

Јадранка ОДОВИЋ (jodovic@pharamcy.bg.ac.yu), Мирјана АЛЕКСИЋ, Институт за аналитичку хемију, Фармацеутски факултет, Београд, Србија и Јасна ТРБОЈЕВИЋ-СТАНКОВИЋ, Одељење хемодијализе, Клиника за урологију, КБЦ "Др Драгиша Мишовић", Београд, Србија

ХРОМАТОГРАФСКЕ МЕТОДЕ: ВИСОКО-ЕФИКАСНА ТЕЧНА И ТАНКОСЛОЈНА ХРОМАТОГРАФИЈА

Хроматографске методе се данас често примењују како у квалитативним тако и у квантитативним испитивањима различитих узорака. Међу њима значајно место заузимају високо-ефикасна течна и танкослојна хроматографија које се често њакмиче у могућностима своје примене. Избор хроматографске методе у разним областима науке и технологије (медицина, фармацеутичка индустрија, индустрија хране, козметологија, екологија) највише зависи од проблема који треба решити, при чему често једна метода није довољна већ је потребно комбиновати различите хроматографске технике.

УВОД

Сепарационе методе, међу којима водећу улогу има хроматографија, заузимају значајно место у проучавању узорака различитог порекла. Почетак хроматографије везује се за радове руског ботаничара Svet-a у којима се даје приказ раздвајања биљних пигмената хроматографијом на колони. Само пола века касније, средином 20. века, радовима научника А.Т. James-a и А.Ј.Р. Martin-a започео је развој модерних хроматографских метода. Данас је хроматографија као брза, једноставна и ефикасна метода, присутна у највећем броју аналитичких лабораторија и налази примену како у квалитативној тако и у квантитативној анализи [1].

Хроматографске методе су сепарационе методе које се заснивају на процесу расподеле молекула или јоне узорка између мобилне (покретне) и стационарне (непокретне) фазе. Стационарна фаза, мобилна фаза и анализирана супстанца су основни елементи хроматографског система [1-3].

Постоји више подела хроматографских метода: према природи мобилне фазе на течну, гасну и хроматографију суперкритичних флуида; према начину смештања стационарне фазе на планарну и колонску; према механизму раздвајања на адсорпциону, партициону, јоноизмењивачку и гел - филтрациону хроматографију [3]. Такође, хроматографске методе се, на основу поларности мобилне и стационарне фазе, могу поделити на нормално- (код које је стационарна фаза поларнија у односу на мобилну) и реверзно-фазне (мобилна фаза поларнија од стационарне) [1,4]. Избор хроматографског система, нормално- или реверзно-фазног, зависи преваходно од карактеристика испитиваних супстанци, њихове поларности, растворљивости, јонизабилности, величине њихових молекула [4].

У циљу повећања ефикасности и смањења граница детекције, хроматографија се комбинује и допуњава

другим методама: масеном, UV, IC спектроскопијом, а могуће је и међусобно комбиновати различите хроматографске методе [2].

Међу хроматографским методама посебно значајно место заузимају две: модерна, осетљива, тачна и прецизна високо-ефикасна течна хроматографија, и традиционална, једноставна и економична танкослојна хроматографија. Стога ће у овом тексту бити приказане ове две, често коришћене хроматографске методе, могућности њихове примене, као и њихове предности и мане.

ВИСОКО-ЕФИКАСНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЈА (HPLC)

Високо-ефикасна течна хроматографија (*high performance liquid chromatography* – HPLC) је данас најшире примењивана хроматографска метода у квалитативним, а посебно у квантитативним анализама узорака различитог порекла.

Сепарациони процеси у хроматографској колони објашњени су кроз две теорије. Према физичкој теорији "концепта теоријских подова", хроматографска колони на којој се врши раздвајање састоји се од серије замишљених слојева, постављених управно на правац кретања зоне. У сваком од ових слојева успоставља се равнотежна расподела испитиване супстанце између мобилне и стационарне фазе. Дужина једног оваквог слоја одговара висини теоријског платоа, односно пода. По овој теорији, број и висина теоријских подова представљају меру ефикасности колоне. Међутим, ова теорија не даје реално објашњење процеса на колони и не води рачуна о свим физичким процесима који се на њој одигравају [3,5].

Да би се избегли недостаци претходне теорије, развијена је кинетичка теорија у којој се истиче значај брзине којом се под хроматографским условима може успоставити равнотежа као и брзине дифузије у мобилној и стационарној фази. Ова теорија разматра све механизме који доприносе ширењу зоне и доводи у везу висину еквивалентну теоријском поду и променљиве од значаја за ширење хроматографске зоне [3,5].

Основни циљ модерне течне хроматографије јесте висока ефикасност одвајања у довољно кратком времену. Високо-ефикасна течна хроматографија постиже овај циљ применом колони малог пречника, компактно и униформно пуњених честицама малог пречника, као и пумпи које одржавају повишени притисак и тиме обезбеђују одговарајући проток мобилне фазе [3,5].

Високо-ефикасни течни хроматограф (Слика 1.) састоји се од:

- пумпе,
- инјектора (систем за уношење узорка),
- хроматографске колоне,
- термостата,
- детектора,
- система за прикупљање и обраду података.

Колоне се израђују од нерђајућег челика и у њих се пакују одговарајуће стационарне фазе. Мобилна фаза може бити смеша два или више растварача у које се може додати одговарајући пуфер и друге помоћне супстанце које утичу на брзину и ефикасност раздвајања и на квалитет зоне. Постоје два типа елуирања: изократско, код којег је састав мобилне фазе константан током анализе, и градијентно, код којег се састав мобилне фазе (однос компонената) мења током елуирања. Градијентно елуирање се примењује када треба раздвојити супстанце значајно различите поларности у циљу скраћења времена анализе [3,5]. Регистровање испитиваних супстанци врши се детектором који на излазу даје сигнал пропорционалан концентрацији анализата. Употребљају се детектори високе осетљивости, најчешће UV/Vis и флуоресцентни, а у новије време се све више користе масени, инфрацрвени, атомско-апсорпциони, електрохемијски детектори [3,5].

ТАНКΟΣЛОЈНА ХРОМАТОГРАФИЈА

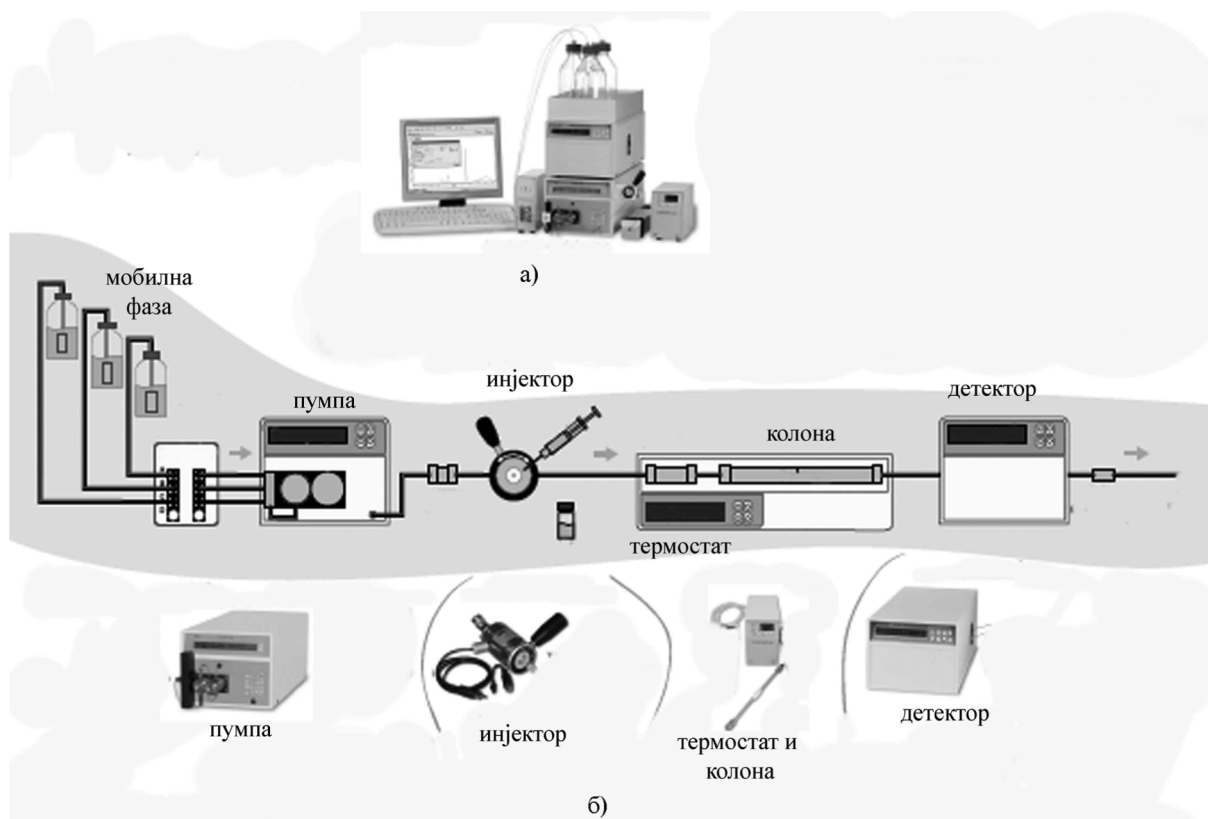
Танкослојна хроматографија (*thin layer chromatography* – TLC) представља вид планарне хроматографије. Према техници развијања она може бити једно- и дво- димензионална, при чему једнодимензионална

хроматографија може бити вертикална, хоризонтална или кружна. Такође, у оквиру ових, могуће је извршити и додатне поделе у зависности од смера и начина развијања хроматограма [4,6].

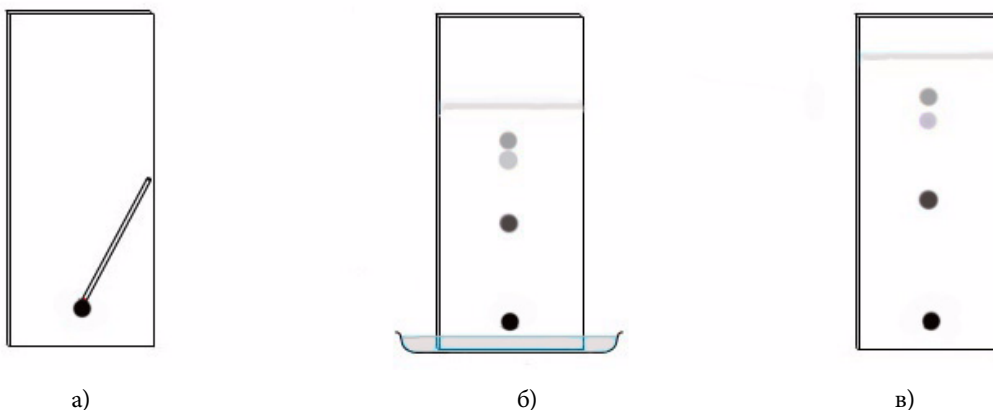
Кретање супстанци код танкослојне хроматографије условљено је односом између елуционе моћи мобилне фазе и ретенције на стационарној за коју је најчешће одговорна адсорпција. Међутим, с обзиром да TLC представља подврсту течне хроматографије (*liquid chromatography* - LC) и други сепарациони механизми карактеристични за LC, као што су партиција, јонска измена и гел-филтрација, овде могу играти значајну улогу. У пракси, раздвајање супстанци је најчешће резултат комбинације већег броја механизма [4,6].

Код хроматографије на танком слоју углавном се користе чврсте стационарне фазе, сорбенти, који могу бити природни и синтетски, неоргански и органски, поларни и неполарни. Треба имати у виду да и природни сорбенти захтевају извесну обраду пре примене, као и да поред класичних органских и неорганских данас постоји и нова генерација органско-неорганских сорбената [7].

За раздвајање компонената испитиваног узорка одговорне су међумолекулске интеракције анализираних супстанци како са стационарном тако и са мобилном фазом. Стога су критеријуми за избор мобилне фазе веома сложени. Првенствено треба водити рачуна о растворљивости анализираних супстанци. Наиме, основни предуслов за постизање хроматографског процеса јесте добра растворљивост узорка у мобилној



Слика 1. а) Високо-ефикасни течни хроматограф; б) Компоненте високо-ефикасног течног хроматографа



Слика 2. Танкослојна хроматографија: а) Наношење узорка; б) Развијање хроматограма; в) Раздвојене компоненте узорка

фази. Осим тога мобилна фаза не треба да ступа у хемијске реакције са адсорбентом или испитиваним супстанцама, у комбинацији са стационарном фазом треба да обезбеди селективно одвајање, максималну ефикасност адсорбенса и што краће време извођења анализе [3,6].

Приказ процедуре танкослојне хроматографије (једно-димензионалне, узлазне) дат је на Слици 2.

ПРИМЕНА ТАНКОСЛОЈНЕ И ВИСОКО-ЕФИКАСНЕ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ, ЊИХОВЕ ПРЕДНОСТИ И МАНЕ

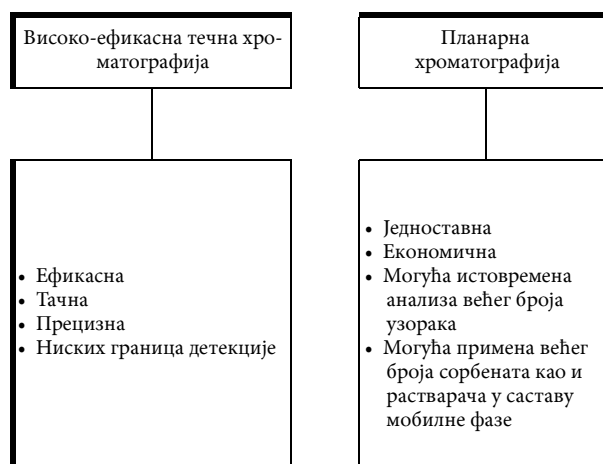
Описане хроматографске методе су погодне за раздвајање, квалитативну и квантитативну анализу различитих узорка. Широко се примењују у многим гранама науке и технологије, у фармацеутској индустрији, медицини, биохемији, клиничкој хемији, индустрији хране, козметологији, екологији и заштити животне средине и често се такмиче у могућностима примене [5,6]. Приликом избора између планарне хроматографије и HPLC методе треба водити рачуна о њиховим међусобним разликама, односно о њиховим предностима и манама.

Високо-ефикасна течна хроматографија је метода високе тачности, прецизности, брзине и ефикасности, а веома ниских граница детекције. Ово је чини погодном како за квалитативне тако и за квантитативне анализе, посебно узорка у којима је концентрација испитиване супстанце ниска. С друге стране, метода танкослојне хроматографије је једноставна и брза, пружа могућност квалитативне и квантитативне анализе, али у односу на HPLC има знатно мању осетљивост и ефикасност.

Ипак, новија истраживања и развој у овој области мењају слику о танкослојној хроматографији. Високо-ефективна танкослојна хроматографија (*high performance thin layer chromatography* - HPTLC), чији је развој започет седамдесетих година прошлог века, обезбедила је танкослојној хроматографији место уз HPLC методу са којом се сада може поредити по ефикасности, брзини, осетљивости и репродуктивности [6]. HPTLC пружа могућност анализе већег броја узорка истовремено (Самаг хоризонтална када омогућава истовремено

анализу чак 72 узорка), док је HPLC методом могуће анализирати само један узорак. Хроматографски систем код планарне хроматографије је отворен, за разлику од HPLC методе где је систем затворен. HPLC је скупа метода и захтева раствараче високог степена чистоте. За разлику од ње, планарна хроматографија је економичнија, једноставнија за извођење, омогућава знатно бржу замену мобилне фазе, употребу већег броја растварача у саставу мобилне фазе. Метода HPTLC такође омогућава примену већег броја сорбената за стационарну фазу. Ипак метода планарне хроматографије има и извесне мане. Недостаци ове методе, поред мање осетљивости у односу на HPLC, су осетљивост на спољашње услове - влажност, температуру, загађење ваздуха, као и тешкоће у раду са супстанцама осетљивим на влагу, кисеоник или светло [2,6,8,9].

У Шеми 1. дате су основне карактеристике метода високо-ефикасне течне и планарне хроматографије.



Шема 1. Карактеристике високо-ефикасне течне и планарне хроматографије

ЗАКЉУЧАК

С обзиром на све изложене предности и недостатке HPLC методе и методе планарне хроматографије може се закључити да избор хроматографске методе зависи пре свега од проблема који треба решити. У неким случајевима, као што је одређивање супстанци у узорцима у којима су оне присутне у ниским концен-

трацијама, предност која се даје HPLC методи је оправдана. Међутим, у великом броју квалитативних али и квантитативних анализа предност треба дати методи планарне хроматографије, посебно с обзиром на развој постигнут у тој области у новије време. Такође, често једна метода није довољна за решење аналитичког проблема те је тада потребно комбиновати различите хроматографске технике.

Abstract

THE CHROMATOGRAPHY METHODS: HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

Jadranka Odović, Mirjana Aleksić, Jasna Trbojević-Stanković¹, Institute of Analytical chemistry, Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

¹Department of Hemodialysis, Clinic of Urology, Clinical Center "Dr Dragiša Mišović", Heroja Milana Tepića 1, 11000 Beograd, Serbia

Chromatographic methods represent the most frequently used methods in both qualitative and quantitative studies of various samples. High performance and thin layer chromatography have important place among these methods. They are widely applied in many scientific and technological researches. The choice of specific

chromatographic method depends on the type of research, and sometimes two or more methods are combined.

The main features, advantages and disadvantages of the two most widely used chromatographic methods has been discussed in this short presentation.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] J. M. Miller, *Chromatography, Concepts and Contrasts*, Drew University, Madison, New Jersey, 2005.
- [2] K. Tyrpien, B. Janoszka, D. Bodzek, *J. Chromatogr. A*, **774** (1997) 111 – 120.
- [3] G. Milovanović, *Hromatografske metode odvajanja*, PMF Univerziteta u Beogradu i Jugoslovenski zavod za produktivnost rada i informacione sisteme, Beograd, 1985.
- [4] S. Gocan, *Modern Thin-Layer Chromatography*, N. Grinberg (Ed.), Dekker, New York, 1990.
- [5] W.J. Lough, I.W. Wainer, *High Performance Liquid Chromatography, Fundamental principles and practice*, 1995.
- [6] V. D. Krasikov, *J. Anal. Chem.*, **58** (8) (2003) 706 – 719.
- [7] R.J. Vervoort, E. Ruyter, A.J.J. Debets, H.A. Claessens, C.A. Cramers, G.J. de Jong, *J. Chromatogr. A*, **931** (2001) 67 – 79.
- [8] C.F. Poole, *J. Chromatogr. A*, **856** (1999) 399 – 427.
- [9] C.F. Poole, *J. Chromatogr. A*, **1000** (2003) 963 – 984.



Милош К. МИЛЧИЋ и Снежана Д. ЗАРИЋ, Хемијски факултет, Студентски трг 12-16, Београд, Србија
(e-mail: mmilcic@ibms.sinica.edu.tw)

КРАТКА ИСТОРИЈА ПОЈМА АРОМАТИЧНОСТИ

Један од најчешће коришћених појмова у модерној хемијској литератури је појам ароматичности¹⁻⁵. Ова тврдња се може и квантитативно доказати; од 1981. године до средине 2006. године појавило се више од 300 000 чланака о ароматичним особинама хемијских система. Најзначајнији хемијски часопис, *Chemical Reviews*, је у задњих 5 година посветио два пуна издања прегледу најновијих достигнућа на пољу ароматичности (свеска бр. 5, 2001. године и свеска бр 10, 2005. године). Ипак, упркос великој заступљености у хемијској литератури, ароматичност, као и многи други веома корисни и популарни хемијски концепти (као што су парцијална наелектрисања на атомима, хемијска веза, хиперкоњугација, електронегативност,...) нема недвосмислену и чврсту физичку основу. Такође ароматичност се не може квантитативно изразити, нити се може директно експериментално измерити. Другим речима, ароматичност је апстрактна величина, пре него физичка опсервабла. Можда је најбољи опис ароматичности дао Шлејер (Paul von Ragué Schleyer) рекавши да је ароматичност као и лепота у очима посматрача⁶. За оба ова појма може се рећи да се лако препознају (мада не увек), јављају се у разним облицима, тешки су за

упоређивање, још тежи за квантитативно одређивање и свако има своје мишљење за које сматра да је једино исправно. Због недостатка јасне дефиниције појма ароматичности 70.-тих година прошлог века почели су „напади“ на овај појам. Неки истраживачи су чак предлагали да појам ароматичност треба напустити као нејасан, неоснован и збуњујући⁷⁻¹⁰. Чињеница је да је концепт ароматичности еволуирао током времена као и да ће наставити и даље да се употпуњује новим аспектима. Данас је добро познато да је континуална делокализација електрона, која изазива ароматичност, веома широк феномен, који није ограничен само на π електроне планарних прстенова са sp^2 хибридованим атомима. Ипак, било би неозбиљно престати користити концепт ароматичности само зато што нисмо у стању да га јасно дефинишемо и измеримо¹¹. Најновија квалитативна дефиниција појма ароматичности, која обухвата најразлицитије аспекте овог концепта и у складу је са тенденцијама нових истраживања гласи:

„Ароматичност је последица делокализације електрона у затвореним колицама, било у две или више димензије. То резултује у снижењу енергије, често веома значајном, као и великом броју нео-