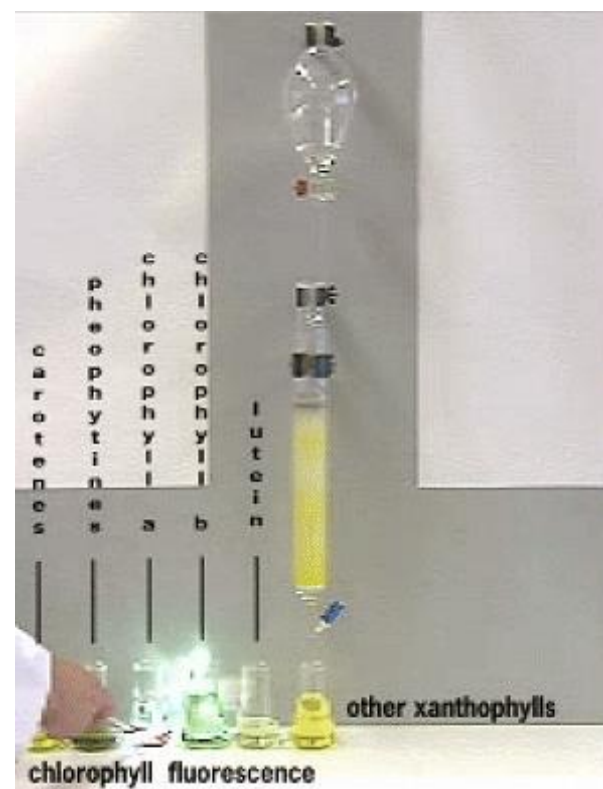
- Служи за одвајање компонената из смеше елуирањем кроз колону
- Колоне се пуне најчешће силикагелом, алуминијумоксидом и др.
- Као елуенти користе се различити растварачи или системи растварача
- Компоненте се крећу кроз колону различитим брзинама
- Испод колоне поставе се ерленмајери у које се сакупљају појединачне компоненте
- Ако су компоненте обојене могуће је посматрати њихово кретање кроз колону







Раздвајање пигментата из зеленог биља



# Јоноизмењивачка хроматографија

Заснива се на разликама у афинитету јонских врста у раствору према измени са јонима активних група које поседују неки апсорбенси. Такви адсорбенси могу бити неорганског и органског порекла, синтетички и природни.

Примена јонских измењивача у аналитичке сврхе је различита:

- раздвајање елемената сличног хемијског понашања (нпр. лантанида и актинида)
- одвајање јонских од нејонских врста
- раздвајање јона
- раздвајање катјона од анјона
- концентрисање јона метала из врло разблажених раствора
- одређивање концентрације

- А $\pi$ сорпција



А $\pi$ сорпција



# Гасна хроматографија

- је првенствено техника раздвајања која региструје количину компоненте која је елуирала из хроматографског система.
- **Мобилна фаза:** гас (носећи гас), He, H<sub>2</sub>, Ar, N<sub>2</sub>
- **Стационарна фаза:** чврст носач или течност нанета на чврсту инертну подлогу или течни слој равномерно нанесен на зидове колоне (налази се у колони).



# Основни делови гасног хроматографа:

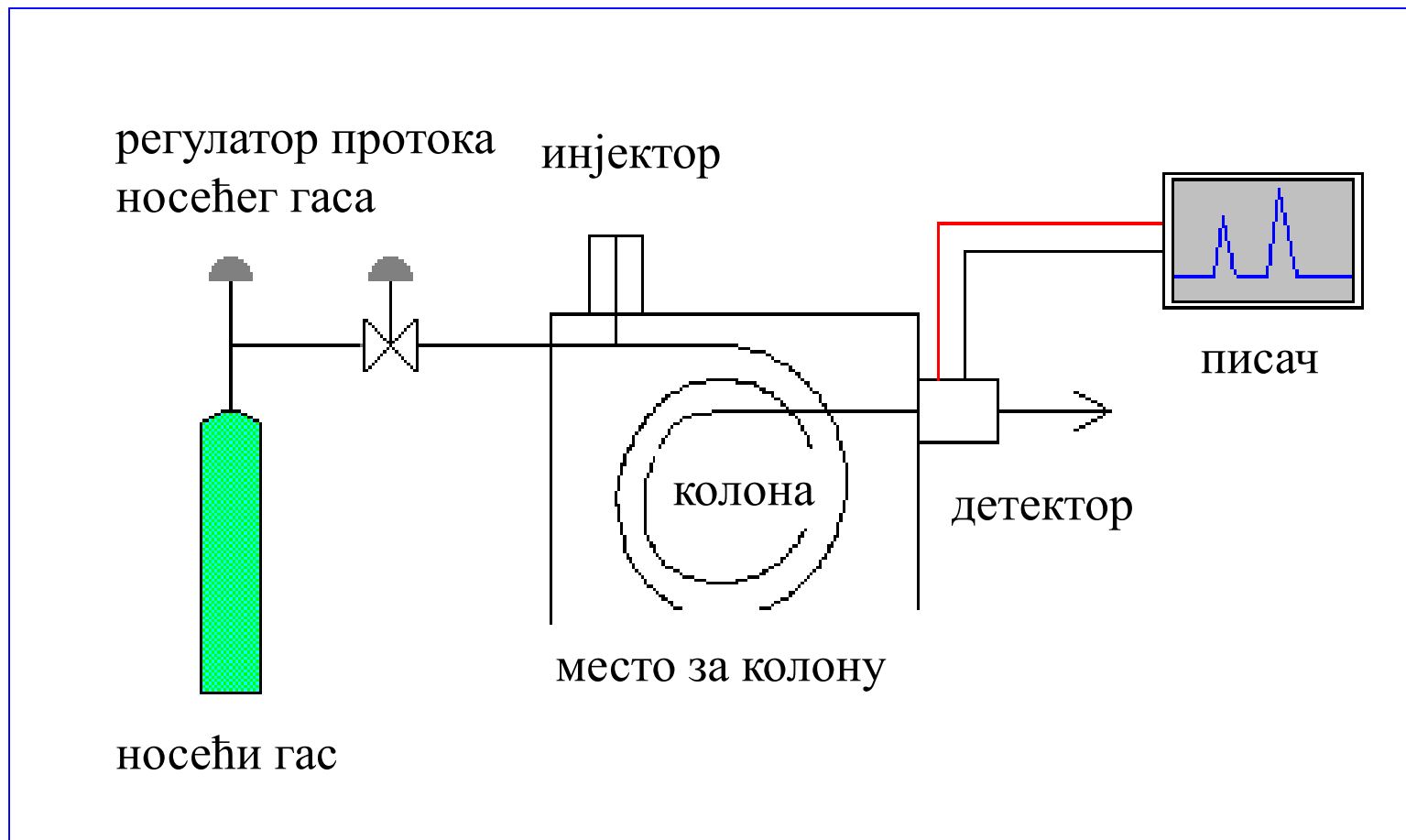
- Уређај за довод гаса (боца са носећим гасом, регулатор протока носећег гаса), испаривач (инјектор), ГН колона, детектор, писач.
- Узорак (у облику раствора) се најчешће уноси у инјектор помоћу шприца.



10 µl



# Схема гасног хроматографа



Аутосемплер  
за течне  
узорке

Инјекционе  
бочице  
аутосемплера

FID или TCD

Монитор  
параметара

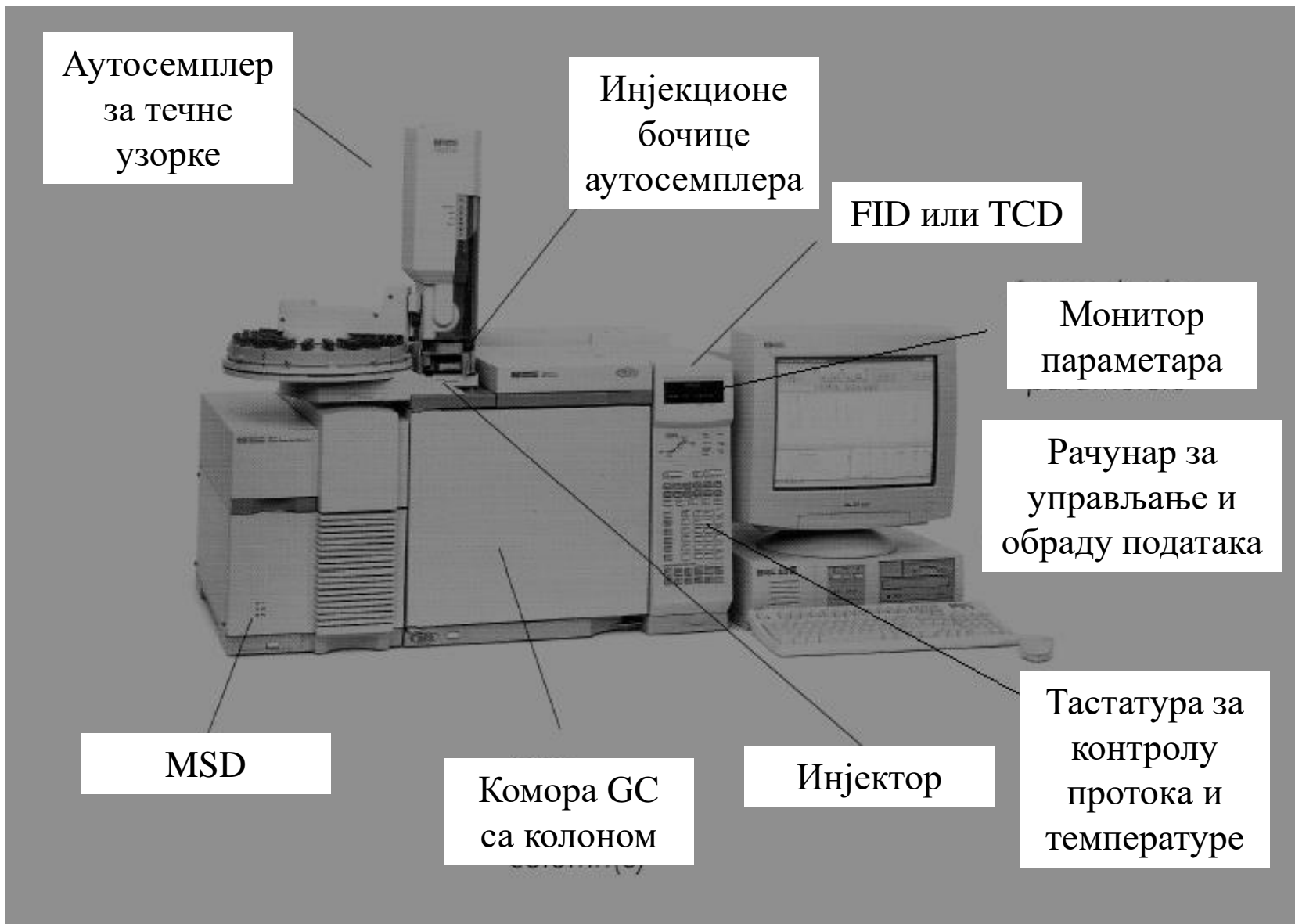
Рачунар за  
управљање и  
обраду података

Тастатура за  
контролу  
протока и  
температуре

MSD

Комора GC  
са колоном

Инјектор



- **У испаривачу** се узорак претвара у гас и помоћу гаса носача преводи у ГН колону, где се врши раздвајање компонената.
- **Детектор** то детектује и писач бележи као гасни хроматограм.
- **Носећи гас** мора бити инертан (хелијум, неон, азот итд.).
- **ГН колоне** су обично од стакла или нерђајућег челика. Могу бити **капиларне** (дугачке и уске) и **паковане аналитичке колоне** (краће и шире). **Температура** може бити константна или програмирана.

# Хроматографски процес

Б+А улазе у колону

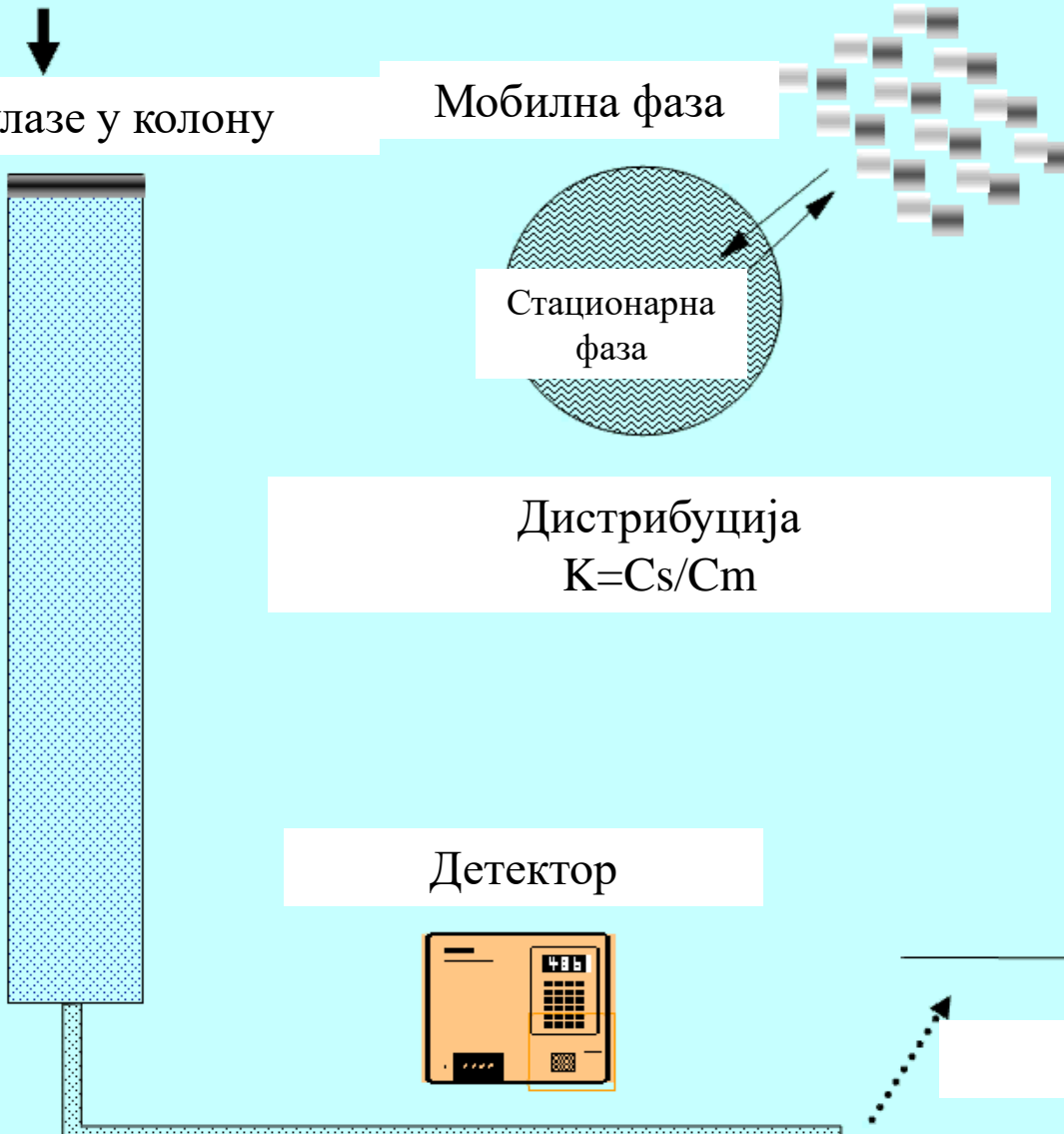
Мобилна фаза

Стационарна фаза

Дистрибуција  
 $K = C_s / C_m$

Детектор

Хроматограм



# колоне

капиларне  
колоне



танак слој  
стационарне  
фазе

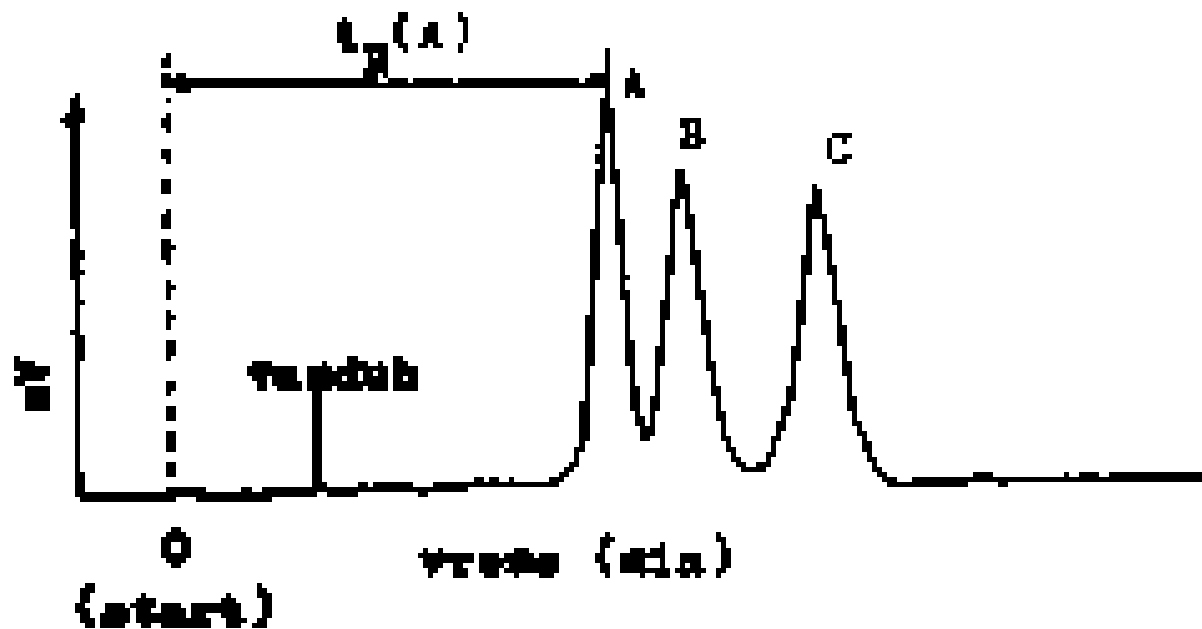
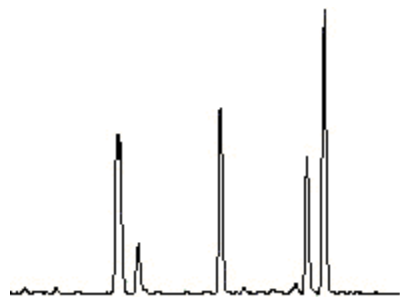
$d = 0.1 - 0.53 \text{ mm},$   
 $l = 10 - 50 \text{ m},$

паковане  
аналитичке  
колоне



мали “комади”  
стационарне фазе

$d = 0.53 \text{ mm},$   
 $l = 0.5 - 10 \text{ cm},$

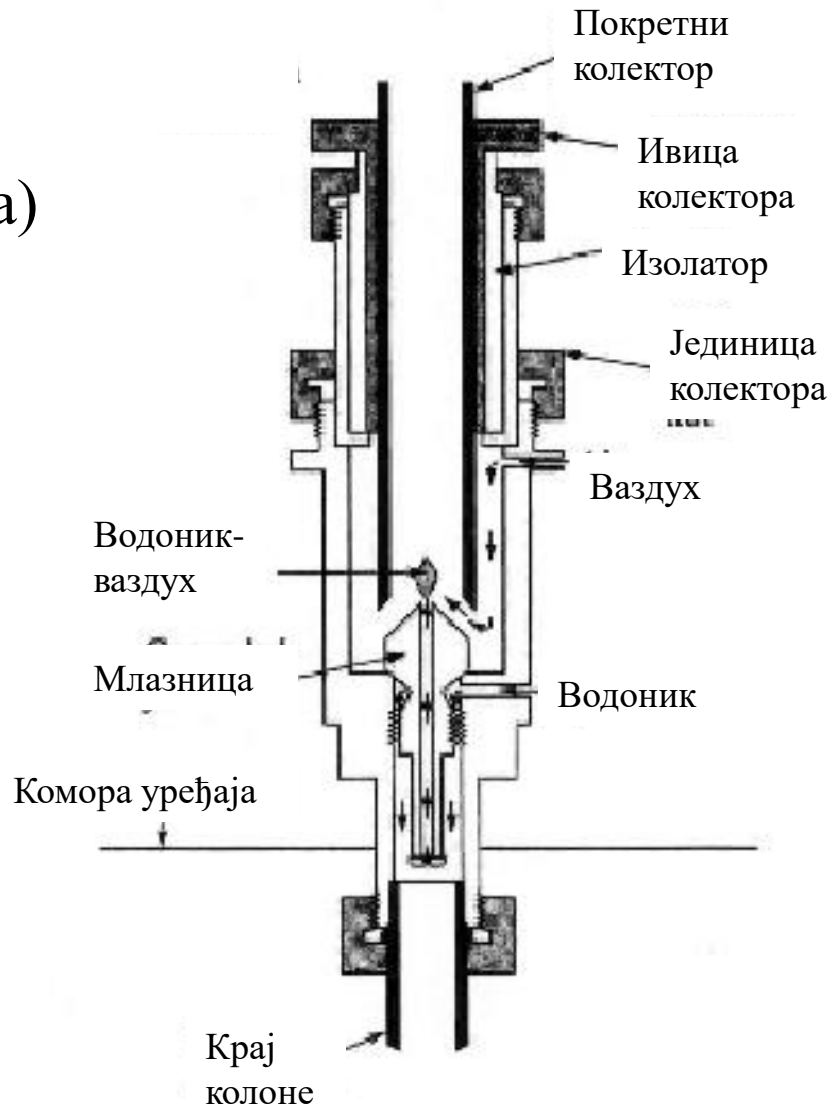
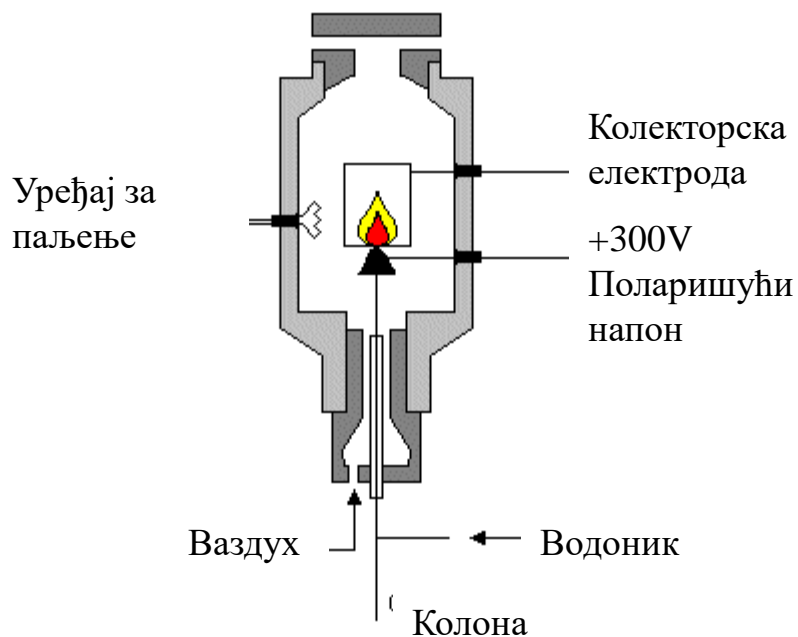


Гасни хроматограм трокомпонентне смеси (A+B+C) ↓

- Детектори могу бити:
- **Термопроводљиви**
- **Јонизациони**
- пламено-јонизациони (Flame Ionisation Detector FID)
- детектори са захватом електрона (Electron capture detector ECD)
- детектор са алкалним пламеном или фосфорни детектор (за пестициде и бојне отрове)
- Анализа хроматограма врши се на основу ретенционих времена и површине пикова.

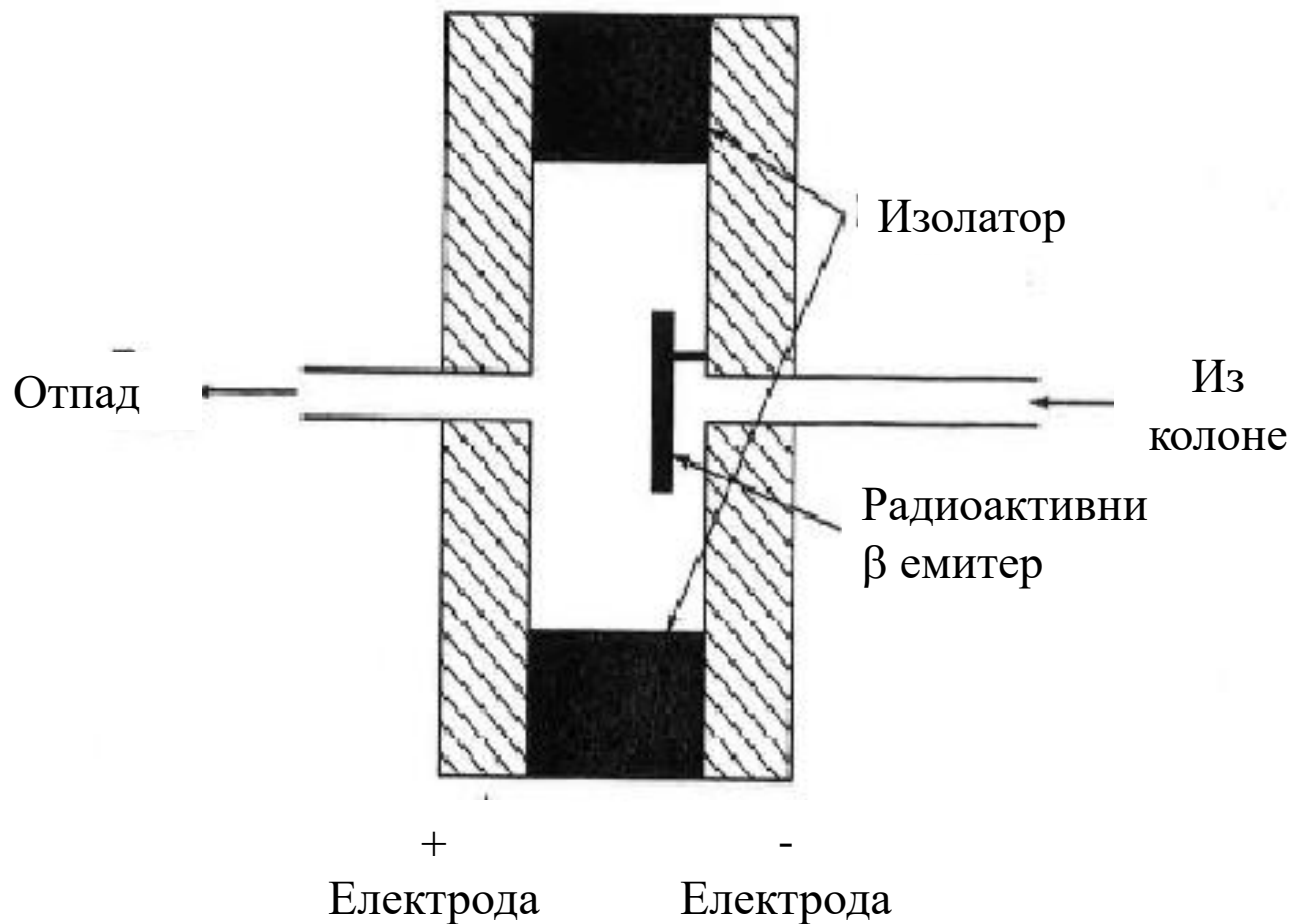
# Пламено-јонизациони детектор (Flame ionization detector – FID)

Јонизује једињења у пламену  
(мешавина водоника и ваздуха)



# Electron Capture Detector (ECD)

## ДЕТЕКТОР ЗА ЗАХВАТОМ ЕЛЕКТРОНА



# Течне фазе

- Услови које мора да има:
  - термичка стабилност
  - хемијска инертност у односу на испитивана једињења
  - неиспарљивост на радној температури
- 
- **Користе се поларна једињења:** полиетилен-гликоли, полисилоксани

# Чврст носач

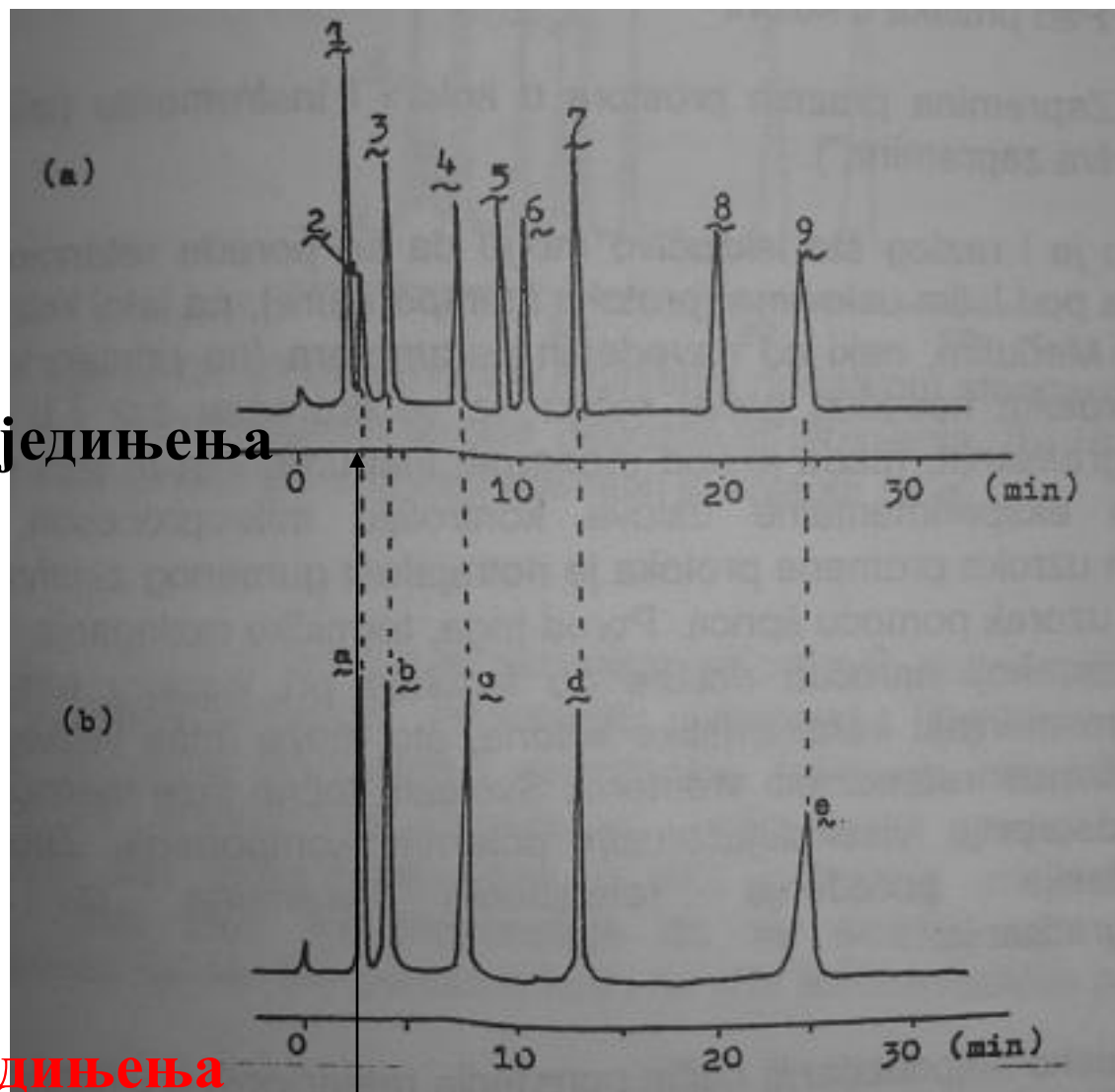
- По својој површини веже и равномерно распоређује танак филм течне фазе
- Дијатомит или дијатомејска земља или кизелгур  
Комерцијални назив Chromosorb (A, G, P, W и T)
- Умрежени кополимери стирена и дивинил бензена (Chromosorb 101-108, а такође Porapak)

# Квалитативна ГН анализа

- **РЕТЕНЦИОНО ВРЕМЕ** ( $t_R$ ) је дужина боравка једињења у ГН колони

- Метода поређења

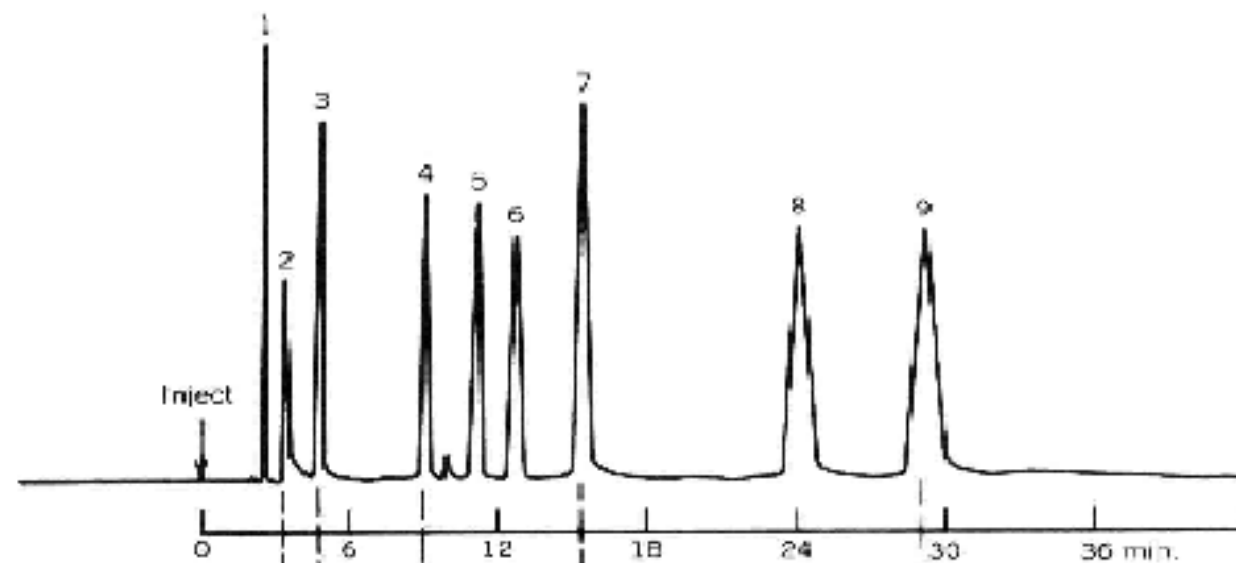
Поређење ( $t_R$ ) непознатих једињења са ( $t_R$ ) познатих једињења



Непозната једињења

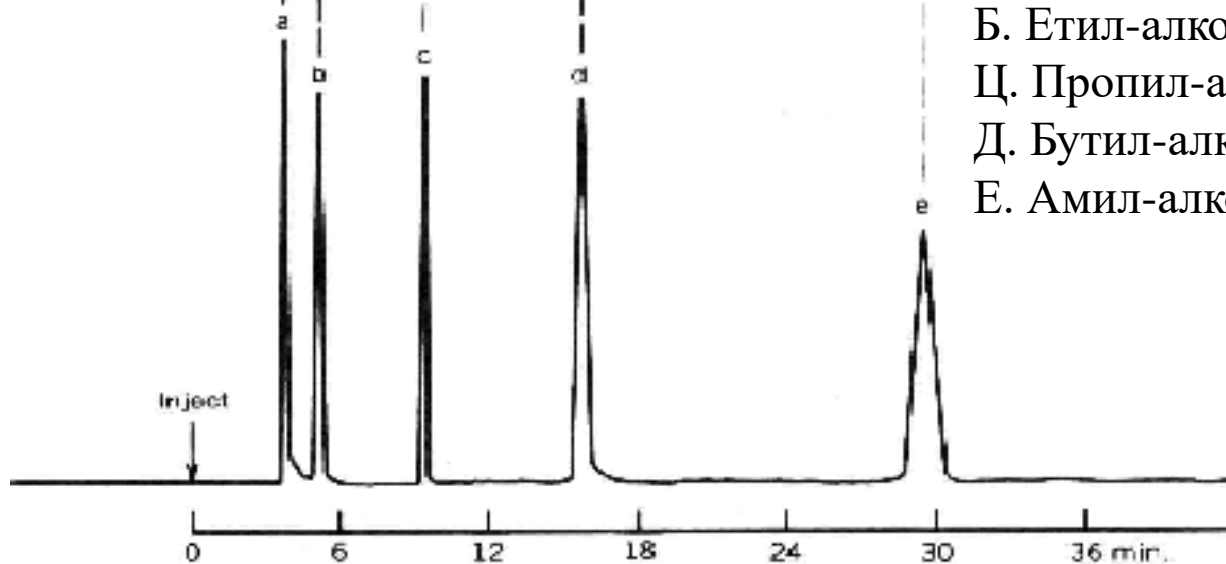
2=a  
3=b  
4=c  
7=d  
9=e

Позната једињења



(a) Unknown alcohol

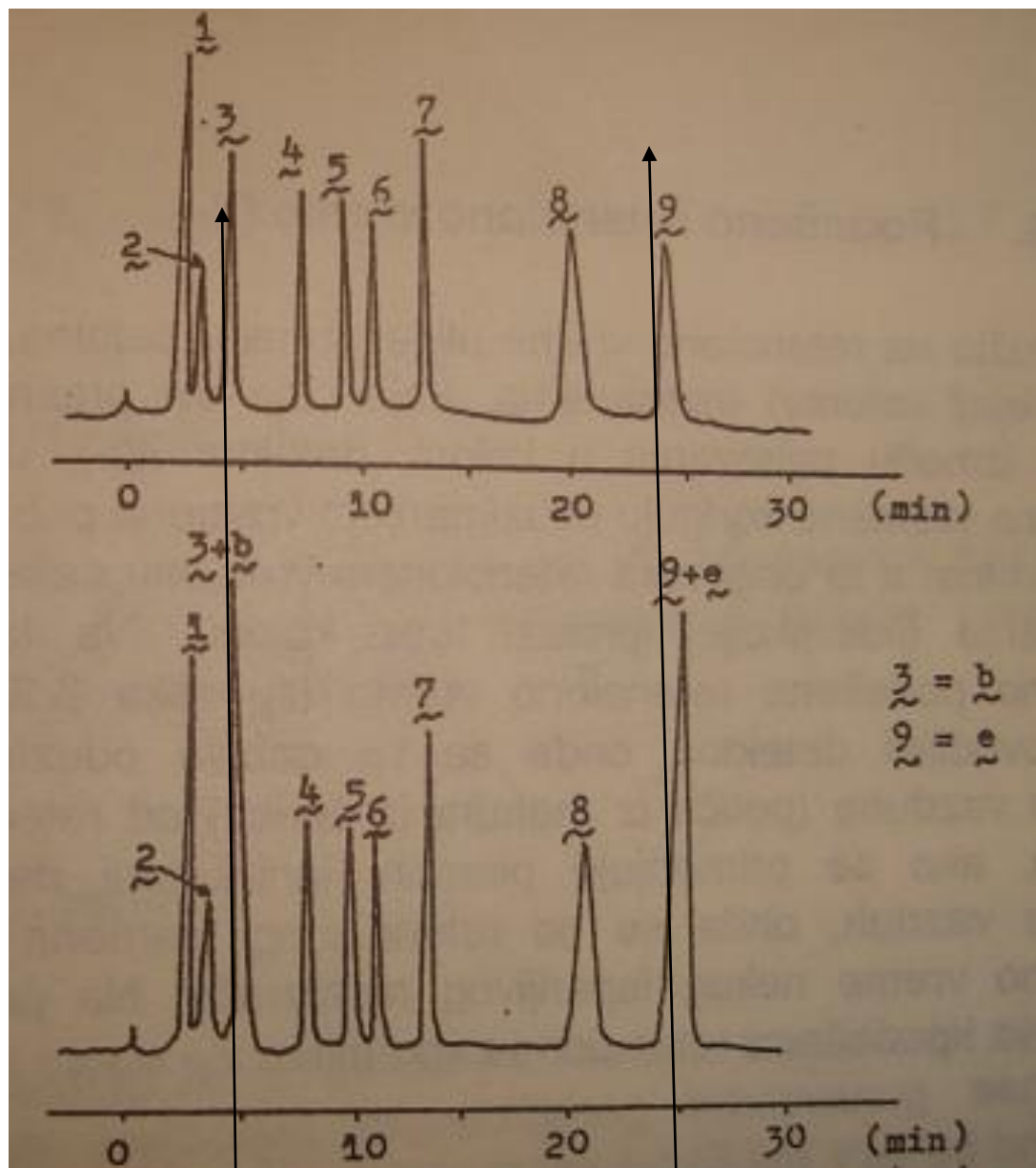
- А. Метил-алкохол
- Б. Етил-алкохол
- Ц. Пропил-алкохол
- Д. Бутил-алкохол
- Е. Амил-алкохол



(b) Standard

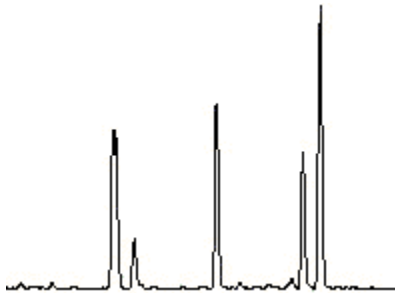
# Метода коинјектирања

- Сними се хроматограм непознате смеше, затим се дода стандард и на основу увећања пика потврди присуство једињења.



# Квантитативна ГН анализа

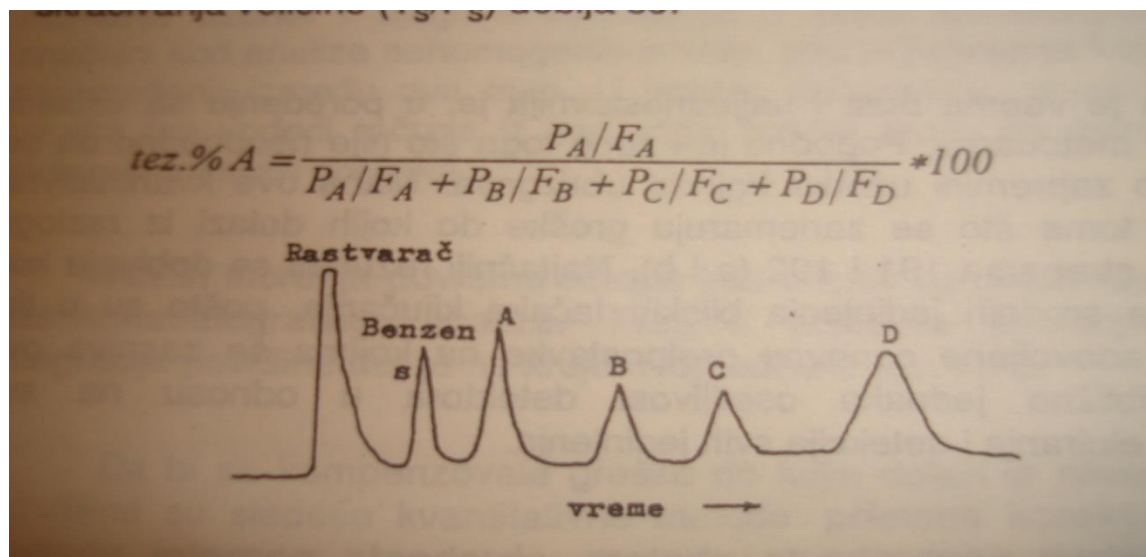
- Заснива се на зависности површине апсорпционих максимума од њихове концентрације.



# Метода нормализације површина

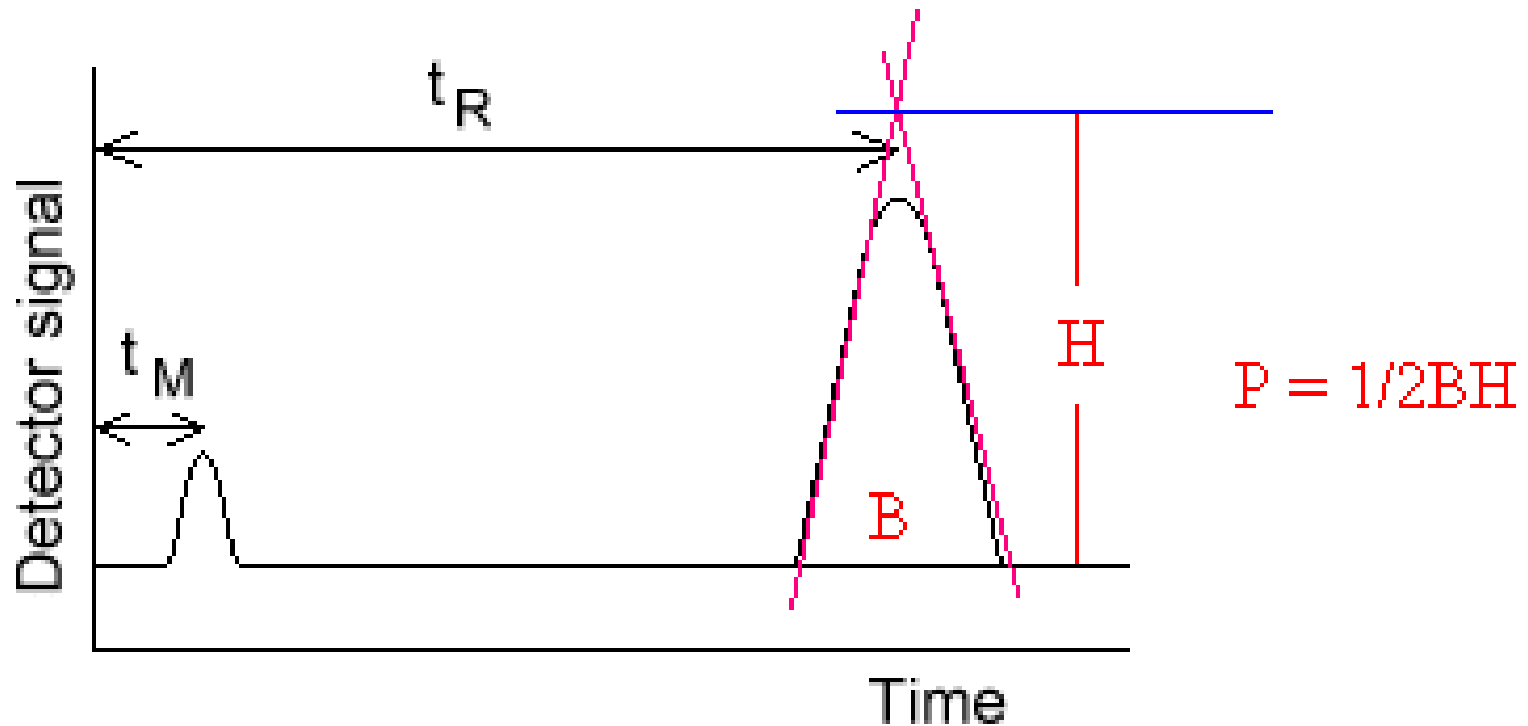
$$\% A = \frac{P_A}{P_A + P_B + P_C + P_D} \times 100$$

## Примена корекционих фактора



# мерење површине

*апроксимацијом са троуглом*



# Метода интерног стандарда

Припреми се више раствора који садрже различите тежинске односе према стандарту

Нпр. однос компоненте А према стандарту

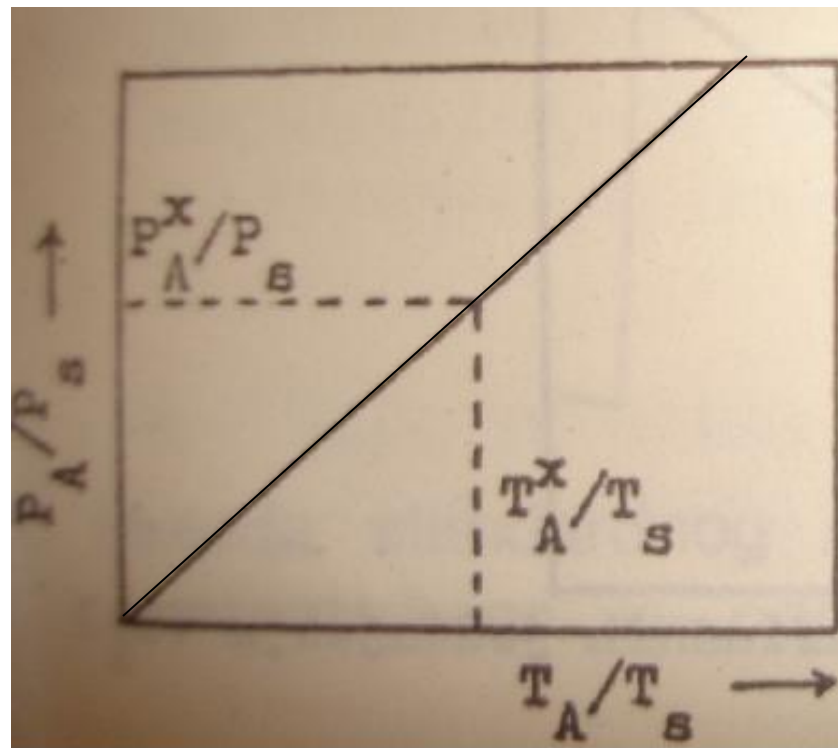
$$T_A/T_c$$

↓  
Након тога уради се  
хроматографија

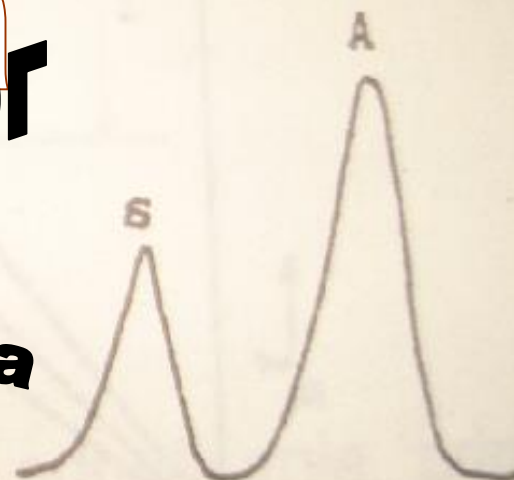
Одређују се површине испод максимума



Конструира се калибрациона крива



Метода  
интерног  
стандарда



# Метода стандардног додатка

- За одређивање малих концентрација (нпр. алкохола у крви и нечистоћа у препаратима)

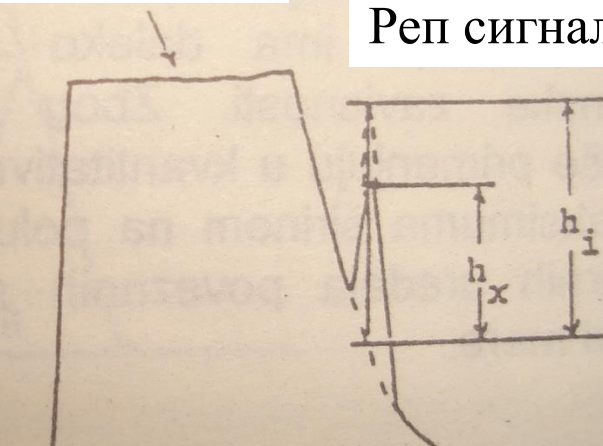
$$h_x : (h_i - h_x) = x : k_i$$

$$x = \frac{h_x * k_i}{h_i - h_x}$$

Главна  
компонента

Реп сигнала

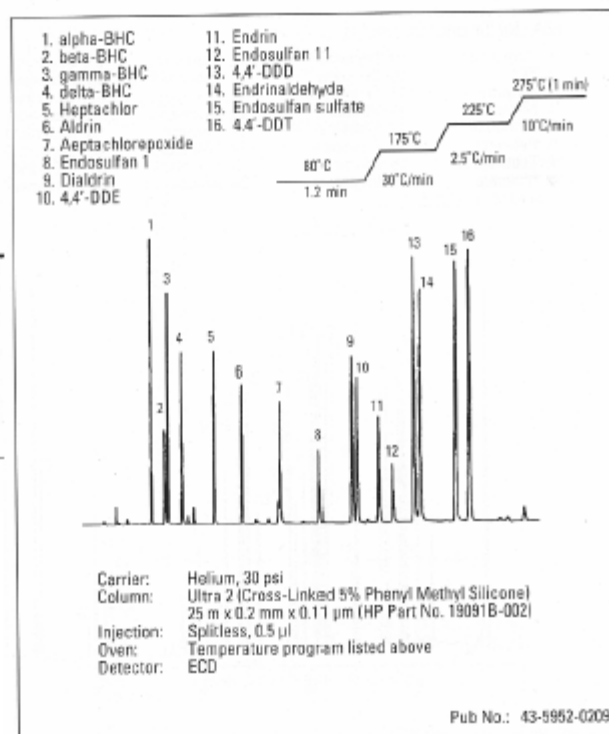
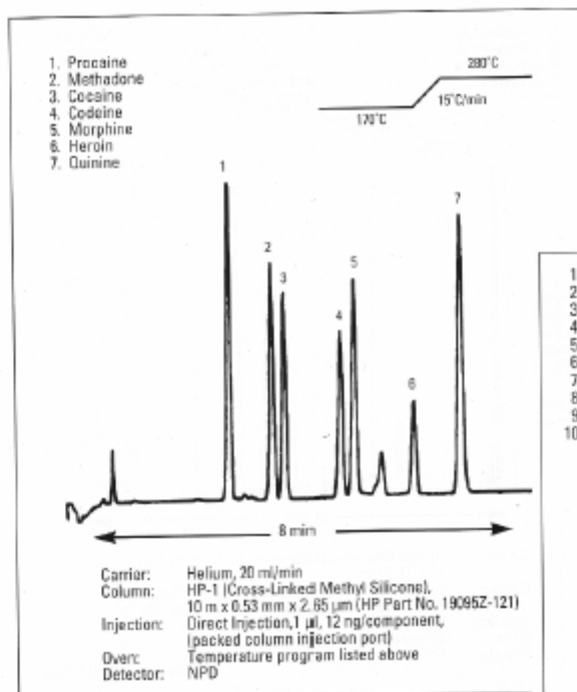
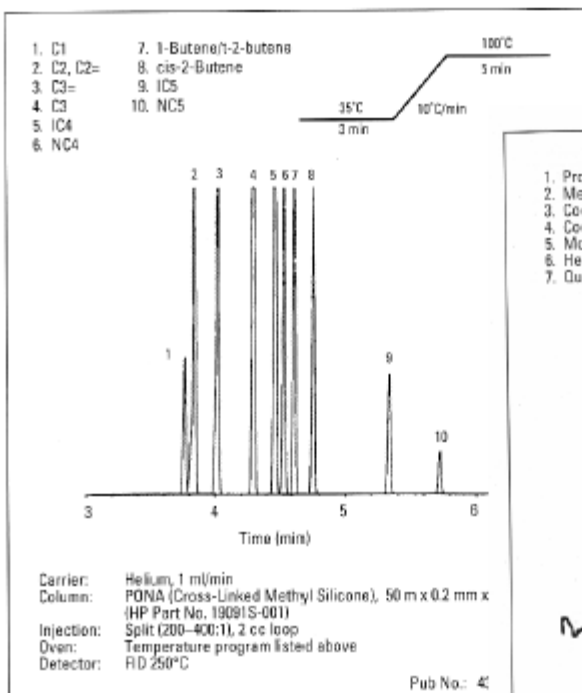
**X = садржај неке примесе**  
 **$x_x$  = средња вредност висине**  
**максијума испитив. примесе**  
 **$k_i$  = тачно одмерена количина**  
**примесе**  
 **$h_i$  = средња вредност висине**  
**након додатка стандарда**



# ГН-Примена

Фармацевтска анализа:  
Улична алкалоидна дрога

Анализа животне средине:  
Хлоровани пестициди

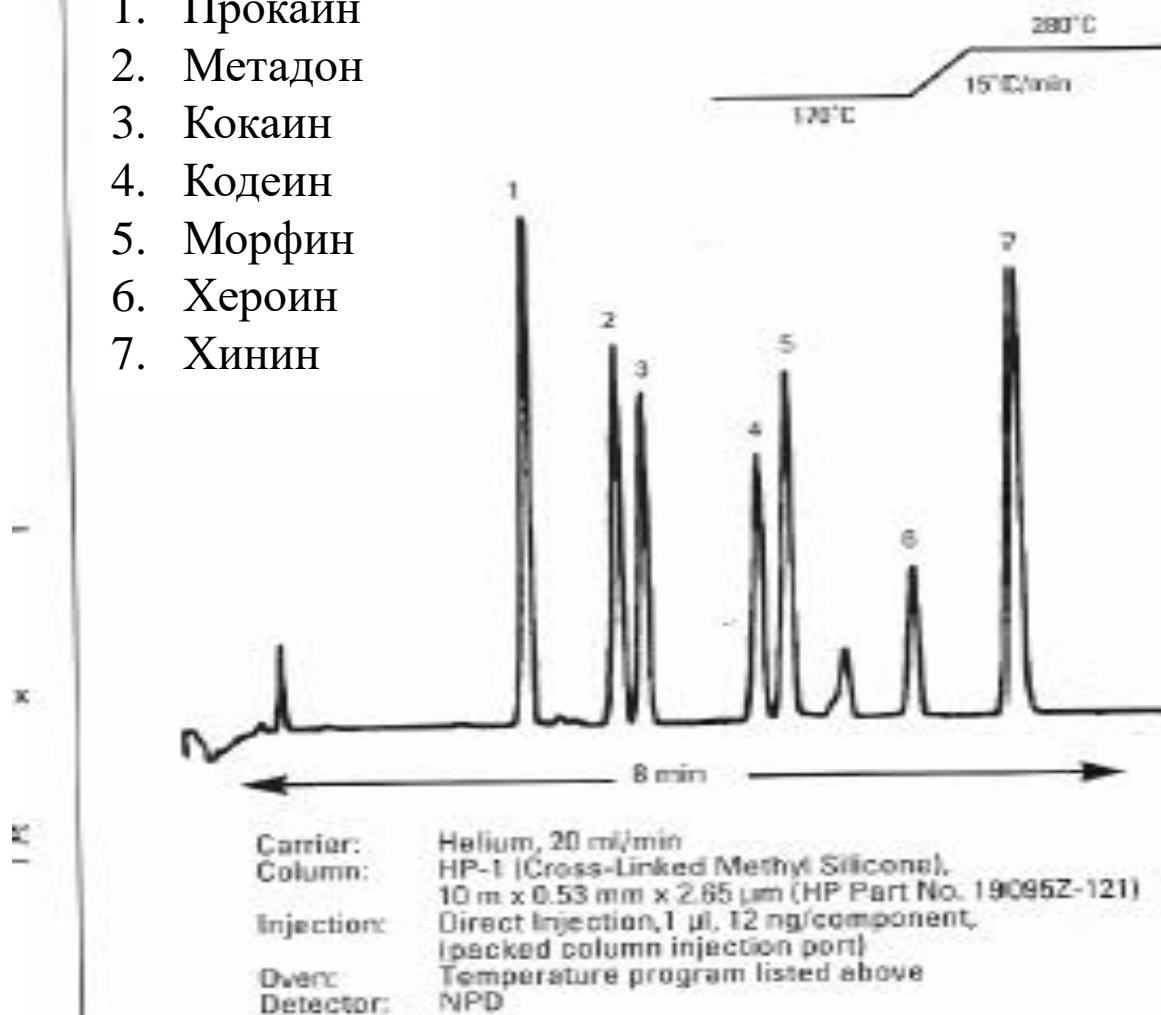


Петрохемијска  
анализа:  
Рафинеријски гас

100°C  
5 min

## Фармацевтска анализа: Улична алкалоидна дрога

1. Прокаин
2. Метадон
3. Кокаин
4. Кодеин
5. Морфин
6. Хероин
7. Хинин

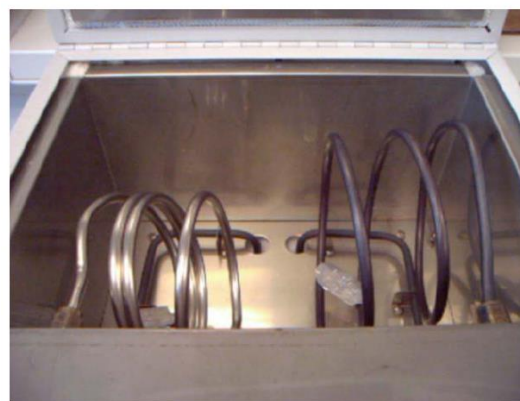




The HP 6890 Gas Chromatograph



Боце са носећим гасом



Гасни хроматограф



Слика GC-MS спектрометра