

NOTA 1224

Instituut voor Cultuurtechniek en Waterhuishouding
Wageningen

ALTERRA
Wageningen Universiteit & Research centre
Omgevingswetenschappen
Centrum Water & Klimaat
Team Integraal Waterbeheer

CHROMATOGRAFIE

(Samenvatting van de cursus gegeven in het voorjaar 1980)

J. Harmsen

Nota's van het Instituut zijn in principe interne communicatiemiddelen, dus geen officiële publikaties.

Hun inhoud varieert sterk en kan zowel betrekking hebben op een eenvoudige weergave van cijferreeksen, als op een concluderende discussie van onderzoeksresultaten. In de meeste gevallen zullen de conclusies echter van voorlopige aard zijn omdat het onderzoek nog niet is afgesloten.

Bepaalde nota's komen niet voor verspreiding buiten het Instituut in aanmerking

I N H O U D

	blz.
1. INLEIDING	1
2. DEFINITIE CHROMATOGRAPHIE	1
3. GESCHIEDENIS	2
4. HOE WERKT CHROMATOGRAPHIE?	3
5. DE MATHEMATISCHE ACHTERGROND VAN DE SCHEIDING	4
6. SAMENVATTING HOOFDSTUK 2 t/m 5	11
7. GASCHROMATOGRAPHIE	12
7.1. Opbouw gaschromatograaf	12
7.2. Onderverdeling gaschromatografie	13
7.3. Beïnvloeding scheiding	13
7.4. Kolommen	21
7.5. Injektie systemen	22
7.6. Toepassingen	26
8. VLOEISTOFCHROMATOGRAPHIE	31
8.1. Inleiding in de vloeistofchromatografie	31
8.2. Pompsystemen	32
8.3. Beïnvloeding scheiding	34
8.4. Opbouw apparatuur	42
8.5. Toepassingen	43
9. DETEKTIESYSTEMEN	43
9.1. Onderverdeling detektoren	43
9.2. Detektoren voor gaschromatografie	44
9.3. Detektoren voor vloeistofchromatografie	50

	blz.
10. REGISTRATIE EN INTERPRETATIE	54
10.1. Registratie	54
10.2. Interpretatie	64
11. WAT KAN ER FOUT GAAN EN HOE KAN DAT WORDEN OPGELOST?	66
12. TOEPASSINGSGEBIEDEN	68
13. LITERATUUR	72

ALTERRA

Wageningen Universiteit & Research centre
Omgevingswetenschappen
Centrum Water & Klimaat
Team Integraal Waterbeheer

1. INLEIDING

Op het waterkwaliteitslaboratorium van het ICW hebben de chromatografische technieken een belangrijke plaats ingenomen. Het op de juiste wijze toepassen hiervan vereist echter een gedegen kennis van de chromatografie, zowel voor degenen die er praktisch mee bezig zijn als voor degenen die de resultaten verwerken.

Dit is de reden geweest om binnen de hoofdafdeling Waterkwaliteit een cursus chromatografie te organiseren. Deze cursus is gehouden in de maanden april en mei 1980 gedurende 7 middagen. De behandelde stof wordt in deze nota beschreven.

Gezien de korte tijd van de cursus was het niet mogelijk de chromatografie volledig te behandelen. Om toch zoveel mogelijk te bespreken zijn hier en daar vereenvoudigingen ingevoerd, die bij nadere beschouwing misschien niet helemaal juist zijn, maar die toch een goede indruk geven van de mogelijkheden van chromatografie. Voor degenen die meer willen weten over chromatografie wordt verwezen naar de literatuurlijst.

Deze nota geeft een overzicht van de chromatografie met de nadruk op de technieken die op het waterkwaliteitslaboratorium van het ICW worden toegepast en is in eerste instantie bedoeld als naslagwerk voor degenen die de cursus hebben gevolgd.

2. DEFINITIE CHROMATOGRAPHIE

Chromatografie is een techniek om stoffen te scheiden. Alle chromatografische methoden berusten op een verdeling van de te scheiden stoffen over twee fasen, waarbij de ene fase (stationaire fase) door een vaste drager op zijn plaats wordt gehouden, terwijl

de tweede (mobiele fase) beweegt. Door selectieve vertraging (bijvoorbeeld stof A wordt minder vertraagd dan stof B), door de stationaire fase uitgeoefend zullen de componenten van een mengsel zich met verschillende snelheid voortbewegen en hierdoor van elkaar worden gescheiden.

De definitie kan ook worden weergegeven met de volgende illustratie (fig. 1)

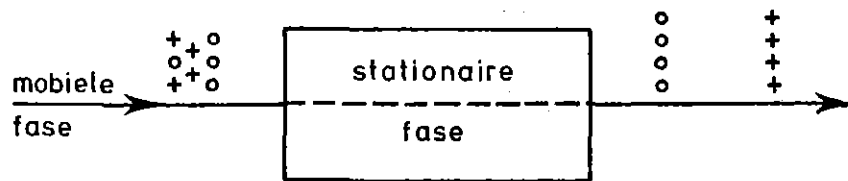


Fig. 1. Weergave definitie chromatografie

+ is stof A

o is stof B

3. GESCHIEDENIS

De ontdekking van de chromatografie wordt toegeschreven aan de Russische botanicus TSWETT (1903). Hij leidde een extract van groene bladeren, dat hij had verkregen door de bladeren te extraheren met petroleum-ether over een kolom die gevuld was met gepoederd calcium carbonaat. Tswett zag hierbij verschillende gekleurde zones ontstaan, welke zich met verschillende snelheid door de kolom bewogen. Hij had dus een scheiding gekregen tussen verschillende gekleurde stoffen. Hij noemde deze techniek CHROMATOGRAFIE, naar het Griekse chromo grafia, hetgeen schrijven met kleuren betekent. Hoewel de techniek later ook gebruikt werd voor de scheiding van kleurloze stoffen, is de naam chromatografie ingeburgerd gebleven.

Een nieuwe vorm van chromatografie werd in 1941 geïntroduceerd door Martin en Synge. Zij gebruikten voor de scheiding twee vloeibare fasen, waarvan er één door een vaste drager in een kolom op zijn plaats werd gehouden.

Dezelfde onderzoekers vonden in 1941 dat ook filtreerpapier als drager van een vloeistoffase kan dienen. Deze ontdekking, de papierchromatografie, maakte scheidingen op een schaal van microgrammen mogelijk.

Martin had al in 1941 gewezen op de mogelijkheid om een gas als mobiele fase te gebruiken. Door de tweede wereldoorlog stond het onderzoek echter een tijdlang stil. Pas in 1952 voerde hij samen met James een scheiding van vluchtige vetzuren uit met behulp van een mobiele gasfase. De gaschromatografie bleek een snelle en zeer gevoelige methode te zijn en heeft zich dan ook ontwikkeld tot een veel gebruikte techniek.

De laatste jaren is men echter ook beperkingen van gaschromatografie gaan inzien. Hierdoor is men gekomen tot een verdere ontwikkeling van de chromatografie waarbij een vloeistof als mobiele fase fungeert. Dit heeft geleid tot een nieuwe techniek, de HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

4. HOE WERKT CHROMATOGRAFIE?

Het belangrijkste onderdeel bij chromatografie is in veel gevallen een kolom. Hierin bevindt zich de stationaire fase. Zo'n kolom kan verschillende vormen hebben. De inwendige diameter kan bijvoorbeeld variëren van 0,2 mm tot enkele centimeters en de lengte van enkele centimeters tot tientallen meters.

Naast de kolom worden ook papier en platen, waarop de stationaire fase als een dunne laag is aangebracht, gebruikt. Er is dan sprake van papier- of dunne-laag chromatografie (Thin Layer Chromatography). Deze laatste twee technieken worden op het waterkwaliteitslaboratorium niet toegepast.

Voor het scheiden van een aantal stoffen wordt het mengsel bovenop de kolom gebracht. Door de kolom wordt de mobiele fase geleid. Het mengsel wordt door de mobiele fase meegenomen en in de kolom gescheiden. De stoffen komen afzonderlijk uit de kolom en worden daar gemeten (gedetekteerd). Het gemeten signaal (detektorsignaal) wordt dan weergegeven op een recorder. Dit geeft een chromatogram (fig. 2).

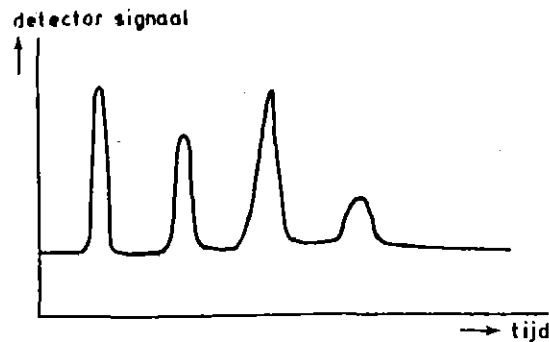


Fig. 2. Chromatogram, detektorsignaal uitgezet tegen de tijd

In het chromatogram zijn een aantal pieken zichtbaar. Elke piek stelt een stof voor en de plaats is karakteristiek voor de stof. De grootte van de piek is evenredig met de hoeveelheid van de stof.

Bij chromatografie wordt ernaar gestreeft dat alle stoffen in een mengsel afzonderlijke pieken in het chromatogram geven, zodat ze ook afzonderlijk kunnen worden bepaald. Hoe goed een scheiding is wordt bepaald door de juiste keuze van methode, stationaire en mobiele fase.

5. DE MATHEMATISCHE ACHTERGROND VAN DE SCHEIDING

H e t b e l a n g v a n d e m a t h e m a t i e k

De chromatografische scheiding van stoffen is mathematisch volledig af te leiden. Hierover bestaan vele boekwerken. Er wordt echter wel eens gesuggereerd dat je met verkregen formules van tevoren kunt berekenen of een bepaalde scheiding zal lukken. In de praktijk gaat dit niet, omdat je meestal wel één of meer gegevens mist. Wel kan met de formules een bestaande scheiding worden verbeterd.

Of een bepaald mengsel kan worden gescheiden wordt in de praktijk uitgeprobeerd en niet berekend. De mathematiek en verdere theorie dienen hierbij als leidraad en er wordt weinig of niets mee berekend.

Hetgeen in dit hoofdstuk en andere theoretische hoofdstukken wordt beschreven moet dan ook niet worden gezien als een aantal formules waar

van alles mee kan worden berekend. Het is belangrijker de formules te begrijpen en zo te zien welke factoren een scheiding beïnvloeden. Dit kan het uitproberen bekorten. Chromatografie zou daarom gezien kunnen worden als een 'probeerwetenschap'.

De resolutie

De resolutie of het scheidend vermogen is een maat voor de scheiding van de pieken in het chromatogram. Dit is weergegeven in fig. 3, hierin zijn twee pieken te zien die slecht en volledig zijn gescheiden.

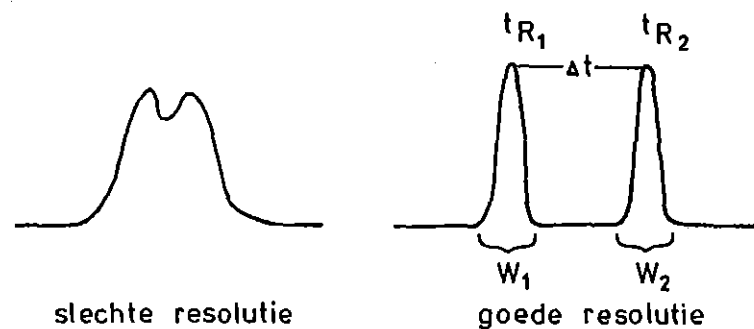


Fig. 3. De resolutie

R , de maat voor de resolutie, is gelijk aan

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{w_1 + w_2}{2}} = \frac{2 \Delta t}{w_1 + w_2}$$

t_{R1} = tijd waarop de 1e component wordt gedetekteerd

t_{R2} = idem voor 2e component

w_1 = breedte van de piek bij de basis van de 1e component

w_2 = idem voor 2e component

De resolutie kan worden beïnvloed door te zorgen voor een grote Δt . Dit kan door een goede keuze van de kolom, oftewel een kolom te nemen met een grote seletiviteit. Zo'n kolom moet met de ene stof een

grotere wisselwerking hebben dan met de andere.

De selektiviteit wordt ook wel gegeven door α

$$\alpha = \frac{t_{R_2} - t_o}{t_{R_1} - t_o}$$

t_o = tijd die verstrijkt, voordat een stof die geen wisselwerking heeft door de kolom komt

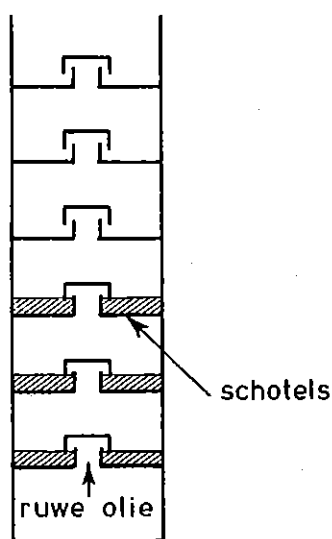
Er is sprake van een scheiding als $\alpha \neq 1$

De breedte van de piek bepaalt eveneens de grootte van de resolutie. De breedte wordt bepaald door de effectiviteit. Dit wordt in het volgende hoofdstuk beschreven.

D e e f f e c t i v i t e i t

De breedte van een piek wordt zoals al is vermeld bepaald door de effectiviteit. Een maat hiervoor is de HETP, Height Equivalent to a Theoretical Plate of hoogte gelijk aan een theoretische schotel.

Voordat verder wordt gegaan met de HETP zal eerst het begrip schotel worden verklaard, dit is een theoretisch begrip. Het stamt uit de destillatietechniek. Een destillatiekolom in een oliaffinaderij is opgebouwd uit een aantal schotels (fig. 4). De ruwe olie onderin wordt gekookt en condenseert weer in de 1e schotel. Door de toegevoegde warmte gaat de vloeistof weer koken en condenseert in de 2e schotel.



Bij het koken gaan er meer vluchtige componenten in dampvorm over, dan componenten met een hoog kookpunt, uiteindelijk komen alleen de vluchtige componenten in de bovenste schotel. In elke schotel stelt zich een zodanige toestand in, dat de damp en de vloeistof met elkaar in evenwicht zijn.

Dit begrip schotel kan nu ook worden overgebracht naar een chromatografische kolom. Het is een bepaald stukje kolom waarin zich precies één evenwichtsinstelling afspeelt. Als er bijvoorbeeld wordt gekeken

Fig. 4. Destillatiekolom

naar een deeltje dat wisselwerking heeft met de stationaire fase en gelijk verdeeld is over de stationaire- en mobiele fase, dan is 1 schotel gelijk aan het stukje kolom waarin de stof 1x is geadsorbeerd en 1x is gedesorbeerd (zie fig. 5).

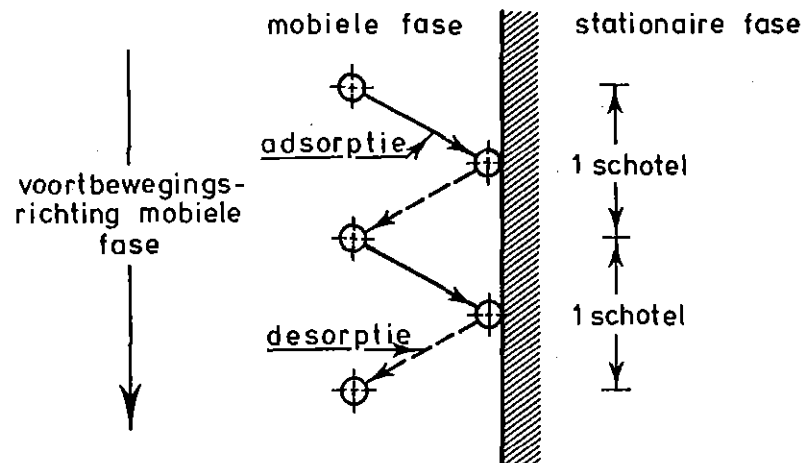


Fig. 5. Het begrip schotel

$$\text{De verdelingscoëfficiënt } K = \frac{\text{aantal deeltjes in stat fase}}{\text{aantal deeltjes mob fase}}$$

Nu geldt hoe vaker zich een evenwicht instelt hoe beter. Dit wordt geïllustreerd aan de hand van een voorbeeld, waarbij wordt gekeken naar 2 verschillende stoffen, waarvan de ene stof een verdelingscoëfficiënt K van 0,14 en de andere een K van 1.

In tabel 1 is weergegeven hoe de evenwichten zich dan instellen. Op de eerste schotel zijn 64 deeltjes van beide deeltjes aangebracht. In deze schotel stelt zich evenwicht in (kolom evenw.). Links van de lijn staan de deeltjes in de mobiele fase en rechts die in de stationaire fase. De mobiele fase beweegt, dus de deeltjes in de mobiele fase schuiven op naar de volgende schotel (kolom opsch.). Dit proces blijft zich herhalen. In de tabel is alles uitgerekend tot de 6e evenwichtsinstelling. Er is nu al een scheiding zichtbaar. Het maximum van de 1e component bevindt zich al op de 6e schotel, van de 2e pas op de 3e en 4e schotel.

Tabel 1. De verdeling van twee stoffen over een aantal schotels

$K = 0,14$ en $K = 1$

	op- brengen	evenw.1	opsch.	evenw.2	opsch.	evenw.3	opsch.	evenw.6
1e schotel	64 0 56 8	8	7 1	1 1 0	0 0 0			
	<u>64</u> 0 <u>32</u> <u>32</u>	<u>32</u>	<u>16</u> <u>16</u>	<u>16</u> <u>8</u> <u>8</u>	<u>8</u> <u>1</u> <u>1</u>			
2e schotel		56	49 7	7 7 12 2	1 2 0 0			
		<u>32</u>	<u>16</u> <u>16</u>	<u>16</u> <u>16</u>	<u>8</u> <u>16</u> <u>5</u> <u>5</u>			
3e schotel			49	43 6	12 6 1 0			
			<u>16</u>	<u>8</u> <u>8</u>	<u>16</u> <u>8</u> <u>10</u> <u>10</u>			
4e schotel				43	6 1			
				<u>8</u>	<u>10</u> <u>10</u>			
5e schotel					20 3			
					<u>5</u> <u>5</u>			
6e schotel					29 4			
					<u>1</u> <u>1</u>			

Voor een scheiding zijn dus een voldoende aantal schotels nodig.
Hoe meer schotels, des te beter de scheiding.

VAN DEEMTER heeft een vergelijking afgeleid voor de HETP. Deze vergelijking is tamelijk ingewikkeld, maar kan worden samengevat tot de volgende vorm.

$$\text{HETP} = A + \frac{B}{v} + C v \quad v = \text{snelheid mobiele fase}$$

A = Eddy diffusie

Dit wordt veroorzaakt door een niet ideaal gedrag in de kolom, doordat de pakking niet overal homogeen is. Fig. 6 is een illustratie hiervan. Als de kolom homogeen zou zijn, dan komen alle deeltjes gelijk aan aan het einde van de kolom. Bij inhomogeniteit van de kolom treedt er een spreiding op door een verschil in weglengte.

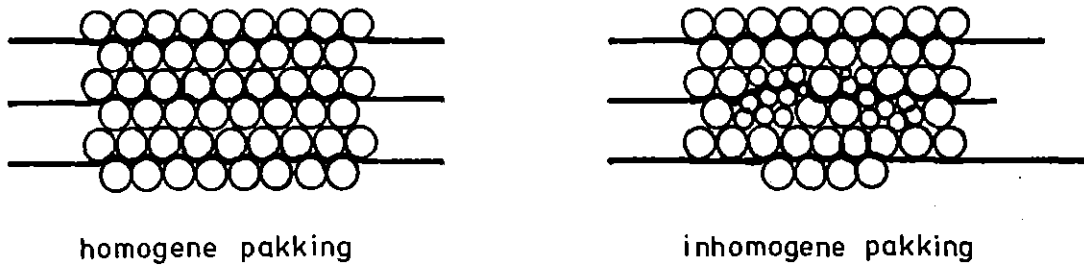


Fig. 6. Effect pakking op de Eddy diffusie

$\frac{B}{v}$ is een term die staat voor de diffusie. In de kolom zijn concentratieverschillen, waardoor er een diffusiestroom komt van de hoge naar de lage concentratie. Dit komt tot uiting in een breder worden van de piek. Bij een grote v is deze term van minder belang.

C_v Geldt voor het massatransport. Voor het instellen van een evenwichtssituatie is tijd nodig. Bij een te hoge snelheid van de mobiele fase zal het evenwicht zich niet goed instellen, hetgeen ten koste gaat van de HETP. Bij een vloeistof als stationaire fase is C ook afhankelijk van de dikte van de vloeistoflaag. Bij een dikke laag stelt het evenwicht zich snel in, bij een dunne langzaam.

De drie termen uit de Van Deemter vergelijking zijn in fig. 7 uitgezet tegen de snelheid van de mobiele fase. Ook de som van de drie, de totale HETP is in de figuur weergegeven. Uit de figuur blijkt dat er een optimum is van de HETP. De HETP is hier minimaal, dus zoveel mogelijk schotels (groot schotelgetal).

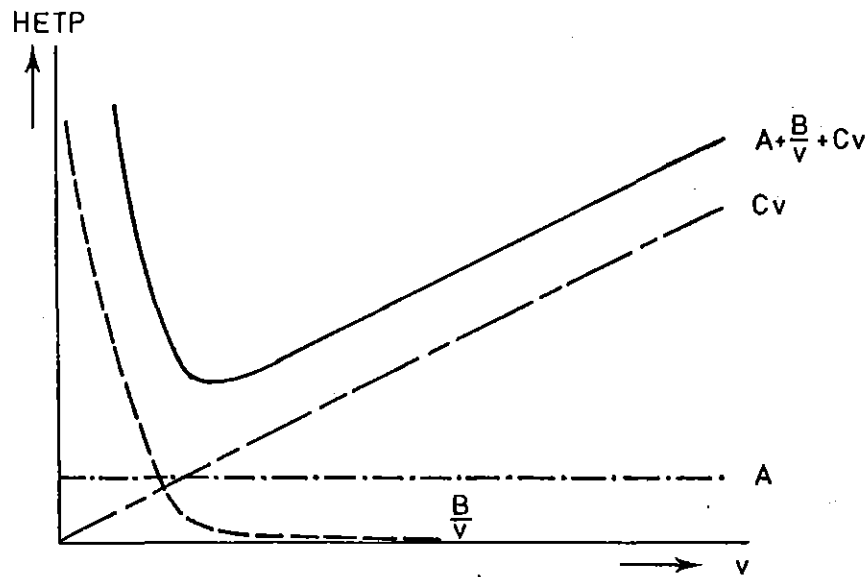


Fig. 7. De HETP als functie van de snelheid van de mobiele fase.

De HETP en het schotelgetal komen in het chromatogram tot uiting in de breedte van de pieken (zie fig. 8).

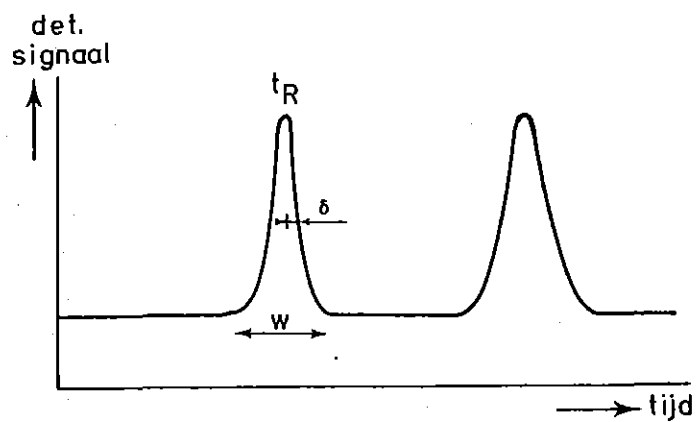


Fig. 8. Berekening schotelgetal

Het schotelgetal n is gelijk aan

$$n = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2$$

σ = standaardafwijking van de piek

Aangezien $w = 4\sigma$ geeft dit

$$n = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

Hoe groter het aantal schotels, hoe smaller de piek ten opzichte van de retentietijd. Het belang van het schotelgetal wordt ook weergegeven in fig. 9. Duidelijk is te zien dat een kolom met een groot schotelgetal een betere scheiding wordt verkregen. Met deze kolom kunnen in principe nog meer stoffen worden gescheiden.

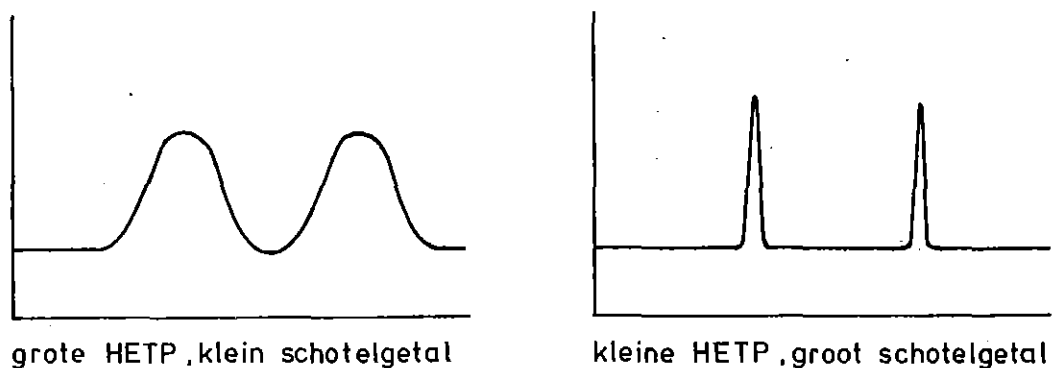


Fig. 9. De invloed van het schotelgetal op de scheiding

6. SAMENVATTING HOOFDSTUK 2 T/M 5

Chromatografie is een techniek voor het scheiden van stoffen. Voor de scheiding is een kolom nodig met een goede resolutie. De resolutie wordt bepaald door de selektiviteit en de HETP van een kolom. De selektiviteit wordt beïnvloed door keuze van de stationaire en mobiele fase.

De HETP is afhankelijk van de manier waarop een kolom gepakt is en van de snelheid van de mobiele fase.

Indien er nu 2 stoffen moeten worden gescheiden, dan moet er worden gelet op:

- 1) De kolom moet wisselwerking hebben met de te scheiden stoffen.

Voor apolaire stoffen is een apolaire kolom nodig en voor polaire een polaire kolom.

- 2) Voor 2 stoffen zijn betrekkelijk weinig schotels nodig. Er kan dan worden volstaan met een korte kolom. Ook aan de kwaliteit van de kolom hoeven niet te hoge eisen worden gesteld. Bij scheiding van meerdere stoffen zijn wel veel schotels nodig. Deze kunnen worden verkregen door een langere kolom te nemen. Dit kan echter niet onbeperkt, waardoor ook de kwaliteit zal moeten verbeteren.

7. GASCHROMATOGRAPHIE

7.1. O p b o u w g a s c h r o m a t o g r a f i e

Bij gaschromatografie is de mobiele fase een gas. Het gas wordt door een kolom geleid (fig. 10).

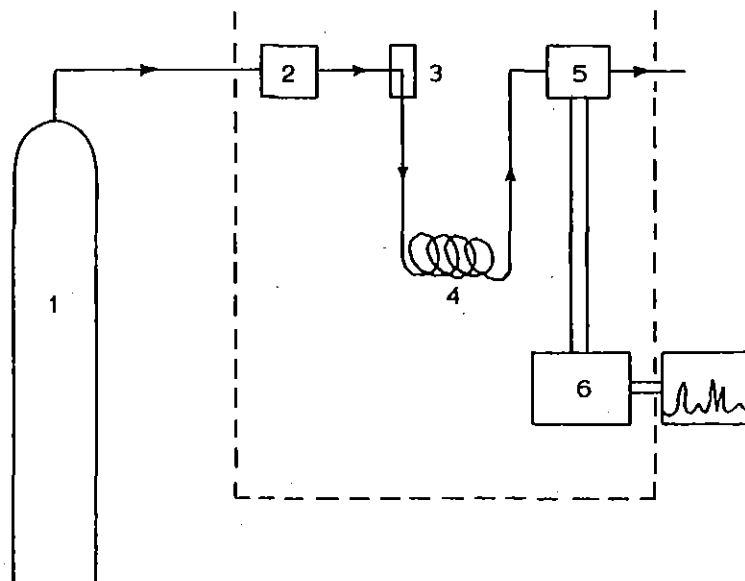


Fig. 10. Schematisch overzicht gaschromatograaf

1. cilinder : gevuld met mobiele fase (dragergas); de meest gebruikte gassen zijn stikstof, waterstof en helium
2. gasregeling : hiermee kan de gasstroom door de kolom worden geregeld

- 3. injectiesysteem : aan het begin van de kolom; hier wordt het monster in de kolom geïnjecteerd
- 4. kolom : Belangrijkste onderdeel van de apparatuur, omdat hier de scheiding plaatsvindt; bevindt zich in een oven en is gevuld met de stationaire fase
- 5. detector : aan het eind van de kolom; hier worden de gescheiden stoffen gemeten
- 6. registratiesysteem: versterkt en registreert het signaal van de detector; bestaat uit een electronisch versterkersgedeelte in de gaschromatograaf, een recorder en een integrator.

7.2. O n d e r v e r d e l i n g g a s c h r o m a t o g r a f i e

Bij gaschromatografie wordt er onderscheid gemaakt in

Gas-vast-chromatografie, de stationaire fase is een vaste stof.

Dit wordt ook wel GSC genoemd (Gas Solid Chromatography)

Gas-vloeistof-chromatografie, de stationaire fase is een vloeistof.

De vloeistof is meestal als een dunne laag aangebracht op een vaste inerte (niet-actieve) drager. Het heet ook wel GLC (Gas Liquid Chromatography).

7.3. B e ï n v l o e d i n g s c h e i d i n g

In hoofdstuk 5.3.1. is al aangetoond, dat stoffen kunnen worden gescheiden als ze een verschillende wisselwerking met de stationaire fase hebben.

$$K = \frac{\text{concentratie in stat fase}}{\text{concentratie in mob fase}}$$

Voor de volgende theoretische afleiding is het makkelijker K anders te schrijven en wel

$$K_A = \frac{x_{A \text{ stat}}}{x_{A \text{ gas}}} \quad (1)$$

x = molfractie

$$= \frac{\text{aantal mol stof A in bepaalde fase}}{\text{totaal aantal mol in die fase}}$$

b.v. 0,1 mol A opgelost in 10 mol B

$$x_A = \frac{0,1}{0,1+10} = 0,0099$$

Nu geldt voor de dampspanning van A, (deze is evenredig met x_A gas), de wet van Raoult

$$P_A = x_A \text{ stat } P_A^0 \quad (2)$$

P_A = dampspanning stof A

P_A^0 = dampspanning bij $x_A = 1$, dus bij zuiver A

In vergelijking (2) staat dat de dampspanning van A evenredig is met de molfractie in de stationaire fase. De wet van Raoult geldt alleen als de molfractie van A in de stationaire fase klein is en als er geen wisselwerking is tussen A en de stationaire fase. Dit laatste is meestal niet het geval. Hiervoor kan een correctiefactor worden ingevoerd, (2) wordt dan

$$P_A = x_A \text{ stat } f P_A^0 \quad (3)$$

f = correctiefactor, hoeft geen evenredigheid te zijn

P_A^0 is afhankelijk van de temperatuur. Dit wordt weergegeven door de wet van Clapeyron.

$$\frac{d \ln P_A^0}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (4)$$

ΔH = verdampingswarmte

T = temperatuur in $^{\circ}\text{K}$

R = gasconstante

Oplossen van deze vergelijking levert

$$\ln \frac{P_{A_2}^0}{P_{A_1}^0} = \frac{\Delta H(T_2 - T_1)}{R T_1 T_2} \quad (5)$$

Is de dampspanning $P_{A_1}^0$ bij temperatuur T_1 bekend dan kan $P_{A_2}^0$ voor elke andere willekeurige temperatuur worden berekend. Voor T_1 wordt meestal de kooktemperatuur genoemd, dan is $P_{A_1}^0$ gelijk aan 1.

Dit geeft dan

$$\ln P_{A_2}^0 = \frac{\Delta H(T_2 - T_1)}{R T_1 T_2}$$

T_1 = kooktemperatuur

T_2 = werkt temperatuur

of

$$P_{A_2}^0 = e^{\frac{\Delta H(T_2 - T_1)}{RT_1 T_2}} \quad (6)$$

(6) ingevuld in de wet van Raoult (3) geeft

$$P_A = x_{A \text{ stat}}^f \cdot e^{\frac{\Delta H(T_2 - T_1)}{RT_1 T_2}}$$

of

$$\frac{x_{A \text{ stat}}}{P_A} = \frac{1}{f} \cdot e^{\frac{-\Delta H(T_2 - T_1)}{RT_1 T_2}} \quad (7)$$

Verder is P_A evenredig met de molfractie in de gasfase

$$P_A = c \cdot x_{A \text{ gas}} \quad (8)$$

(7) en (8) gecombineerd met 1 levert

$$K = \frac{1}{cf} \cdot e^{\frac{-\Delta H(T_2 - T_1)}{RT_1 T_2}} \quad (9)$$

In formule (9) staat weergegeven dat de verdelingscoëfficiënt K afhankelijk is van de temperatuur en van een factor f die de

wisselwerking van stof A met de stationaire fase weergeeft. Deze factor kan ook weer van de temperatuur afhangen.

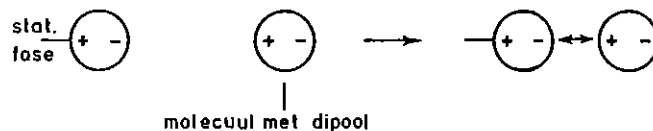
Effect f op de scheiding

f , de factor voor de wisselwerking tussen de stationaire fase en de te bepalen stof wordt bepaald door:

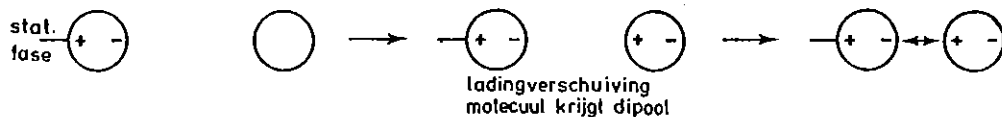
1. Dispersiekrachten - krachten tussen niet polaire moleculen
(v.d. Waals wisselwerking)



2. Dipoolkrachten - krachten tussen moleculen, waarin permanente dipolen aanwezig zijn

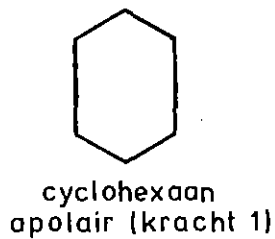


3. Induktiekrachten - krachten tussen polaire moleculen en moleculen waarin een dipool wordt geïnduceerd



Door het kiezen van een stationaire fase waarin de krachten in meerdere of mindere mate aanwezig zijn, is het mogelijk een bepaalde scheiding uit te voeren.

Als voorbeeld is de scheiding van benzeen en cyclohexaan genomen bij 56°C . Bij deze temperatuur hebben beide stoffen dezelfde dampspanning.



Bij gebruik van een polaire stationaire fase is de wisselwerking van benzeen met die fase groter dan die van hexaan. In het chromatogram komt benzeen dan ook na cyclohexaan (fig. 11). Bij een apolaire stationaire fase is de situatie juist andersom.

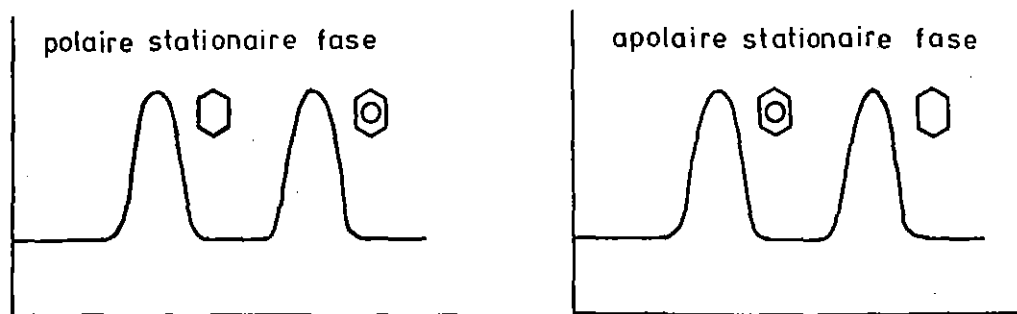


Fig. 11. De scheiding van benzeen en cyclohexaan bij verschillende stationaire fasen

Effect van de temperatuur op de scheiding

Het temperatuurseffect wordt duidelijk gemaakt aan de hand van de scheiding van n-alkanen. Dit zijn koolwaterstoffen met een rechte koolstofketen, die alleen in aantal koolstofatomen van elkaar verschillen. Ze hebben alle dezelfde wisselwerking met de stationaire fase en verschillen alleen in kookpunt en verdampingswarmte. Als bij één bepaalde temperatuur het chromatogram van deze stoffen wordt opgenomen, wordt het volgende plaatje verkregen (fig. 12).

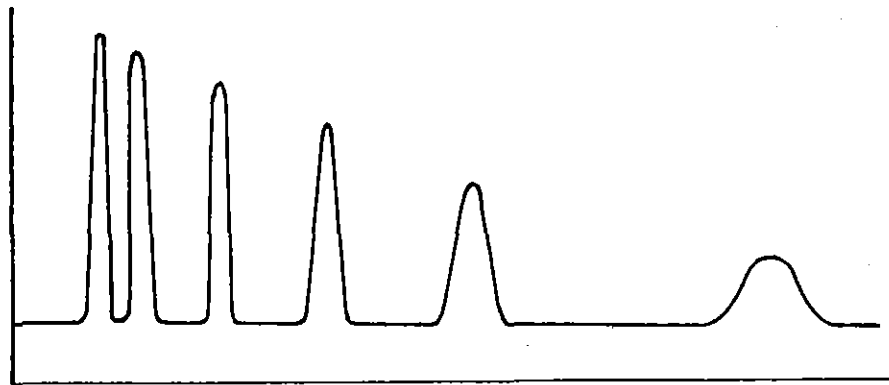


Fig. 12. Gaschromatogram n-alkanen (C_{10} t/m C_{15}) bij lage temperatuur

De eerste pieken in fig. 12 zijn goed gescheiden. De laatste pieken zijn echter verbreed. Wordt dezelfde analyse nogmaals bij een hogere temperatuur gedaan, dan wordt het chromatogram verkregen, dat is weergegeven in fig. 13.

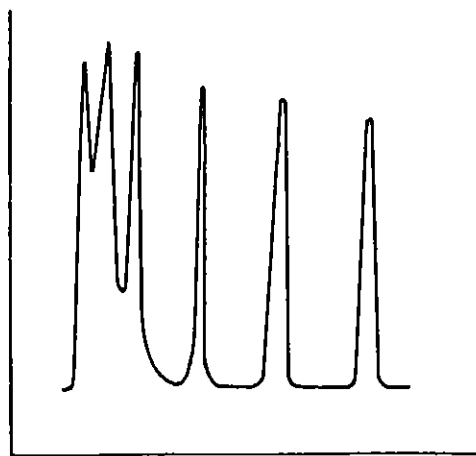


Fig. 13. Gaschromatogram n-alkanen (C_{10} t/m C_{15}) bij hoge temperatuur

Nu zijn de laatste pieken goed gescheiden, terwijl de eerste samen-vallen. Door keuze van de temperatuur zijn dus stoffen te scheiden. De laagkokende n-alkanen kunnen worden gescheiden bij een lage tempe-ratuur, de hoogkokende bij een hoge temperatuur.

Het is echter vaak noodzakelijk, om zowel de hoogkokende als de laagkokende stoffen gelijktijdig te kunnen bepalen. Dit is mogelijk met behulp van temperatuurprogrammering. Hierbij wordt gestart met een lage temperatuur en wordt tijdens de analyse de temperatuur langzaam verhoogd (lineaire programmering). De verhoging, aantal $^{\circ}\text{C}$ per minuut, moet zodanig zijn dat alle pieken goed worden gescheiden. Dit is een kwestie van proberen. Bij een goede programmering wordt een chromatogram verkregen als weergegeven in fig. 14.

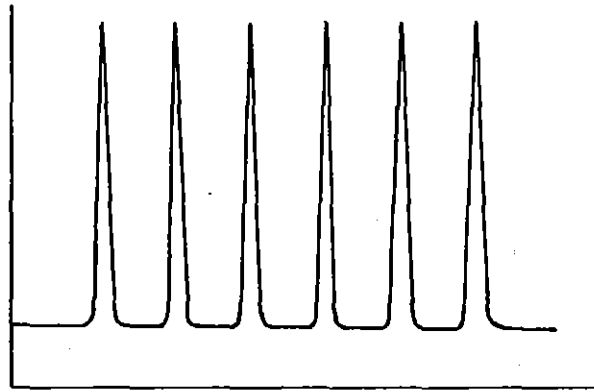


Fig. 14. Gaschromatogram n-alkanen (C_{10} t/m C_{15}) bij temperatuurprogrammering

Het toepassen van temperatuurprogrammering, vereist echter wel een aanpassing van de apparatuur. Bij het verhogen van de temperatuur komt er namelijk mobiele fase van de kolom af. Deze mobiele fase bereikt de detector, hetgeen aanleiding geeft tot verhoging van de basislijn (fig. 15). Het vrijkomen van de mobiele fase wordt ook wel 'bleeding' genoemd.

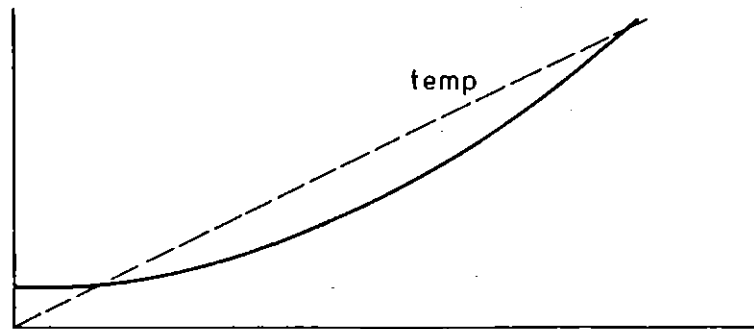


Fig. 15. Basislijn bij temperatuurprogrammering

De te bepalen pieken komen op de verlopende basislijn te liggen en geven dan een moeilijk te interpreteren chromatogram, fig. 16.

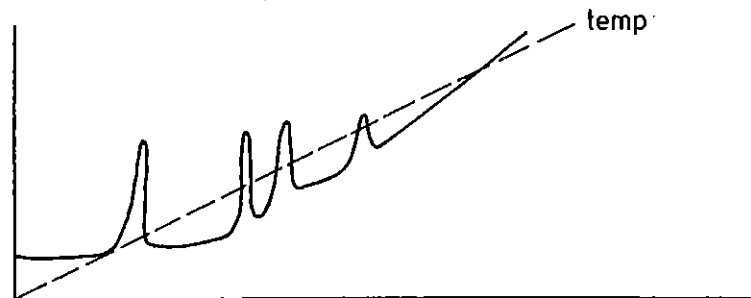


Fig. 16. Gaschromatogram bij temperatuurprogrammering

Er kan worden gecorrigeerd voor de bleeding, door gebruik te maken van twee identieke kolommen elk met een detector. Op de ene kolom wordt het monster geïnjecteerd. Hierbij wordt een chromatogram als fig. 16 verkregen (pieken + bleeding). Op de tweede kolom, de referentiekolom, wordt niets geïnjecteerd. De bleeding is hetzelfde als bij de eerste kolom. Het signaal van de detector is dat van fig. 15. Nu geeft het verschilsignaal van beide detectoren het juiste chromatogram (fig. 17).

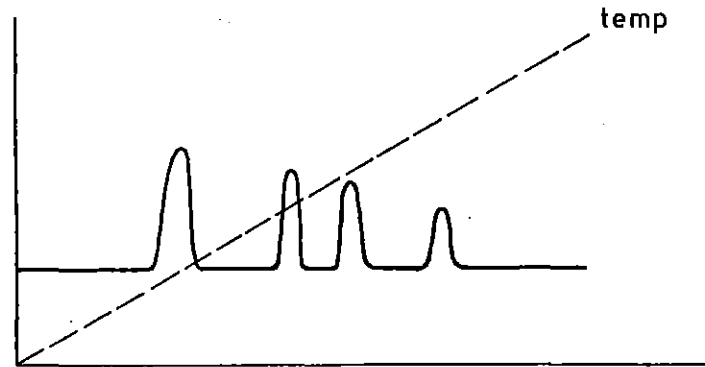


Fig. 17. Gaschromatogram bij temperatuurprogrammering
Twee kolomsysteem

Een referentiekolom is nodig bij gebruik van een gepakte kolom. Bij een kapillaire kolom is de bleeding zo gering dat er hier volstaan kan worden met één kolom. Het verschil tussen een gepakte en kapillaire kolom wordt in het volgende hoofdstuk nader uiteengezet.

7.4. K o l o m m e n

Bij gaschromatografie zijn 2 type kolommen in gebruik. Voor beide typen geldt dat de soort stationaire fase bepaalt welke scheiding mogelijk is.

De langst gebruikte kolom is de gepakte kolom. Dit is een metalen of glazen buis, meestal gespiraliseerd, zodat hij in de oven past. De inwendige diameter is over het algemeen 2 mm. De buis is gepakt met inerte deeltjes (diameter circa 0,2 mm) waarop een dunne laag stationaire fase is aangebracht. Bij een dunne laag is de HETP het kleinst, omdat dan het massatransport (C) het kleinst is. Er kan dan slechts weinig monster worden geïnjecteerd, omdat anders de kolom wordt overladen. Bij een dikkere laag kan meer worden geïnjecteerd, maar de HETP is veel groter.

Voor analytische kolommen wordt meestal gewerkt met een hoeveelheid stationaire fase van circa 3%. Dit geeft een goede scheiding, terwijl toch nog 1 tot 10 μ l kan worden geïnjecteerd.

De lengte van een gepakte kolom is beperkt tot 2 à 3 meter, omdat anders een veel te grote gasdruk nodig is om de mobiele fase met een snelheid van circa 25 ml per minuut door de kolom te sturen.

Aangezien het schotelgetal tot 6000 per meter kan zijn betekent dit een beperking voor het aantal schotels van circa 20 000.

Met een kapillaire kolom kan het schotelgetal veel groter worden. Zo'n kolom bestaat uit een kapillaire buis met een inwendige diameter van 0,2 mm. De stationaire fase is aangebracht op de wand van de kolom. Het schotelgetal bedraagt circa 5000 per meter. Doordat het drukverval bij een kapillaire kolom laag is kan gewerkt worden met zeer lange kolommen (tot 100 m). Dit betekent een schotelgetal tot 500 000.

Met een kapillaire kolom is de scheiding dus veel beter dan met een gepakte kolom, waardoor zo'n kolom geschikt is voor de scheiding van complexe mengsels. Een nadeel is dat er slechts weinig monster geïnjecteerd kan worden. Hierop wordt teruggekomen in het volgende hoofdstuk.

7.5. I n j e k t i e s y s t e m e n

Het monster wordt bij gaschromatografie meestal in opgeloste vorm geïnjecteerd met behulp van een injectiespuit. Het injectievolume ligt meestal tussen 0,5 en 10 μ l. Minder injecteren is moeilijk in verband met een te grote onnauwkeurigheid. Meer monster gaat ten koste van het scheidend vermogen van de kolom, omdat de kolom dan wordt overladen door het oplosmiddel of de te bepalen stoffen. In de kolom stelt zich dan geen evenwicht meer in.

Bij het opbrengen van het monster op de kolom, moet ervoor worden gezorgd, dat er geen lekkages ontstaan, omdat dan een deel van het monster weggeblazen kan worden. Dit kan door gebruik te maken van een septum. Een septum bestaat uit materiaal waar een injectienaald gemakkelijk doorheen kan worden gestoken. Het wordt op zijn plaats gehouden door een septumhouder (fig. 18).

Het septum is zodanig soepel, dat het zich om de naald heen sluit, en het systeem gasdicht blijft. Wordt de injectienaald eruit getrokken, dan trekt het gat meteen dicht. Het septum kan, afhankelijk van het materiaal, 20 tot 50 injecties worden gebruikt.

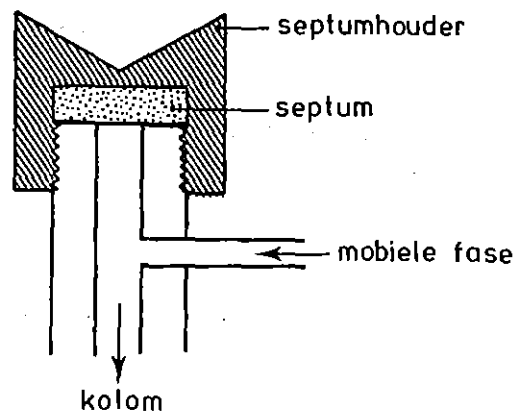


Fig. 18. Septum injectiesysteem

Een andere mogelijkheid, is de loopinjectie (fig. 19). Hierbij wordt gebruik gemaakt van een 6-weg kraan. De loop wordt volledig gevuld met monster, waarna de kraan wordt gedraaid. Het monster bevindt zich dan op de weg van de mobiele fase en wordt hierdoor meegenomen. Het loopinjectiesysteem wordt gebruikt bij de analyse van gassen, maar ook bij vloeistofchromatografie. De grootte van het monster wordt bepaald door de grootte van de loop.

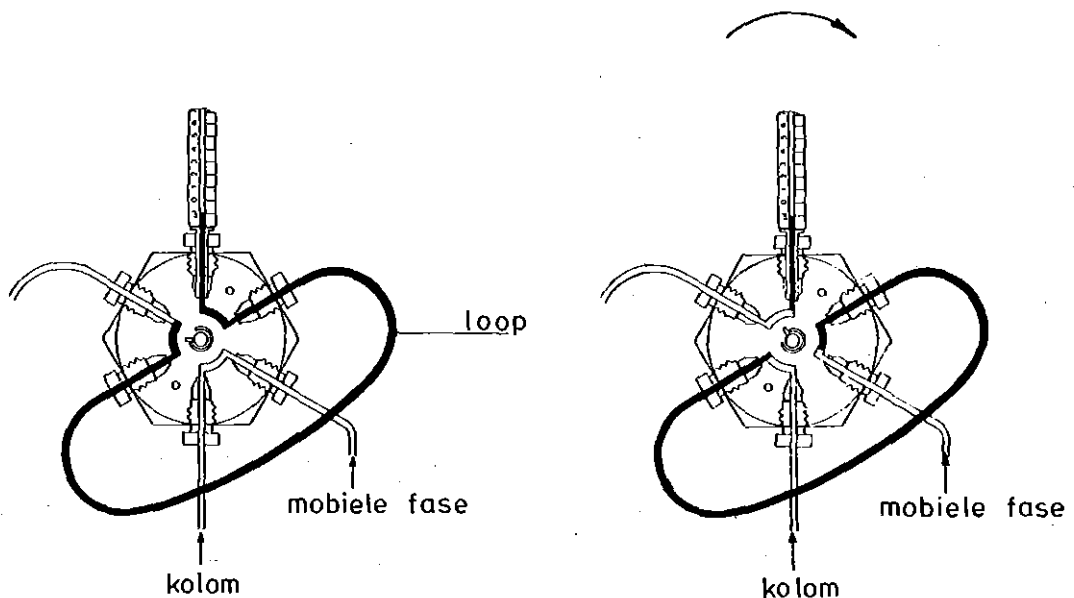


Fig. 19. Loopinjectiesysteem

Bij een kapillaire kolom kan slechts weinig monster (minder dan 0,1 μ l) opgebracht, omdat anders de kolom voor een groot deel gevuld zou zijn met oplosmiddel. Dit is erg slecht voor de kolom. Zo'n kleine hoeveelheid kan echter niet nauwkeurig worden geïnjecteerd. Om toch grotere hoeveelheden te kunnen injecteren bestaan er een aantal injectietechnieken.

Split-injectie

Bij split-injectie worden enkele μ l via een septum geïnjecteerd. Voor de kolom wordt de gasstroom 'gesplit'. Een klein gedeelte gaat de kapillaire kolom in en de rest wordt afgevoerd. Dit is schematisch weergegeven in fig. 20.

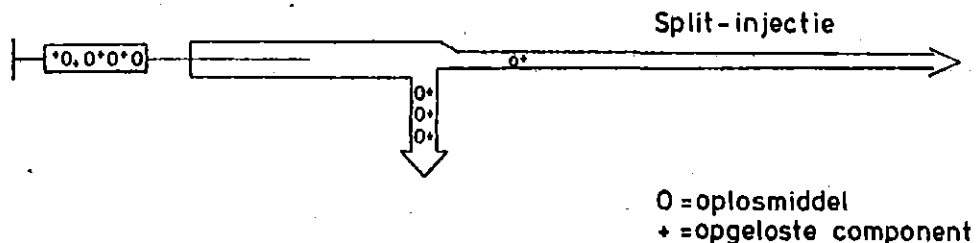


Fig. 20. Split-injectie

Een nadeel van de split-injectie is dat het niet geschikt is voor sporenanalyse, omdat ook het grootste deel van de te bepalen componenten wordt weggeleid.

Macro-injectie techniek

Met behulp van de injectie volgens Grob kunnen er meer van de te bepalen componenten op de kolom worden gebracht. Deze techniek wordt op het lab niet gebruikt en daarom ook niet beschreven.

Een verdergaande verbetering is de macro-injectietechniek ontwikkeld door het KIWA (NOORDSY, 1979). Deze methode is ook beschreven door v.d. Berg 1980 en wordt op het lab gebruikt.

Het essentiële kenmerk van de macro-injectie is dat op een kolommetje voor de capillaire kolom een scheiding wordt gemaakt tussen

oplosmiddel en de daarin opgeloste componenten. Het oplosmiddel wordt na de scheiding afgevoerd, waarna de te analyseren stoffen op de kapillaire kolom worden gebracht. Op de kapillaire kolom komt dus geen oplosmiddel. (fig. 21). De injectiehoeveelheid kan enkele tientallen microliters zijn, terwijl geen beperkingen gelden aan gaande het type oplosmiddel. Het oplosmiddel komt immers niet in contact met de kapillaire kolom.

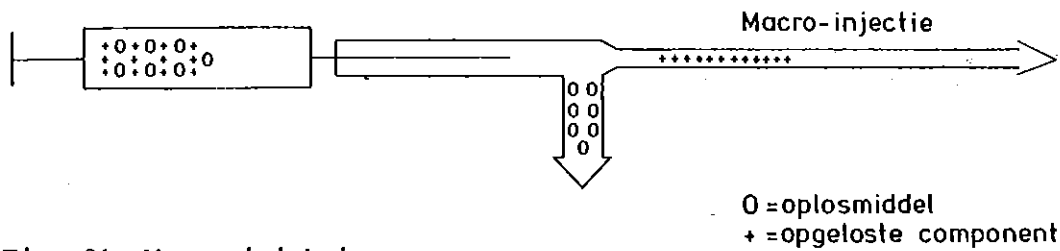


Fig. 21. Macro-injectie

Bij de injectie wordt een monster, bestaande uit een oplosmiddel met daarin de opgeloste componenten, via een septum geïnjecteerd in een gepakte voorkolom van circa 10 cm lengte (fig. 22).

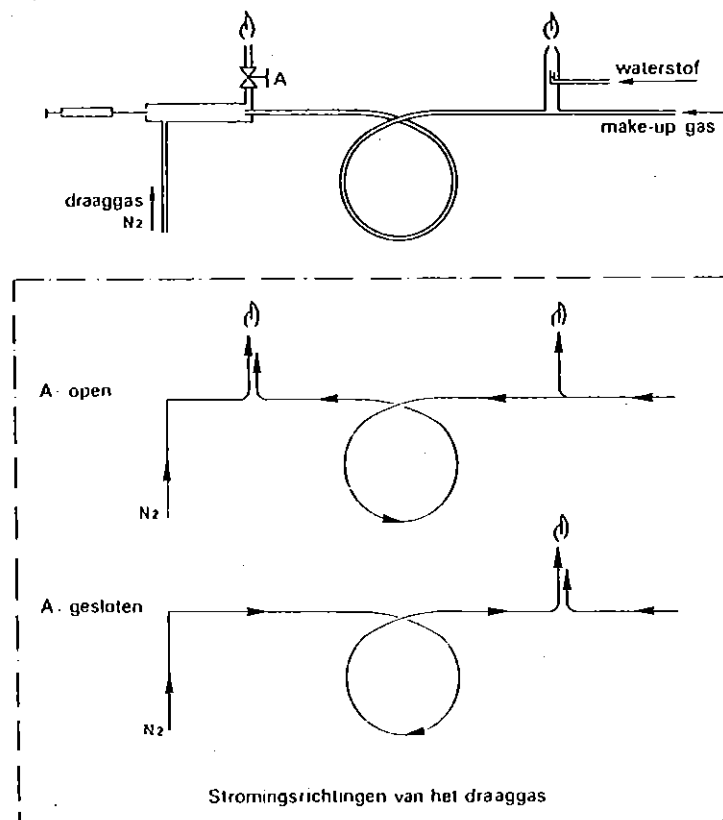


Fig. 22. Principe macro-injectie (naar NOORDSY, 1979)

Op deze kolom vindt de scheiding plaats tussen het oplosmiddel en de overige componenten. Door de overdruk van het make-up gas is de gasstroom in de kapillaire kolom tegengesteld aan de normale stromingsrichting. Hierdoor wordt voorkomen dat er aan het begin van de kapillaire kolom een vorm van splitting optreedt, waardoor een gedeelte van het oplosmiddel op de kapillaire kolom terecht komt. Het oplosmiddel wordt via de geopende kraan A afgevoerd en aldaar verbrand.

Het make-up gas wordt bij een kapillaire kolom gebruikt om er voor te zorgen dat de gassnelheid in de detektor hoog genoeg is.

Nadat het oplosmiddel de voorkolom heeft verlaten wordt de kraan A gesloten, waardoor het draaggas in de gewenste richting stroomt. De voorkolom wordt verwarmd tot 300°C , waardoor de daarop geadsorbeerde componenten gedesorbeerd en in de kapillaire kolom ingevoerd worden. Omdat de kapillaire kolom op een lage temperatuur van circa 30°C is, zullen de componenten direkt in de eerste schotels oplossen. Dit kan in feite worden vergeleken met een gewone injectie, maar nu is er veel meer van de te bepalen componenten op de kolom gekomen.

Voor de instelling van de gassnelheid zijn twee regelingen nodig die parallel geschakeld zijn. Eén regeling die zorgt voor een goede gassnelheid van 30 ml/min door de voorkolom tijdens de scheiding van de componenten en oplosmiddel. De tweede regeling zorgt voor een zodanige druk dat de snelheid in de kapillaire kolom gedurende de analyse 0,5 ml/min is. Hiervoor is een druk nodig van circa 0,8 atmosfeer.

7.6. T o e p a s s i n g e n

Gaschromatografie kan worden toegepast voor stoffen die bij de werkte temperatuur vluchtig zijn of vluchtig zijn gemaakt door een chemische omzetting.

Er worden nu verder in het kort enkele gaschromatografische analyses beschreven die op het laboratorium worden gedaan. Voor meer uitgebreide informatie wordt verwezen naar de desbetreffende nota's.

Vrije vluchtige vetzuren

De vrije vluchtige vetzuren (azijnzuur CH_3COOH tot capronzuur $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{COOH}$) kunnen met een polaire kolom worden gescheiden (HARMSEN, 1977). Aan de kolom is wat fosforzuur toegevoegd om adsorptie van de zuren tegen te gaan.

Adsorptie wordt veroorzaakt door het polaire karakter van de zuren en kan niet volledig worden tegengegaan door het fosforzuur. De adsorptie vindt veelal plaats in het injectiestuk, omdat dit op den duur wordt verontreinigd. Dit kan aanleiding geven tot zogenaamde spookpieken (ghosting). Dit zijn pieken die verschijnen als alleen water wordt geïnjecteerd. Ze verschijnen op dezelfde plaats als de pieken van de zuren en worden veroorzaakt doordat de geadsorbeerde zuren in het injectiestuk weer desorberen. De spookpieken kunnen worden tegengegaan door aan het monster een stof toe te voegen die beter wordt geadsorbeerd dan de te bepalen zuren. In dit geval voldeed mierzuur goed.

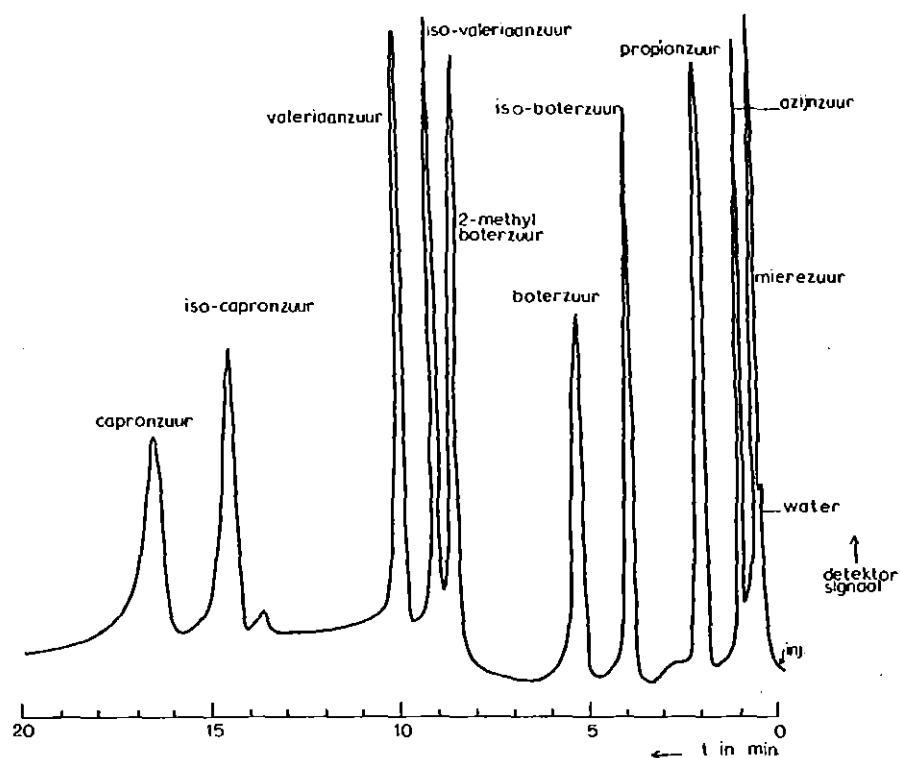


Fig. 23. Gaschromatogram $\text{C}_2\text{-C}_6$ zuren

0,01% van elk van de zuren; 1% mierzuur

kolom: 3% Carbowax 20 M; 0,5% H_3PO_4 op Carbowax B

kolomtemperatuur 170°C gedurende 7 min. daarna in 1 min. naar 210°C

Vluchtige amines

De amines kunnen met eenzelfde type kolom worden geanalyseerd als de zuren (fig. 24). Ook hierbij zijn spookpieken gesignaleerd. Deze kunnen worden verminderd door toevoegen van ammonia en loog aan het monster (MUYLAERT, 1979).

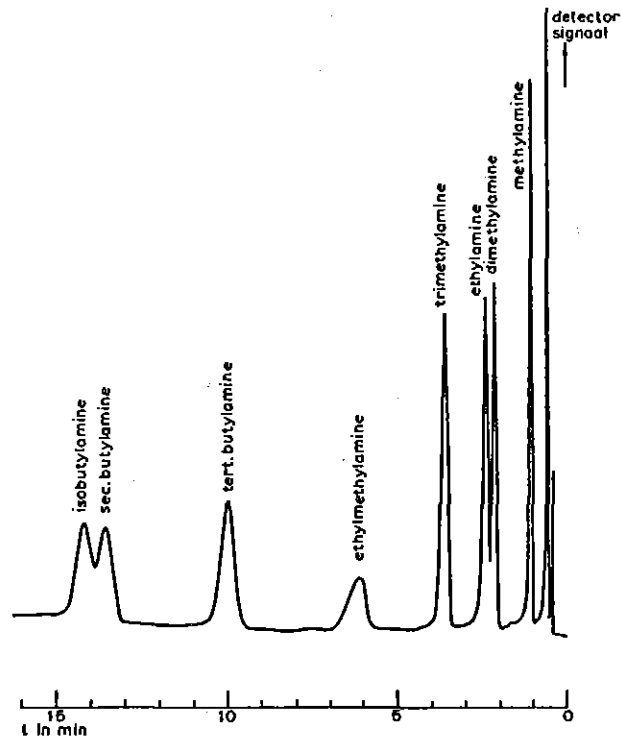


Fig. 24. Gaschromatogram vluchtige amines

0,01% van elk van de amines; 5% NH_3 en 1% KOH

kolom: 4% Carbowax 20 M; 0,8% KOH op Carbopack B

kolomtemperatuur: 70°C gedurende 5 min. daarna met 4°C per min. naar 150°C

EDTA

Ethyleen diamine tetra azijnzuur is een niet vluchtige stof en kan dan ook niet direkt gaschromatografisch worden bepaald. Door de zuurgroepen te veresteren wordt EDTA wel vluchtig. Gaschromatografische analyse is dan mogelijk (V.D.TOORN, HARMSSEN, 1979).

Olie

Huisbrandolie kan worden gescheiden met behulp van een gepakte kolom. De resultaten hiervan zijn weergegeven in fig. 25 (VAN GESTEL, 1979).

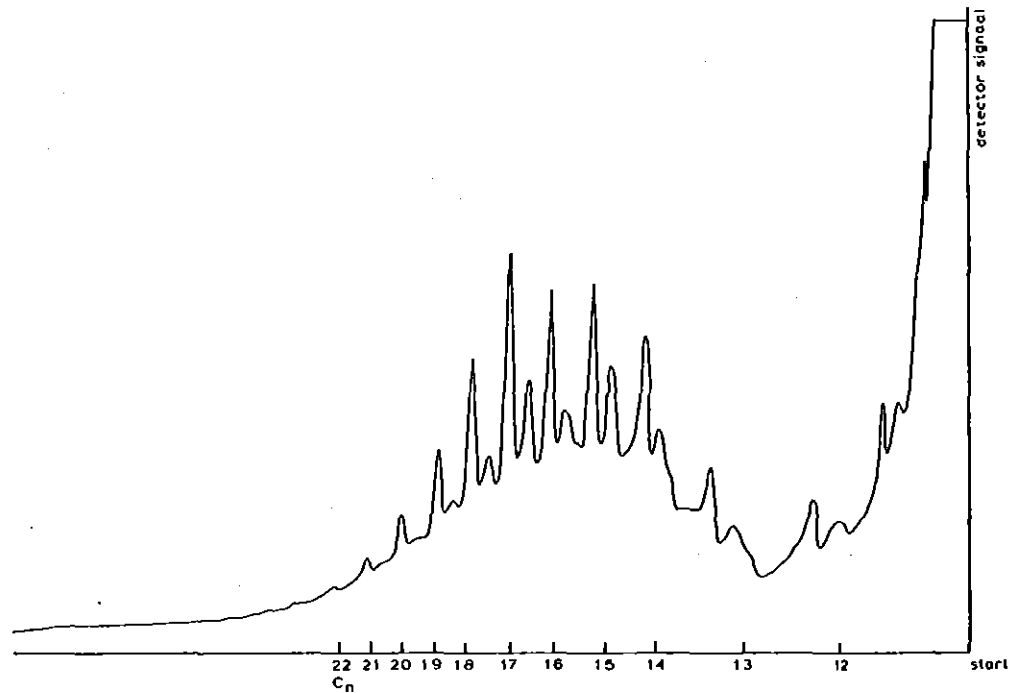


Fig. 25. Gaschromatogram HBO-I in n-hexaan met gepakte kolom
kolom: 5% OV - 1 op Chromosorb W, AW, DMCS 80 - 100 mesh
kolomtemperatuur: 75°C gedurende 5 min. dan naar 300°C
met 10°C/min.

Zoals uit fig. 25 blijkt is de scheiding niet optimaal. De pieken zijn slecht gescheiden. Een beter chromatogram wordt verkregen met een kapillaire kolom uitgerust met macro-injectie, fig. 26 (V.D. BERG, 1980).

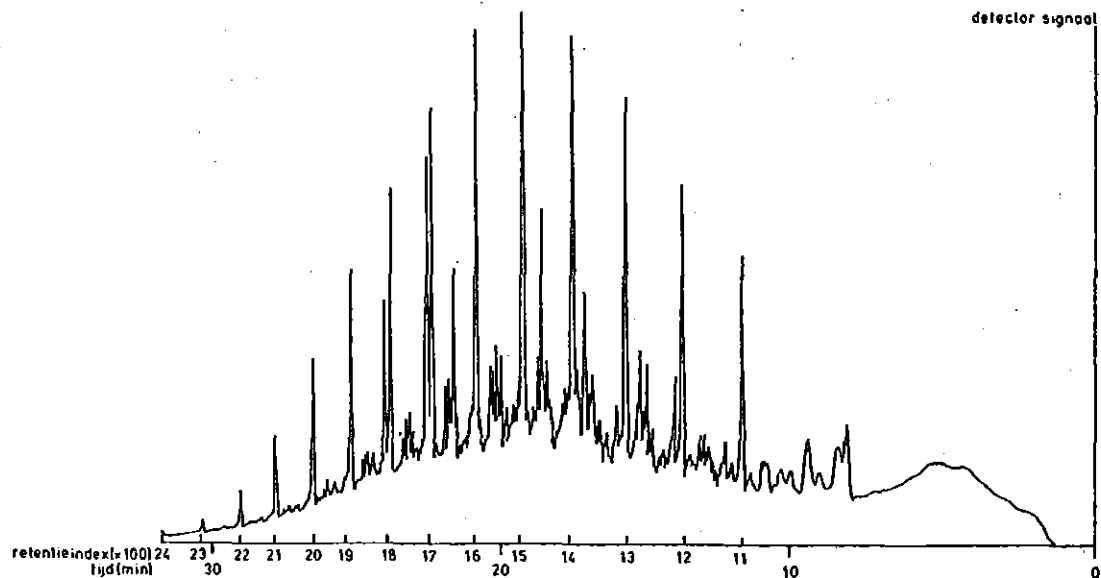


Fig. 26. Gaschromatogram HBO-I in n hexaan met kapillaire kolom
kolom: WCOT 0,23 mm x 24,5 m gevuld met CP-sil-5
kolomtemperatuur: 30°C gedurende 5 min. dan naar 250°C met
8°C per min.

Permanente gassen

De permanente gassen N_2 , O_2 en CO_2 kunnen niet gelijktijdig met één kolom worden gescheiden. Met een Porapak Q kolom kan CO_2 worden gescheiden van N_2 en O_2 , maar de laatste twee vallen nog samen. Met een moleculaire zeef kunnen N_2 en O_2 wel worden gescheiden, maar wordt CO_2 door de kolom vastgehouden.

Door beide kolommen te combineren is een scheiding wel mogelijk. Het is dan een kwestie van op de juiste tijd omschakelen van de ene naar de andere kolom. De preciese werking is beschreven door HARMSEN (1980).

Het werken met meerdere kolommen wordt ook weleens multidimensionele chromatografie genoemd.

8. VLOEISTOFCHROMATOGRAFIE

8.1. Inleiding in de vloeistofchromatografie

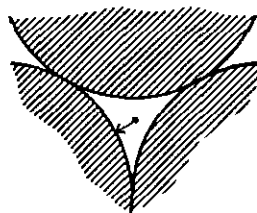
Vloeistofchromatografie is de oudste chromatografische techniek. Swett, de uitvinder van de chromatografie maakte ook al gebruik van een vloeistof als mobiele fase. Vloeistof chromatografie is jarenlang een techniek geweest met een beperkt scheidend vermogen. Het was slechts mogelijk enkele stoffen of groepen van stoffen te scheiden en zolang dit het geval was, werden er goede resultaten mee verkregen.

De scheiding kan worden verbeterd door het schotelgetal groter te maken of de HETP kleiner. De HETP wordt zoals al is vermeld gegeven door de Van Deemter vergelijking (zie blz. 8).

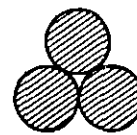
$$HETP = A + \frac{B}{v} + C_v$$

A de Eddy diffusie is afhankelijk van de pakking en is klein bij gebruik van zo klein en zo rond mogelijke deeltjes, omdat deze deeltjes beter kunnen worden gepakt

C_v het massatransport is ook afhankelijk van de deeltjesgrootte, omdat bij kleine deeltjes de tussenruimte ook kleiner is: Het massatransport van het midden van de mobiele fase naar de stationaire fase duurt dan korter (fig. 27).



grote deeltjes grote afstand



kleine deeltjes kleine afstand

Fig. 27. Effect tussenruimte op massatransport

Ook de vorm van de deeltjes is belangrijk, want in een holte stroomt de mobiele fase immers niet meer. Ronde deeltjes geven dan een beter massatransport.

Samenvattend kan worden gesteld, dat het scheidend vermogen van vloeistofchromatografie verbeterd kan worden door te werken met kleine ronde deeltjes. Experimenten hebben aangetoond, dat er inderdaad een veel betere scheiding werd verkregen. Er is ook een nieuwe naam ingevoerd voor dit soort chromatografie namelijk:

HPLC = High Performance Liquid Chromatography
grote prestatie vloeistof chromatografie

8.2. P o m p s y s t e e m

De P uit HPLC wordt vaak gelezen als pressure. Dit komt omdat er zeer hoge drukken (circa 100 atm) nodig zijn om de vloeistof door de kolom te pompen. De kleine deeltjes in de kolom zorgen immers voor een groot drukverval. Naast dat de pomp bij hoge druk moet kunnen werken moet de vloeistofstroom ook constant zijn. Dit stelt zeer hoge eisen aan de pomp.

De eerste pomp voor HPLC was van het zogenaamde 'fietspompprincipe' (fig. 28).

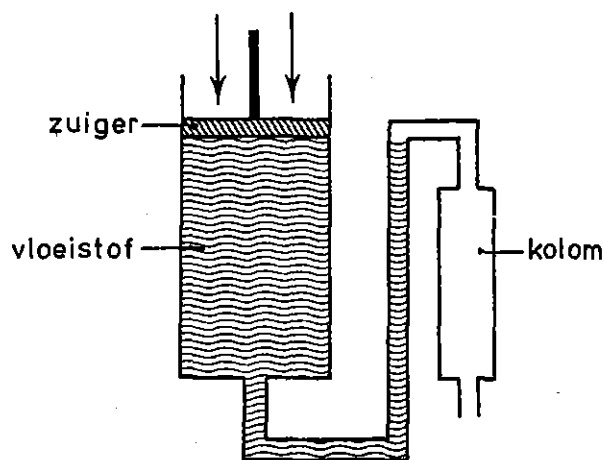


Fig. 28. HPLC pomp 'fietspompprincipe'

Bij deze pomp wordt de zuiger langzaam naar beneden bewogen en daardoor de vloeistof door de kolom gepompt. Een voordeel van dit systeem is dat er een volkomen constante vloeistofstroom wordt verkregen. Nadelen zijn dat het reservoir steeds opnieuw gevuld moet worden als de zuiger beneden is en vooral de hoge prijs.

Bovendien zijn er twee pompen nodig als de samenstelling van de mobiele fase tijdens de analyse moet veranderen, zogenaamde gradient elutie.

De huidige pompen zijn van het goedkopere reciprocerend principe (fig. 29).

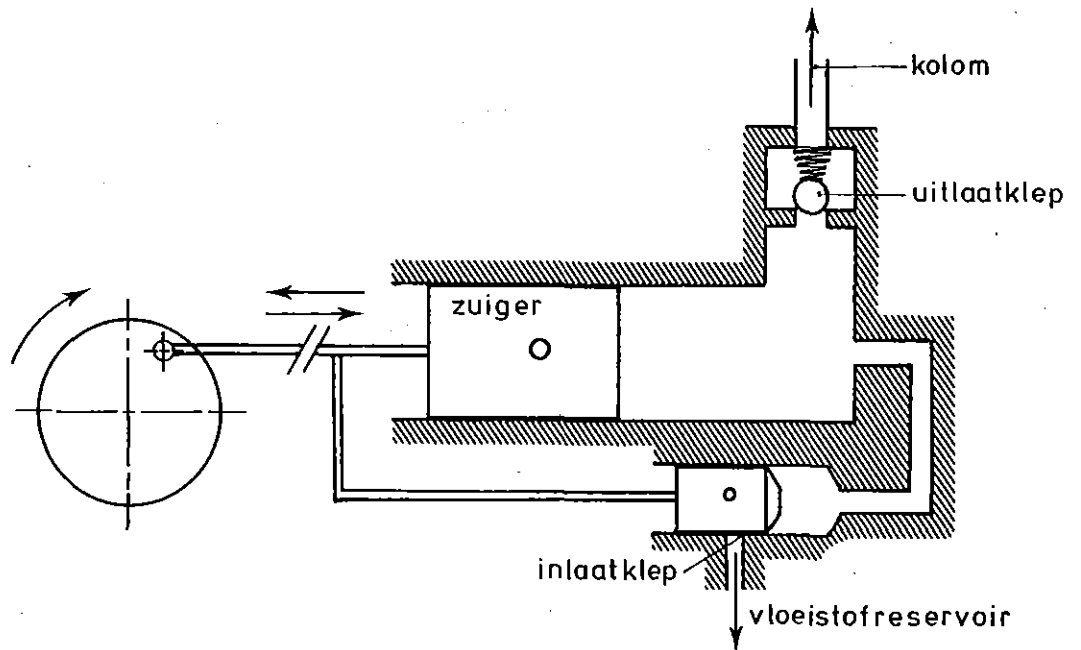


Fig. 29. HPLC pomp reciproce type

Bij deze pomp wordt de zuiger heen en weer bewogen door een ronddraaiende schijf. Bij het vullen gaat de zuiger naar links, waardoor de inlaatklep wordt geopend en de uitlaatklep gesloten. Bij het persen gaat dit net andersom en wordt de vloeistof in de richting van de kolom geperst. Dit geeft een vloeistofstroom zoals weergegeven in fig. 30A.

Dit is natuurlijk verre van ideaal. Een beter beeld wordt verkregen als de vulslag wordt bekort (fig. 30B). Een verdere verbetering is het lineariseren van de zuigerbewegingen, wat wil zeggen dat deze met een constante snelheid perst (fig. 30C). Als nu verder nog na de pomp een pulsedemper wordt gebruikt, dan wordt een constante pulsvrije vloeistofstroom verkregen.

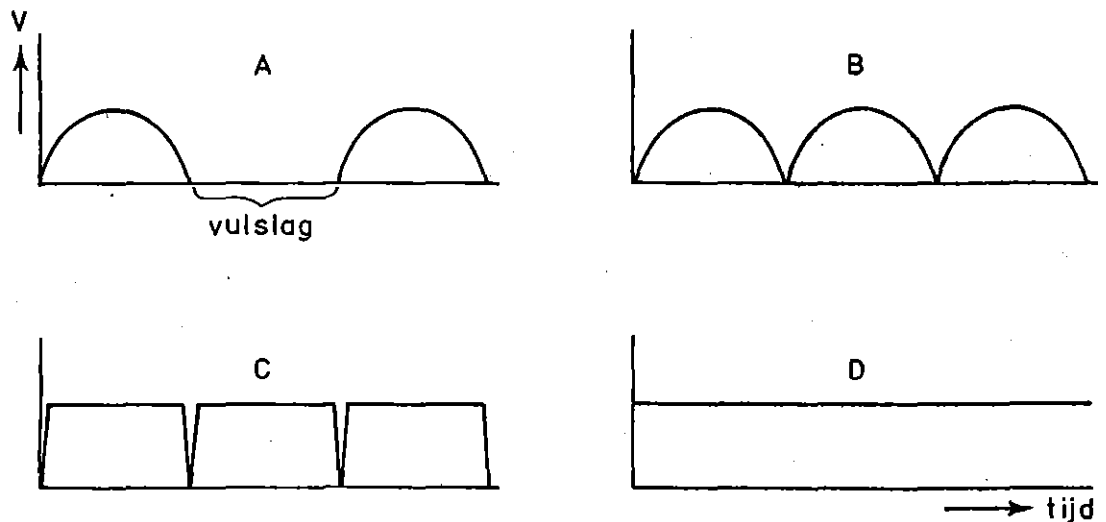


Fig. 30B. Geleverd volume V door een reciprocerende pomp

- A zonder voorzieningen
- B na reduceren vulslag
- C na linealiseren zuigerbeweging
- D na pulsdemping

8.3. B e i n v l o e d i n g s c h e i d i n g

Ook nu weer geldt dat stoffen kunnen worden gescheiden als ze een verschillende verdelingscoëfficiënt K hebben.

$$K = \frac{\text{concentratie in stat. fase}}{\text{concentratie in mob. fase}}$$

In tegenstelling met gaschromatografie speelt nu ook de mobiele fase een rol bij de scheiding, omdat de eigenschappen beïnvloed kunnen worden door verschillende vloeistoffen te nemen.

Als eerste wordt nu de stationaire fase, dit wil zeggen de kolom besproken. Bij HPLC is de keus uit een aantal verschillende typen kolommen. De soort chromatografie is naar deze kolommen genoemd.

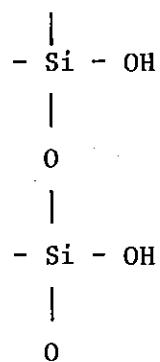
1. Adsorptie chromatografie
2. Verdelingschromatografie
3. Gelpermeatie
4. Ionenwisseling

In de volgende hoofdstukken worden deze vier onderwerpen verder behandeld.

Adsorptie chromatografie

Adsorptie chromatografie valt onder liquid-solid chromatography LSC. De stationaire fase is een vaste stof waarmee de wisselwerking plaatsvindt. Voorbeelden van zulke stationaire fasen zijn silicagel, aluminiumoxide en actieve kool.

Silicagel bijvoorbeeld heeft aan het oppervlak de volgende structuur



De OH groepen zijn polair en hieraan vindt de adsorptie plaats. Als mobiele fase wordt een apolaire vloeistof gebruikt (b.v. hexaan). Bij deze techniek hebben polaire stoffen de meeste wisselwerking met de stat. fase en komen dus aan het einde van het chromatogram. De vloeistoffen moeten watervrij zijn, omdat anders het water adsorbeert aan de OH groepen en bovendien water met de silicagel kiezelzuur

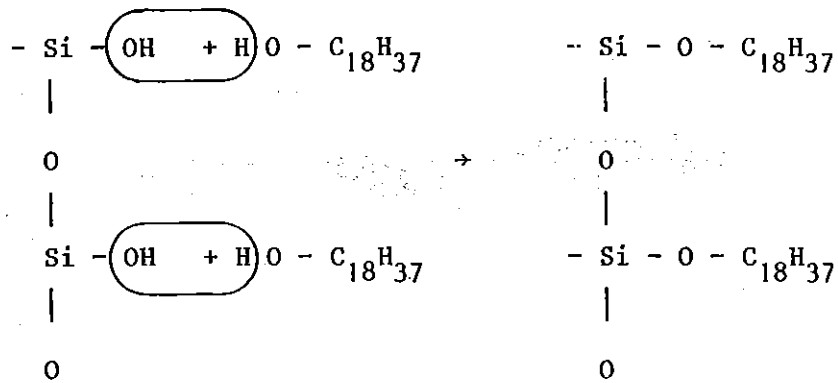
vormt, waardoor de kolom langzaam oplost.

Verdelingschromatografie

Bij dit type chromatografie bestaat de stationaire fase uit inerte bolletjes waarop een dun laagje vloeistof is aangebracht die niet mengbaar is met de mobiele fase. Scheiding berust op een verschillende verdeling van de te bepalen stoffen over de twee vloeistoffen.

De beste scheiding wordt verkregen als het vloeistoflaagje zo dun mogelijk is, omdat dan het massatransport gunstig is (lage C_v). Bij een dikke vloeistoflaag kan een deeltje ver doordringen in de vloeistof en het kost dan tijd om weer aan het oppervlak te komen, waar het pas weer deel kan nemen aan de wisselwerking.

De kleinste C_v wordt verkregen bij een vloeistoflaag van één molecuul dik. Dit is mogelijk en heeft geleid tot twee nieuwe typen kolommen waarbij de vloeistoflaag chemisch gebonden is aan het dragermateriaal (zie reactievergelijking).



In dit geval is er een apolaire stof ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}$) gebonden aan het dragermateriaal. Er wordt dan gesproken van *r e v e r s e d p h a s e*. Zit er uiteindelijk een polaire stof aan het dragermateriaal, dan wordt er gesproken van *b o n d e d p h a s e*. De verschillen tussen reversed en bonded phase worden verder weergegeven in tabel 2.

Tabel 2. Verschillen reversed en bonded phase

	stationaire fase	mobiele fase	te scheiden stoffen
Reversed phase	apolair	polair, b.v. water, methanol	apolair
Bonded phase	polair	apolair b.v. hexaan	half polair

Gelpermeatie

Gelpermeatie is een techniek om moleculen te scheiden op grootte oftewel op molecuulgewicht. De kolom bestaat hierbij uit een gel waarin zich allemaal kleine ruimtes bevinden. Grote moleculen kunnen zich alleen maar door de grote tussenruimtes bewegen en zijn snel aan het einde van de kolom. Kleine moleculen hebben de beschikking over veel tussenruimten en komen daardoor laat uit de kolom. Het chromatogram ziet er dan als volgt uit (fig. 31).

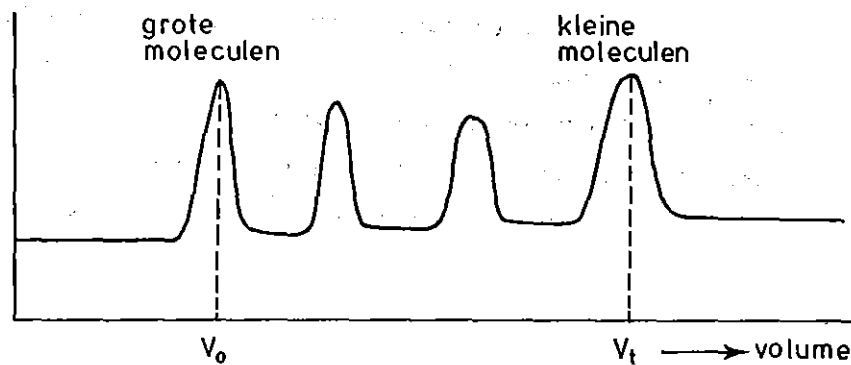


Fig. 31. Chromatogram bij gelpermeatie

V_o uit fig. 31 is de tussenruimte in de gel. V_t is het totale volume, dus het volume dat de kleine moleculen ter beschikking hebben (fig. 32). Alle stoffen worden geëluëerd tussen V_o en V_t

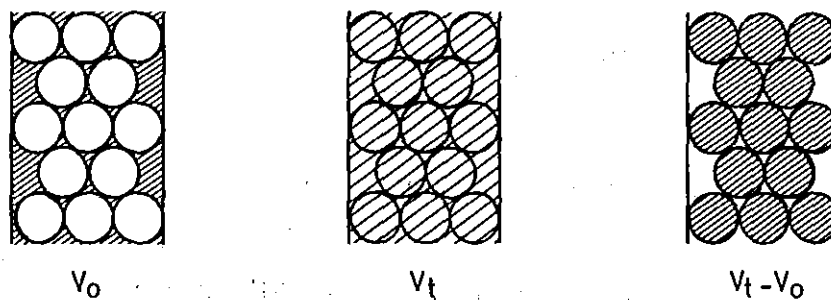


Fig. 32. Volumina in een gel

De plaats van de piek kan worden gegeven door het volume dat doorgeleid is als de stof verschijnt (V_e), maar ook door K

$$K = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

K ligt altijd tussen 0 en 1. Een voordeel is dat K onafhankelijk is van de dichtheid van de pakking, terwijl V_e dat wel is.

Er bestaan verschillende gels, die elk een bepaald molecuul-groottetrajekt overlopen (b.v. molecuulgewicht tussen 0 en 10 000). Sephadex kolommen worden veel gebruikt, terwijl er ook speciale kolommen voor HPLC beschikbaar zijn.

Fig. 33 illustreert verder waarom verschil in grootte bepalend is voor de transportsnelheid. De kleine deeltjes kunnen via allerlei 'omwegen' in de gel en doen er dus langer over om aan het einde te komen.

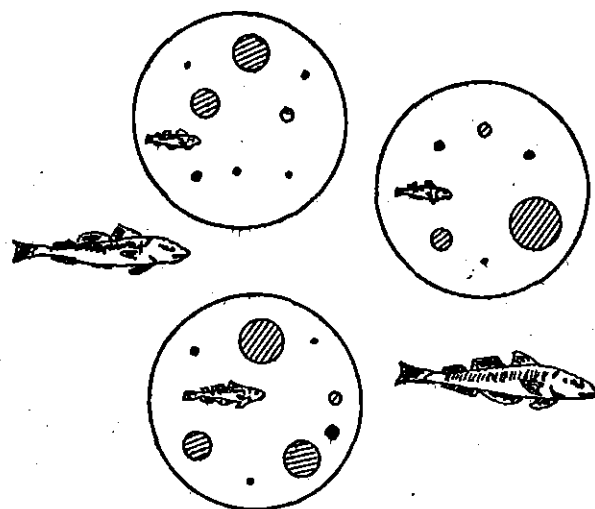


Fig. 33. 'Deeltjesgrootte' en transportsnelheid

Een voordeel van gelpermeatie is dat de kolommen hoog belast kunnen worden (tot 1 ml voor een kolom met een doorsnee van 1 cm). De concentraties in het effluent zijn dan hoog genoeg dat er bijvoorbeeld zware metalen in kunnen worden bepaald. Er kan dan een relatie worden gelegd tussen zware metalen en de complexerende mogelijkheden van moleculen van verschillende grootte.

Beïnvloeding scheiding door de mobiele fase

Voordat de ionenwisseling wordt behandeld wordt nu eerst de beïnvloeding door de mobiele fase beschreven, omdat dit van belang is bij ionenwisseling.

Er kan worden gewerkt met een constante samenstelling van de mobiele fase. Dit heet *i s o c r a t i s c h*. De samenstelling moet dan zodanig zijn dat de stoffen worden gescheiden.

Bij reversed phase kan een mengsel worden genomen van water en methanol. Water is polair en methanol is veel minder polair, zodat een mengsel van een bepaalde polariteit kan worden gemaakt.

Voor ingewikkelde monsters is isocratisch werken niet altijd goed. Dit is weergegeven in fig. 34. Bij 100% water verschijnen de pieken pas laat in het chromatogram. 100% methanol laat ze direkt aan het begin samenvallen. Een mengsel van 1 : 1 geeft een betere scheiding, maar de 3e piek is toch nog erg laat. Hiervoor biedt *g r a d i ë n t e l u t i e* een oplossing. Dit betekent, dat tijdens de analyse de samenstelling van de mobiele fase wordt veranderd, er wordt een gradiënt aangelegd. Met een gradiënt worden de drie stoffen wel goed gescheiden.

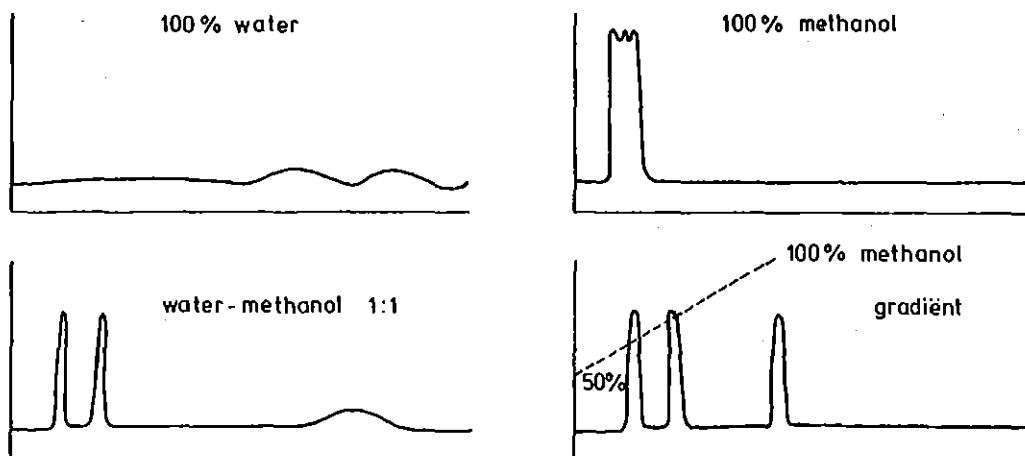


Fig. 34. Beïnvloeding scheiding door mobiele fase

Ionenwisseling

Ionenwisseling wordt gebruikt voor de scheiding van ionen. Er bestaan twee soorten ionenwisselaars en wel voor kationen (pos.) en anionen (neg.).

Een ionenwisseling bestaat uit een hars met een groot oppervlak. Op dit hars zijn groepen gebonden die ionen kunnen uitwisselen (fig. 35). Voor kationen-wisselaars wordt de $-\text{SO}_3^-$ groep veel gebruikt en voor anionenwisselaars de $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ groep.

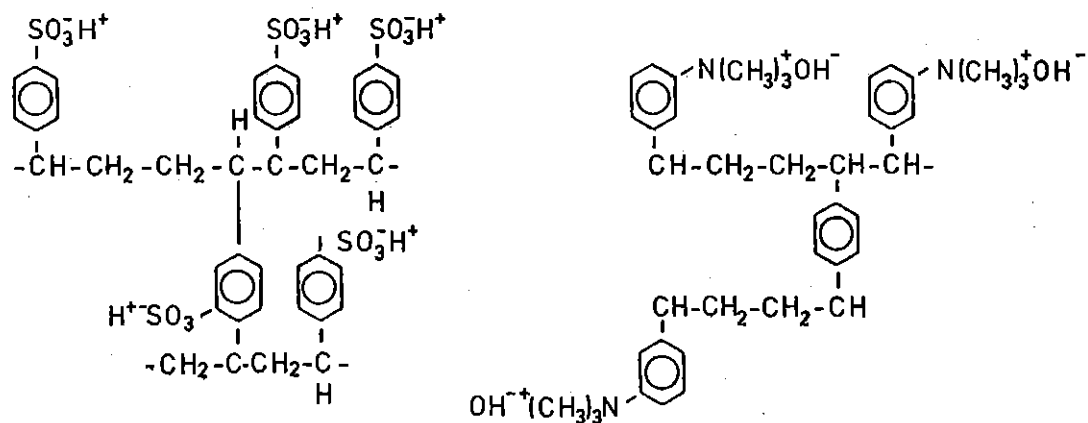
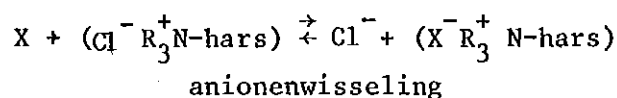
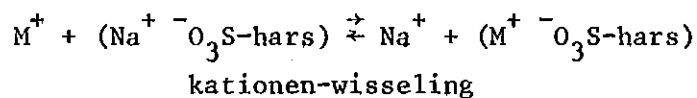


Fig. 35. Kationen-wisselaar

Anionen-wisselaar

De actieve groepen kunnen in verschillende vormen aanwezig zijn, bijvoorbeeld $-\text{SO}_3\text{H}$ en $-\text{SO}_3\text{Na}$.

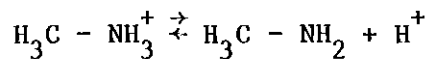
De wisselwerking in de kolom wordt beschreven door de volgende vergelijkingen waarin M^+ of X^- de te bepalen stoffen zijn



Ook hiervoor geldt weer dat als er twee stoffen gescheiden moeten worden ze een verschillende $K (= \frac{\text{conc stat.fase}}{\text{conc mob.fase}})$ moeten hebben.

Nu kan K worden beïnvloed door bij de kationenwisseling de Na^+ concentratie zodanig te kiezen dat een scheiding mogelijk is. De Na^+ concentratie beïnvloedt namelijk de ligging van het evenwicht. Bij veel Na^+ evenwicht naar links, bij weinig naar rechts. Ook kan de scheiding worden beïnvloed door in plaats van met een wisselaar in Na^+ vorm te werken met een wisselaar in H^+ vorm.

De pH is bij veel ionen van invloed op de scheiding. Als M^+ het ion $\text{H}_3\text{C}-\text{NH}_3^+$ is dan geldt hiervoor ook het volgende evenwicht



Bij een grote concentratie H^+ concentratie (lage pH) ligt het evenwicht naar links. Bij een kleine H^+ concentratie (hoge pH) ligt het naar rechts, wat betekent, dat een groot deel niet als ion aanwezig is en constant in de mobiele fase zit. Dit betekent, dat K kleiner wordt bij een hogere pH. De scheiding is dus te beïnvloeden met de pH. De pH moet wel in de hand gehouden worden, zodat er vaak met buffers moet worden gewerkt.

Bij ionenwisseling wordt veel met gradiënt elutie gewerkt. Dit wordt gedaan door bijvoorbeeld de Na^+ concentratie of de pH te variëren tijdens de analyse, of over te gaan van Na^+ op bijvoorbeeld K^+ . Een voorbeeld van gradiënt elutie is weergegeven in fig. 36.

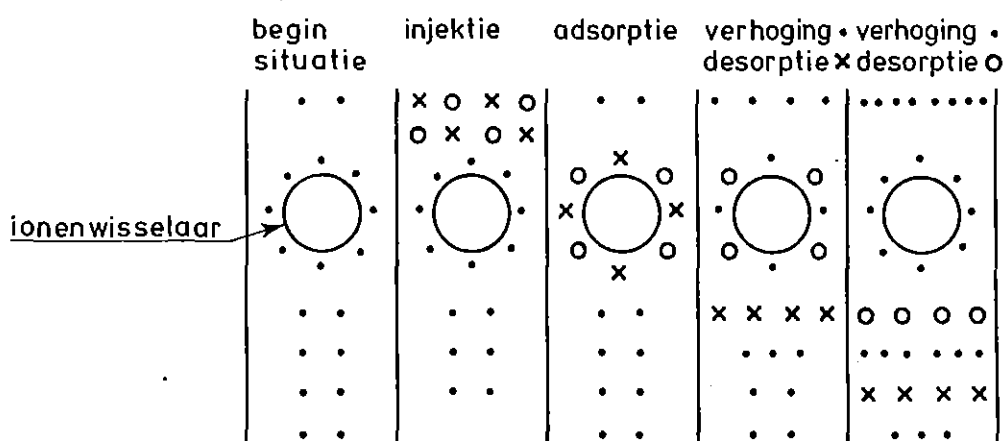


Fig. 36. Gradiënt elutie bij ionenwisseling

In het begin is de toestand zodanig dat de te scheiden stoffen, o en x, aan de ionenwisselaar worden geadsorbeerd. Hierna wordt de concentratie van . verhoogd, zodat eerst x desorbeert. Bij verdere verhoging desorbeert o.

Ionenwisseling wordt veel toegepast bij de analyse van aminozuren. Een toepassing voor de toekomst kan zijn de simultane bepaling van Na^+ , K^+ , Ca^{2+} en Mg^{2+} en van Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- en HCO_3^- . Dit laatste bevindt zich momenteel echter nog in de kinderschoenen.

8.4. Opbouw apparatuur

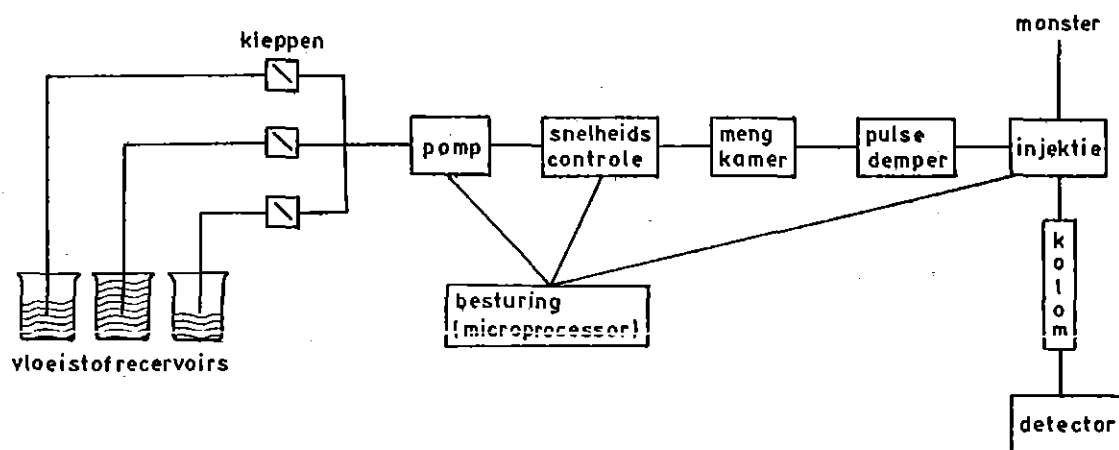


Fig. 37. Opbouw vloeistofchromatograaf

In fig. 37 is de opbouw van de vloeistofchromatograaf Varian LC 5020 weergegeven. Andere typen komen ongeveer met dit blokschema overeen.

Er is keuze uit 3 vloeistoffen die als mobiele fase kunnen dienen. Ze kunnen bovendien twee aan twee worden gemengd. Met de kleppen wordt de samenstelling van de mobiele fase geregeld. De microprocessor zorgt voor het juiste resultaat. Een eventuele gradiënt wordt hier

gemaakt. Na de pomp en de snelheidscontrole komt de mengkamer, waar de vloeistoffen worden gemengd, zodat de samenstelling overal in de mobiele fase constant is. Hierna komt de pulsedemper gevolgd door een automatische loop injectiekraan. Het monster gaat dan de kolom in, wordt gescheiden en gedetekteerd in de detector. De microprocessor regelt de werking van het hele apparaat.

8.5. T o e p a s s i n g e n

De vloeistofchromatograaf is nog niet zo lang in gebruik op het laboratorium, zodat er nog geen toepassingen in een nota zijn beschreven. Het apparaat wordt momenteel gebruikt voor de analyse van polycyclische aromaten, benzeen, toluen en xyleen in water. In de directe toekomst zal ook worden gewerkt met kolommen voor de scheiding van hoog moleculaire stoffen.

9. DETEKTIESYSTEMEN

9.1. O n d e r v e r d e l i n g d e t e k t o r e n

Met een detector kunnen stoffen worden waargenomen en gemeten. De detector staat altijd direkt achter de kolom. Om de verkregen scheiding niet te reduceren moet het volume tussen de kolom en de detector zo klein mogelijk zijn, dit wil zeggen korte en dunne leidingen.

Een onderverdeling voor detectoren is in de volgende typen: het o o g: Gekleurde verbindingen, die door een kolom worden geleid, kunnen met het oog worden waargenomen. Dit wordt toegepast bij de klassieke vloeistofchromatografie. Het oog speelt verder een belangrijke rol bij de controle van andere detectoren.

D e n e u s: Reukstoffen kunnen na de scheiding met de neus worden waargenomen. Bij gaschromatografische analyse van reukstoffen wordt dit wel gedaan. Meestal is dit echter een weinig gezonde methode door de giftigheid van veel organische stoffen.

I n s t r u m e n t e l e d e t e k t o r e n. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de fysische of chemische eigenschappen van de te bepalen

stoffen. Deze worden met behulp van een apparaat gemeten. De instrumentele detektoren kunnen nog worden onderverdeeld in universele en specifieke detektoren. Met een universele detector kunnen praktisch alle stoffen worden gemeten, terwijl met een specifieke alleen bepaalde stoffen, met bijvoorbeeld een Cl of P atoom kunnen worden aangetoond.

9.2. Detektoren voor gaschromatografie

Katharometer

De katharometer of warmtegeleidbaarheidsdetector berust op het feit dat verschillende moleculen een verschillend geleidend vermogen voor warmte hebben. Deze detector wordt ook wel TCD genoemd (thermal conductivity detector). Het is een universele detector.

Bij de katharometer wordt gebruik gemaakt van weerstanden met een grote temperatuurscoëfficiënt, wat wil zeggen dat de weerstand verandert met de temperatuur. De temperatuurgevoelige weerstanden zijn opgenomen in een brug van wheatstone (fig. 38) en zijn op een hogere temperatuur gebracht dan de omgeving.

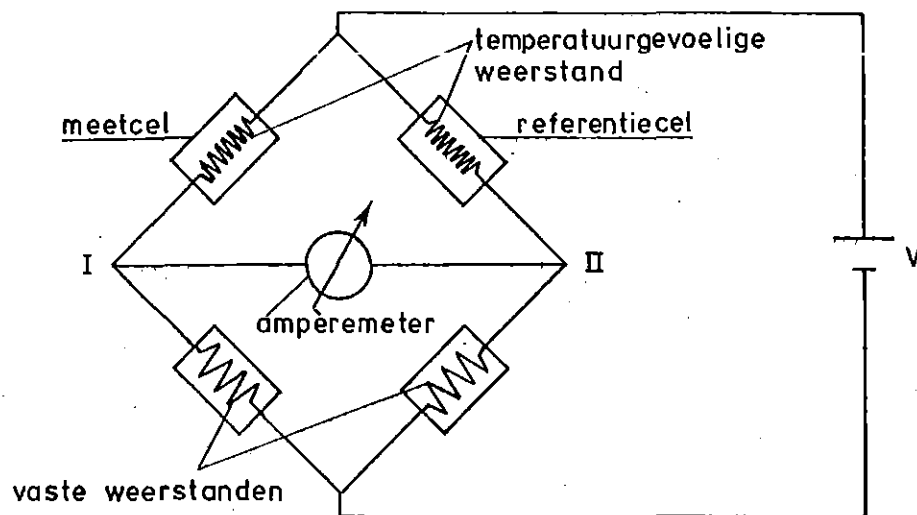


Fig. 38.

Als zowel de meet als referentiecel worden omspoeld door zuiver draaggas, dan zijn overal de weerstanden gelijk en is er geen spanningsverschil tussen I en II. Er loopt dan geen stroom, de cel is in evenwicht. Zodra zich in de meetcel een component van het monster bevindt verandert het warmtegeleidend vermogen in de cel. Dit komt tot uiting in een temperatuursverandering van de weerstand, omdat er meer of minder warmte wordt afgestaan aan de omgeving. De cel raakt dan uit evenwicht er komt een spanningsverschil tussen I en II en er wordt een stroom gemeten. De grootte van de stroom (de brugstroom) is een maat voor de hoeveelheid van de component in de meetcel.

Bij de besproken opstelling verschilt de temperatuur van de beide temperatuurgevoelige weerstanden, waardoor ze sneller versleten raken. In de nieuwe meters, ook die op het laboratorium, wordt de temperatuur van de weerstanden constant gehouden. De energie die hiervoor nodig is, is een maat voor de hoeveelheid stof. Ter illustratie is in fig. 39 een dwarsdoorsnede van de op het laboratorium gebruikte katharometer weergegeven.

Een voorwaarde voor het gebruik van een katharometer is dat er verschil in warmtegeleiding moet zijn tussen het draaggas en de te bepalen component. De katharometer wordt op het laboratorium gebruikt in de gaschromatograaf voor de analyse van gassen. Draaggas hierbij is H_2 met een lage warmtegeleiding. Alle andere gassen hebben een hogere warmtegeleiding.

Als H_2 moet worden gemeten dan is een ander draaggas nodig. He kan dan worden gebruikt, maar het verschil in warmtegeleiding tussen He en H_2 is echter klein, wat zou resulteren in kleine pieken. Wanneer toch het dragergas moet worden verwisseld kan net zo goed N_2 worden genomen. Dit heeft een veel groter verschil in warmtegeleiding, waardoor veel grotere pieken worden gemeten.

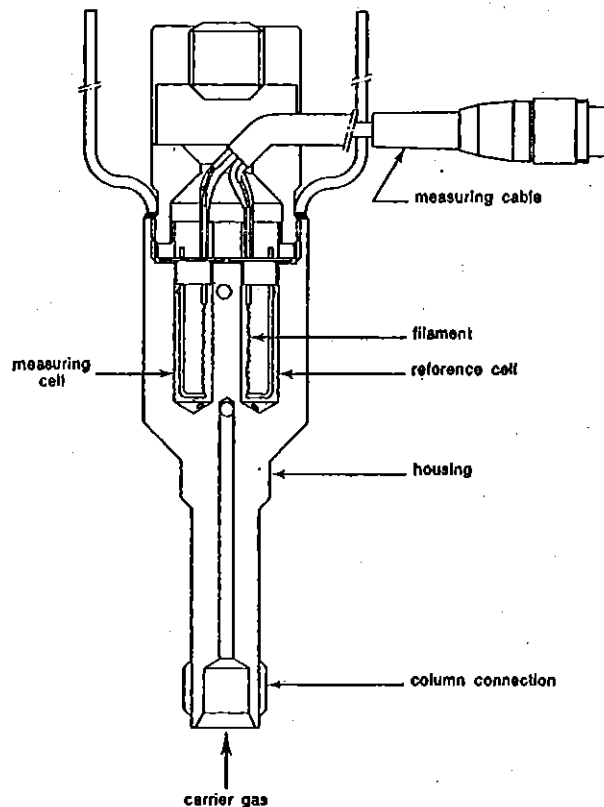


Fig. 39. Dwarsdoorsnede TCD 903 (Packard)

Vlam ionisatie detector

De vlamionisatie detector wordt meestal FID genoemd, van Flame Ionisation Detector. De FID bestaat uit een waterstof-lucht vlam aan het einde van de kolom. Boven en onder de vlam zitten elektroden die een bepaald spanningsverschil hebben. Doordat er zich in de vlam ionen bevinden, loopt er een stroom tussen de elektroden. De ionen zorgen voor de geleiding.

Als er nu andere stoffen in de vlam komen, verbranden deze en wordt de mate van ionisatie groter. Dit betekent dat het geleidend vermogen groter wordt en dus ook de stroom. De stroom wordt geregistreerd.

De vlamionisatie detector is vrij universeel bruikbaar. Alleen stoffen die onbrandbaar zijn worden niet waargenomen. De FID is veel gevoeliger dan de katharometer. Het is de meest gebruikte detector bij gaschromatografie.

In fig. 40 is de FID in gedemonteerde toestand weergegeven. Bij het pijltje bevindt zich het vlammetje. 1 en 2 zijn de elektroden.

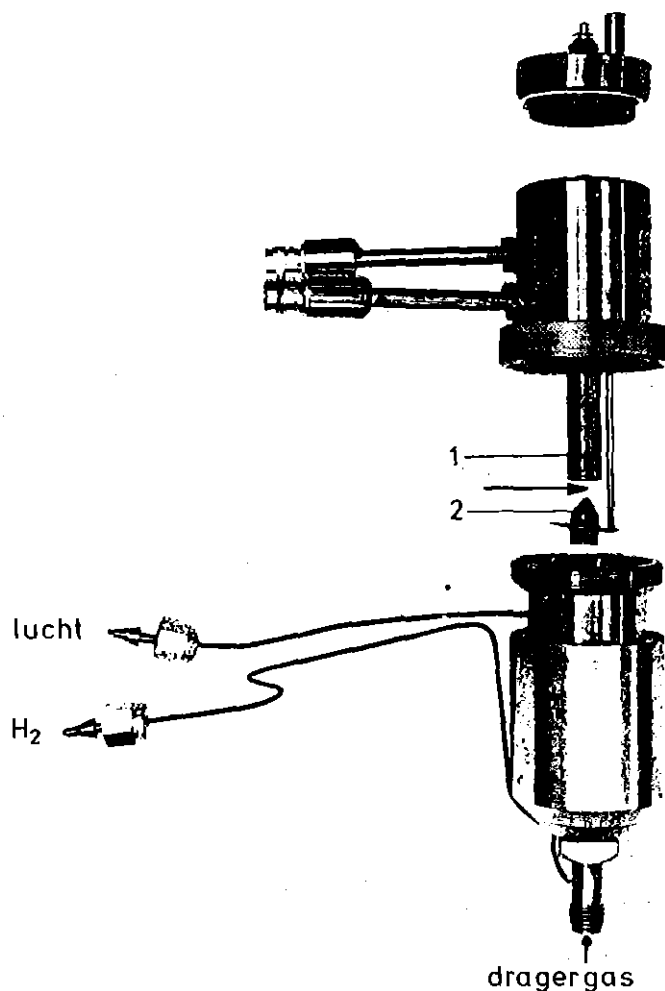


Fig. 40. De FID (Packard Becker)

Electron capture detector

Bij de electron capture detector, ECD, zorgt een radio actief preparaat voor de elektronenstroom tussen twee elektroden. De moleculen in de gasstroom kunnen de elektronen in meer of mindere mate opvangen en zo de stroom reduceren. Vooral halogenen worden met deze detector goed gemeten. Het is dan ook een specifieke detector, die onder andere wordt gebruikt bij de analyse van pesticiden.

Vlamfotometrische detector

In de vlamfotometrische detector wordt de te bepalen stof verbrand. Het licht uitgezonden door de vlam wordt gemeten. Licht met een golflengte van 394 nm duidt op zwavel, van 526 nm op fosfor. Dit is ook een specifieke detector.

Massaspektrometer

De meest ideale detektie mogelijkheid tot nu toe is de gaschromatograaf gekoppeld aan een massaspektrometer. Het nadeel van de massaspektrometer is de hoge prijs (vanaf f 150 000). Het is een detector waarmee het mogelijk is onbekende stoffen te identificeren.

In de massaspektrometer worden de te bepalen stoffen gebombardeerd met elektronen met een energie van 70 eV. Dit is voldoende energie om een molecuul te ioniseren en op te splitsen in allerlei brokstukken. De positief geladen brokstukken worden hierna versneld door een aantal negatief geladen platen. Ze krijgen allemaal dezelfde snelheid (fig. 41).

De brokstukken worden dan een magneetveld binnengeleid. Hierdoor gaan ze afbuigen en in cirkelvormige banen bewegen. De mate van afbuiging is afhankelijk van de massa. Kleine brokstukken worden sterk afgebogen en grote minder sterk. Alleen brokstukken met een bepaalde massa komen in de uittreedspleet terecht en worden gemeten. Door nu het magneetveld te variëren komen achtereenvolgens deeltjes met de massa 1 tot ∞ door de uittreedspleet. Uiteindelijk wordt een massaspektrum weergegeven. Als voorbeeld is in fig. 42 het massaspektrum van methanol weergegeven. In tabel 3 staat vermeld door

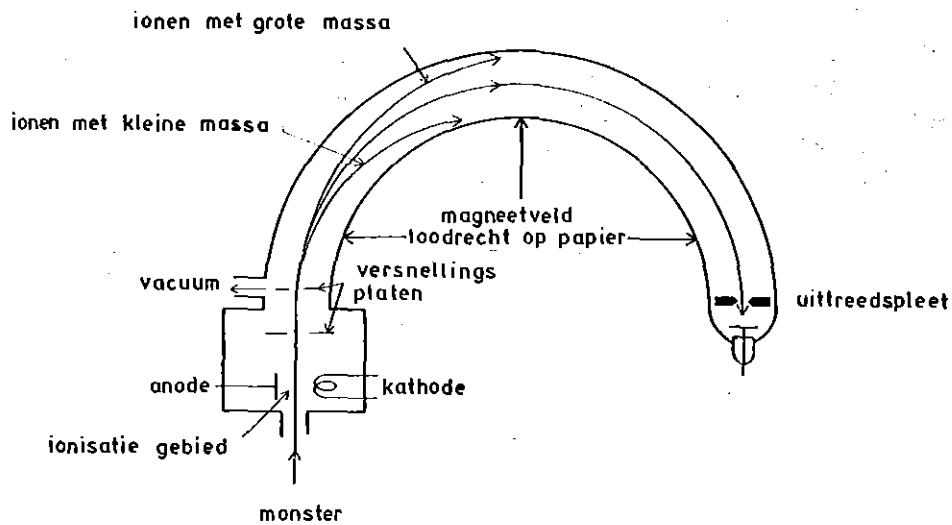


Fig. 41. Schematische opbouw massaspectrometer

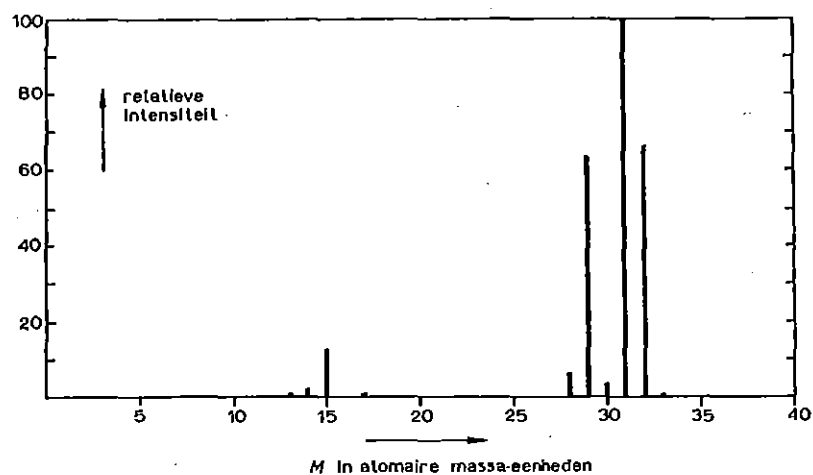


Fig. 42. Massaspektrum methanol (naar de Galan)

welke brokstukken de pieken zijn veroorzaakt. Bij de interpretatie moet er rekening mee worden gehouden dat er ook isotopen bestaan. Naast C met massa 12 bestaat er ook C met massa 13.

Aan de hand van het spektrum is het mogelijk de structuur van een onbekende stof op te helderen. Dit gebeurt veelal aan de hand van referentiespektra's in boeken of per computer.

Tabel 3. Massaspektrum methanol

Brokstuk	Massa	Rel. intensiteit	Brokstuk	Massa	Rel. intensiteit
C^+	12	0,33	CHO^+	29	64
CH^+	13	0,72	CH_2O^+	30	3,8
CH_2^+	14	2,4	CH_3O^+	31	100
CH_3^+	15	13	CH_3OH^+	32	66 (molecuul-ion)
O^+	16	0,21	$^{13}CH_3OH^+$	33	0,98
OH^+	17	1,0	$CH_3^{18}OH^+$	34	0,14
CO^+	28	6,3			

9.3. Detektoren voor vloeistof - chromatografie

UV - zichtbaar gebied detector

De meest gebruikte detector bij HPLC is de UV-zichtbaar gebied detector. Dit is in feite een spektrofotometer met enkele aanpassingen. De kuvet bijvoorbeeld is zeer klein (8 ul) om de scheiding niet te niet te doen. Het principe van de detector is weergegeven in fig. 43.

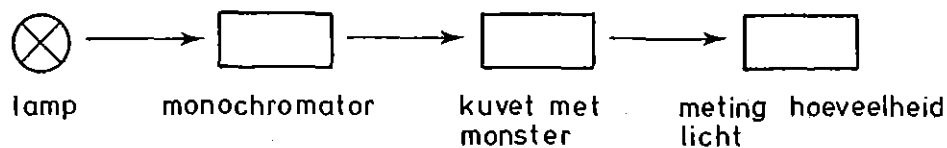


Fig. 43. Blokschema eenvoudige spektrofotometer

De monochromator selecteert een klein golflengte gebiedje (bepaalde kleur) uit het door de lamp uitgezonden licht. Dit wordt door de kuvet geleid. Bevindt zich een stof in de kuvet die het licht kan absorberen, dan vermindert de intensiteit van de lichtstraal. De intensiteit wordt gemeten.

Er wordt onderscheid gemaakt in twee typen

1. Detektor met vaste golflengte. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een kwiklamp. Zo'n lamp geeft een lijnenspektrum. De meest intense lijn (254 nm) wordt meestal gebruikt. Deze detektor kan alleen worden gebruikt voor stoffen die bij die golflengte absorberen.
2. Detektor met variabele golflengte. De golflengte is nu instelbaar (tussen 190 en 600 nm). Er moet daarom gebruik worden gemaakt van een continue lichtbron (D_2 en Wolfram lamp) en een monochromator. Een voordeel is dat nu de golflengte ingesteld kan worden op het absorptiemaximum. Deze detektor is iets minder gevoelig dan die met een vaste golflengte, omdat nu slechts een deel van het licht wordt gebruikt.

De meeste detektoren met variabele golflengte zijn dubbelstraals, wat het verlopen van de basislijn tegengaat. Het blokschema van de op het laboratorium aanwezige detektor is weergegeven in fig. 44. Voor verdere uitleg wordt verwezen naar de handleiding van het apparaat (Varian).

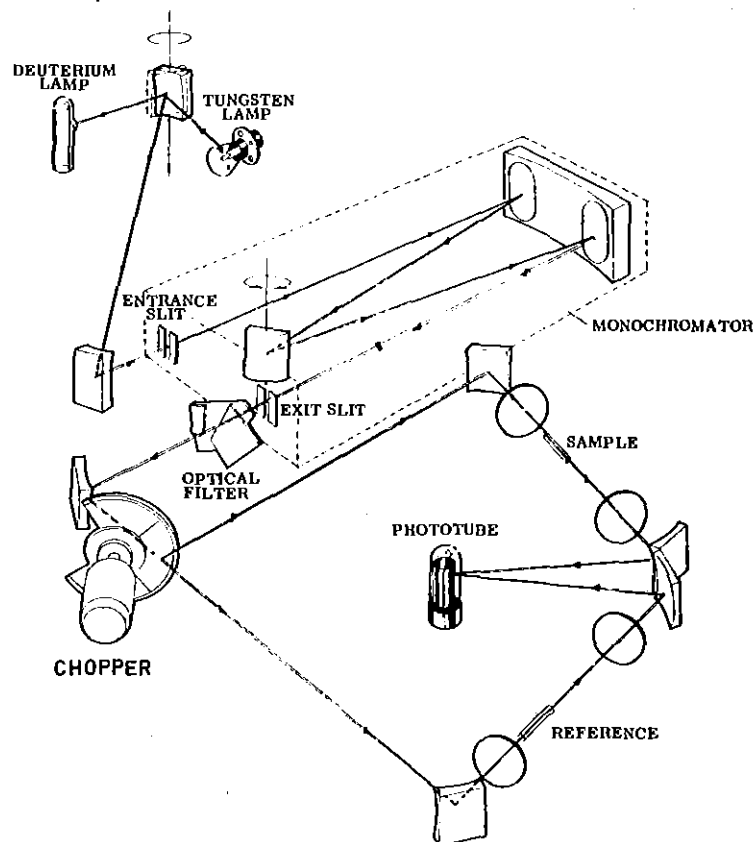


Fig. 44. Blokschema variabele golflengte detektor

De beide typen detektoren zijn bruikbaar voor stoffen die in het UV of zichtbaar gebied absorberen. Een voorwaarde is dat de mobiele fase in dit gebied niet mag absorberen.

Op het chromatogram wordt meestal als gevoeligheid het aantal AUFS weergegeven (= absorbance units full scale) 0,1 AUFS betekent dat de volle schaal van de recorder 0,1 absorptieeenheid is. Bij de meeste andere detektoren wordt de attenuation-stand (verzwakker) weergegeven.

Fluorescentie-detektor

Bij fluorescentie gaat een stof naar een hoger energieniveau door absorptie van licht (= excitatie). Het valt hierna weer terug, maar niet naar het oorspronkelijke niveau. Bij dit terugvallen wordt licht uitgezonden (= emissie), zie fig. 45.

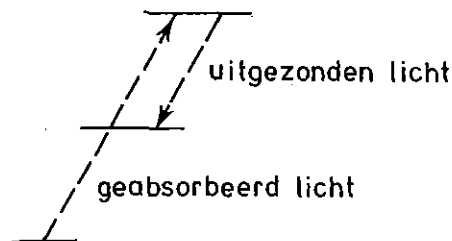


Fig. 45. Fluorescentie

Er moeten dus 2 golflengten worden ingesteld, de excitatie en de emissiegolflengte. Dit gebeurt meestal met behulp van filters (zie fig. 46).

De fluorescentiedetektor is een vrij specifieke detektor. Het kan bijvoorbeeld worden gebruikt voor de analyse van polycyclische aromaten.

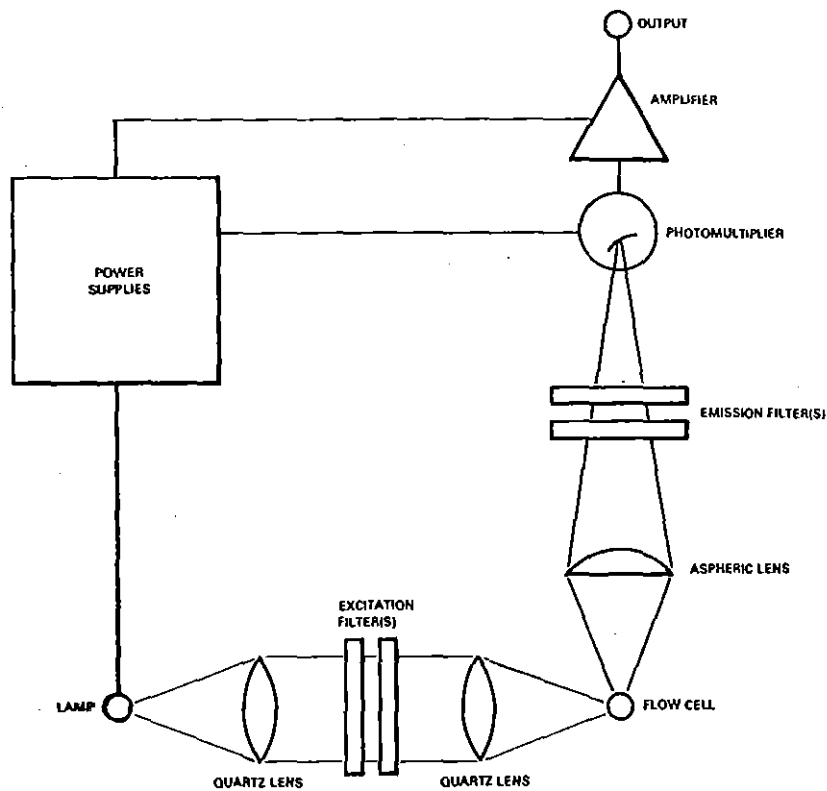


Fig. 46. Blokschema fluorescentie detector (Varian)

Refractie-index detector

Bij deze detector wordt het verschil in refractie-index, breking van licht, gemeten. Hij wordt gebruikt bij de analyse van suikers en is vrij ongevoelig.

Elektro-chemische detectoren

Voor stoffen die geoxydeerd of gereduceerd kunnen worden zijn elektro-chemische detectoren bruikbaar. Er bestaan een aantal typen, afhankelijk van de te meten stof. Ze zijn specifiek.

Andere detectoren

Er bestaan detectoren waarbij eerst de gescheiden stof wordt omgezet in een gekleurde verbinding, welke dan kan worden gemeten.

Ze worden onder andere gebruikt bij de analyse van aminozuren.

De koppeling van een vloeistofchromatograaf aan een massaspektrometer is momenteel nog in ontwikkeling.

Voor alle detektoren geldt dat het zeer belangrijk is, dat de werking ervan bekend is. Het is dan mogelijk om het apparaat zo optimaal mogelijk in te stellen, wat de nauwkeurigheid en betrouwbaarheid van de analyses ten goede komt.

10. REGISTRATIE EN INTERPRETATIE

Tot nu toe zijn de scheiding op de kolom en de detectie behandeld. Als laatste twee stappen komen de registratie en de interpretatie.

10.1. Registratie

De registratie gebeurt met behulp van een recorder en een integrator. Bij aansluiten hiervan moet er rekening mee worden gehouden dat ze zijn aangepast aan het uitgangssignaal van de detector, meestal 1, 2, 10 of 1000 mV. Ook de polariteit moet goed zijn, dus pos pool van de recorder, aan pos pool van de integrator. De detector moet op een zodanige versterking staan, dat de pieken op het papier blijven. De versterking is meestal te halen uit voorgaande experimenten of moet empirisch worden bepaald. Als papiersnelheid is 5 of 10 mm/min gebruikelijk.

Op de recorder komt dan het chromatogram. Zoals al vermeld is, is de plaats van de piek typerend voor de stof (kwalitatief). Het oppervlak is een maat voor de hoeveelheid (kwantitatief). Het oppervlak kan op een aantal manieren worden gemeten.

Schatting

Een ruwe methode om het oppervlak te bepalen is door het te schatten. Dit kan door het oppervlak van een niet goed geïntegreerde piek te vergelijken met een goed geïntegreerde piek.

Dit mag worden gebruikt als alle overige hulpmiddelen niet voldoen, en als controle van deze hulpmiddelen.

Driehoeksmeting

Het oppervlak van een piek kan worden benaderd door een driehoek.
Oppervlak = basis $\times$ $\frac{1}{2}$ hoogte.

Hoogtemeting

Als de pieken symetrisch zijn, is de hoogte evenredig met het oppervlak. De breedte van de piek is dan voor alle concentraties vrijwel gelijk.

Eenvoudige integrator

Met zo'n integrator wordt het oppervlak boven de basislijn gemeten. Dit gaat goed zolang de basislijn recht is en de pieken terugkomen op de basislijn. Is dit niet het geval, dus bij een verlopende basislijn, dan is de integratie erg onnauwkeurig.

Elektronische integrator

Met een elektronische integrator is het mogelijk te corrigeren voor een verlopende basislijn. Hiertoe dient het apparaat te worden geprogrammeerd. De juistheid van programmeren is erg belangrijk, daar het resultaat afhankelijk is van de wijze van programmeren.

Indien de pieken goed gescheiden zijn en terugkeren op de basislijn is het standaardprogramma meestal afdoende voor een goede integratie. Voor ingewikkelde chromatogrammen moet het programma worden aangepast. Dit wordt in het volgende hoofdstuk beschreven.

Programmering integrator

In dit hoofdstuk wordt de programmering beschreven van de minigrator welke op het laboratorium aanwezig is. De belangrijkste parameter is de P.W. Dit is de peak width oftewel de breedte van de piek op halve hoogte in seconden. Is de PW-waarde te klein, dan worden pieken niet geïntegreerd, omdat de integrator ze dan ziet als een verlopende basislijn. Bij een te grote PW gebeurt het omgekeerde en wordt een klein verloop van de basislijn als piek geregistreerd.

In het gaschromatogram zijn alle pieken niet even breed, aan

het einde worden ze breder. Als dit het geval is kan parameter T_2 worden ingevoerd. Dit is de tijd waarna de PW-waarde wordt verdubbeld.

Een piek moet groter zijn dan de ruis om te worden geïntegreerd. De ruis kan worden ingesteld met de parameter SS. Deze parameter kan automatisch door de integrator worden gemeten. Dit gebeurt direkt na het starten (de injectie) in $1\frac{1}{2}$ maal de PW tijd. Valt hier echter een piek in, dan wordt deze piek als ruis waargenomen.

In zo'n geval moet de halfautomatische instelling worden gebruikt. Hierbij wordt voor de analyse de ruis met de integrator gemeten. De gemeten ruis wordt dan geprogrammeerd. Dit laatste wordt in de meeste gevallen gedaan.

BL (= Base line) is een parameter die de basislijn steeds test. Als de waarde van BL 1 is dan gaat de basislijn van dal tot dal. Bij een hogere BL wordt rekening gehouden met het overlappen van pieken (fig. 47).

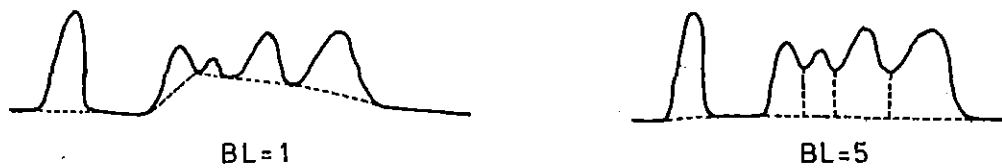


Fig. 47. Invloed BL op de integratie

De TP (= Tailing peak) parameter wordt gebruikt om tailende pieken te herkennen. Wat een tailende piek is, is weergegeven in fig. 48. De piek afkomstig van het oplosmiddel is vaak een tailende piek.

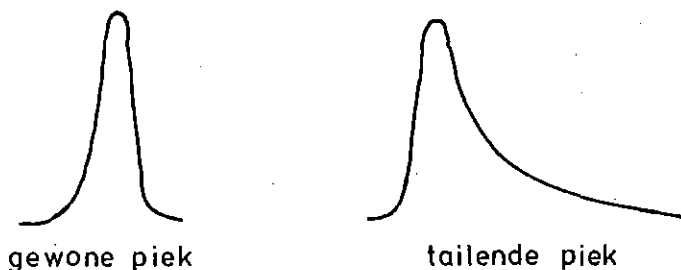


Fig. 48. Tailende piek

Deze parameter is vooral van belang, als erop de oplosmiddel piek andere zogenaamde 'rider' pieken voorkomen (fig. 49).

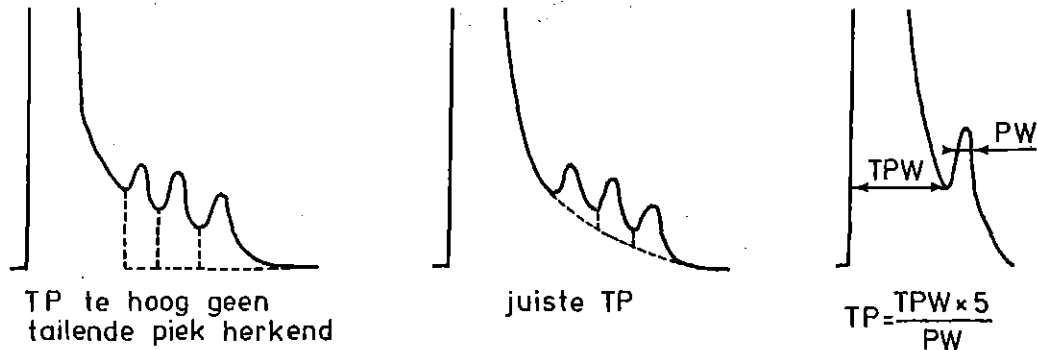


Fig. 49. Integratie rider pieken bij verschillende TP-waarden

Met MA (= Minimum area) kan het minimum oppervlak worden ingesteld dat geïntegreerd moet worden. Oninteressante pieken met een oppervlak kleiner dan deze waarde worden dan niet weergegeven.

TD (= Identification) wordt gebruikt om een nummer of code aan de analyse te geven. Dit nummer wordt bovenaan het integratierapport weergegeven.

De SP (= Spike) waarde kan 0 of 1 zijn. Bij SP = 1 worden hele smalle pieken (spikes), die bijvoorbeeld worden veroorzaakt door storingen in de netspanning, niet geregistreerd. Deze parameter moet alleen worden gebruikt als dit soort pieken voorkomt, wat meestal niet het geval is.

Als de PL (= Plateau) parameter geactiveerd is (PL = 1), wordt een plateau herkend. Zou dit niet worden gedaan, dan zou dit als piek worden geregistreerd (fig. 50).

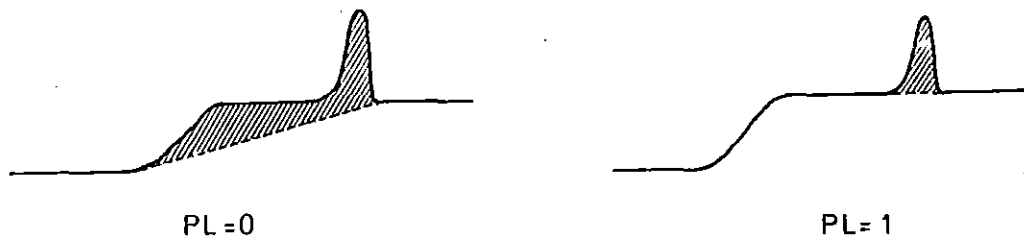


Fig. 50. PL-parameter

B_1 wordt gebruikt als de basislijn tengevolge van een schakeling plotseling verloopt. Hier wordt dan rekening mee gehouden (fig. 51).



Fig. 51. B_1 parameter

T_1 is de tijd vanaf de injectie, waarover geen registratie plaatsvindt. De pieken worden wel geïntegreerd, maar niet weergegeven op het integratierapport. T_1 kan van nut zijn als in het begin van het chromatogram oninteressante pieken voorkomen. Door deze niet te registreren wordt het integratierapport eenvoudiger. Als zowel T_1 als T_2 wordt gebruikt dan moet T_2 groter zijn dan T_1 . $T_2 - T_1$ is dan de tijd die verloopt voor de PW waarde wordt verdubbeld.

Met T_3 , T_4 , T_5 en T_6 kunnen schakelingen worden uitgevoerd. Er kan een kraan worden geschakeld. Het temperatuurprogramma van de gaschromatograaf kan worden gestopt en het integreren kan worden onderbroken en opnieuw worden gestart.

De PW, SS, TP en BL parameters moeten altijd worden ingesteld. Indien dit niet wordt gedaan hebben ze de waarde PW = 5, SS wordt automatisch gemeten, TP = 60 en BL = 5.

De wijze van integreren wordt weergegeven met een code (fig. 52). Verder geeft de integrator op de punten waar een basislijn is vastgesteld een streepje op de recorder. Aan de hand van de codering en de streepjes is na te gaan of het oppervlak goed geïntegreerd is.

DE BESLISSING OF EEN OPPERVLAKE GOED GEÏNTEGREERD IS, WORDT GENOMEN DOOR DEGENE DIE ER MEE WERKT EN NIET DOOR DE INTEGRATOR.

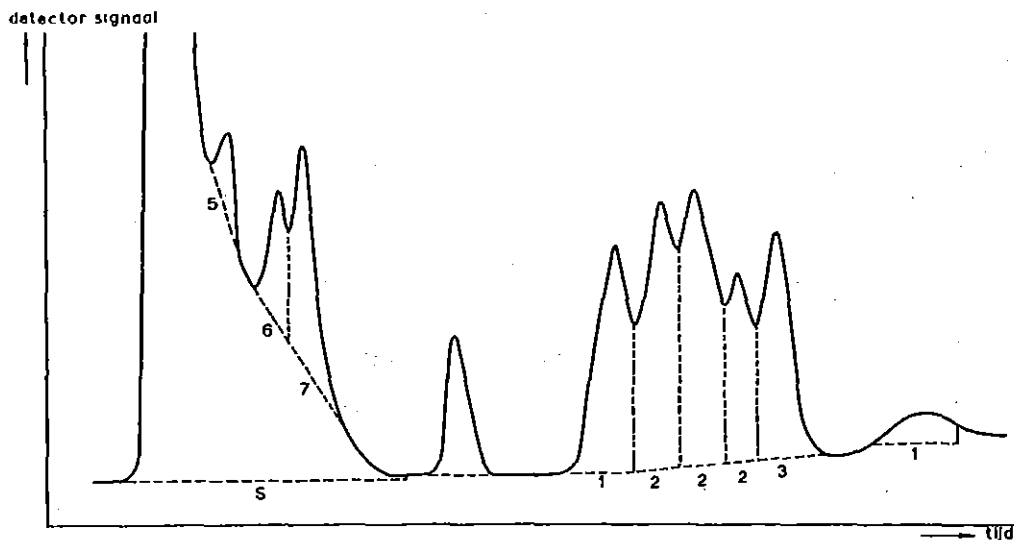


Fig. 52. Wijze van codering bij het integreren

- S - een scheve of tailende piek
- 5 - een individuele piek op een tailende piek
- 6 - een samenvallende piek op een tailende piek met tangentiële basislijncorrectie
- 7 - de laatste piek van een groep samenvallende pieken op een tailende piek met tangentiële basislijncorrectie

Geen

symbool - een piek welke terugkomt op de basislijn

- 1 - een piek met een horizontale basislijn vanaf het begin van de piek
- 2 - een samenvallende piek met trapezoïdale basislijncorrectie
- 3 - de laatste piek van een groep samenvallende pieken met trapezoïdale basislijncorrectie
- 4 - speciaal geval. Bij gebruik B₁ (zie ook Minigrator Instruction Manual, blz. 4-5)
- A - oppervlak groter dan 99999999
- B - detectorsignaal groter dan 1 Volt

A, B en C staan niet in de figuur

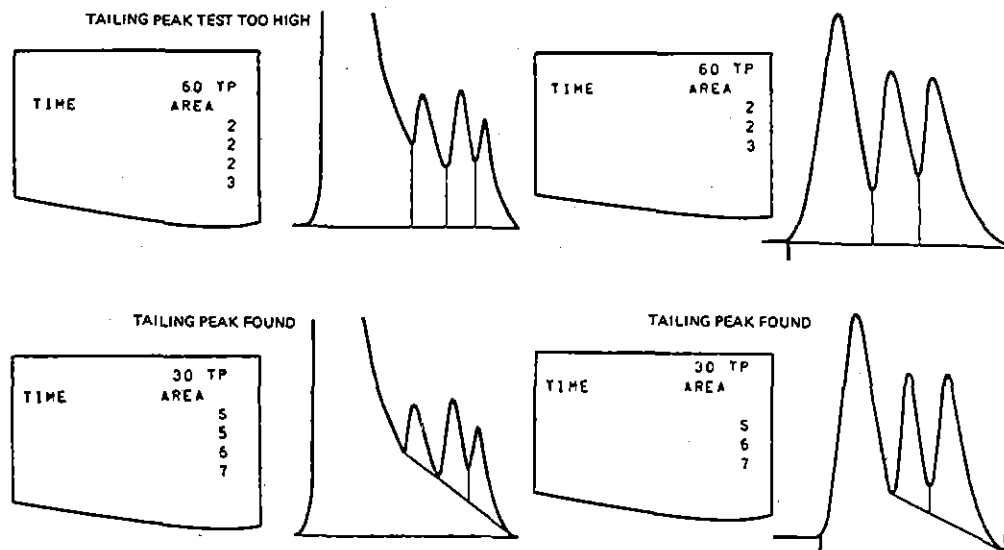
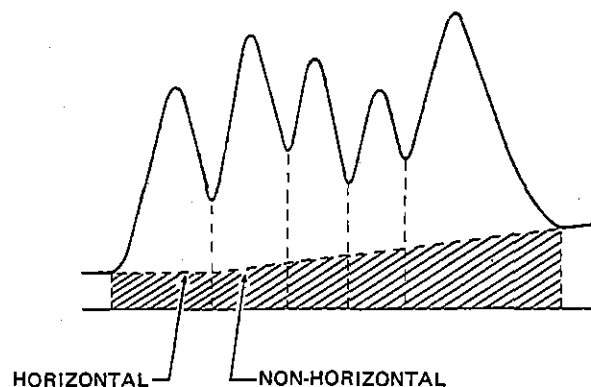
Ter illustratie van hoe de integratie kan worden beïnvloed volgen nu enkele bladzijden uit de handleiding van de minigrator (SPECTRA PHYSICS).

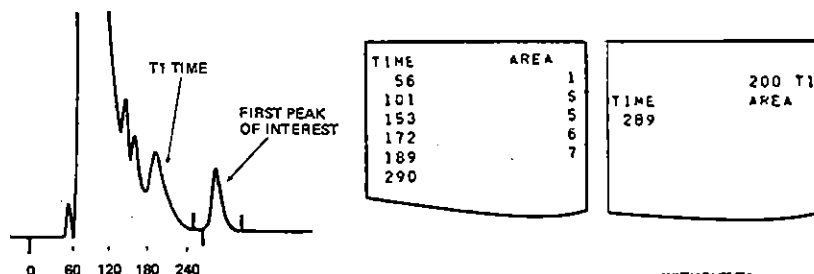
Most errors made in peak detection are due to the entry of an incorrect PW (peak width) parameter. See Section 4.3 for instructions on finding the correct PW parameter.

The following are examples of chromatograms and suggestions for adjusting parameters to achieve different types of area allocation.

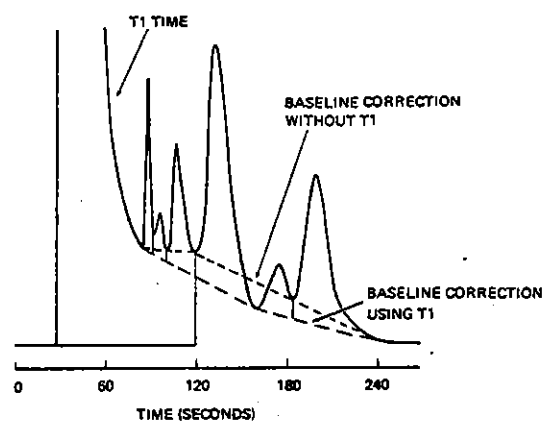
Minigrator can store as many as four fused peaks for non-horizontal baseline correction. If more than four fused peaks are found, the first fused peak is forced out of memory and given horizontal correction from the beginning baseline.

The TP value can be changed to provide the area allocation desired for some fused peaks. Both solvent and non-solvent peaks may receive tailing peak area allocation.





T1 can be used to eliminate the printout of early peaks.



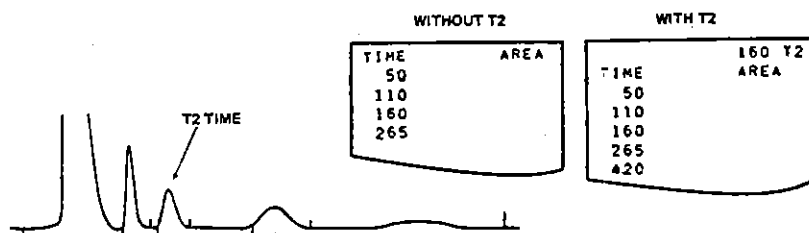
WITHOUT T1

TIME	AREA
36	5
87	6
99	6
108	6
135	2
180	2
201	3

WITH T1

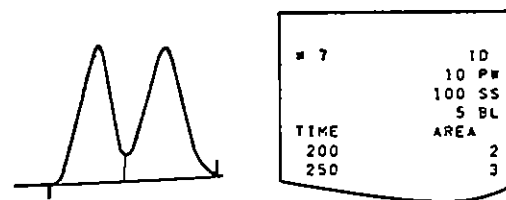
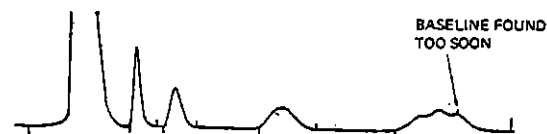
TIME	60 T1	AREA
87	6	
99	6	
108	6	
135	7	
180	6	
201	7	

A tailing peak with more than 3 rider peaks fills peak storage memory. If a fourth rider is found, the tailing peak and 3 riders must be baseline corrected. Use T1 to eliminate the tailing peak area, unless it is required for some reason.

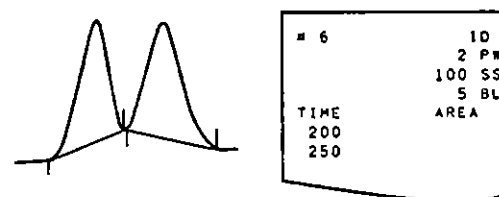


T2 may be used to ensure detection of low, broad peaks late in the chromatogram.

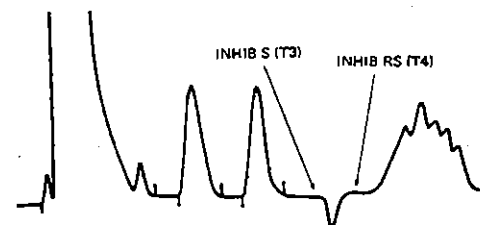
Use T2 to ensure correct PW parameter late in the chromatogram for the detection of true baseline. If PW is correct, increase the BL value.

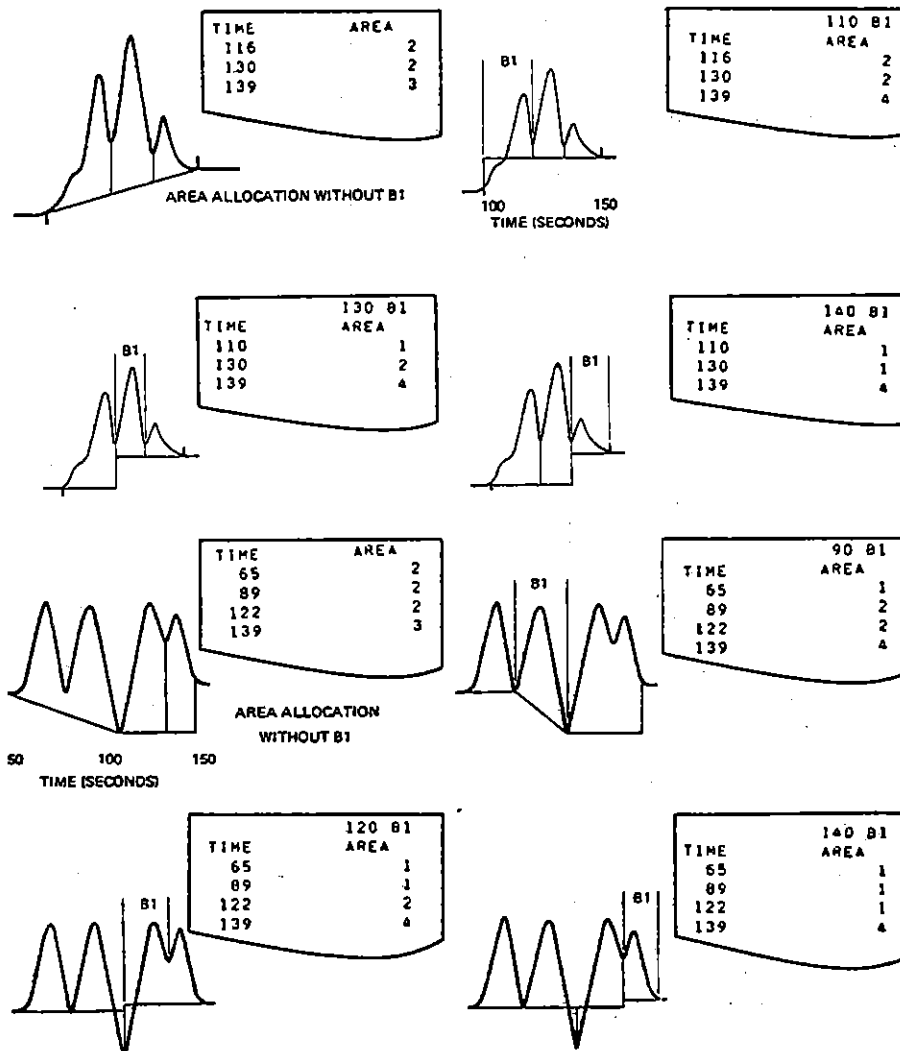


Baseline being found between fused peaks is due to the BL value being too low or the PW value being too low. Check PW, T2, and BL.



Integration inhibit can be used to eliminate integration during a baseline upset or to end peak integration.





B1 and B2 can be used to integrate peaks in the vicinity of baseline upsets. Note that the time of the B1 or B2 parameter can be used to determine the type of area allocation given.

Als er meer dan 4 pieken samenvallen dan faalt de minigrator. Er is dan een integrator nodig met een grotere geheugencapaciteit. Voor zeer ingewikkelde chromatogrammen, bijvoorbeeld olie analyses is het zelfs zeer moeilijk om de integrator vooraf te programmeren. Dit moet dan achteraf kunnen.

Zo'n integrator komt binnenkort op het laboratorium. Deze integrator is uitgerust met een grote geheugencapaciteit (circa 1000 pieken) en de mogelijkheid het ruwe chromatogram op te slaan op een floppy disk, zodat integratie achteraf mogelijk is.

10.2. Interpretatie

Identificatie

De plaats van de piek, de retentietijd, is bepalend voor de stof. Dit kan worden gecontroleerd met behulp van standaarden. Een stof moet zowel in het monster als in de standaard dezelfde retentietijd hebben. Een betere identificatie wordt verkregen als er een mengsel van de standaard en het monster wordt geïnjecteerd. Er mogen dan geen twee pieken verschijnen. Ook op een andere kolom moeten de pieken exact samenvallen.

Een ander hulpmiddel is het gebruik van twee verschillende detectoren, bijvoorbeeld fluorescentie en UV absorptie bij HPLC. De verhouding in piekoppervlakken van deze twee detectoren moet zowel voor het monster als de standaard hetzelfde zijn.

Bij gaschromatografie komen als temperatuurprogrammering wordt toegepast, alle homologe stoffen op eenzelfde afstand van elkaar, bijvoorbeeld n-alkanen bij olie. Als er dus één van bekend is, is de rest eenvoudig vast te stellen. Dit kan ook gebeuren door bij constante temperatuur te werken. De log van de retentietijd uitgezet tegen het aantal C atomen geeft dan een rechte lijn (fig. 53).

Is de stof volledig onbekend dan wordt de identificatie zeer gecompliceerd, omdat er duizenden mogelijkheden bestaan. Het gebruik van specifieke detectoren geeft dan meer informatie. Een stof kan bijvoorbeeld fluoriseren. Het UV spectrum kan worden opgenomen bij HPLC door de pomp stil te zetten als de stof in de kuvet zit. De retentietijd bij gaschromatografie zegt iets over de vluchtigheid.

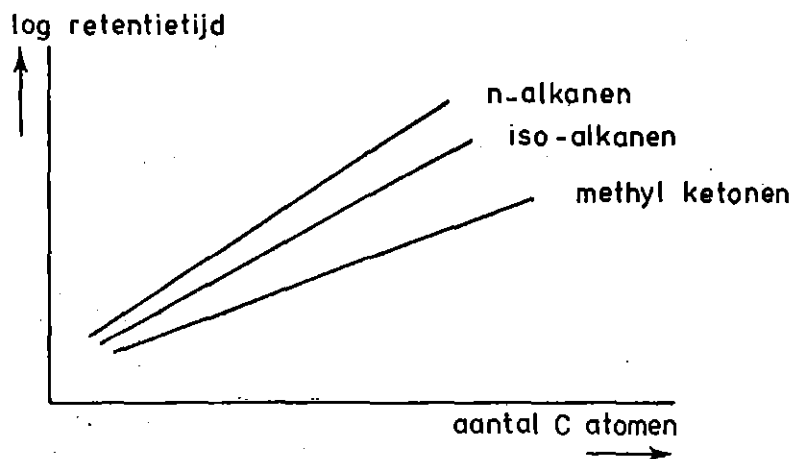


Fig. 53. Verband log retentietijd en het aantal C atomen

Het combineren van alle eigenschappen leidt tot een beperking van de mogelijkheden. Hierna wordt het een kwestie van uitproberen. Een ideaal hulpmiddel is dan wellicht het gebruik van een gaschromatograaf-massaspektrometer combinatie.

Bepaling gehalten

De oppervlakken van de pieken kunnen worden vergeleken met de piekoppervlakken van monsters met een bekend gehalte (standaard). Hieruit kan dan het gehalte van het onbekende monster worden berekend.

Een andere methode is die waar gebruik wordt gemaakt van een inwendige standaard. Hierbij wordt aan het monster een bekend hoeveelheid van een stof toegevoegd, die ook een piek op het chromatogram geeft. De verhouding van de oppervlakken van de te bepalen stof en de bekende bekende stof is dan een maat voor de hoeveelheid. Dit moet dan ook weer worden gecorreleerd aan standaarden. Het voordeel van deze methode is, dat als er tijdens de voorbereiding verliezen optreden, dit zowel bij de te bepalen stof als de toegevoegde stof gebeurt. De verhouding blijft echter constant, zodat het verkregen gehalte juist is. De verhouding is ook onafhankelijk van de hoeveelheid geïnjecteerd monster. De injectienauwkeurigheid is dan niet meer bepalend voor de nauwkeurigheid van het gehalte.

De interne standaardmethode werkt natuurlijk niet meer als als toevoeging een stof wordt genomen met totaal andere eigenschappen dan de te bepalen stof.

11. WAT KAN ER FOUT GAAN EN HOE KAN DAT WORDEN OPGELOST?

Om fouten bij chromatografie op te lossen is het zeer belangrijk om te weten hoe de processen gaan en hoe de apparatuur werkt. Voor het oplossen van fouten is het nuttig de chromatograaf in onderdelen te beschouwen (fig. 54). Dit blokschema geldt zowel voor een gas- als een vloeistofchromatograaf.

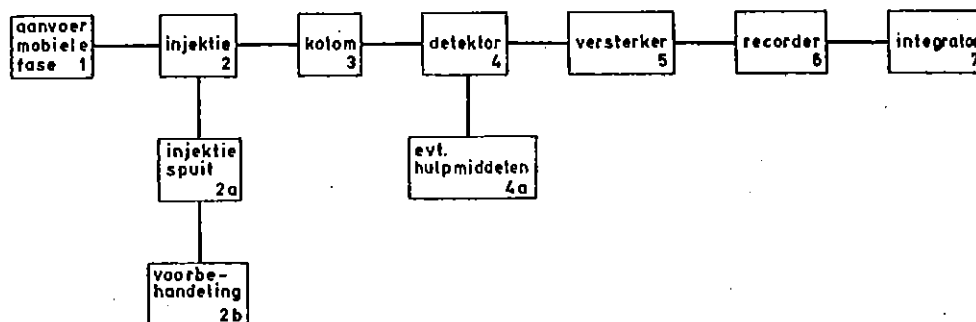


Fig. 54. Blokschema chromatograaf

Als er iets fout gaat, kan de chromatograaf blok voor blok worden doorgenomen of er in het blok of de verbindingen iets fout zit. Deze procedure wordt aan de hand van enkele voorbeelden behandeld.

Probleem 1: De pieken zijn kleiner dan verwacht, maar komen wel op dezelfde plaats.

De fouten opsporen aan de hand van blok 1 tot en met 7.

1. Geen invloed
2. Injectie te gering
 - Lekkage
 - Verkeerde voorbehandeling
3. Lekkage
 - Achteruitgang kolom (dan ook piekverbreding)

4. Instelling detector fout

Lekkage

5. Verkeerde versterking

Defect aan versterking. Controle 2x zo grote gevoeligheid geeft
een 2x zo grote piek

6. Ingang recorder niet afgestemd op uitgang detector.

Losse contacten (extra weerstand)

7. idem 6

Probleem 2: Geen pieken

1. Geen aanvoer mobiele fase

a) de voorraad is op (flessen leeg)

b) gesloten kraan

c) groot lek

d) verstopping

2. Verstoppte spuit, niets geïnjecteerd

Lek septum, alles wordt er gelijk weer uitgeblazen

3. Verstopping, kolom opnieuw pakken of vervangen

4. Detector geeft geen signaal

Geen spanning, kapotte zekering

FID, H₂ vlam is uit

UV, lamp is kapot

5. Versterker is kortgesloten, op stand shunt

6. Defecte recorder

7. Defecte integrator

Probleem 3: Pieken komen te laat

1. Lekkage (kan ook in 2, 3 en 4) waardoor de snelheid van de
mobiele fase kleiner is. Verkeerde samenstelling mobiele fase
(bij HPLC)

Verkeerde temperatuurprogrammering

Probleem 4: Onregelmatige basislijn

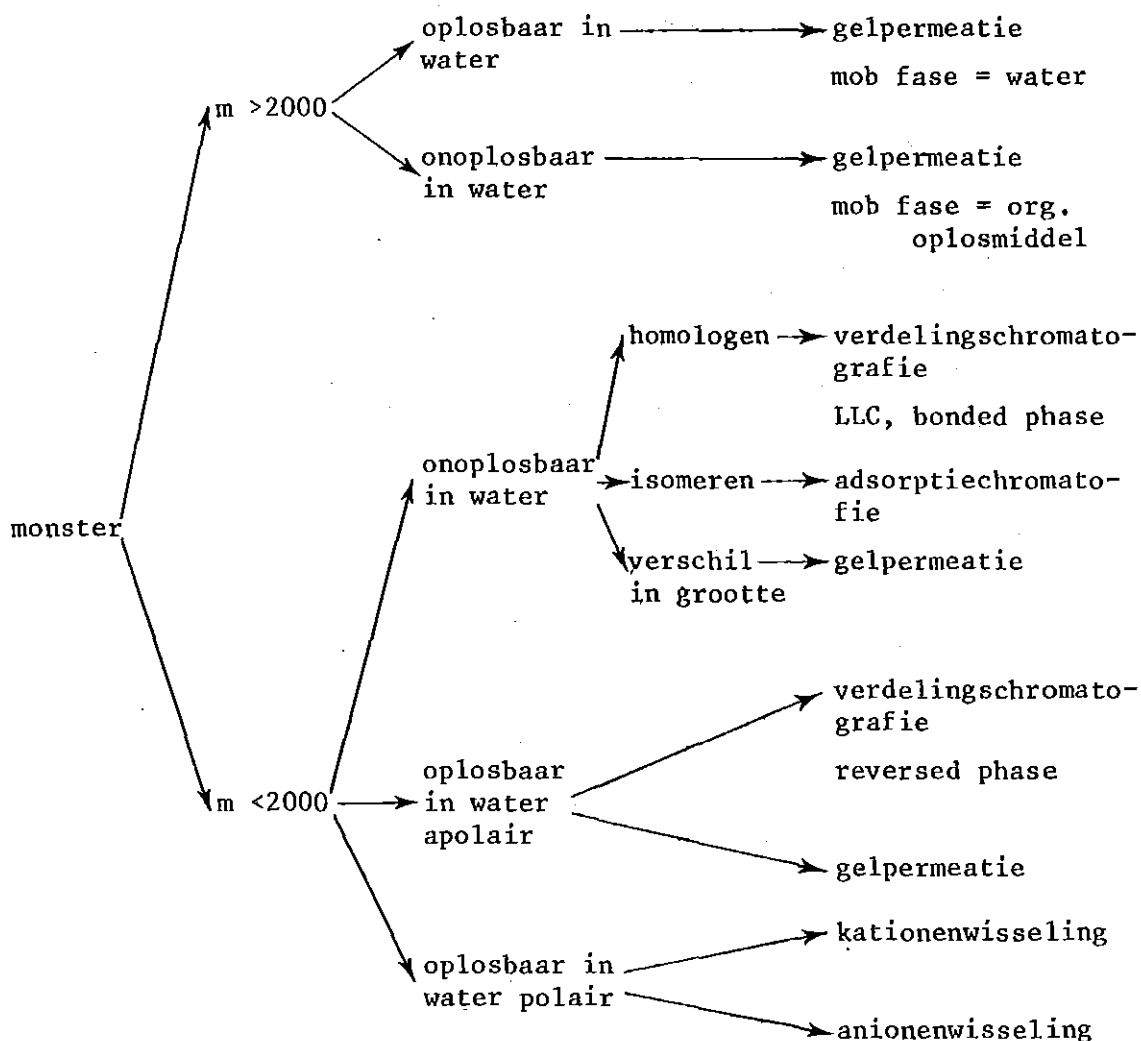
1. Mobiele fase vervuild

2. Vervuiling kolom

Remedie gaschromatografie: kolom en detector gedurende een
nacht uitstoken bij een 20°C hogere temperatuur dan normaal

Het volgende punt is de keuze van de kolom. Voor gaschromatografie is de keuze afhankelijk van de polariteit van de te bepalen stoffen. De keus wordt gemakkelijk gemaakt door de fabrikanten van kolommen. In de catalogi worden vrij veel toepassingen beschreven en meestal is hier wel één bij met dezelfde of aanverwante stoffen.

Voor HPLC bestaan er meerdere typen kolommen. De keuze hiervan kan met behulp van het volgende schema worden gemaakt. (m = molecuulgewicht).



Na de kolomkeuze kan een duidelijk antwoord worden verkregen dat slechts één bepaalde techniek bruikbaar is. Het kan ook, dat er nu nog steeds meerdere technieken mogelijk zijn. Bij de uiteinde-

lijke selectie moet gekeken worden naar welke methode het handigst werkt en die vermoedelijk de meest betrouwbare informatie zal opleveren. Hierbij moet ook de monstername en monstervoorbereiding in beschouwing worden genomen.

De volgende stap is: p r o b e r e n.

13. LITERATUUR

- BERG, C. VAN DEN, 1980. De analyse van oliecomponenten in water met behulp van XAD-hars en gaschromatografie. ICW nota 1192
- DEELDER, R.S.; J. KONINGS. Chromatografie, dictaatnr. 6.66
Technische Hogeschool Eindhoven
- DLO, 1976. Dictaat cursus chromatografie
- GALAN, L. DE, 1969. Analytische Spectrometrie. Agon, Elsevier
- GESTEL, C.A.M. VAN, 1979. Transport en afbraak van olie in bodem en grondwater. ICW nota 1119
- HARMSSEN, J., 1977. Gaschromatografische analyse van vluchtige vrije vetzuren in watermonster. ICW nota 980
- _____ 1977. Onderzoek naar opgeloste organische stoffen in het perkolatiewater van de vuilstortplaats Ambt Delden. ICW nota 1010
- _____ 1980. Gaschromatografische analyse van permanente gassen. In concept
- JOHNSON, E., STEVENSON, B., 1977. Basic liquid chromatography. Varian
- McNAIR, H.M.; E.J. BONELLI, 1969. Basic Gas chromatography, Varian
- MUYLAERT, J.M., 1979. Gaschromatografische analyse van vluchtige amines in watermonsters. ICW nota 1120
- SKOOG, D.A.; D.M. WEST. Principles of Instrumental Analysis Holt Rinhart Winston

Handleidingen apparatuur

Varian	Vari-chrom UV-Vis-detector
Varian	Vari-chrom Sample Flowcell
Varian	Fluorichrom Fluorescence detector
Varian	Model 5000 Liquid chromatograph. Operators manual
Spectra Physics	Minigrators Instruction manual
Packard	Instruction manual model 417 gaschromatograph
Packard	Operation manual model 427 gaschromatograph
Packard	Operation manual Packard model 903 en 904 Thermal Conductivity Detectors