

Chromatografie

DR. IR. R.S. DEELDER

DR. G.J. DE JONG

DR. IR. J.H.M. VAN DEN BERG

Derde druk

Syntax Media - Utrecht

© 2017 Uitgeverij Syntax Media, Utrecht

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

Voor zover het maken van reprografische verveelvoudigingen uit deze uitgave is toegestaan op grond van Artikel 16h Auteurswet 1912 dient men de daarvoor verschuldigde vergoedingen te voldoen aan Stichting Reprorecht (www.reprorecht.nl). Voor het overnemen van gedeelte(n) uit deze uitgave in bloemlezingen, readers en andere compilatiewerken (artikel 16 Auteurswet 1912) kan men zich wenden tot Stichting PRO (www.stichting-pro.nl).

ISBN 978 94 91764 23 3

www.syntaxmedia.nl

Eerste druk 1985

Tweede druk 1994

Tweede druk, eerste oplage 1994

Tweede druk, tweede oplage 2001

Tweede druk, derde oplage 2008

Derde druk 2017

Woord vooraf

De tijd is voorbij dat de chromatografie een exclusieve vorm van analytische chemie was die slechts door enkele speciaal geschoolden werd bedreven. Binnen enkele tientallen jaren hebben eerst de gaschromatografie en daarna ook de vloeistofchromatografie zich ontwikkeld tot populaire technieken, die in vrijwel ieder modern laboratorium op ruime schaal worden toegepast. De gebruiker heeft de keuze uit een groot scala betrouwbare, eenvoudig te bedienen instrumenten.

De belangrijke plaats die de chromatografie in de analytische praktijk heeft verworven, verklaart dat deze techniek ook in het laboratoriumonderwijs toenemende aandacht krijgt. Aan het verzoek om ten behoeve van dit onderwijs een leerboek over chromatografie te schrijven, hebben wij graag gevolg gegeven.

Dit boek is, in tegenstelling tot meeste andere leerboeken in de HERON-reeks, niet geschreven door docenten uit het laboratoriumonderwijs. Wij hebben ons bij de opzet van het boek daarom wellicht ook meer dan door leerplannen laten leiden door de kennis en inzichten waarover analytisch-chemici naar onze mening voor het ontwikkelen van chromatografische scheidingen dienen te beschikken. We hopen dat het boek in de uiteindelijke vorm niet alleen in het laboratoriumonderwijs, maar ook in het wetenschappelijk onderwijs als inleiding tot de chromatografie van nut zal zijn.

Voor het overgrote deel van de behandelde onderwerpen geldt, dat ze elk voor zich onderwerp van een apart boek kunnen zijn. Het schrijven van een beknopt leerboek dwingt tot het maken van keuzen. Daarbij speelt de persoonlijke visie uiteraard een grote rol. Het boek is opgezet in drie delen. Na een inleidend hoofdstuk wordt in het eerste gedeelte (hoofdstukken 2-5) aandacht geschonken aan de fysische en fysisch-chemische achtergronden van het chromatografische scheidingsproces; verschijnselen zoals stroming, stoftransport en verdelingevenwichten komen aan de orde. Het tweede gedeelte van het boek (hoofdstukken 6 en 7) is gewijd aan de gaschromatografie, het derde deel (hoofdstukken 8-13) aan de vloeistofchromatografie. Getracht is om in dit tweede en derde gedeelte niet alleen methoden en apparaten te beschrijven, maar ook aan te geven hoe de inzichten in de algemene achtergronden van chromatografische processen leiden tot weliswaar enigszins globale, maar toch vaak zeer bruikbare regels die van groot nut zijn bij het ontwikkelen van nieuwe chromatografische analyses.

We hopen dat de gevolgde aanpak de samenhang tussen de verschillende chromatografische technieken duidelijk maakt. Het boek bevat een betrekkelijk groot aantal formules. We zijn van mening, dat we die in het betoog niet konden missen; ze geven immers steeds kwantitatief aan hoe een bepaalde eigenschap van een chromatografisch systeem wordt beïnvloed door de experimentele variabelen.

Zoals reeds is opgemerkt, is dit boek vanuit een persoonlijke visie opgezet en geschreven. Wij houden ons ten zeerste aanbevolen voor het commentaar dat opzet en inhoud eventueel oproepen.

Rest mij nog een woord van oprechte dank te richten tot mijn beide mede-auteurs, J.H.M. van den Berg en P.H. Tommassen. Zonder hun wezenlijke bijdragen zou mijn poging om dit boek ook werkelijk vorm te geven op niets zijn uitgelopen.

Geleen, mei 1985

R.S. DEELDER

Bij de tweede druk

De populariteit van de chromatografie is sinds het verschijnen van de eerste druk in 1985 alleen nog maar verder gegroeid: het aantal gebruikers en de toepassingen zijn toegenomen, de apparatuur is sterk verbeterd en vaak geautomatiseerd en ook de techniek zelf heeft zich verder ontwikkeld. In deze tweede druk, die qua opzet hetzelfde is gebleven als de eerste, zijn die nieuwe ontwikkelingen, althans voor zover op dit moment relevant, verwerkt door aanpassingen in het praktische stuk, dat wil zeggen het tweede en het derde gedeelte.

In het tweede deel, dat handelt over de *praktijk van de gaschromatografie*, is met name meer aandacht besteed aan de capillaire gaschromatografie. In het derde deel over de *praktijk van de vloeistofchromatografie* zijn moderne ontwikkelingen op het gebied van monstervoorbehandeling, derivatisering, sporenanalyse, detectie en validatie toegevoegd alsmede preparatieve vloeistofchromatografie. In de literatuurlijst zijn moderne naslagwerken opgenomen en de nomenclatuur is volgens de IUPAC-regels van 1993 aangepast.

Door de aandacht die tegenwoordig bij het werk in het laboratorium wordt besteed aan kwaliteit en efficiency, zijn wij gesterkt in onze mening dat iedere medewerker die daar te maken krijgt met het ontwikkelen van chromatografische analyses moet beschikken over een zeker inzicht in het hoe-en-waarom van de techniek. Door een goede, aangepaste selectie uit de inhoud van dit boek kan zowel de doorsnee analytisch/chromatografie-gebruiker als de toekomstige chromatografie-specialist de voor zijn niveau van werk noodzakelijke basiskennis verwerven.

Geleen, Mijdrecht, Baarn, januari 1994

R.S. DEELDER
G.J. DE JONG
J.H.M. VAN DEN BERG

Bij de derde druk

In de derde druk zijn enkele nieuwe ontwikkelingen in de vloeistofchromatografie toegevoegd. Verkleining van de deeltjes in combinatie met apparatuur waarmee hogere drukken kunnen worden verkregen geeft nieuwe mogelijkheden. Daarnaast zijn andere typen stationaire fasen ontwikkeld. Op het gebied van detectie in vloeistofchromatografie is massaspectrometrie niet meer weg te denken. De principes en toepasbaarheid van deze systemen zijn beschreven. In de literatuurlijst zijn enkele nieuwe relevante naslagwerken opgenomen.

Het belang van moderne scheidingstechnieken en met name chromatografie is de afgelopen jaren verder toegenomen. In diverse laboratoria worden dagelijks vele chromatografische analyses uitgevoerd en hiervoor worden vaak geautomatiseerde instrumenten gebruikt. Kennis van de theoretische achtergronden en inzicht in de technieken blijft echter noodzakelijk voor een goede methode-ontwikkeling en voor efficiënt gebruik van de apparatuur.

april 2017

R.S. DEELDER
G.J. DE JONG
J.H.M. VAN DEN BERG

Inhoud

Deel 1: algemene theorie van de chromatografie	11
1. Inleiding	13
1.1 Scheidingsmethoden en chromatografie	13
1.2 Geschiedenis van de chromatografische technieken	14
1.3 Enige elementaire begrippen	18
1.4 Overzicht van chromatografische methoden	25
1.5 Piekverbreding	27
2. Stroming	33
2.1 Inleiding	33
2.2 Viscositeit	33
2.3 Stroming door gepakte kolommen	38
3. Stoftransport	44
3.1 Inleiding	44
3.2 Diffusie	44
3.3 Convectie	47
3.4 Convectie in gepakte kolommen	51
3.5 Stofoverdracht	53
4. Piekverbreding in chromatografische kolommen	58
4.1 Inleiding	58
4.2 Van Deemtervergelijking	58
4.3 Andere schotelhoogtevergelijkingen	62
4.4 Samendrukbare eluenten	66
4.5 Capillaire kolommen	69
4.6 Extra piekverbreding	70
5. Evenwichten	74
5.1 Verdelingscoëfficiënt en verdelingsisotherm	74
5.2 Thermodynamische aspecten	76
5.3 Polariteit	78
5.4 Oplosbaarheidsparameters	80

Deel 2: de praktijk van de gaschromatografie	83
6. Gaschromatografie	85
6.1 Inleiding	85
6.2 Apparatuur	86
6.3 Chromatogram	92
6.4 Stationaire fase	96
6.4.1 Verdelingscoëfficiënt en temperatuur	96
6.4.2 Activiteitscoëfficiënt en polariteit	100
6.4.3 Homologe reeksen en retentie-index	103
6.4.4 Materialen voor GSC	105
6.5 Gepakte kolommen	105
6.6 Capillaire kolommen	109
6.7 Injectietechnieken bij capillaire kolommen	118
7. Detectie in de gaschromatografie	125
7.1 Inleiding	125
7.2 Algemene eigenschappen van detectoren	126
7.3 Katharometer	130
7.4 Vlamionisatiedetector	132
7.5 Electron-capture detector	134
7.6 Massaspectrometrie	135
7.7 Kwantitatieve analyse	140
7.8 Concentratieberekeningen	141
7.8.1 Externe standaardmethode	141
7.8.2 Interne standaardmethode	142
7.8.3 Interne normalisatie of '100%-methode'	144
7.9 Detectiegrenzen	146
Deel 3: de praktijk van de vloeistofchromatografie	149
8. Vloeistofchromatografie	151
8.1 Inleiding	151
8.2 Vormen van vloeistofchromatografie	151
8.3 Apparatuur	154
8.4 Theorie	157
9. Adsorptiechromatografie	164
9.1 Inleiding	164
9.2 Mechanisme van adsorptiechromatografie	164
9.3 Adsorbentia	168
9.3.1 Silicagel	168
9.3.2 Chemisch gemodificeerde silicagel	169
9.4 De rol van het eluent	170

10. Reversed-phase-chromatografie	175
10.1 Inleiding	175
10.2 Retentie van niet-ionogene verbindingen	176
10.3 Gradiëntelutie	180
10.4 Retentie van ionogene verbindingen	186
10.5 Ionpaarchromatografie	191
11. Ionenwisselingschromatografie	194
11.1 Ionenwisselaars	194
11.2 Verdelingscoëfficiënten in de ionenwisselingschromatografie	198
11.3 Ionchromatografie	200
12. Gelchromatografie	203
12.1 Gelchromatografie	203
12.1.1 Pakkingmaterialen en eluent	204
12.1.2 Molecuulmassa en molecuulmassaverdeling	205
13. Detectie in de vloeistofchromatografie	207
13.1 Inleiding	207
13.2 UV-detectie	208
13.3 Brekingsindexdetectie	211
13.4 Fluorescentiedetectie	213
13.5 Elektrochemische detectie	215
13.6 Derivatisering	215
13.7 Massaspectromie	217
13.7 Kwantitatieve analyse in de LC	221
13.8 Sporenanalyse	222
13.9 Validatie	226
14. Andere vormen van vloeistofchromatografie	228
14.1 Dunne-laag-chromatografie	228
14.1.1 Theoretische achtergronden van de dunne-laag-chromatografie	229
14.1.2 Praktische uitvoering en kwantitatieve analyse	232
14.2 Preparatieve vloeistofchromatografie	233
Literatuur	237
Symbolenlijst	239
Register	245

noldsgetal een bepaalde kritische waarde overschrijdt. Dit getal, aangegeven als Re , is een in de fysische technologie, meer in het bijzonder de stromingsleer, veelgebruikt dimensieloos kengetal dat als volgt is gedefinieerd:

$$Re = \frac{\rho v d_t}{\eta} \quad (2.11)$$

waarin d_t de buisdiameter ($= 2R$) voorstelt en ρ de dichtheid. We zullen hier niet verder ingaan op de fysische achtergronden van dimensieloze kengetallen; van belang is hier dat de afwijkingen van de wet van Poiseuille in gladde, ronde buizen optreden vanaf $Re = 2\,000$. In de buis worden dan wervels waargenomen; de stroming wordt *turbulent*. Deze wervelvorming kost energie; de drukval is daarom hoger dan overeenkomt met de wet van Poiseuille. In de chromatografie hebben we vrijwel steeds te maken met laminaire stromingen.

Voorbeeld

In de vloeistofchromatografie wordt de scheidingskolom meestal met korte, metalen capillairen met het injectiesysteem en met de detector verbonden (zie ook hoofdstuk 8). Veronderstel nu, dat hiervoor een capillair wordt gebruikt met een inwendige diameter van 0,1 mm en 25 cm lengte. Door het capillair stroomt het eluent, een mengsel van water (70 vol. -%) en methanol (30 vol. -%); stel, het debiet is $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, een normaal debiet bij LC scheidingen.

Is de stroming laminair?

Dit kan worden nagegaan door het berekenen van Re volgens (2.11).

$$\text{Gegevens: } F = 1,67 \cdot 10^{-8} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$

$$d_t = 10^{-4} \text{ m}$$

$$\eta = 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$$

$$\rho = 10^3 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$$

Uit (2.10) volgt:

$$\bar{v} = 2,12 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$$

en vervolgens met (2.11): $Re = 212$.

De stroming is dus laminair. De drukval kan nu worden berekend met de wet van Poiseuille (2.8):

$$\Delta p = 1,70 \cdot 10^6 \text{ Pa}$$

Bij een dergelijk debiet is de drukval over een kort stuk capillair al aanzienlijk. In de praktijk worden in de LC bij deze debieten capillairen van 0,25 mm inwendige diameter gebruikt voor het maken van verbindingen met injectiesysteem en detector; de drukval wordt dan $1/2,5^4 \approx 1/40$ maal de drukval bij een capillair van dezelfde lengte doch met een inwendige diameter van 0,1 mm.

Tot nu toe is steeds verondersteld dat het stromende medium niet samendrukbaar is. Deze veronderstelling is juist voor vloeistoffen. Bij gassen echter moet rekening worden gehouden met de samendrukbaarheid. Voor een ideaal gas geldt:

$$\bar{v}(z) \cdot p(z) = \bar{v}(z = L) \cdot p(z = L) \quad (2.12)$$

waarbij $\bar{v}(z)$ de gemiddelde lineaire snelheid \bar{v} ter plaatse z in de buis voorstelt. Aan de ingang van de buis geldt $z = 0$ en aan de uitgang $z = L$. Afgeleid kan worden dat voor gassen bij stroming onder isotherme condities geldt:

debiet in capillaire kolom

$$F(L) = \frac{\pi R^4}{16\eta L} \frac{p_0^2 - p_L^2}{p_L} \quad (2.13)$$

waarin $p_0 = p(z = 0)$ en $p_L = p(z = L)$; $F(L)$ is het debiet gemeten bij de druk p_L .

Ook bij de stroming van ideale gassen kan Re worden berekend: ρ is immers constant en η is onafhankelijk van de druk.

Voorbeeld

Een normale inwendige diameter voor een capillaire kolom uit de gaschromatografie is 0,25 mm. Veronderstel dat het capillair 100 m lang is. Door het capillair stroomt stikstof (het draaggas) en de temperatuur van de kolom is 100 °C. De drukval Δp over de kolom is $2 \cdot 10^5$ Pa en de druk aan de uitgang is atmosferisch. Gevraagd wordt het debiet F aan de uitgang.

Gegevens:

$$\begin{aligned} R &= 0,125 \cdot 10^{-3} \text{ m} \\ \eta &= 0,208 \cdot 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s} \\ L &= 100 \text{ m} \\ p_L &= 1 \cdot 10^5 \text{ Pa} \\ p_0 &= 3 \cdot 10^5 \text{ Pa} \end{aligned}$$

Met (2.13) berekenen we nu:

$$F(L) = 1,85 \cdot 10^{-8} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1} = 1,11 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$$

Als dit debiet gemeten wordt bij kamertemperatuur (298 K) dan levert dit:

$$F = 1,11 \frac{298}{373} = 0,83 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$$

Nu geldt (2.13) alleen maar als de stroming laminair is. Met $\bar{v}(L) = F(L)/\pi R^2$ vinden we $\bar{v}(L) = 0,376 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$.

Bij 100 °C geldt voor stikstof bij atmosferische druk een dichtheid $\rho = 0,59 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ zodat:

$$Re = 2,7$$

Ook in dit geval is de stroming dus laminair.

6.3 CHROMATOGRAM

Met de detector wordt de concentratie gemeten van de componenten die aanwezig zijn in het draaggas dat uit de kolom stroomt. Het chromatogram is de grafische weergave van het detectorsignaal als functie van de tijd. Met een recorder kan dat signaal eenvoudig worden vervolgd; wanneer een component de kolom verlaat wordt een piek geregistreerd.

De plaats van een piek is karakteristiek voor een component, terwijl het piekoppervlak een maat is voor de hoeveelheid ervan in het geïnjecteerde monster. Het chromatogram bevat dus kwalitatieve en kwantitatieve informatie.

kwalitatief en kwantitatief

Op een gegeven kolom zal bij gelijkblijvende condities voor wat betreft temperatuur en inlaatdruk, een bepaalde verbinding steeds een zelfde tijd na injectie, de *retentietijd*, de kolom verlaten, onafhankelijk van de concentratie of van de aanwezigheid van andere stoffen in het mengsel. Voor de retentietijd vonden we al eerder (zie formule 1.5):

$$t_{R,i} = \frac{L}{u} (1 + k'_i) \quad (6.1)$$

t_R bij samendrukbaar draaggas

Omdat rekening moet worden gehouden met de samendrukbaarheid van het draaggas, moet u worden vervangen door \bar{u} , de gemiddelde lineaire snelheid van het draaggas:

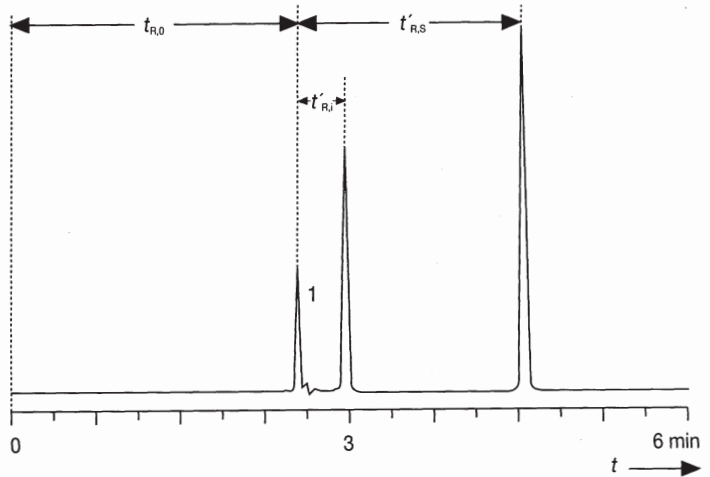
$$t_{R,i} = \frac{L}{\bar{u}} (1 + k'_i) \quad (6.2)$$

Uit deze formule volgt dat de retentietijd voor het identificeren van een verbinding alleen bruikbaar is als \bar{u} en de capaciteitsfactor k' (en dus K) constant zijn. De lineaire gassnelheid \bar{u} is alleen constant als in- en uitlaatdruk constant zijn. Omdat de verdelingscoëfficiënt K afhankelijk is van de kolomtemperatuur, moet ook die constant zijn. In de praktijk wordt de benoeming van pieken in een chromatogram vaak op deze manier uitgevoerd: de retentietijden in het chromatogram van het monster worden vergeleken met die van bekende stoffen, die of als zuivere verbindingen of als mengsel op dezelfde kolom onder dezelfde condities zijn bepaald. Als temperatuurprogrammering wordt gebruikt, moeten de programma's identiek zijn.

De gemiddelde lineaire gassnelheid \bar{u} wordt berekend uit de retentietijd $t_{R,0}$ van een inerte stof, dat wil zeggen een verbinding waarvan voor de verdelingscoëfficiënt geldt $K = 0$ (dus $k' = 0$).

$$t_{R,0} = \frac{L}{\bar{u}} \quad (6.3)$$

In de praktijk wordt, afhankelijk van de soort detector en de kolom, methaan (aardgas), waterstof of lucht geïnjec-



Afb. 6.5 Bepaling van netto-retentietijden $t'_{R,i}$. Piek 1 is de piek voor een component met $k' = 0$ (bijv. methaan).

dode tijd $t_{R,0}$

teerd. Door de retentietijd $t_{R,i}$ van een component te corrigeren voor de *dode tijd* $t_{R,0}$ wordt de *netto-retentietijd* $t'_{R,i}$ verkregen (afb. 6.5):

$$t'_{R,i} = t_{R,i} - t_{R,0} \quad (6.4)$$

Vaak wordt in plaats van de retentietijd de *relatieve retentie* $r_{i,s}$ van een stof i ten opzichte van een standaard s gebruikt:

$$r_{i,s} = \frac{t'_{R,i}}{t'_{R,s}} \quad (6.5)$$

relatieve retentie

Hierin is $t'_{R,s}$ de netto-retentietijd van de standaard waarvan de piek in hetzelfde chromatogram voorkomt als de stof i . Met de *relatieve retentie* $r_{i,s}$ kan de benoeming van pieken in een chromatogram dan in principe ook gebeuren door het vergelijken met waarden in tabellen die verkregen zijn door metingen op andere kolommen met dezelfde stationaire fase en bij dezelfde temperatuur. Immers, vergelijking (6.5) kan ook worden geschreven als $r_{i,s} = K_i/K_s$ waarbij K de verdelingscoëfficiënt is. Het bezwaar van deze methode is onder meer de willekeurige keuze van de standaard. Als oplossing is het gebruik van n -alkanen als standaardstoffen voorgesteld; het systeem van de retentie-index is hierop gebaseerd (Kovatz, 1957). Deze *retentie-index* I_i van een stof i is als volgt gedefinieerd:

retentie-index I_i

$$I_i = 100 N + 100 \frac{\log t'_{R,i} - \log t'_{R,N}}{\log t'_{R,N+1} - \log t'_{R,N}} \quad (6.6)$$

waarin:

$t'_{R,i}$ = netto-retentietijd van stof i

$t'_{R,N}$ = netto-retentietijd van n -alkaan met N koolstofatomen

$t'_{R,N+1}$ = netto-retentietijd van n -alkaan met $N + 1$ koolstofatomen.

Verder geldt: $t'_{R,N} < t'_{R,i} < t'_{R,N+1}$.

De vlamionisatiedetector is een voorbeeld van een massastroomgevoelige detector (zie paragraaf 7.4). Het detector-signaal $R(t)$ zal hier evenredig zijn met de hoeveelheid van de component die per tijdseenheid wordt toegevoerd: $Fc(t)$

7.2 ALGEMENE EIGENSCHAPPEN VAN DETECTOREN

Bij het bespreken van de eigenschappen van detectoren maken we steeds gebruik van een aantal algemeen karakteristieken zoals:

- gevoeligheid
- ruis
- lineair werkgebied
- responsietijd.

In deze paragraaf zullen we nader op deze begrippen ingaan. Een detector zet een verandering ΔQ van een eigenschap Q van het doorstromende eluent om in een verandering ΔR van een elektrisch signaal R .

De *gevoeligheid* S is gedefinieerd als:

$$S = \frac{\Delta R}{\Delta Q} \quad (7.2)$$

Als regel geldt dat de gevoeligheid over een groot gebied van Q -waarden constant is. In dat geval geldt dus:

$$S = \frac{R}{Q} \quad (7.3)$$

We spreken dan van een lineaire detector (afb. 7.1).

concentratie

Is een detector concentratiegevoelig, zoals bijvoorbeeld een katharometer, dan is de gemeten grootheid Q gelijk aan de concentratie c ($\text{kg} \cdot \text{dm}^{-3}$) van de component in het draaggas. Voor een massastroomgevoelige detector daarentegen is Q de hoeveelheid stof die per tijdseenheid de detector binnenstroomt ($\text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$); in dat geval geldt $Q = Fc$. Het elektrisch signaal R kan een stroom (I , in ampère) of een spanning (V , in volt) zijn. Voor een lineaire, concentratiegevoelige detector kan in (7.1) $c(t)$ worden vervangen door $R(t)/S$; we vinden dan:

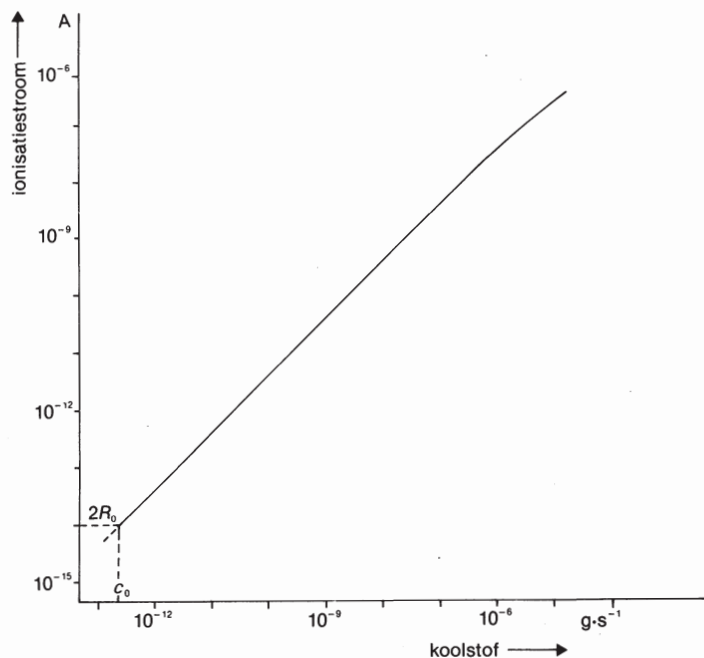
massastroom

$$M = \frac{F}{S} \int_{-\infty}^{+\infty} R(t) dt \quad (7.4)$$

Voor een lineaire massastroomgevoelige detector geldt:

$$M = \frac{1}{S} \int_{-\infty}^{+\infty} R(t) dt \quad (7.5)$$

Het oppervlak van de piek in het chromatogram is dus recht



Afb. 7.1 Lineair werkgebied van de vlamionisatiedetector.

evenredig met de hoeveelheid M van de component in het mengsel.

In de praktijk kunnen we de gevoeligheid S van een detector eenvoudig bepalen. We hoeven daarbij geen gebruik te maken van een stroom eluent die een constante concentratie van een component bevat. We kunnen volstaan met het injecteren van een bekende hoeveelheid M van een geschikte stof in een kolom die is aangesloten op de te onderzoeken detector. Met de detector wordt dan een Gaussvormige piek waargenomen. De concentratie in het piekmaximum, c_{\max} , kan worden berekend met een reeds eerder afgeleide betrekking (1.17):

$$c_{\max} = \frac{M}{F\sigma_t\sqrt{2\pi}} \quad (7.6)$$

Combinatie van deze betrekking met (7.3) levert voor een concentratiegevoelige detector:

$$S = \frac{R_{\max}}{c_{\max}} = \frac{R_{\max}F\sigma_t\sqrt{2\pi}}{M} \quad (7.7)$$

en voor een massastroomgevoelige detector:

$$S = \frac{R_{\max}}{FC_{\max}} = \frac{R_{\max}\sigma_t\sqrt{2\pi}}{M} \quad (7.8)$$

Uit het chromatogram worden σ_t en R_{\max} van de piek gemeten en omdat M bekend is, kan de gevoeligheid worden berekend.

Vaak wordt gebruik gemaakt van (10.7) en deze benadering stemt goed overeen met de theorie:

$$\log k'_i = \log k'_{i,w} - S\Phi \quad (10.7)$$

S is een stofconstante die weinig variatie vertoont (zie tabel 10.1).

S kan worden bepaald door bij twee samenstellingen Φ en k'_i te meten. We krijgen dan twee vergelijkingen met twee onbekenden, namelijk $k'_{i,w}$ en S .

Het simpele thermodynamische model en de vereenvoudigingen bij de verdere afleiding maken dat we van (10.6) en zeker van (10.7) geen nauwkeurige voorspellingen van capaciteitsfactoren mogen verwachten; toch is de betrekking zeer waardevol bij het zoeken naar een geschikt eluent voor het uitvoeren van een bepaalde scheiding.

Het zal duidelijk zijn dat bij de binaire mengsels van water en een polair organisch oplosmiddel waarover we tot nu toe steeds hebben gesproken, de volumefractie Φ van de modifier die nodig is om eenzelfde polariteit δ_m van het mengsel te verkrijgen afhankelijk is van de aard van die modifier. Als we bijvoorbeeld een mengsel methanol-water vergelijken met een mengsel tetrahydrofuraan-water, dan geldt in het geval van gelijke polariteit volgens (10.4):

$$\Phi_M \delta_M + (1 - \Phi_M) \delta_W = \Phi_T \delta_T + (1 - \Phi_T) \delta_W \quad (10.8)$$

of:

$$\Phi_T = \frac{(\delta_W - \delta_M) \Phi_M}{\delta_W - \delta_T} \quad (10.9)$$

Φ_T is de samenstelling van een mengsel tetrahydrofuraan-water dat dezelfde polariteit heeft als een mengsel methanol-water met de samenstelling Φ_M .

De toepassing van (10.8) en (10.9) kunnen we illustreren aan de hand van het volgende voorbeeld.

Voorbeeld

Op een bepaald type C_{18} -reversed-phase-pakking geldt dat voor 2,5-dimethylfenol in 45% methanol-water $k' = 9,6$. Met de δ -waarden uit tabel 5.2 vinden we voor tetrahydrofuraan met (10.9) de volgende samenstelling:

$$\Phi_T = \frac{(23,4 - 14,5) \cdot 0,45}{23,4 - 9,1} = 0,28$$

Experimenteel vinden we in een dergelijk mengsel $k' = 10,0$.

Dit resultaat is echter wel wat geflatteerd. In de praktijk leidt de verandering van het organisch oplosmiddel, ondanks een aanpassing tot de gewenste δ via Φ , tot vaak grotere verschil-

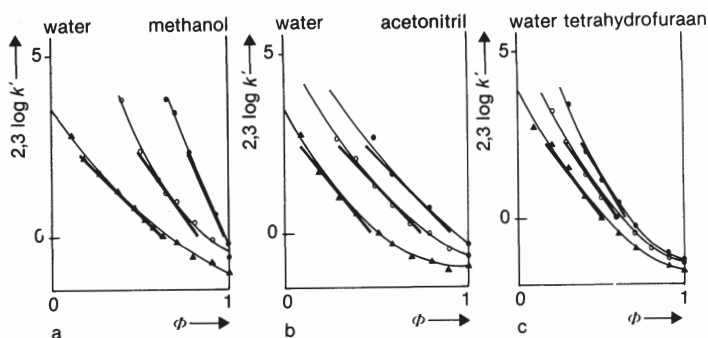
berekening van Φ_T

len tussen k' -waarden van een component in het ene en in het andere systeem dan in het bovengenoemde voorbeeld het geval is.

De oorzaak hiervan is, dat de waarden van A, B en C (zie (10.6) en (10.7)) in de praktijk afhankelijk zijn van de combinatie van component en organisch oplosmiddel, zoals ook blijkt uit afb. 10.1. In deze figuur zijn voorbeelden gegeven van het verband tussen $\log k'$ en Φ voor een drietal veelgebruikte binaire mengsels. In methanol-water divergeren de lijnen sterk; dat wil zeggen: de selectiviteit $r_{j,i} = k'_i/k'_j$ varieert sterk met Φ ; in acetonitril is dit veel minder het geval. De figuur laat ook zien dat in een systeem met 45% methanol de selectiviteit verschilt van die in een systeem met 28% tetrahydrofuraan; dat wil zeggen: de k' van een component zal in het ene systeem niet dezelfde waarde behoeven te hebben als in het andere, ondanks dezelfde δ van de systemen.

Afb. 10.1 Relatie tussen $2,3 \log k'$ en ϕ voor drie representatieve componenten in de mobiele fasesystemen.

- a. Methanol-water
- b. acetonitril-water
- c. tetrahydrofuraan-water.
- Naftaleen, ○ anisool, ▲ fenol
- formule (10.6) voor $k' < 50$
- formule (10.7) voor $1 < k' < 10$.



De hoge selectiviteit van systemen water-methanol heeft het bezwaar dat bij de scheiding van componenten met grote verschillen in structuur ook zodanig grote verschillen in k' voorkomen, dat het niet mogelijk wordt een samenstelling te vinden waarbij de elutie van de pieken plaatsvindt in het normale gebied $1 < k' < 10$; in dat geval kan het overschakelen op een systeem water-tetrahydrofuraan nuttig zijn. Uit tabel 5.2 kan uit de partiële oplosbaarheidsparameters worden afgeleid dat methanol relatief hoge δ_a - en δ_b -waarden (protondonor- en protonacceptoreigenschappen) heeft terwijl acetonitril een permanente dipool (hoge δ_o) heeft en tetrahydrofuraan qua eigenschappen er tussen in zit. Deze verschillen in partiële oplosbaarheidsparameters zorgen voor de verschillen in selectiviteit.

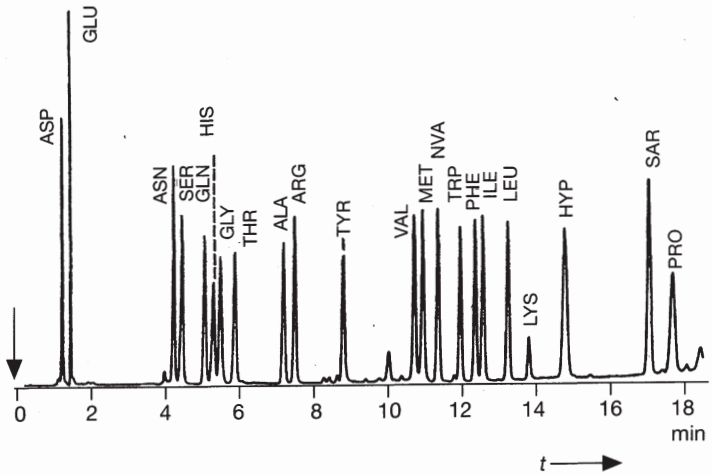
Tegenwoordig wordt voor de scheiding van zeer polaire verbindingen ook veel gebruikgemaakt van hydrofiële interactie chromatografie (HILIC). Hierbij worden hydrofiële stationaire fasen gecombineerd met mobiele fasen die in de reversed-phase LC worden gebruikt. Diverse stationaire fasen (silica, amino, diol, amide, kat- en anionen, zwitter-

De belangrijkste voordelen van nakolomsderivatisering (ook wel reactiedetectie genoemd) zijn:

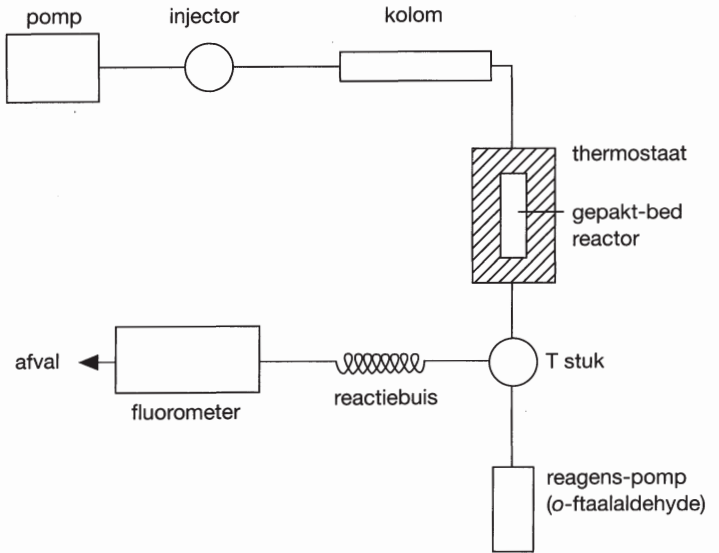
- de reactie moet reproduceerbaar verlopen maar hoeft niet kwantitatief te zijn. Bijprodukten storen de detectie niet als ze reproduceerbaar worden gevormd;
- de gescheiden verbindingen kunnen vóór de reactie met een andere detector worden gedetecteerd.

De belangrijkste nadelen van nakolomsderivatisering zijn de bandverbreding in de reactor, dat wil zeggen alleen snelle reacties (maximaal enkele min.) zijn bruikbaar, en de mogelijke storing van de overmaat reagens. Verder is altijd extra apparatuur (pomp, reactor) nodig. Voorkolomsderivatiseringen kunnen tegenwoordig met diverse monsterwisselaars ook worden geautomatiseerd. Op deze wijze kunnen manuele stappen en blootstelling aan de omgeving worden voorkomen en neemt de reproduceerbaarheid duidelijk toe. Een bekend voorbeeld hiervan is de reactie van aminozuren met *o*-ftaaldehyde (OPA). Een chromatogram staat afgebeeld in afb. 13.12. Verschillende typen nakolomsreactoren kunnen worden gebruikt. De eenvoudigste en meest toegepaste reactor is de rechte, gespiraliseerde of gevlochten open-buis (= capillair) reactor.

Afb. 13.12 Chromatogram van *o*-ftaaldehyde-derivaten van aminozuren (10 pmol per component) met fluorescentiedetectie. Aminozuren met een secundaire aminogroep zijn gederiviseerd met 9-fluorenylmethylchloroformaat.



Een illustratief voorbeeld is de residu-analyse van *N*-methylcarbamaat pesticiden. De apparatuur wordt schematisch weergegeven in afb. 13.13. De methode is gebaseerd op de katalytische hydrolyse van de *N*-methylcarbamaaten met behulp van een sterke anionenwisselaar bij circa 100°C. Na deze hydrolyse met een zogenaamde gepakt-bed reactor wordt het hydrolyseproduct, methylamine, gedetecteerd door middel van een reactie met *o*-ftaaldehyde. De hydrolyse kan ook gerealiseerd worden door middel van toevoeging van natriumhydroxide-oplossing na de kolom. Dit leidt tot meer piekverbreding en bovendien is nog een pomp nodig.



Afb. 13.13 Schema van de apparatuur voor de bepaling van N-methylcarbamaaten met HPLC-scheiding, hydrolyse (anionenwisselaar bij circa 100 °C, 40 × 4,6 mm inwendige diameter), derivatisering met *o*-ftaalaldehyde en fluorescentiedetectie.

13.7 MASSASPECTROMETRIE

In hoofdstuk 7 is beschreven dat met de koppeling van chromatografie en massaspectrometrie zeer krachtige analyssystemen kunnen worden verkregen. Massaspectrometrie geeft structuurinformatie over de gescheiden verbindingen en vaak kan zelfs identificatie plaatsvinden. De koppeling van LC en MS is moeilijker dan die van GC en MS, omdat de mobiele fase moet worden geïntroduceerd in het vacuüm van de massaspectrometer. Als de mobiele fase zouten bevat, geeft dit nog meer beperkingen. De ontwikkeling van LC-MS heeft vele jaren gekost, maar deze systemen worden nu routinematig in vele laboratoria toegepast. Dit is mogelijk gemaakt door atmosferische druk ionisatie (API) en met name de elektro spray ionisatie (ESI). Dit interface kan worden toegepast bij flows van ca. 1 ml/min., maar de ionisatie is efficiënter en de gevoeligheid dus hoger bij lagere flows (kleinere diameters van LC-kolommen). Het verdient echter wel aanbeveling om niet-vluchtige buffers zo veel mogelijk te vermijden, omdat deze kunnen leiden tot onderdrukking van het signaal en zoutvorming in de ionenbron.

Bij API worden de stoffen in hun neutrale vorm of als ionen overgebracht naar de gasfase door verneveling van de mobiele fase en desolvatering van de druppels. Hierbij wordt zo min mogelijk warmte gebruikt, om ontleding van stoffen te voorkomen. De verneveling bij ESI is het resultaat van een potentiaal van 2-5 kV op het capillair waar de vloeistof uitkomt. Uniforme druppels van ca. 1 µm ontstaan door autorepulsie van het elektrostatisch geladen oppervlak. In de volgende stap worden ionen geproduceerd uit de druppels die verdampen. API en ESI worden schematisch weerge-

LC-MS