

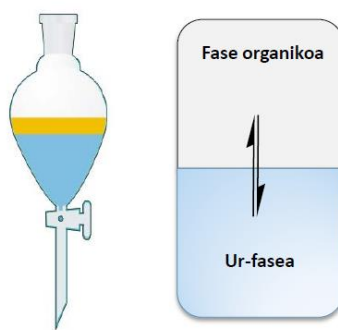


- Azido edo baseen disoluzioak

Beste fasea organikoa izango da, **fase organikoa**:

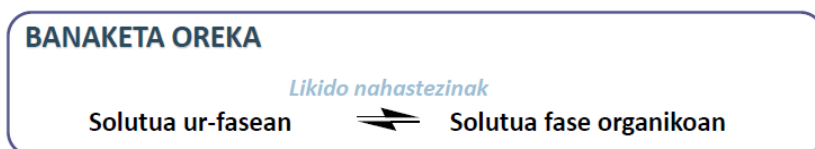
- Hidrokarburo (Hk) aromatikoak: tolueno edo xilenoren isomeroak
- Hk alifatikoak: hexano, di-, tri-, tetra-klorometanoa
- Eterrak: dietileter
- Esterrak: etil azetatoa
- Uretan disolbagaitzak diren alkohol eta zetonak

Analitoaren arabera disolbatzaile bat edo beste erabiliko da. Analito apolarrak erauzteko hidrokarburo aromatikoak erabiltzen dira, hauek baitira apolarrenak.



#### ❖ LIKIDO-LIKIDO ERAUZKETAREN OINARRIAK

Analitoa fase-urtsuan dago, eta honi fase organikoa gehitzen diogunean, banaketa oreka bat agertzen da.



- **Nerst-en banaketa edo distribuzioaren legearen arabera** solutuaren edo analitoaren aktibitatearen erlazioa bi faseen artean konstantea da, **presioa eta temperatura konstanteak** baitira:

$$K_D^T = \frac{(a_s)_2}{(a_s)_1}$$

**Nerst-en Banaketa edo Distribuzio Legea**

- **Disoluzio diluituekin** kontzentrazioa eta aktibitatea berdina izango da. Analitoa bi faseetan egoera kimiko berean egon behar da, baina askotan hau ez da betetzen, konposatu kimikoek bestelako orekak izan ditzaketelako, azido-base oreka adibidez. Bestelako orekak badituzte banaketa orekan ere eragingo dute.

Banaketa konstantearen ( $K_D$ -ren) balioak taulatuta daude.

Normalean guk ikusiko ditugun banaketa konstanteak  $K_{OW}$  izango dira, fase-organiko gisa oktanola eta fase-urtsu bezala ura erabiliz kalkulatu direnak. Banaketa konstanteak unitate logaritmikoetan ematen dira: **Log  $K_{OW}$  = Log p** (partition).

Log p = 3 bada,  $[A]_{okt} / [A]_{ura} = 10^3$ , hartaz analitoa apolarra da nagusiki, fase-organikora pasa nahi izango du.

**Log p > 3 analitoa apolarra da nagusiki.**

**Log p < 1 polarrak**

**Log p = 0 oso polarrak**

**Log p = 1-3 bada, 3-tik gertu geroz eta apolarragoak.** Tarte honetan badago, analitoaren erauzketa hobetzeko, prozesuaren etekina hobea izateko, inguruko baldintzak (disolbatzaile egoki baten hautaketa, pH-aren doiketa eta gatzen adizioa) doitu ditzakegu.

$$K_D = \frac{[S]_2}{[S]_1}$$

Bi faseetan, solutua, egoera kimiko berean aurkitzen denean

*$K_D$ : banaketa konstantea*

- **Banaketa erlazioa (D):** bi faseen arteko solutuaren espezie guztien kontzentrazioen arteko erlazioa adierazten du. Banaketa erlazioa pH-en arabera aldatuko da, solutuen kontzentrazioak ionizazioaren arabera aldatzen direlako, eta ionizazioa (konplexuen formazio oreka) pH-ren menpekoa delako.

$$D = \frac{\sum [S]_2}{\sum [S]_1}$$

Bi faseen arteko solutuaren espezie guztien kontzentrazioen erlazioa.

## 1. BERRESKURAPEN FAKTOREA (edo etekina):

$$\%R = \frac{[S]_2 \cdot V_2}{[S]_1 \cdot V_1 + [S]_2 \cdot V_2} \times 100$$

$$\%R = \frac{\frac{[S]_2 \cdot V_2}{V_1}}{\frac{[S]_1 \cdot V_1 + [S]_2 \cdot V_2}{V_1}} \times 100$$

$$\%R = \frac{D \cdot V_2/V_1}{1 + D \cdot V_2/V_1} \times 100$$

$V_1 = V_2$  Baldin bada

$$\%R = \frac{D}{D+1} \times 100$$

Hau da erabiliko dugun Adierazpena

n erauzketa burutuz gero:

$$\%R = \left[ 1 - \left( \frac{1}{1 + D \cdot \frac{V_2}{V_1}} \right)^n \right]$$

Likido-likido erauzketa bakarra eginda baliteke etekina ona ez izatea. Hau gertatzen bazaigu, hainbat erauzketa egingo ditugu segidan. Adibidez: gernu bolumen bat 50 ml hartuko ditugu, erauzle bat gehituko diogu, irabiatu, dekantatzen utzi dekantazio inbutu batean adibidez. Faseak banatuko ditugu, hau da, erauzketa egingo dugu (erauzlea elimintzeko); eta gernu laginari, erauzketa jasan duenari, erauzle garbia gehitu (erabili gabekoa); eta bigarren erauzketa bat egingo dugu. Amaieran erabilitako erauzle guztiak edukiko ditugu; eta guzti hauek nahastuko ditugu; eta disolbatzailea lurrunduko dugu kontzentratzeko. Modu honetan, erauzketa bakoitzean analito mol gehiago erauziko direnez etekina handitzen da.

## 2. ERAUZKETAREN SELEKTIBITATEA:

Selektibitatearen erauzketa egiteko separazio faktorea ( $\alpha$ ) erabiltzen da. Separazio faktorearen balioa ahalik eta handiena izatea komeni da.

Separazio faktorea

$$\alpha_{B/A} = \frac{(K_D)_B}{(K_D)_A}$$



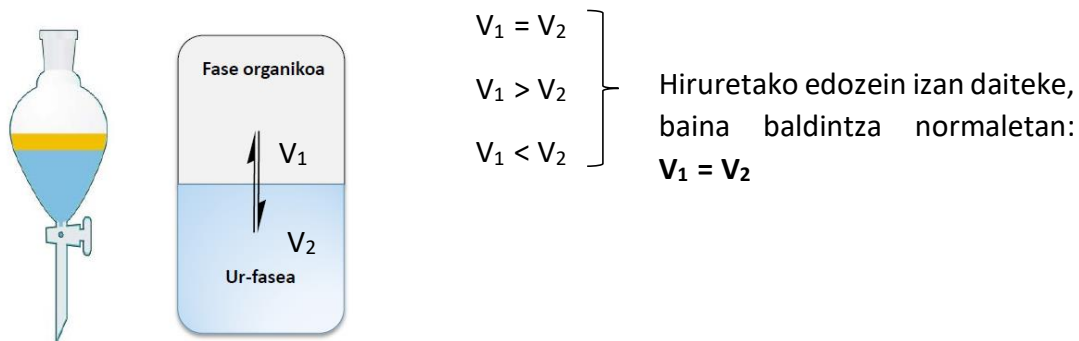
Hurrengo taulan bi disolbatzaile elkarren nahastean nahaskorrak diren edo ez ikusi dezakegu:

**DISOLBATZAILEEN NAHASKORTASUN-TAULA**

Disolbatzaile	Acetone	Acetonitrile	n-Butyl Alcohol	Chloroform	Cyclohexane	Dichloromethane	N,N-Dimethylformamide	Dimethyl Sulfoxide	1,4-Dioxane	Ethyl Acetate	Ethyl Alcohol	Ethyl Ether	Ethylene Dichloride	Heptane	Hexane	Isooctane	Isopropyl Alcohol	Methanol	Methyl t-Butyl Ether	Methyl Ethyl Ketone	Pentane	Tetrahydrofuran	Toluene	Water	o-Xylene
Acetone	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Acetonitrile	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
n-Butyl Alcohol	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Chloroform	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Cyclohexane	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Dichloromethane	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
N,N-Dimethylformamide	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Dimethyl Sulfoxide	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
1,4-Dioxane	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Ethyl Acetate	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Ethyl Alcohol	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Ethyl Ether	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Ethylene Dichloride	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Heptane	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Hexane	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Isooctane	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Isopropyl Alcohol	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Methanol	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Methyl t-Butyl Ether	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Methyl Ethyl Ketone	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Pentane	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Tetrahydrofuran	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Toluene	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Water	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
o-Xylene	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊

Legend:  
 ◊ Nahaskorra  
 ◼ Nahastezina

Erauzle motaz gain, kontuan eduki behar dugu gehitzen dugun erauzlearen bolumena:



Erauzlearen etekina ez bada ona, erauzlearen bolumena doituz, etekina ona izatea lortu dezakegu:  $V_1 > V_2$  bada, analitoa erauzteko gaitasuna igotzen denez, etekina hobetzen da.

Etekinak ikaragarri ona bada, erazlearen bolumena txikitu dezakegu:  $V_1 < V_2$  bada, erazitako analitoaren kontzentrazioa handiagoa izango da, hau da, aurrekontzentrazioa igotzen denez, errazagoa izango da analitoa detektatzea.

- **pH-a:**

Espezie neutroak disolbagarriak dira disolbatzaile organikoetan.

Espezie ionizatuak disolbagarriak dira disolbatzaile polarretan.

Fase urtsutik organikora ionizatuta ez dagoen espezia pasako da, hau da, espezie neutroa igaroko da.

Helburua espezia fase urtsuan egoera neutroan egotea da; eta hau pH-a doituaz lortzen dugu. Adibidez:

- Analitoa azido ahula da, eta bere  $pK_a = 6$  da. Hartaz, espezia ez-ionizatuta egoteko  $pK_a < 6$  izan beharko du, balio horietan ez baita disoziatzen.  $pH = pK_a$  denean, espezie erdia disoziatuta egongo da, baina beste erdia ez. Horregatik,  $pH < 6$  denean espezie neutroa gailenduko da.

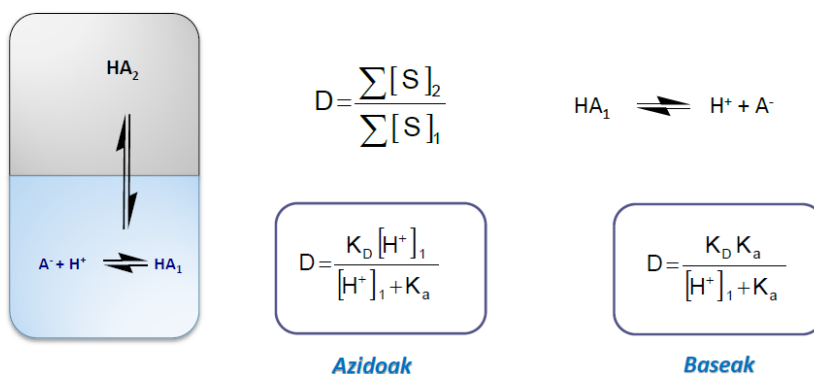
Teorian  $pH = pK_a \pm 2$  denean, bat edo beste gailenduko da; baina praktikan  $pH = pK_a \pm 1$ .

- Analitoa azidoa bada:

$$pH \leq pK_a - 2$$

- Analitoa basea bada:

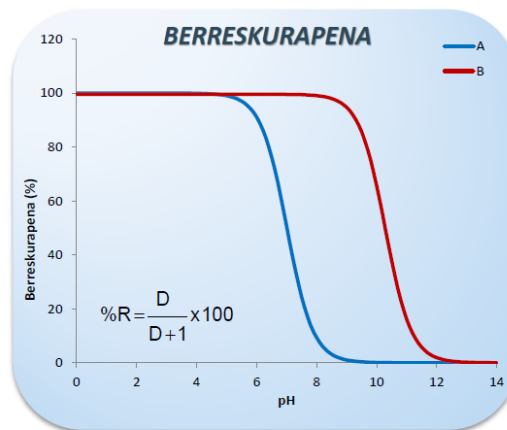
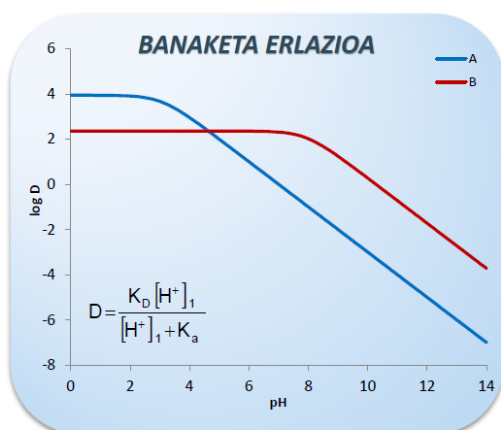
$$pH \geq pK_a + 2$$



**Adibidea:** A konposatu azidoaren datuak:  
 B konposatu azidoaren datuak:

**pKa: 3.06**  
**pKa: 7.92**

**log K<sub>D</sub>:3.95**  
**log K<sub>D</sub>:2.36**



pK<sub>a</sub> eta Log K<sub>D</sub> jakinda etekinaren eta berreskurapenaren balioak ezagutu ditzakegu.

Abiapuntua: pK<sub>a</sub> x ardatzean, pH adierazten den lekuan; eta Y ardatzean, Log D adierazten den lekuan K<sub>D</sub>.

pK<sub>a</sub> – 2 -tik ezkerrera marra horizontal bat marrazten da. pK<sub>a</sub> + 2 -tik behera zuzen bat marraztuko dugu.

Ezkerreko grafikoan oinarrituz berreskurapenaren balioa aurrean dezakegu.

Eskubiko grafikoari erreparatuz hurrengoaz ohartuko gara:

- pH > 12 denean ez da ez A ez B konposatua erauziko.
- pH > 8 denean B konposatua soilik erauziko da.
- pH= 8-12 denean, likido-likido erauzketa egin beharko dugu, tarte horretan konposatu bakarra erauzten baita.

• **GATZ NEUTROEN ADIZIOA:**

- **GATZ INERTE BATEN KANTITATE HANDIEN ADIZIOA (<30%) “Salting out” efektua:** Gatzak gehitzean bi faseen arteko banaketa lerroa hobeto ikusiko da, eta beraz, dekantazioa hobeto emango da. Normalean gehitzen diren gatzak NaCl edo antzekoak izaten dira: NaCl; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; amonio gatzak; aluminio eta burdin gatzak. Gatz inerte bat kantitate handian botatzen badugu “salting out” efektuaren ondorioz hurrengoa geratuko da:
  - Indar ionikoa handituko da.
  - Analito ez ionizatuen disolbagarritasuna txikituko da.
  - Disolbatzailearen nahaskortasuna ur-fasearekin txikituko da.

< %30 NaCl  
 < 30g/100mL



- **BIKOTE IONIKOEN ERAKETA**
- **KONPLEXUEN FORMAIOA IOI METALIKOekin**

**A. ERAUZKETA EZ-JARRAIA:** erauzketa ez jarraia eskuz egiten da dekantazio inbutuan (beirazko ontzian).

Lagin likido bat izango dugu, fase urtsuan analitoa + interferentziak + matrizea izango dituen.

Lagin likido hau dekantazio inbutu batena jarriko dugu; eta erauzle bat (fase organiko bat) gehituko diogu. Erauzlearen dentsitatea urarena baino txikiagoa bada goian geldituko da. Dentsitate baxuena duena gelditzen da goian. Hidrokarburoak normalean beheran gelditzen dira.

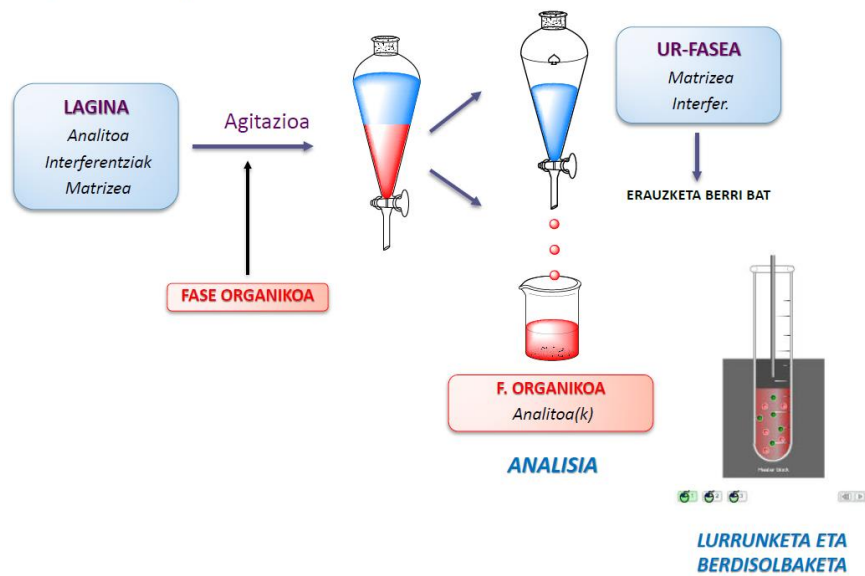
Behin erauzlea gehitu dugula agitatu, irabiatu egingo dugu. Hurrengo pausua dekantazioa da, eta honen bidez fase urtsua eta fase organikoa bereizten dira.

Analitoa fase organikoan egongo da; eta hartaz fase hau analizatuko dugu. Fase organiko honek lurrunketa bat eta berdisolbaketa bat jasango du. Lurrunketa nitrogeno gasa eta bloke metaliko bat (bero aplikatzeko) erabiliz gertatuko da: disolbatzailea lurrundu egiten da eta analitoa paretetan gelditzen da itsatsita. Orain disolbatzaile berri bat, garbia izango dena gehituko diogu eta berdisolbaketa emango da.

Lurrunketa prozesuarekin disolbatzailearen bolumena txikitzen dugu, berdisolbaketa disolbatzaile bolumen txikiago batekin egiten baita. Beraz, aurrekontzentrazio bat egiten da.

Dekantazioa egin ondoren, hau d, a bi faseak banatu ondoren etekina ona ez bada n erauzketa egin beharko genituzke. Lehenengo dekantazioan lortutako ur-fasean matrizea eta interferentzia geldituko dira, eta honekin egingo genuke erauzketa berri bat. Erauzketa guztiak egin ondoren, lortutako fase organiko bakoitza batuko genituzke, analito guztiak elkarrekin egoteko eta nahasketa hau analizatuko genuke (lurrunketa eta berdisolbaketa egingo genuke).

## A) Erauzketa ez-jarraia



**B. ERAUZKETA JARRAIA:** erauzketa jarraia lagin likidoentzat egokitutako beirazko ontzietan egiten da. Erabiltzen den aparatua Soslet-aren parekoa da.

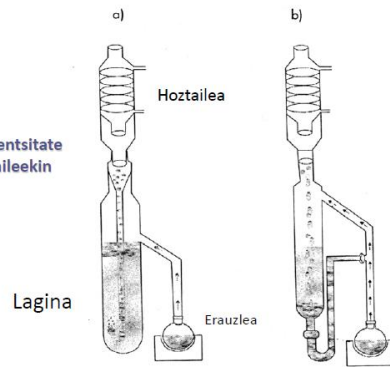
Hurrengo kasuetan egingo dugu erauzketa jarraia:

- Analitoen D balioa txikia denean.
- Laginaren bolumena oso handia denean
- Erauzketaren zinetika geldoa denean, eta ondorioz, erauzketaren denbora handia denean.

Erauzketa egiteko muntai desberdinak daude, erabiltzen dugun disolbatzailearen dentsitatearen arabera:

- a) Erauzketa ura baino dentsitate baxuagoko disolbatzaileekin burutzeko.
- b) Erauzketa ura baino dentsitate altuagoko disolbatzaileekin burutzeko.

Erauzketa, ura baino dentsitate baxuagoko disolbatzaileekin burutzeko:



Erauzketa, ura baino dentsitate altuagoko disolbatzaileekin burutzeko:



### Nola egiten da erazketa jarraia?

1. Erauzketa ura baino dentsitate baxuagoko disolbatzaileekin egiten bada: matrizea plaka batekin berotzen da, eta ondorioz, bertan dagoen erazketa lurrundu egiten da, hoztailura iristen den arte. Hoztailura iristen denez ur hotza, bertan kondentsatu egingo da erazketa eta tantak-tantaka eroriko da laginaren gainera.

Erazketa laginarekin kontaktuan jartzean, laginak baino dentsitate txikiagoa duenez, laginaren goiko alderantz, gainazalerantz igotzeko joera izango du. Goranzko prozesu horretan laginarekin kontaktua izango du eta gainera, laginean dagoen analitoa eta hainbat interferentzia bereganatuko ditu. Beste hodiaren mailara iristean, hasierako matrizea itzuliko da, berriro ere prozesua martxan jarri: erazketa lurrundu, hoztaileraino iritsi, kondentsatu, hodiaren behearaino iritsi, laginarekin kontaktuan jarri goranzko prozesuan....

2. Erauzketa ura baino dentsitate altuagoko disolbatzaileekin egiten bada: kasu honetan prozesua berdina izango baina disolbatzaileak urak baino dentsitate handiagoa denez, kondentsatutako tanta laginaren goikaldean isuriko dira, baina jarraian laginean zehar jeitsiko dira, hondoan geldituz. Beheranzko prozesu honetan analitoa eta interferentziak bereganatuko ditu erazketa.

Muntaiaren azpian sifoi bat jartzen zaio, eta erazketa hondon pilatzen denean, sifoi honetatik bueltatuko da hasierako matrizea.

Bi prozesu hauek, bai a eta bai b prozesuak, ziklikoak dira.

## ❖ ERAUZKETA FASE SOLIDOAN (SPE): SARRERA

Analitoak kartutxoan material absorbatzailean (atal solidoan) gelditzen dira atxikituta. Grabitatearen indarrarekin nekez pasatuko dira lagin likidoak kartutxotik. Gehienetan kanpotik indar bat aplikatu behar diogu hau gertatzeko. Normalean erabiltzen den teknika hutsa aplikatzea da; eta honetarako hutsean lan egiten duten kolektoreak erabiltzen dira. Hauek hainbat posizio ditu kartutxoak kokatzeko. Barnealdeko ganbera hutsean dago, bertan aurkitzen da huts ponpa lagin likidoa zurrupatzeko. Kolektorea huts ponpari lotuta egoten da. Huts ponpari esker kartutxoan sartzen dugun lagin likidoak absorbatzaile solidoa zeharkatu eta barnekaldera sartuko da. Barnekaldean lagina jasoko dugu. Hainbat saiodi edo beirazko ontzi jarri beharko genituzke kartutxoetatik erortzen dena jasotzeko.

Demagun kolektorea 10 kartutxorako dagoela prestatuta. Honek 10 lagin aldi beran aztertu ahal izatea ahalbidetzen digu.



Oreka bat ematen da, analitoa lagin likidoan eta analitoa fase solidoaren artean. Analitoen kontzentrazioaren erlazioari banaketa konstante ( $K_D$ ) esaten zaio.

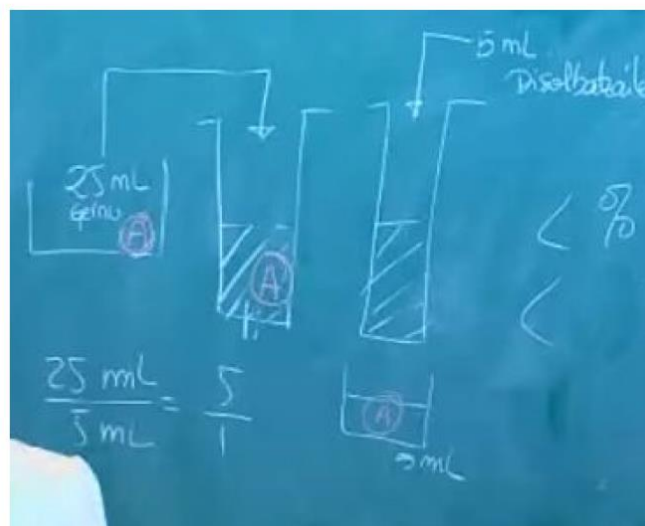


❖ SPE-ren HELBURUAK:

HELBURUA	ERABILPENA
Interferentzien eliminazioa	% 50
Analitoen (aurre)kontzentrazioa	% 35
Fase edo disolbatzaile aldaketa	% 5 ondoren erabiliko dugun teknikaren arabera izango da
Laginaren kontserbazioeta garraioa	% 5
Gatzen eliminazioa	% 5

Analitoen aurrekontzentrazioa gauzatzeko balioko digu. Kartutxo batetik 25 ml gerru pasatzen baditugu adibidez, analitoa absorbatzailean geldituko da eta gero imaginatu 5 ml disolbatzaile gehitzen ditugula. Analitoa 5 ml horietan jasoko dugu. Hasieran analitoa 25ml-tan zegoen eta amaieran 5ml-tan. 25 ml-tan zegoena 5ml-tan jaso dugu. 5 aldiz ari gara aurrekontzentratzen lagin horretan dagoen analitoa. Beraz, interferentziak ezabatzeke modu ona da eta baita analitoak kontzentratzekoa ere.

Gerruan disolbatzailea ura da eta berdisolbatzeko beste disolbatzaile bat erabiltzen dugu, beraz, disolbatzaile berriren 5 ml horiek bateragarriak izan beharko dira ondoren egin nahiko den azterketarekin.



## ❖ SPE PROZESUAREN OINARRIAK

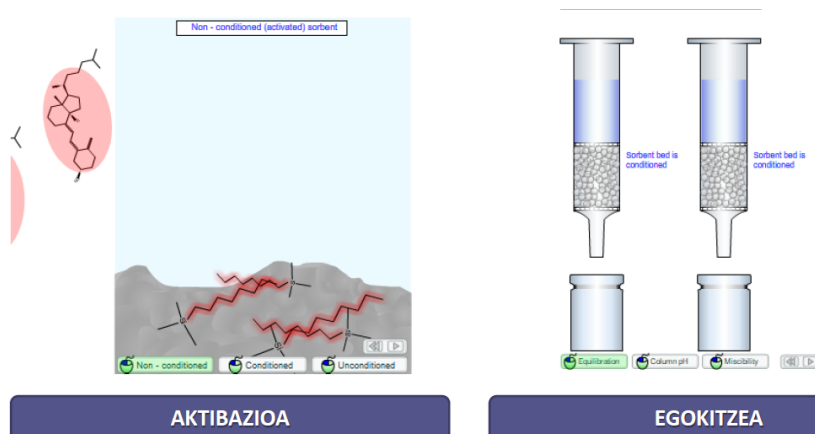
4 pausu nagusi ditu:

1. **AKTIBAZIOA ETA EGOKITZEA:** Kartutxoak erabili aurretik aktibatu egin behar dira, disolbatzaile egoki bat gehituz (azetonitriloa, etanola). 1-2 mL inguru disolbatzaile gehitzen zaizkio aktibazioa egiteko.

Kartutxoak aktibatzen ditugunean, gehitzen diogun disolbatzaileari esker hidrokarburo kateak kanporantz bideratzen dira, eta fase solidoak barnerantz.

Adsorbatzaile apolarren aktibazioa derrigorrezkoa da, eta azetonitriloa (AZN) edo metanola (MeOH) erabiliz gauzatu da. Adsorbatzaile polarretan, aldiz, aktibazioa ez da beharrezkoa.

Kartutxoaren barnean dagoen absorbantzia eremua egokitu egin behar da, hezatu egin behar da, lehor etortzen baita materiala. Bestela, atxikipena ez litzateke emango eta analitoaren zati handi bat galdu egingo litzateke. Egokipena analitoa gehitu aurretik egin behar da, eta horretarako laginak duen disolbatzaile bera gehitu behar zaio, normalean ura izan ohi da, ur desionizatua.



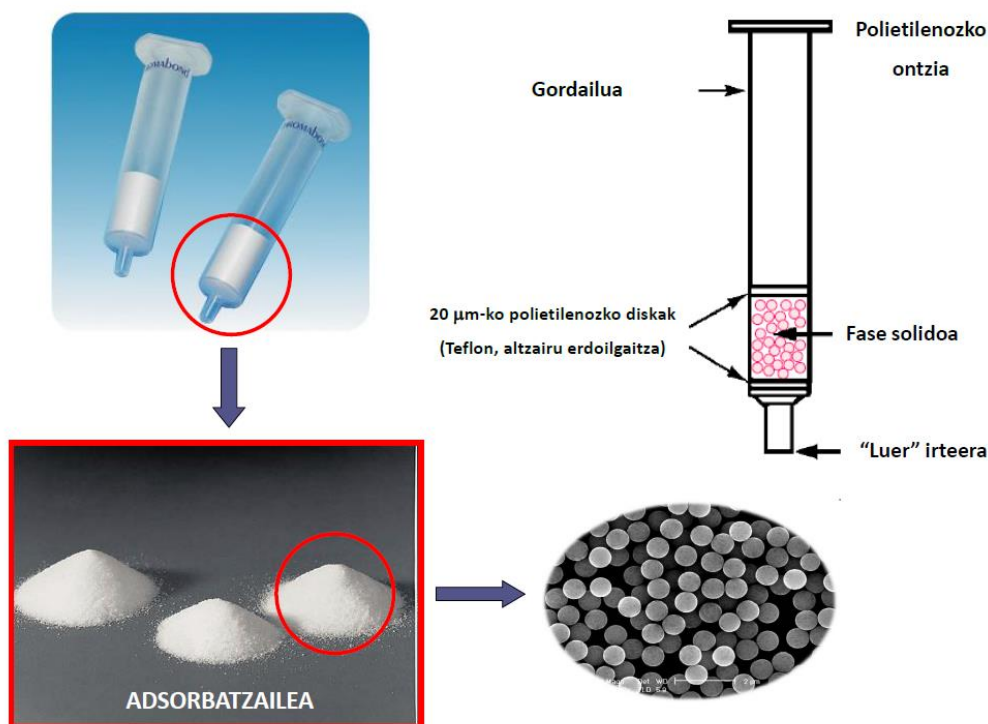
- Adsorbatzaile apolarren aktibazioa (C18)
- Ad.polarretan baliteke beharrezkoa ez izatea

Analitoaren kargaren aurretik adsorbatzailea analitoak duen disolbatzaile berdinarekin egokituko dugu

AZN MeOH

2. **KARGA ETA ERRETENTZIOA:** Lagin likidoa analito eta interferentziekin batera kartutxotik pasatuko dugu eta guztia atxikituta geldituko da, bestelako matrizearen osagaiak kanporatuz. Karga eta erretentzio prozesua fluxu konstante (2-4 mL/min) batean egin behar da, tantaka pasatuko dugu lagina.





#### ❖ SPE-rako MATERIALA: ADSORBATZAILEAK

Lehen aipatu dugun bezala adsorbatzaile mota ezberdinak daude:

- **ADSORBATZAILE APOLARRAK:** silizea inguratzen duen geruza apolarra bada adsorbatzaileak apolarrak izango dira. Lagin polarretan dauden konposatu organikoen erauzketa edo garbiketarako dira aproposak.  
**Adsorbatzaile apolar guztiak** hidrokarburoak dira, talde polarririk gabekoak. Lotura apolarrak emango dira adsorbatzailearen eta analitoaren artean, indar hidrofobikoak, London indarrak adibidez.  
 Adsorbatzaile apolarrak ur laginak ditugunean erabiltzen dira, izan ere, laginaren eta adsorbatzailearen polaritatea kontrakoa izan behar da, matrizearen eta adsorbatzailearen artean atxikipena eman dadin.

Adsorbatzaile apolarrak erabiltzen ditugunean alderantzizko fasean lan egiten dugula esaten da.

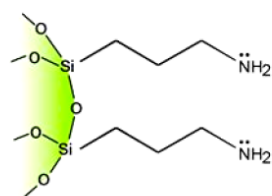
Gehien erabiltzen den adsorbatzaile apolarra oktadezilsilanoa (C18) da.



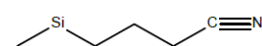


## ADSORBATZAILE POLARRAK

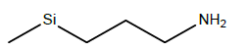
Polaritate baxuko matrizeetatik konposatu organikoak erazteko erabiliak.



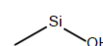
	ADSORBATZAILEA	EGITURA KIMIKOA
<b>Si</b>	Silize aktibatua	-Si-OH
<b>CN</b>	Zianopropilsilanoa	-Si-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CN
<b>2OH</b>	Diolsilanoa	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> OH
<b>NH<sub>2</sub></b>	Aminopropilsilanoa	-Si-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>



**CN**



**NH<sub>2</sub>**



**Si**

- **ADSORBATZAILE IOI-TRUKATZAILEAK:** silizea inguratzen duen geruza kargatuta badago, adsorbatzaileak ioi-trukatzaileak izango dira. Adsorbatzaile hauek positiboki edo negatiboki kargatuta daudenez, egokiak dira ionizatu daitezkeen analitoentzat. Karga positibodun adsorbatzaileak anioi trukerako erabiltzen dira; eta negatiboki kargatutakoak, aldiz, katioi trukerako.

Positiboki kargatutakoak analito azido ahulen erazketarako erabiltzen dira, eta negatiboki kargatutakoak analito basikoak erazteko.

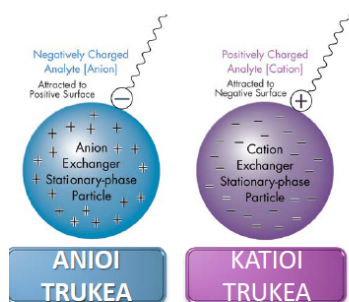
Analitoaren eta adsorbatzailearen artean ematen diren loturak ionikoak izango dira, ioien artekoan emango dira, hau da, anioien eta katioien artean.

Analitoen berreskurapenerako silizeari positiboki kargatutako analitoa lotu zaio. Hori askatzeko: lotura ionikoa apurtu behar da; eta hau hiru modu desberdinetan egin diateke:

- pH azidoko indargetzaile baten bidez karga neutralizatuz
- pH basiko bat jarrizkarag neutralizatuz (analitoaren pK<sub>a</sub> baino bi unitate gorago)
- Sodio kloruroa gehituz: sodioa analitoari gehitzena, analitoa bultzatuko du eta askatu egingo da.

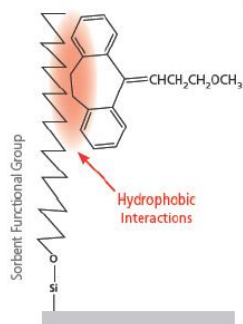
## ADSORBATZAILE IOI-TRUKATZAILEAK

Positiboki edo negatiboki kargatutako adsorbatzaileak. Ionizatu daitezkeen analitoentzako erabilgarriak

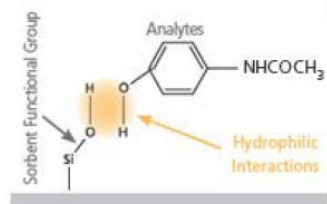


ADSORBATZAILEA	EGITURA KIMIKOA
SCX Bentzenosulfonilpropilsilanoa	
PRS Sulfonilpropilsilanoa	
CBA Karboximetilsilanoa	
DBA Dietilaminopropilsilanoa	
SAX Trimetilaminopropilsilanoa	

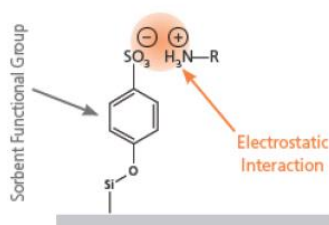
## ALDERANTZIZKO FASEA



## FASE NORMALA



## IOI-TRUKEA (kargaduna, lotura-ionikoa)



**Alderantziko fasea** (adsorbatzaile apolarrak erabiltzean):

- Lagin polarra
- Lotura hidrofobikoak
- Adsorbatzaile apolarra

**Fase normala** (adsorbatzaile polarrek erabiltzean):

- Lagin apolarra
- Lotura hidrofilikoa
- Adsorbatzaile polarra

LOTURA MOTA	ADSORBATZAILEAK	APLIKAZIOAK	AKTIBAZIOA	ELUZIOA (askapena, berreskurapena egiteko)
London indarrak (indar hidrofobikoak)	Apolarrak (adib: C18, C8)	Konposatu organikoak/lagin urtsuak	MeOH/AZN	AZN (hexanoa, Cl <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )
Polarrak: H zubiak, dipolo-dipolo	Polarrak (adib: -NH <sub>2</sub> )	Konposatu organikoak/ polaritate baxukoak (matrize organikoak)	Normalean ez d aktibaziorik behar, zuzenean pasako ginateke egokitzapen era. Egokitzapen erako laginak duen disolbatzaile berdina erabiliko da.	MeOH/isopropan ola
Ionikoak	loi trukatzailak: -Positiboki kargatutakoak -Negatiboki kargatutakoak	Azido/base (elektrolitoak) ahulak erauzteko matrize polarretatik	Positiboki kargatutako ak aktibatze pH azidoa (indargetzail ea edo azido diluitua). Negatiboki kargatutako ak aktibatze pH basikoa (indargetzail ea edo base diluitua).	Positiboki kargatutakoak askatzeko pH basikoa (indargetzailea edo base diluitua) Negatiboki kargatutakoak askatzeko pH azidoa (indargetzailea edo azido diluitua)

- **ADSORBATZAILE MISTOAK:**

- **HLB:** dibinilbentzenoz eta binilpirrolidinaz osatutako polimeroa da. Konposatu polar eta apolarrak erauzteko erabiltzen da. Analito asko baditugu, eta polaritate ezberdinekoak badira adsorbatzaile hau erabiltzea aukera bat da.
- **MCX:** sulfonilo taldeekin modifikatutako HLB adsorbatzailea da. Konposatu polar eta positiboki kargatutakoak erauzteko balio du. MCX-k karga negatiboa dauka. CX-k cation exchanger esan nahi du. Analito basikoak lotzen dituzte.
- **MAX:** amina taldeekin modifikatutako HLB adsorbatzailea da. Konposatu polar eta negatiboki kargatutakoak erauzteko balio du. AX-k anion exchanger esan nahi du. Analito azidoak lotzen dituzte.

**ESKLUSIO MOLEKULARREKO ADSORBATZAILEAK:** Esklusio molekularreko adsorbatzaileak material porotsuko polimeroak dira.

Tamaina handiko analitoei kostatzen zaie poroetan sartzea eta ibilbide motzago bat egiten dute, polimero osoa lehenago zeharkatzea lortzen dute. Analito txikiak, aldiz, poroetan sartzen dira, eta burutzen duten ibilbidea handiagoa denez, denbora gehiago tardatzen dute polimero osoa zeharkatzen.

Tamaina handiko konposatuen bereizketa egiteko erabiltzen dira: plasmako proteinak eliminatzeko, karbohidratoak eliminatzeko...

Analitoa ez da polimeroarekin lotuko, poroen tamainari esker egiten da bereizketa.

- **SEPHADEX:** dextranoa glizerinarekin elkargurutzatuta
- **BIO-GelP:** poliakrilamida-co-N,N'-metilenbisakrilamida

❖ **SPE-rako MATERIALA: DISOLBATZAILEAK**

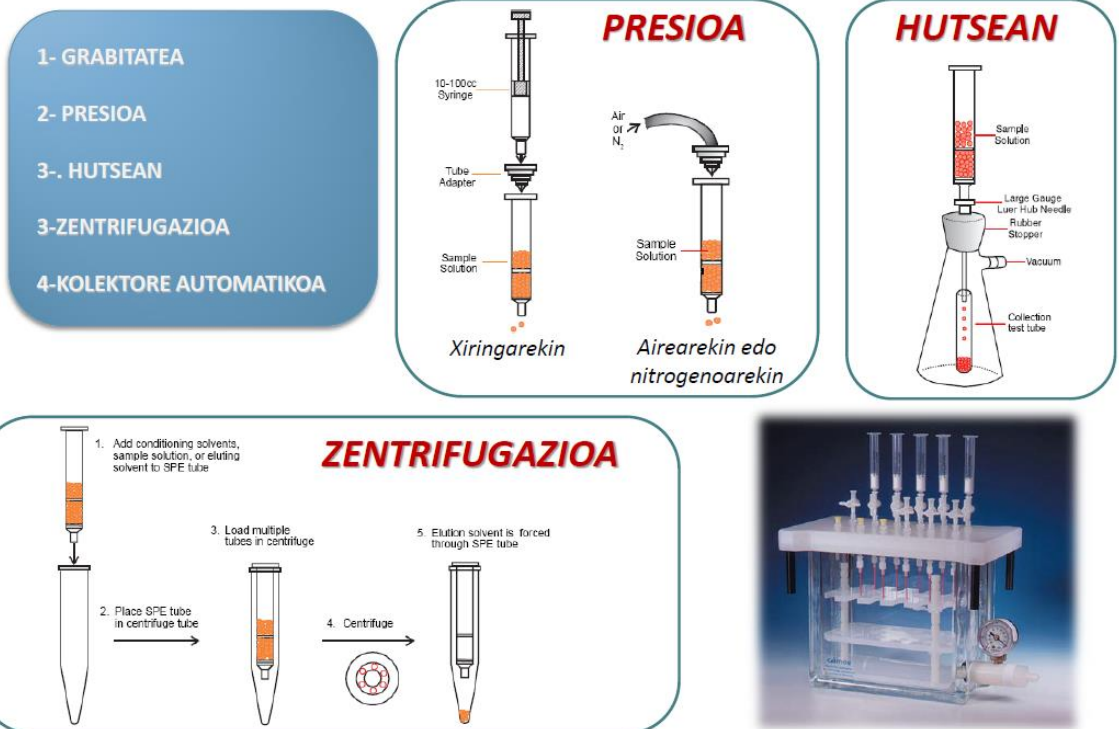
Disolbatzaileen sailkapena indar eluotropikoaren arabera da: analitoa fase solidotik askatzeko disolbatzaileak duen indarra.

Azetonitrilo izena duen disolbatzailea asko erabiltzen da.



Muntaiaren behelaldean hainbat saioldi jarri beharko ditugu (irudian ez dira irakusten), kartutxo bakoitzetik askatzen dena berreskuratzea ahal izateko.

#### 4-. SPE MODUAK



#### ❖ MIKROERAUZKETA FASE SOLIDOAN (SPME)

Belardi eta Pawliszyn-ek garatutako erauzketa teknika da (1989), eta gaur egun asko erabiltzen da. Baina garestia da, eta gainera zuntzak erraz apurtzen dira.

SPME-rako gailua polimeroz inguratuta dagoen silize urtuaz osatutako zuntz batez dago osatuta. Silize urtua euskarria da, hautsi ez dadin. Gailuak gora eta behera egiten du, eta zuntza sartu eta atera egin daiteke. Erabiltzen ez denean zuntza sartu, gorde egiten da babesteko, baina erabili behar dugunean atera, erauzketa egin ahal izateko.

Helburua: zuntzaren gainazalean analitoak metatzea da. Honetarako zuntza eta lagin likidoa kontaktuan jarri behar dira, lagina irabiatzen den bitartean zuntza disoluzioan sartuta egon behar da.

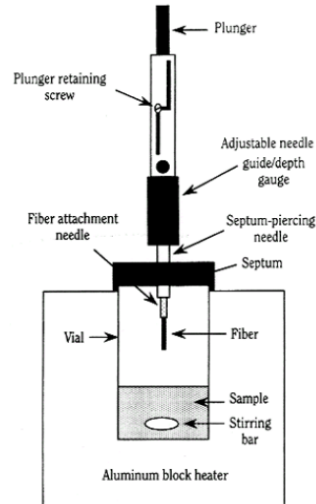
Banaketa oreka bat egongo da, zuntzaren (f) eta disoluzioaren (s) artean. *Beheko irudia begiratu.*



$$K_{fs} = \frac{[A]_f}{[A]_s}$$

**ETAPAK:**

- 1-. Erauzketa
- 2-. Desortzioa



SPME erauzketa egiteko bi etapa daude: erauzketa eta desortzioa:

1. **ERAUZKETA:** analitoak zuntzaren gainazalean pilatzen, metatzen dira. Bi erauzketa mota daude.

- **ZUZENA:** Zuntzak kontaktu zuzenean daude lagin likidoarekin. Denbora jakin batez disoluzioan sartuta uzten da, irabiatzen dugun bitartean (etekina hobetzeko). Kasu batzuetan irabiatzeaz gain, berotu ere egiten da. Zuntzak laginarekin kontaktu zuzenean jartzeagatik, zuntzaren bizitza motzagoa da, lehenago hondatzen da. Hala ere, zuntzak hainbat alditan berrerabili daitezke. Gainera, erauzketa zuzenean interferentzia gehiago metatzen dira zuntzaren gainazalean.

Muturreko baldintzak, (pH oso basikoak edo oso azidoak) saihestu behar dira. Disolbatzaile organiko portzentai altua duten laginak ere ahal den neurrian ekidin behar dira.

Erauzketa zuzena analitoak lurrunkorrek ez direnean egiten da. Analitoak lurrunkorrek diren edo ez lurrun-presioaren eta irakite puntuaren arabera jakingo dugu (biak erlazionatuta daude). Konposatu kimiko bakoitzak bere lurrun presioa izango da. Normalean lurrun presioak 25 gradu-zentigradutan ematen dira, eta mmHg edo torr unitateetan.

Lurrun-presioen araberrako sailkapena:

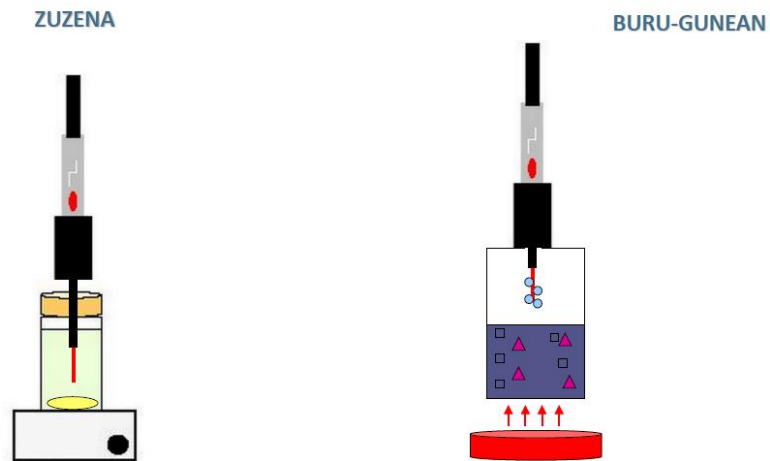
- Konposatu organiko lurrunkorrek > 0.075 Torr
- Konposatu erdi-lurrunkorrek > 10<sup>-5</sup> Torr
- Ez-lurrunkorrek < 10<sup>-6</sup> Torr

Konposatua lurrunkorra edo erdi-lurrunkorra bada erauzketa burugunean egin dezakegu.

- **BURU-GUNEAN:** Zuntza ez dugu kontaktuan jarriko atal likidoarekin, baizik eta atal likidoaren gainean dagoen tartearrekin (tarte honetan airea



dago soilik). Tarte honi buru gunea deritzo. Analitoa lagin likidotik buru gunera pasako da, eta ondoren, buru gunetik zuntzaren gainazalera. Beraz, interferentzia gutxiago erauziko dira, eta zuntzak gehiago iraungo du, gutxiago hondatuko denez, gehiagotan erabili ahalko dugu. Lagin likidoa berotu egingo dugu analitoen lurrunkortasuna errazteko.

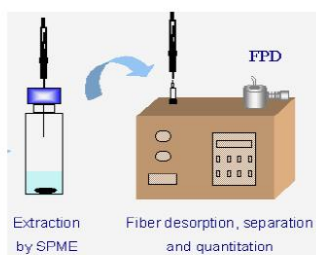
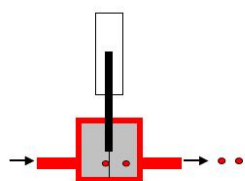


## 2. DESORTZIOA:

- **DESORTZIO TERMIKOA:** analitoa beroari esker askatuko dira, eta modu hau da errazena. Zuntza gas kromatografoaren injektorean (atal batean) sartuko dugu. Injektore honek plaka metaliko batzuk ditu, berotu egiten direnak eta hauek 200 gradu baino gehiagoko tenperatura igortzen dute. Tenperatura hauei esker analitoak askatu egingo dira, sistema kromatografikoaren barnean, neurketa instrumentala bertan emanez. Desortzio termikoa egiteko analitoak lurrunkorrak izan behar dira derrigorrez. Normalean erauzketak buru-gunean egiten ditugunean egiten ditugu desortzio termikoak.
- **DESORTZIO KIMIKOA:** analitoak ez badira lurrunkorrak desortzioa kimikoki egin daiteke, zuntza hondatuko ez duten disolbatzaileak erabiliz. Desortzio kimikoa egiteko bi aukera ditugu:
  - **Estatikoa:** zuntza disolbatzaile garbi baten bolumen txiki batena sartuko dugu. Disolbatzailea berotu eta irabiatu egingo dugu, analitoen askapena errazteko. Modu honetan zuntzaren gainazalean metatutako analitoak disolbatzaile garbira askatzea lortuko dugu. Normalean disolbatzaile bolumen baxuak erabiltzen dira, analitoa ahalik eta kontzentratuen egoteko. Bial izeneko ontzietan egiten da.

- **Dinamikoa:** desortzio ganbaran egiten da, eta hau likido kromatografo bati egoten da lotuta. Desortzioa eman dadin, zuntza desortzio kamaran sartzen da. Likido kromatografoaren fase mugikorra (disolbatzaile desberdinen nahasketa bat) sartuko da ganberara. Bertan, kontatua edukiko du zuntzarekin eta analitoak gainazaletik askatuko ditu zutabe kromatografikorantz bideratuz. Askapena ez da estatikoki ematen, dinamikoki baizik, fluxu bat egongo da ganberara sartuko dena, analitoak askatzeko.

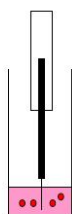
### DESORTZIO TERMIKOA



### DESORTZIO KIMIKOA

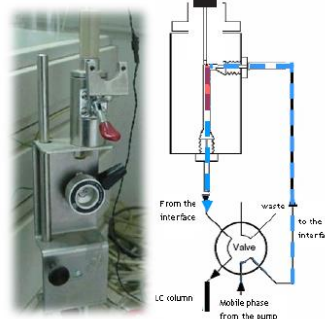
#### Estatikoa

- Agitazioa
- Beroa
- Disolbatzaile bol. baxua



#### Dinamikoa

- Desortzio kamara
- Konposatuen garraioa zutaberantz



### ❖ SPME-rako ZUNTZAK

SPME-rako zuntzen barrutik silize zuntza edukiko dugu eta hau inguratuz, polimeroa. Polimero hau mota askotakoa zian daiteke:

- **PDMS:** poldimetilsiloxanoa. Polimero likido bat da, nahiz eta itxura solidoa duen, baina gel baten portaera du. Nolabait esateko silikona bat da.
- **DVB:** polidibinilbentzenoa. Solidoa da.

PDMS eta DVS apolarrak dira, eta analito apolarrenganako afinitatea dute.

- **Poliakrilatoa:** dentsitate baxuko polimero solidoa da. Analito polarrentzako da egokiagoa.
- **Fase mistoak:** polimero desberdinez osatuta daude.

**Polimero zuntzen diametroa desmerdina da.** Hurrengoak dira zuntz-estaldura motak (silizearen eta polimeroen artekoak):

- **Lotuak:** egonkortasun termiko altua.
- **Ez-lotuak:** kostu baxuagoa
- **Elkargurutzatuak:** egonkortasun kimiko, mekaniko eta termikoa ematen eskaintzen du.

Fase estacionaria / espesor	T <sup>2</sup> máxima de uso	Polaridad <sup>3</sup>	Uso recomendado
<b>Polidimetilsiloxano (PDMS)</b>			
100µm, fase no enlazada	280 °C	No polar	GC/HPLC
30 µm, fase no enlazada	280 °C	No polar	GC/HPLC
7 µm, fase enlazada	340 °C	No polar	GC/HPLC
<b>Polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB)</b>			
65 µm, fase parcialmente entrecruzada	270 °C	Bipolar	GC
60 µm, fase parcialmente entrecruzada	-	Bipolar	HPLC
65 µm, fase muy entrecruzada ( <i>stableflex</i> <sup>1</sup> )	270 °C	Bipolar	GC
<b>Poliacrilato (PA)</b>			
85 µm, fase parcialmente entrecruzada	320 °C	Polar	GC/HPLC
<b>Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS)</b>			
75 µm, fase parcialmente entrecruzada	320 °C	Bipolar	GC
85 µm, fase muy entrecruzada ( <i>stableflex</i> <sup>1</sup> )	320 °C	Bipolar	GC
<b>Carbowax/Divinilbenzene (CW/DVB)</b>			
65 µm, fase parcialmente entrecruzada	265 °C	Polar	GC
70 µm, fase muy entrecruzada ( <i>stableflex</i> <sup>1</sup> )	265 °C	Polar	GC
<b>Carbowax/Templated Resin (CW/TPR)</b>			
50 µm, fase parcialmente entrecruzada	-	Polar	HPLC
<b>Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS)</b>			
50/30 µm, fase muy entrecruzada ( <i>stableflex</i> <sup>1</sup> )	270 °C	Bipolar	GC
50/30 µm, fase muy entrecruzada ( <i>stableflex</i> <sup>1</sup> ) <sup>2</sup>	270 °C	Bipolar	GC

❖ **SPEM-n ERAGINA DUTEN FAKTOREAK:**

- **TENPERATURA ETA ERAUZKETA DENBORA:** tenperaturak eragin bikoitza izango du.
  - Temperatura igotzean analitoen difusioa zuntzerantz areagotu egiten da, hau da, adsortzioa hobetzen da.
  - Temperatura gehiegi igotzean, (erauzketa zuzena egiten dugunean), Kfs (banaketa konstantea) txikitzen da, eta honen ondorioz, zuntzean geldituko den analito kantitatea txikiagoa izango da.

- Temperaturak buru gunean beti laguntzen du erauzketan, lurrundu egiten delako. Kasu hoetan erauzketa egin ahal izateko disoluzioa berotu beharko da, baina ez zuntza.
- Agitazioak erauzketa denbora txikitzen du.

- **GATZ EFEKTUA:**

Laginari gatz neutroak gehituko dizkiogu, egoera neutroan dagoen analitoaren disolbagarritasuna jeisteko; eta honekin batera, zuntzaren gainazalean analito metatzeko. Modu honetan etekina hobetzen da. Gatz efektuak soilik erauzketa zuzenean du eragina, buru gunean ez du inolako eraginik.

- **LAGINAREN pH-a:**

Erauzketa zuzenean du eragina, eta ez buru gainean. Analitoa egoera neutroan, ionizatu gabe (kargarik gabe) egon behar da, zuntzean hobeto atxikitzeko. Honetarako pH bat finkatu behar da.

Analitoa azidoa bada:  $\text{pH} > \text{pKa}+2$

Analitoa basikoa bada:  $\text{pH} < \text{pKa}-2$

Bestalde, pH-ak eragina du zuntzaren egonkortasunean.

- **LAGINAREN BOLUMENA:**

Erauzitako analito kantitate areagotuko du maila bateraino, oreka batera iritsiko gara, non puntu horretatik gora laginaren bolumenak ez duen eraginik izango.

$$n = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot V_s \cdot C_o}{K_{fs} \cdot V_f + V_s} \quad V_s \gg K_{fs} \cdot V_f \text{ denean, } n \text{ kte-a izango da}$$

$V_s$  (laginaren bolumena) oso handia bada,  $K_{fs} \cdot V_f$  baztergarria izango da eta beraz:  $n = K_{fs} \cdot V_f \cdot C_o$

- **BURU-GUNE BOLUMENA:**

Buru-guneko bolumena ahalik eta txikiena izan behar da, analitoen kontzentrazioa handitzeko eta etekina igotzeko.

- **AGITAZIOA:**

Sistema irabiatzen badugu erauzketa denbora murrizten dugu.

- **DISOLBATZAILEEN ADIZIOA:**

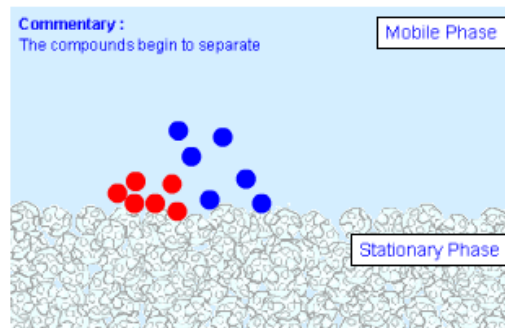
Lagin solidoen erauzketa egin nahi denean lagunduko du disolbatzailearen adizioak. Disolbatzailea gehitzeak analitoen askapena errazten du, baita hauen difusioa zuntzerantz ere.

# 11.GAIA: TEKNIKA KROMATOGRAFIKOAK

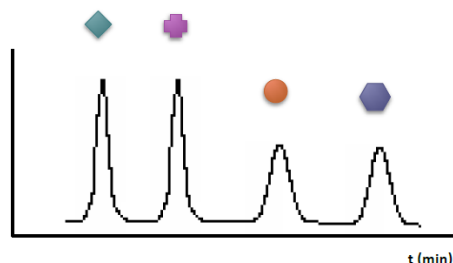
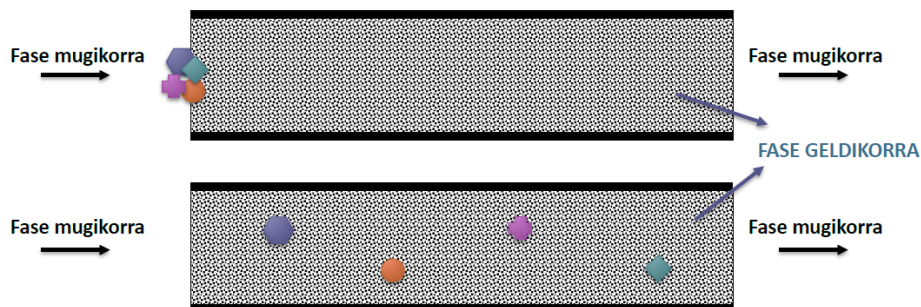
❖ SARRERA:

**IUPAC:** Kromatografia, bereizketa metodo bat da non bereizi beharreko konposatuak bi fase ezberdinen artean banatzen diren. Horietako fase bati, **fase geldikorra** deritzo, eta besteari, aldiz, norabide konkretu batean mugitzen den **fase mugikorra**. Analitoek elkarrekintzak edukiko dituzte fase mugikorrarekin, eta elkarrekintza hauen indarraren arabera azkarrago edo motelago mugituko dira fase geldikorrerantz. Elkarrekintzak sendoak direnean mugimendua motela izango da, eta elkarrekintza ahuletan, aldiz, azkarra.

Hurrengo irudian bi analito desberdin agertzen dira: gorriak eta urdinak. Urdinek fase mugikorrarekin elkarrekintza ahulak eratzen dituztenez, gorriak baino azkarrago mugitzen dira.



Analito desberdinak abiadura desberdinetan mugitzen dira. Hurrengo grafikoan ikusi daitekeen bezala, analito berdeak eratzen dituzte elkarrekintza ahulenak, eta hartaz, hauek mugitzen dira azkarren. Analito moreak aldiz, polikien mugitzen dira, elkarrekintza sendoak eratzen baitituzte.



**OREKA**

$A_{\text{fase mugikorra}} \rightleftharpoons A_{\text{fase geldikorra}}$

$$K = \frac{[A]_{\text{Fase geldikorra}}}{[A]_{\text{Fase mugikorra}}}$$

Teknika kromatografikoak erabiliz lortzen dugun emaitza kromatograma bat izango da, eta gailur kromatogramoak edukiko duena (goiko irudiari erreparatu). Gailur bakoitza analito bati dagokio. Eluzio ordena fase geldikorrarekin eratutako elkarrekintzen menpekoa da. Kromatografian x ardatzean atxikipen edo erretentzio denbora adierazten da: konposatu kimikoak zutabea zeharkatzeko behar duen denbora, edo beste modu batera esanda zutabe kimikoan atxikia gelditzen den denbora. Y ardatzean seinalea, absorbantzia esaterako. Guzti honi kromatograma deritzo.

Fase geldikorra zutabeen barnean egongo da. Bi zutabe mota daude:

- I. Altzairu erdoilgaitza: Barnean fase geldikorra (itxuraz hautsa dirudiena) dauka paketatu. Likido-kromatografian erabiltzen dira hauek.
- II. Zutabe kapilarrak: askoz ere finagoak eta luzaeagoak dira 30-100 metro.

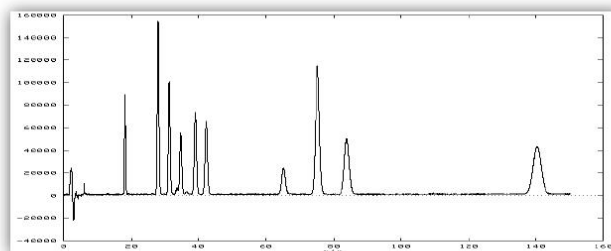
Zutabe-Kromatografian ikusten dugun lehendabiziko gailurra injekzio-gailurra da, analisirako laginak duen disolbatzaileari dagokio, baina beste gailur guztiak analitoei dagozkie.

Oin-lerroa, analitorik ez dagoen puntu desberdinetan ikusten den lerro horizontala da.

Zutabe-kromatograma hau dagokion analisi prozesuak 140 minutu iraun ditu, X ardatzean ikusi dezakegu hau.



#### ZUTABE-KROMATOGRAFIA



## ❖ TEKNIKA KROMATOGRAFIKOEN SAILKAPENA

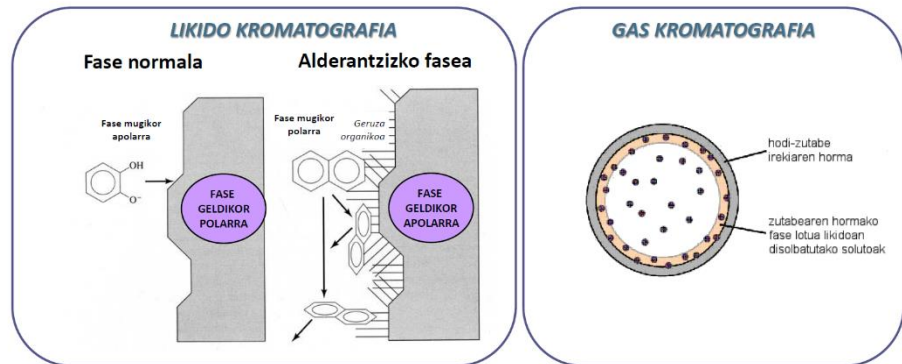
DESKRIBAPEN OROKORRA	FASE MUGIKORRA	FASE GELDIKORRA	KROMATOGRAFIA MOTA
LIKIDO-KROMATOGRAFIA	LIKIDO	LIKIDOA	BANAKETA EDO PARTIZIO KOM.
		SOLIDOA	ADSORTZIO KROMATOGRAFIA
		IOI-TRUKE ERRETXINA	IOI-TRUKE KROMATOGRAFIA
		ZIRRIKITUETAN LIKIDOA DUEN SOLIDO POLIMERIKOA	ESKLUSIO KROMATOGRAFIA
GAS-KROMATOGRAFIA	GASA	LIKIDOA	BANAKETA EDO PARTIZIO KROMATOGRAFIA
		SOLIDOA	ADSORTZIO KROMATOGRAFIA

## ❖ ATXIKIPEN MEKANISMOAK

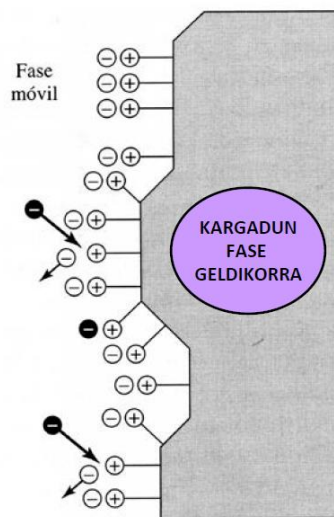
- **ADSORTZIOA:** Silizea, alumina, Kaltzio Karbonatoa.
- **BANAKETA:** fase geldikorra likidoa izango da eta honek bereganatuko du analitoa. Fase geldikorra likidoa izateak ez du esan nahi zutabearen barnean sartuko dena likidoa izango denik, zutabera sartuko diren silize partikula solidoak inguratuz geruza likido organiko bat edukiko dutela baizik. Fase geldikorra apolarra edo polarra izan daiteke; eta honen arabera bi kromatografia bereizten dira:
  - **Likido kromatografia:**
    - Fase normala: fase mugikorra apolarra da, eta fase geldikorra polarra. Analitoa fase geldikor polarrena geldituko da atxikituta, analitoaren eta fase honen artean hidrogeno zubiak, dipolo-dipolo loturak... eratzen direlako.
    - Alderantzizko fasea: fase mugikorra polarra da, eta fase geldikorra apolarra. Fase geldikorra apolarra denez, geruza organiko bat izango du eta bertan txertatuko dira analitoak,

fase honen eta analitoaren artean eratzen diren lotura apolarrei (london indarrei, indar hidrofobikoei) esker.

- **Gas kromatografia:** silize partikulak inguratzen dituen geruza apolarra izango da. Gas kromatografian hodi fin bat egongo da, eta hodi honen barneko horma fase likidoko geruza batekin estali beharra dago, bertan eman dadila elkarrekintzak.

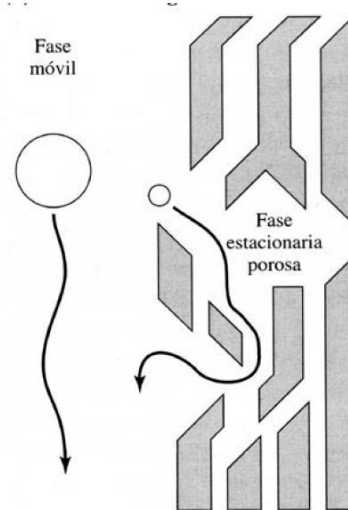


- **IOI-TRUKEA:** kargadun fase geldikorra erabiliko da. Analitoak honekin elkarrekintza-ionikoak edukiko ditu, analitoak, kontrako karga duten fase geldikorrekin lotuko dira. Analitoa negatiboki kargatuta dago, fase geldikorrarekin lotuko da, eta honek analitoaren karga berdina duen ioi bat askatuko du, kloruroa esaterako.



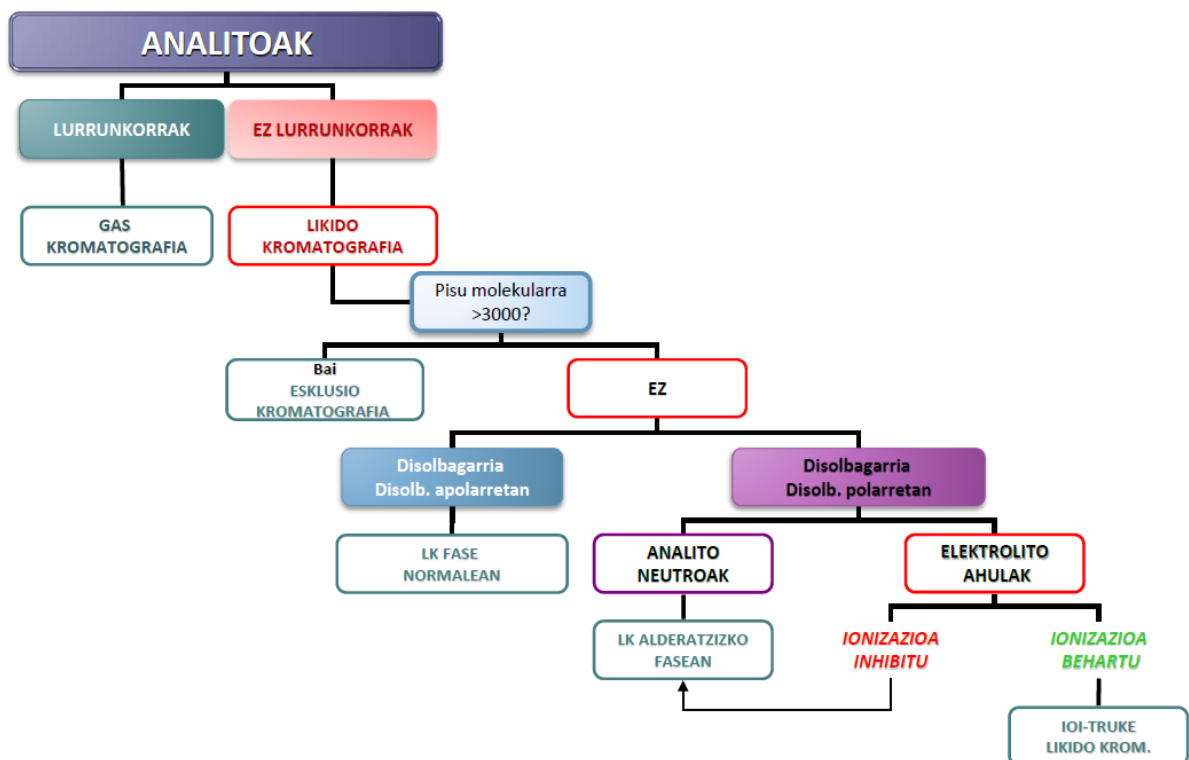


- **TAMAINAREN ARABERAKO ESCLUSIOA:** tamaina handieneko konposatuak fase geldikorra azkarrago zeharkatuko dutek ezin direlako zirrikituetan ez poroetan sartu; eta ondorioz ibilbide motzagoak burutuko dituzte. Tamaina txikikoek poroetan sartzeko gaitasuna dute, eta hartaz, erretentzio-denbora altuagoa izango dute. Zenbat eta masa molar txikiagoa, atxikipen handiagoa.



#### ❖ KROMATOGRAFIA MOTAREN HAUTAKETA

Lurrunkorrak eta termolabilak (beroarekin tenperatura altuetan degradatzea) ez direnean gas kromatografiak egingo ditugu; bestela likido kromatografiak.

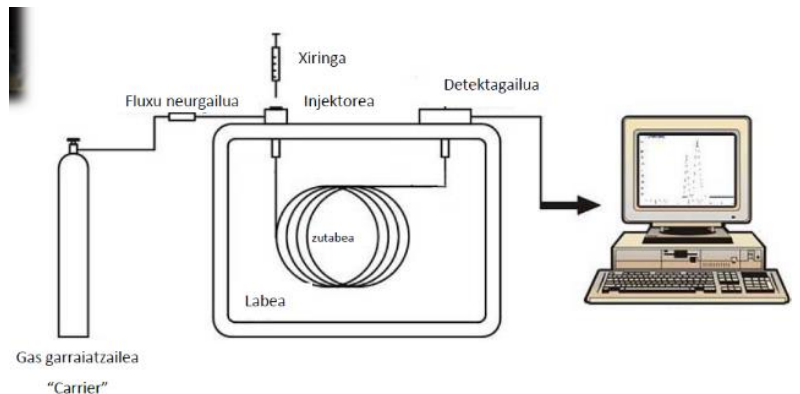


# 12.GAIA: GAS KROMATOGRAFIA

## ❖ GAS-KROMATOGRAFOA:

- Gas garraiatzailea: hemendik aterako da fase mugikorra ondoren injektorean sartzeko.
- Injektorea: lagin likidoa bat-batean lurrundu dadin beroa aplikatzen du.
- Fase geldikorra
- Detektagailua

Analisi lagina xiringa bat erabiliz sartuko dugu, eta zutabea labe baten barnean dago sartuta. Kromatografia labearen barnean emango da.



Analitoak batera sartzen dira zutabearen. Fase mugikorrak analitoak poliki-poliki zutabearen zehar mugiaraz dadila eragingo du. Azkenik, analitoak zutabearen beste aldetik aterako dira, baina banan-banan iristen dira detektagailura. Detektagailuan jasoko da analitoen seinale analitikoa.

### 1. **GAS GARRAIATZAILEA:** hurrengoak dira honen ezaugarriak:

- Gas geldoak
- Uririk ez
- Hidrokarburorik ez
- Oxigenorik ez
- Purutasun oso altuak (>%99.995): analitoekin elkarrekintzak ez sortzeko.

Gas garraiatzailerik erabilienak He, N<sub>2</sub> eta Ar dira. Gas garraiatzaileak bonbonetan erosten dira eta kromatografora konektatzen dira.



**2. INJEKTOREA:** injektoreak atal ezberdinak izango dira. Lagina xiringa batekin sartuko dugu kromatografoan, xiringaren orratzarekin (altzairuzkoa dena) silikonazko septum bat zulatuko dugu, lagin likidoa barnean askatzeko.

Liner-ak beira argia dauka, eta honek iragazki funtzioa du.

Lagin likidoa baporizazio ganbaran sartuko dugu, eta ganbera hau inguratuz bloke metaliko bat egongo da, injektoreari tenperatura aplikatu ahal izateko. Lurrunkortasun baxuena duen konposatuaren irakite puntutik gorako tenperaturak aplikatzen dira. Modu honetan, konposatu guztiak gas egoeran ditugula ziurtatuko dugu.

Azkenik, zutabera bideratzen da analitoa, gas garraiatzailea injektoreari lotuta dagoelako.

Injekzioa prozedura desberdinak daude:

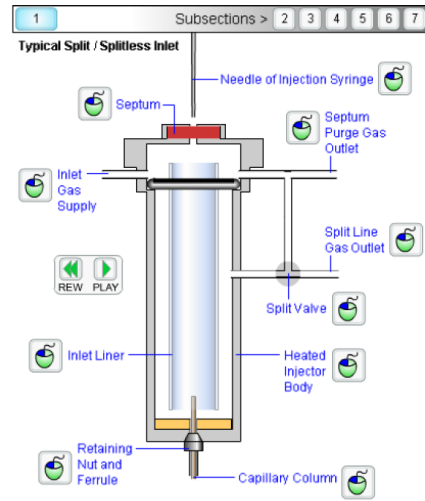
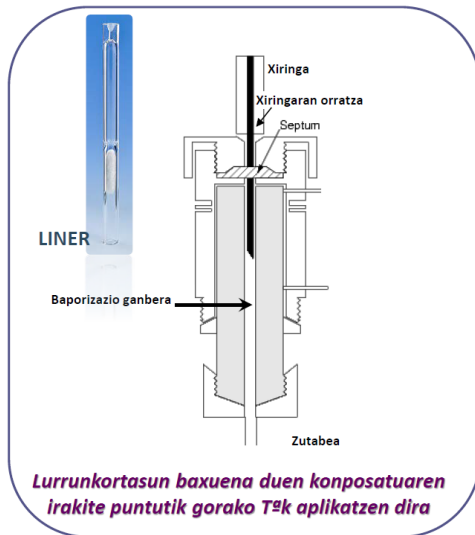
- **Injekzio automatikoa:** injekzio automatikoaren bidez denbora aurrezten da, eta gainera, errepikakorragoa da. Gas kromatografian batez ere bolumen oso txikiak ( mikrolitro 1-2, 5 gehienez) injektatzeko erabiltzen da. Injekzio automatikoa errepikakorra denez, bolumen oso txikiekin lan egitean sortzen diren erroreak are handiak izango dira; eta horregatik eskuz ere egin daitezke injekzioa.
- **Eskuzko injekzioa**

Prozesuan sortu daitezkeen zorizko errorearen zuzenketa egiteko barne estandarraren metodoa erabiltzen da kromatografian.

Gainera, injekzio modu desberdinak daude:

- **SPLIT moduan:** 100mg/L-tik gorako kontzentrazioekin lan egitean zutabe kromatografikoaren saturazioa ekiditeko modu hau erabili dezakegu. Kontzentrazio altuetan egiten da. Lagin gehiena kanporatu egiten da split balbula irekita dagoenez ihesi egiten dutelako. Zutabera kantitate txiki bat soilik bideratzen da, hartaz, laginaren kantitate txiki bat soilik analizatuko da.
- **SPLITLESS moduan:** aztarna mailan (100mg/L-tik beheran) lan egiterakoan modu hau hobesten da. Split balbula itxita dagoenez, lagin guztia bideratzen da zutabera.

## 2-. INJEKTOREA



### Inlet Considerations



## Injekzio prozedurak

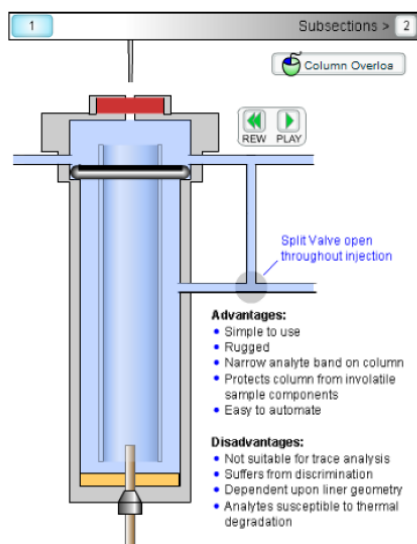


Injekzio automatikoa

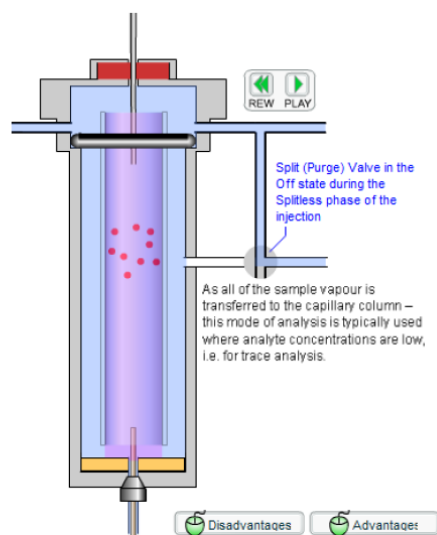


Eskuzko injekzioa

## Injekzio moduak



**SPLIT**



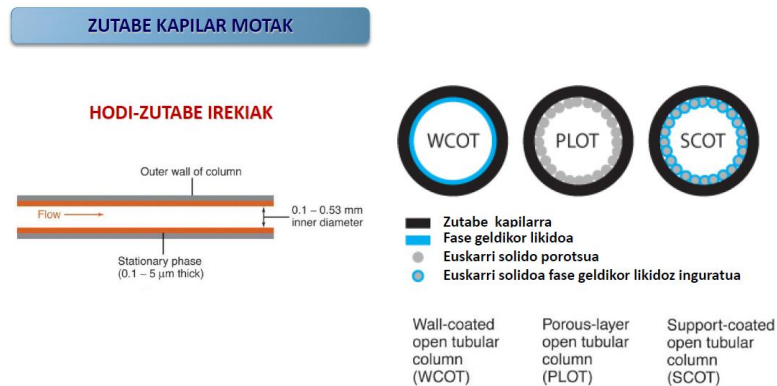
**SPLITLESS**

### 3. ZUTABE KROMATOGRAFIKOAK:

- **Paketatuak:** fluxu baxuan (<1mL/min) lan egin behar da. Fase geldikor solidoa izango dute barnean. Abortzio kromatografian lan egiteko balio dute, kapilareek baino luzeera (1/6m) eta diametro (2/6mm) txikiagoa dute.
- **Kapilarrak (hodi-zutabe irekiak):** fluxu altuetan (20mL/min) lan egin daiteke. Fase geldikor likidoa dute barnean. 10/100 metroko luzeera eta 0,1/0,6 mm-ko diametroa dute. Kapilarrek hiru geruza dituzte, kanpotik barrura: polimida, silize urtua eta fase geldikorra.

Zutabe kapilar mota desberdinak daude:

- **WCOT:** polimida, silize urtuz eta fase geldikorrak kubritutako pareta dauka.
- **PLOT:** hauek abortzio kromatografian erabiltzen dira, fase geldikorra solido porotsua bada.
- **SCOT:** fase geldikor likidoa dute, baina partikula solidoek egiten dute euskarri lana, eta hau inguratuz egongo da geruza likidoa.



### 3-. ZUTABE KROMATOGRAFIKOAK

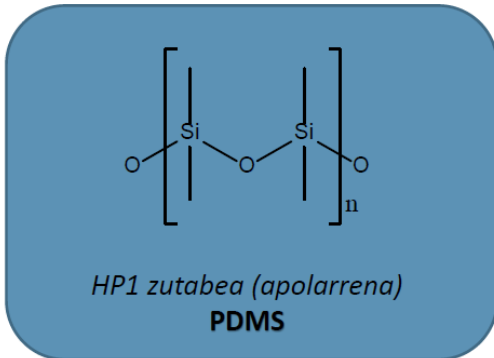


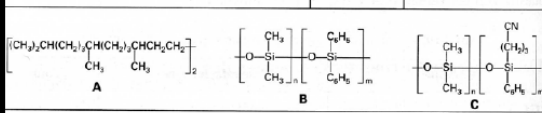
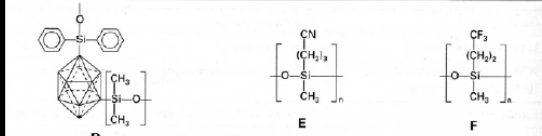
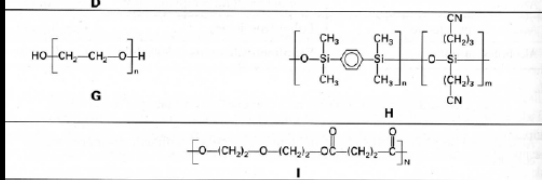
**Paketatuak**  
F. Geldikor Solidoa  
1/6 m luzera  
2/6 mm ø  
Fluxu baxuak (<1 mL/min)



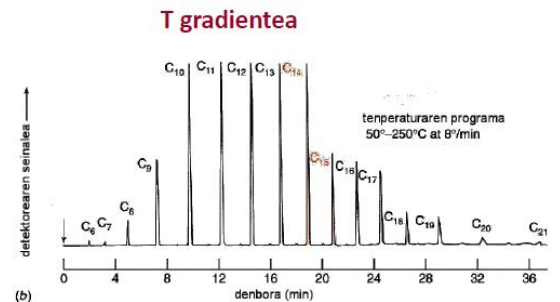
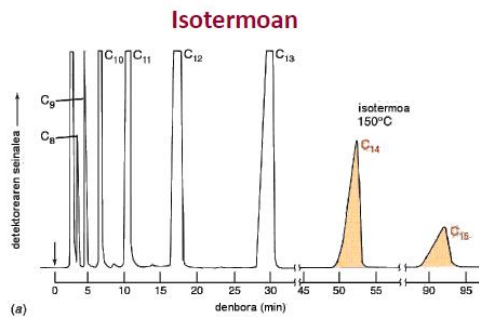
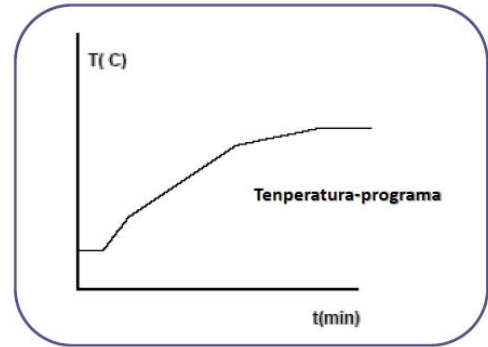
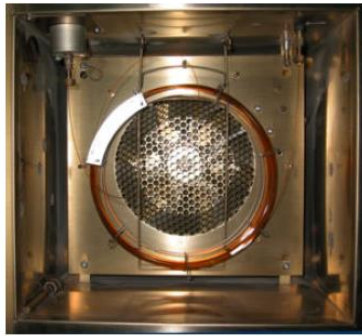
**Kapilarrak (Hodi-zutabe irekiak)**  
F.G Likidoa  
10/100 m luzera  
0,1/0,6 mm ø  
20 mL/min

## BANAKETA EDO PARTIZIO KROMATOGRAFIA



Fases líquidas	Límite de temperatura	Estructura
<i>No polares</i>		
escualeno	150	A
100% metilpolisiloxano HP-1	300	B (n = 100%, m = 0)
5% fenil/95% metilpolisiloxano HP-5	300	B (n = 95%, m = 5%)
<i>Moderadamente polares</i>		
14% cianopropilfenil/86% metilpolisiloxano	300	C (n = 86%, m = 14%)
50% fenil/50% metilpolisiloxano	225	B (n = m = 50%)
fenilsiloxano carborano		
<i>Polares</i>		
50% cianopropil/50% metilpolisiloxano	275	E
50% trifluoropropil/50% metilpolisiloxano	250	F
polietilenglicol	225	G
<i>Muy polares</i>		
70% cianopropilpolisifenilosiloxano	250	H
poli (dietilenglicol succinato)	200	I
		
		
		

4. **LABEA:** zutabeak labe baten barnean sartuta egongo dira. Modu isotermoan edo gradiente eran lan egin dezakegu. Modu isotermoan lan egiten badugu, analisi prozesu guztian zehar tenperatura berdina erabiltzen da, eta gailur asimetrikoak lortzen dira, zabalak izango direnak. Gradiente eran lan egitean, berriz, tenperatura programak erabiltzen dira: hasieran labea 50-60 gradutan, tenperatura baxuetan finkatzen da; eta tenperatura hau igo egiten da prozesu kromatografikoak aurrera egin ahala. Tenperatura programak gehienetan gas-kromatografian erabiltzen dira, lortzen diren gailur kromatografikoak simetrikoagoak direlako, eta honek kuantifikazioa eta bereizketa kromatografikoa errazten ditu. Hasieran tenperatura baxuak finkatzen ditugu, analitoak zutabearen momentu berean sartu daitezten. Izan ere, analitoak zutabearen sartzean bat-batea lurruntzen dira eta lurrunkorrenak izango dira lurruntzen diren lehenengoak, eta hauek zutabearen burura iritsiko dira besteak baino lehenago, hartaz, baliteke hauek zutabearen lehenago sartzea, baina hau ez gertatzeko, bertan kondentsatu egiten dira.



**5. DETEKTAGAILUAK:** detektagailurik gabe lan egin ezker, bereizketa kromatografikoa emango litzateke, baina ez litzateke kromatogramarik lortuko. Mota desberdinetako detektagailuak ditugu:

- **Bero-eroankortasun detektagailua:** unibertsala da. Gasek beroa garraiatzeko duten ahalmenean oinarritzen da. Detektagailu honetan erabiltzen diren gasek, bero eroankortasun altua dute, helioa edo hidrogenoa esaterako. Hidrogenoa ez denez gas geldoa, hobeto da helioa erabiltzea.

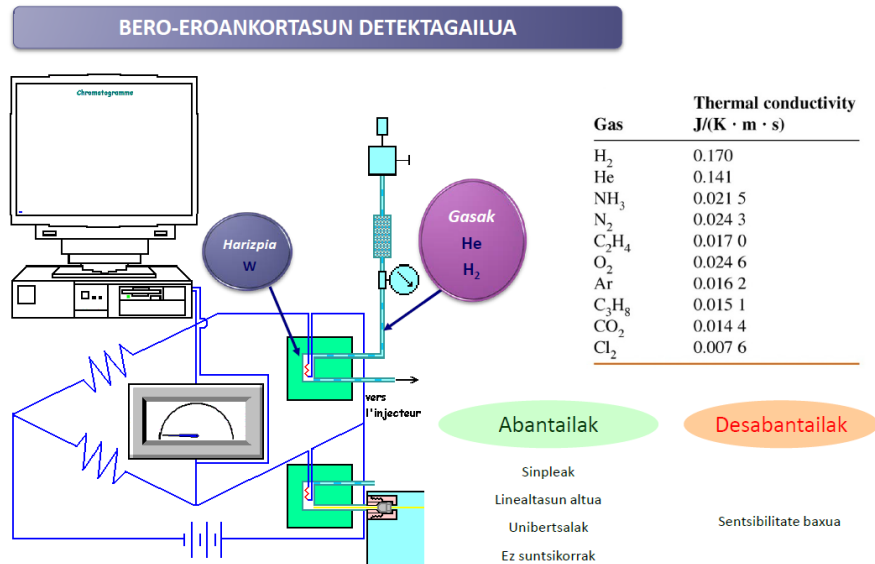
**Bi bloke termostatizatu erabiltzen dira:** erreferentziakoa eta neurketarako. Bloke hauen barnean harizpi bat kokatzen da, wolframiozkoa dena; eta hau elektrikoki berotuko da. Harizpiari blokeari baino temperatura altuagoa aplikatzen zaio. Erreferentziako bloketik helioa pasako da soilik; zutabetik ateratzen den analito bakoitza neurketarako blokean sartuko da, eta wolframiozko harizpiarekin izango du kontaktua. Analitoak harizpiarekin kontaktua edukitzen duenean, bero eroankortasun ahalmena jeitsi egiten da, eta harizpiaren bero galera txikiagoa izango da, hau da, neurketarako blokearen temperatura igo egingo da. Temperaturaren igoera hau erreferentziako blokearekin konparatzen da.

Bloketik helioa soilik pasatzen bada, harizpiak temperatura galduko du, helioak xurgatuko baitu harizpiaren beroa.

Analitoak harizpiarekin kontaktua edukitzen duenean, harizpiak ezingo dio beroa pasa analitoari eta hartaz, bero eroankortasuna jaitsi egingo da, analitoak harizpia berotzea eragingo du,



harizpiaren tenperatura igoz, eta gailur kromatografiko bat erregistratuz.



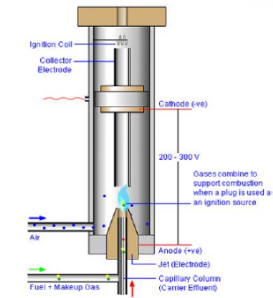
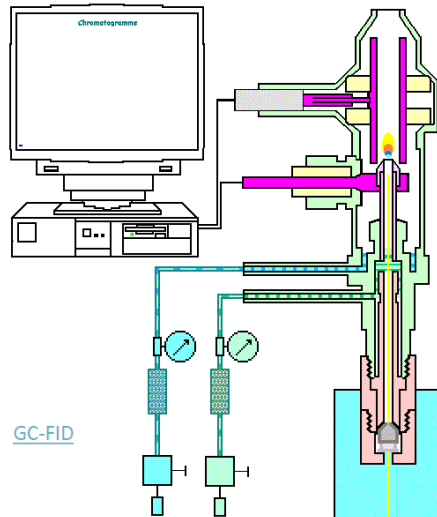
- **Garraren bidezko ionizazio-detektagailua (FID):** unibertsala (ia edozein konposatu kimikok emango du seinalea) eta suntsikorra da, hau da, analisiaren ostean ezin dugu lagina berreskuratu. Konposatu organikoen errekuntza ematen da, detektagailu honek sugar bat dauka, eta sugar hau bi gasei esker mantentzen da, aireari (oxidatzaile gisa) eta hidrogenoari (erreduzitzaile gisa) esker.

Anodo eta katodo bat ditugu, anodoa sugarraren azpialdean dago, katodoa goian. Bien artean potentzial elektriko bat aplikatzen da, 200-300 Voltio bitartekoa.

Zutabe kromatograifkoan bereizketa eman, eta analitoak banan-banan iritsiko dira detektagailura. Behin detektagailura iritsitakoan, sugarrarekin kontaktuan jarriko dira, eta analitoen errekuntza emango da, hidrokarburoen errekuntza ematen da, ioiak emanez. Katodo eta anodoaren artean aplikatutako voltairi esker, sugarrean eratutako ioiak katodorantz iritsiko dira, eta korrante elektriko bat erregistratuko da, eratutako ioiekiko proportzionala izango dena. Lortutako korrante elektriko honen igoera gailur kromatografo gisa ikusiko dugu kromatograman.

Garraren bidezko ionizazio-detektagailuak sentsibilitate altua du, bero eroankortasunarenak baino ehun aldiz handiagoa. Eginkortasun altua du; eta sinplea da.

## GARRAREN BIDEZKO IONIZAZIO-DETEKTAGAILUA (FID)

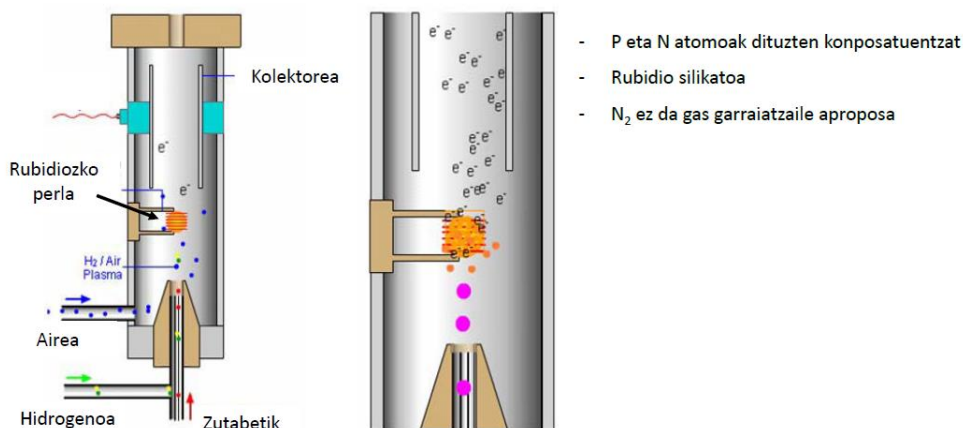


### Konposatu organikoen errektuntza

- K. Organikoentzako erantzun unibertzala
- Sentsibilitate altua (Bero-eroank.x100)
- Egonkortasun altua
- Simplea

- **Nitrogeno-fosforo detektagailua:** garrarenaren oso antzekoa da., hau ere suntsikorra da .Kasu honetan ez duguugarrik, hidrogeno sarrera murriztagoa baita; aireak eta hidrogenoak eratutako plasma bat edukiko dugu. Nitrogeno eta fosforo atomoak dituzten konposatuentzat da sentsiblea batez ere detektagailu hau. Konposatu hauek hidrogeno aire plasmara iristean, beraien errektuntza partziala emango da eta ionizatu egingo dira. Ionizaturik daudenen rubidio silikatozko perlaren gainean metatzen dira; eta perlaren elektroiak igortzeko ahalmena handitu egiten da, hartaz, elektroi gehiago askatuko dira. Hau dela eta, katodora elektroi gehiago iritsiko dira katodora, eta ondorioz, korrante elektrikoa anplifikatu egingo da. Hau kromatograma batean gailur gisa ikusiko dugu. Esan daiteke, aurreko detektagailuaren moldaketa bat dela.

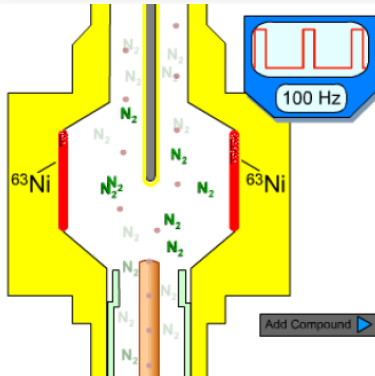
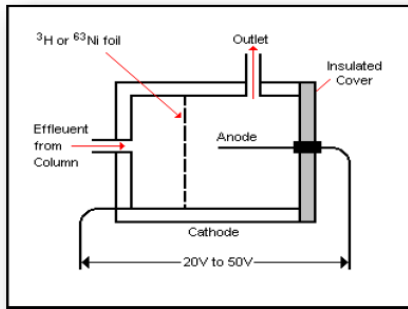
## NITROGENO-FOSFORO DETEKTAGAILUA



- **Elektroi-harrapaketa detektagailua:** ez da unibertuala, edozein konposatuk ez du seinalea emango, hau da, detektagailu selektiboa da. Talde elektronegatiboak dituzten konposatuentzako da erabilgarria, gainera sentsibilitate oso altukoa da, aurrekoak baino altuagoak. Sentsibilitate altuko konposatuentzat da aproposa: Halogenoak, peroxidoa, nitrogenodun taldedun konposatuak.

Detektagailu honek bere barnean nikel 63 isotopoaren xaflak dituzte; eta hauek  $\beta$ -partikula erradioaktiboak igortzen dituzte. Partikula hauei esker, gas garraiatzailea ionizatzen da (kasu honetan nitrogenoa), eta elektroiak askatzen dira. Elektroiak anodora iritsiko dira, eta korrante elektriko bat erregistratuko da. Konposatu kimiko elektronegatibo bat sartzen denean, konposatu honek elektroiak harrapatuko ditu; eta honen ondorioz, anodora elektroi gutxiago iritsiko dira. Hau dela eta, korrante elektrikoa txikitu egingo da. Detektagailua ahaleginduko da hasierako korrantea lortzen eta honetarako ekipamenduak frekuentzia aldatuko du.

## ELEKTROI-HARRAPAKETA DETEKTAGAILUA



### Selektiboa

#### Sentsibilitate altua

- Halogenoak
- Peroxidoak
- Nitro taldedun konp.

#### Sentsibilitate baxua

- Aminak
- HK
- Alkoholak

#### Tarte lineal baxua

[Gas Kromatografia VIDEO-FLASH](#)

# 13.GAIA: LIKIDO KROMATOGRAFIA

## ❖ LIKIDO KROMATOGRAFOA

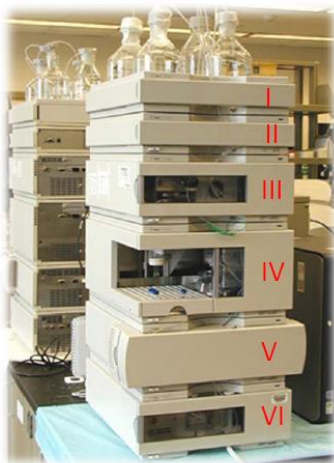
Likido kromatografoak sei atal nagusi ditu:

- I. **Fase mugikorraren gordailua:** fase mugikorra likidoa izango da, disolbatzaile likidoen nahasketak edo disolbatzaile bakar bat.
- II. **Desgasifikatzailea:** garrantzitsua da disolbatzaileek gasik ez edukitzea.
- III. **Ponpa:** fase mugikorra sisteman zehar mugiaraztea da hauen funtzioa. Disolbatzaile desberdinak mugiarazteaz gain, hauek irabiatzeaz ere arduratzen da.
- IV. **Injektorea:** irudiko injektorea automatikoa da. Hemen elkartuko dira lagina eta fase mugikorra.
- V. **Fase geldikorra:** zutabea. Zutabearen beste muturretik banan-banan aterako dira analitoak detektagailura.
- VI. **Detektagailua:** seinale kromatografikoa detektatuko du, eta kromatograma emango digu.

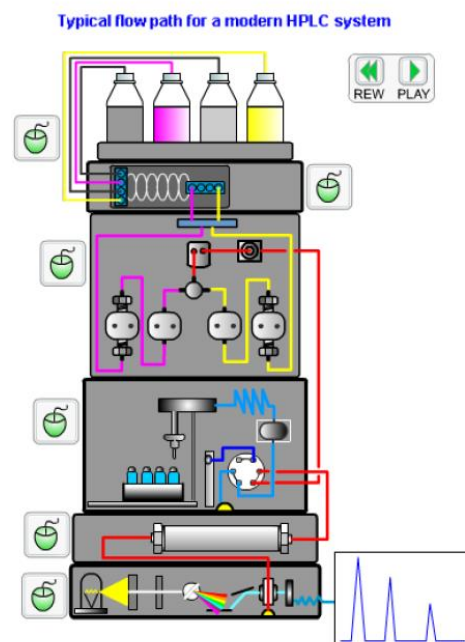
Kromatografoak etengabe funtzionatzen du, ez dago soilik piztuta analisia egiten dugunean. Piztuta mantentzen den bitartean fase mugikorra pasatzen egongo da modulu edo atal guztietatik. Goialdean egongo da fase mugikorra, sisteman sartu eta honetan zehar aurrera egingo du. Azkenik, eskemaren bukaeran ikusi daitekeen hoditik kanporatuko da, eta hondakin ontzi batena jasoko dugu kanporatutakoa.

Eskeman ikusten diren ontzi urdinak, bialak dira, eta bertan jartzen da lagina.

## LIKIDO KROMATOGRAFOA



- I. FM-ren GORDAILUA
- II. DESGASIFIKATZAILEA
- III. PONPA
- IV. INJEKTOREA
- V. FASE GELDIKORRA
- VI. DETEKTAGAILUA



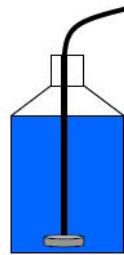
## ❖ FASE MUGIKORRAREN GORDAILUA

Beirazko ontziak dira. Sisteman partikula solidorik sar ez dadin, ontziaren amaieran iragazki bat jartzen da.

Fase mugikorra erabiltzen hasi aurretik hutsean iragazten da. Hutsean iragazten da, prozesu honek balioko digulako alde batetik partikulak eliminatzeko eta bestetik, disolbatutako gasak eliminatzeko, oxigenoa eliminatzeko. Iragazketa honetan erabiltzen diren iragazkiek 0,22 mikrakokoak dira, kapilareak are txikiagoak baitira 0,17 mikra inguruak direlako.



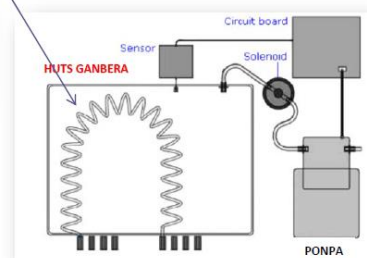
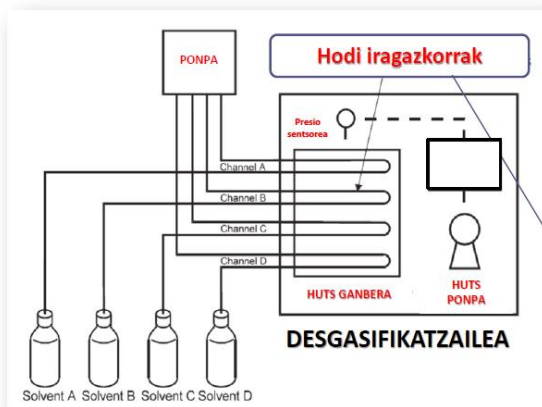
*Iragazketarako tresneria*



*FM-rako ontzia*

## ❖ DESGASIFIKATZAILEA

Fase mugikorra sisteman sartzean, lehendabizi desgasifikatzaile bat erabiliko da, nahiz eta iragazketaren bidez gasak eliminatzen saiatu garen. Fase mugikorra xurgatua izango da bere ontzitik eta desgasifikatzaileara sartuko da. Desgasifikatzailearen barru guztia hutsean egongo da, hau da, huts-ganbera bat izango da. Hodi erdi-iragazkor batzuetatik pasako da fase mugikorra tresna honetan sartzean. Hodi-hauek gasei pasatzen utziko diete, baina likidoei ez. Gasak huts-ganberara joango dira. Ontzi bakoitzean jartzen dugun disolbatzaileak ibilbide desberdinak egingo dituzte, hau da, ez dira elkarren artean nahastuko.

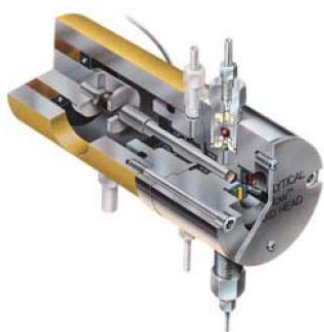


## ❖ PONPA KROMATOGRAFIKOA

Fase mugikorra mugiaraztea da honen funtzioa. Likido kromatografian erabiltzen diren ponpek hainbat baldintza bete behar dituzte:

- <600 psi (400Bar)-etatik gorako presioa
- Pulsaziotik gabeko emaria
- 0.1-10 ml/min
- Korrosioari aurre egiteko materialez osatuta egon behar dute, haien iraupena luzea izan dadin.

Ponpek barnekaldean pistoi bat izaten dute, zafirozkoa izaten dena (txikiak, 5 cm inguru). Pistoi hau aurrerantz eta atzerantz mugitzen da, motor baten eraginez, eta ondorioz, fase mugikorra mugiarazten du. Zafirozko pistoia mugitzen den heinean fase mugikorra azpialdetik sartu eta goikaldetik aterako da.



**PONPA BATEN BARNEALDEA**



**ZAFIROZKO PISTOIAK**

Ponpa mota desberdinak daude:

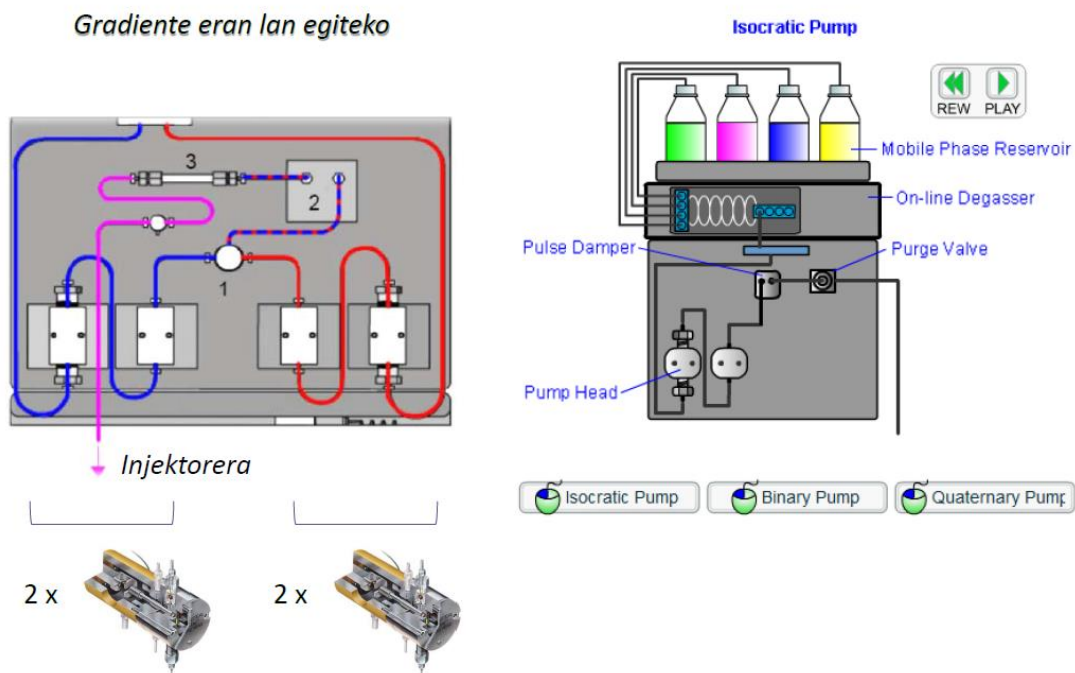
- **Ponpa sinplea edo isokratikoa:** bi pistoiez osatutakoa, beraien artean koordinatuta egongo dira. Ponpa sinpleak soilik disolbatzaile batetik, ontzi batetik hartu dezake fase mugikorra. Orduan, kromatografia egiterako garaian, modu isokratikoan soilik egin dezakegu lan, hau da, fase mugikorraren konposizioa konstante mantendu beharko da analisi edo kromatografia osoan zehar.

*Eskuineko irudia*

- **Ponpa binarioa:** bi pistoi izan beharrean, lau pistoi izango ditu, nolabait bi ponpa sinple izatearen parekoa izango litzateke. Bi zirkuitu egongo dira, ponpa batek ontzi batetik xurgatuko du; eta bestea bestetik. Ontzi batean esaterako ur purua egon daiteke eta bestean azetonitriloa, eta ponpa binarioak sistema kromatografikoan biak nahastuko ditu, dituen balbula desberdinei esker. Gainera, nik nahi dudana nahasketa egingo dute, guk datua ordenagailuan sartuko baitugu. Nahasketa hau desberdina izan daiteke prozesu kromatografikoan zehar. Hartaz, fase mugikorraren konposizioa aldatu dezakegu ponpa binarioak erabiliz. Prozesu kromatografikoan zehar

disolbatzaileen nahasketa aldatzen bada, gradiente eran lan egiten ari garela esango dugu. Hau da normalean gehien erabiltzen den ponpa.

*Ezkerreko irudia*



Normalean bereizketa kromatografikoa egokia bada era isokratikoan, modu honetan burutuko dugu. Baina kasu batzuetan, ezin dugu era isokratikoan lan egin.

**Modu isokratikoan** lan egiten ari garenean fase mugikorraren konposaketa konstante mantentzen da. **Gradiente eran** lan egitean, aldiz, fase mugikorraren konposaketa analisisan zehar aldatuz doa. Gradiente eran lan egitean, denboran zehar disolbatzaileen proportzioa aldatuz, analisia bizkortu dezakegu.

RT, retention time, atxikipen denbora da; eta analitoa zutabean atxikituta zenbat denbora egongo den adierazten du.

Analito batzuen erretentzio denbora luzeegia denean, fase mugikorraren konposizioa aldatu dezakegu. Adibidez, lehenengo analitoa 5. minutuan agertzen bada, analisiaren irauena laburra izango da, baina analitoa 30. minutuan agertzen bada, denbora gehiegi itxaron beharko genuke. Beraz, 5. minututik aurrera fase mugikorraren konposizioa aldatu dezakegu (hasieran fase mugikorraren %60-a azetonitriloa zen, eta %40-a ura), uraren portzentaia jaitsiz eta azetonitriliaren portzentaia gehituz. Izan ere, azetonitrilo gehiago sartuta aurreratu egiten da erretentzio denbora, zutabea apolarra delako, hau da, fase mugikorraren eta analitoaren artean elkarrekintza apolarrak eratzen dira. Azetonitriloak (indar eluotropikoa duen disolbatzaileak) apurtu egingo ditu lotura horiek, beraz, azkartu egiten da zutabetik askatzeko denbora. Ondorioz, lehenengo analitoa 5.minutuan askatuko da, baina azkena ez da 30.minutuan askatuko, azkarrago



baizik, 8, minutuan esaterako. Ez da azken analitoaren erretentzio denbora soilik aldatuko, lehenengo eta azken analitoaren bitartean dauden analitoena ere aurreratu egingo da.

Aldaketa bat baino gehiago egon daitezke, adibidez, lehenengo analittoa lortuta aldaketa bat, bigarren analittoa lortuta beste aldaketa bat.. horrela gailurrak aurreratzen goaz.

Fase mugikorra %100-an azetonitriloz egongo balitzateke osatuta, gailur bakarra lortuko litzateke, analito guztien seinaleak batzen dituen gailurra, eluzioa gertatuko litzateke.

Zutabea polarra denean fase normalean lan egiten dugula esaten da. Analittoa eta fase geldikorren arteko loturak indartu nahi baditugu hexanoa eta diklorometanoa erabiliko ditugu disolbatzaile gisa, izan ere, hauek apolarrek dira. Aldiz, denbora aurreztu nahi badugu, loturak apurtzeko disolbatzaile polarrak erabiliko ditugu: metanola, azetonitriloa edo isopropiloa.

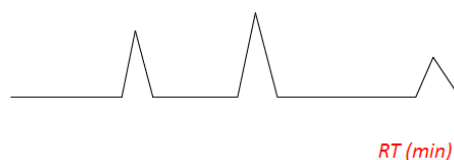
Fase normalean lan egitean analitoaren eta fase geldikorren artean hidrogeno loturak emango dira. Disolbatzaile apolarrek ezingo dituzte hauek hautsi, baina polarrek bai. Disolbatzaile mota bakoitzaren proportzioaren araberakoa aldatu ahal izango dugu denbora.

- **Era Isokratikoa:** FM-ren konposaketa konstante mantentzen da



- **Gradiente era:** FM-ren konposaketa analisisian zehar aldatzen doa

T (min)	H <sub>2</sub> O (%)	MeOH (%)
0	80	20
4	60	40
8	30	70



## ❖ INJEKTOREA

Injektoreari esker sartu dezakegu lagina sistema kromatografikoan, eta eskuz edo automatikoki egin daiteke.

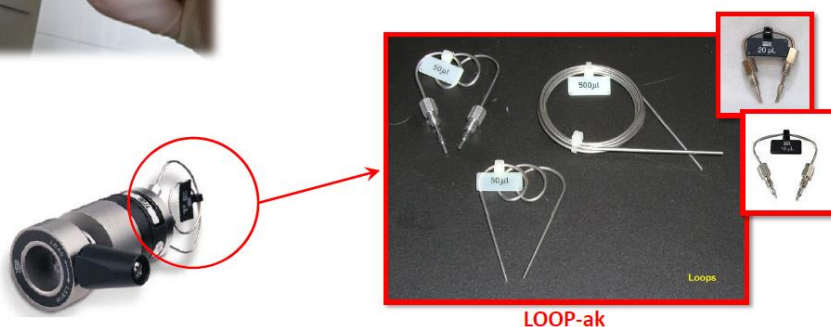
**Injekzio automatikoa** egitean errepikakortasuna handiagoa izango da, injekzioa errepikatu egiten da. Injekzio automatikoak egiteko bandejak egoten dira, eta hauetan ontzi txikiagoak jartzen dira, bial txikiagoak. Beso robotizatu batek bial hau hartuko du eta injekzio punturaino mugituko du. Injekzio puntuan orratz batek automatikoki beharrezkoa den lagin kantitatea hartu eta zuzenean sartuko du sistema kromatografikoan.

Eskuzko injekzioa egiteko beirazko xiringak eta injekzio balbula bereziak erabiltzen dira. Balbularen atzealdean begizta bat dago, loop deritzona. Begizta hauek bolumen finkoa izaten dute, gehienetan 20 mikrolitro, baina badaude beste bolumenetakoak ere. Loop hauek laginaren gordailu gisa funtzionatzen dute; xiringarekin lagina sartu eta loopera iritsiko da, bertan gordetzeko.

Injekzioa egiteko bi posizio izaten dituzte balbulek. Balbula gorantz dagoenean, injektorea load edo karga posizioan dago; eta momentu honetan xiringarekin lagina sartuko dugu sisteman. Xiringarekin lagina sartzean loop-era pasako da, loop osoa betez, saiatu behar gara loop-aren barruan ainerik ez sartzea; eta horretarako, beti injektatzen da loop-aren bolumena baino lagin kantitate gehiago. Lagin gehiago injektatzegatik ez da ezer pasatzen, baina gutxiago sartzen badugu, loop-a airez beteta geldituko da, eta ondoren, aire hau kromatografoan sartu daiteke, eta ez da komeni. Fase mugikorrek (irudian gorri) ez du kontakturik laginarekin (irudian urdinez), ibilbide desberdinak egiten dituzte. Inject posizioan fase mugikorra loop-ean sartuko da eta bertan zegoen lagina arrastatu egingo du zutabeen zehar. Hartaz, balbularen posizioaren arabera geldituko da lagina loop-ean edo zutabera pasako da, fase mugikorrarekin kontaktua edukiz.

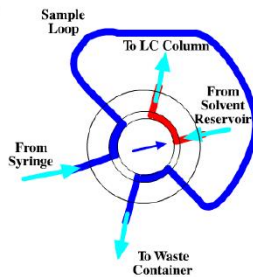


## INJEKZIO AUTOMATIKOA

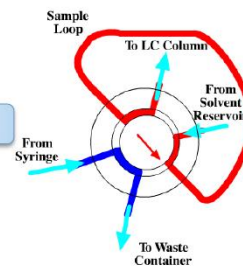




**LOAD**



**INJECT**



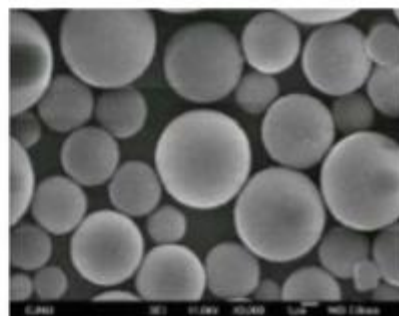
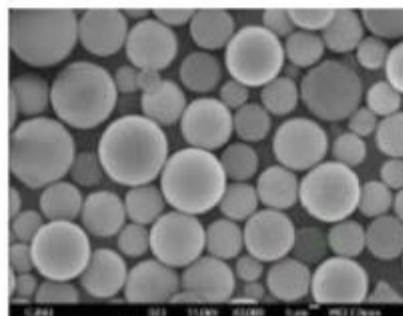
### ❖ FASE GELDIKORRA

Injektoretik zutabe kromatografikora izango dira arrastatuak analitoak Zutabeak kanpotik altzairuzkoak izaten dira; eta hurrengo ezaugarriak dituzte:

- 10-30 cm-ko luzeera dute.
- Diametroa: 4-10 mm
- Partikula tamaina: 3-10  $\mu\text{m}$

Zutabearen aurretik askotan aurrezutabeak erabiltzen dira, zutabe oso txikiak direnak. Zutabearen material berdinez daude eginda; eta diametro eta partikulen tamaina ere berdina da. Baina luzeera desberdina dute, 1 cm ingurukoak izaten dira. Aurrezutabeak zutabearen aurretik jartzen dira zutabea babesteko, izan ere, zutabeak oso garestiak dira.

Likido kromatografian erabiltzen diren zutabeak presiopean paketatua izan ohi dira. Presiopean paketatuta dago fase geldikorra. Hurrengoa da fase geldikorraren itxura mikroskopiokoa:



Fase geldikorra silize partikulaz dago osatuta eta silize hau inguratuz material bat dago, kanpoko geruza batez daude estalita. SPE-an erabiltakoaren antzekoak dira, baina kasu honetan askoz txikiagoak. Geruza horren propietateen arabera fase geldikor bat edo beste bat izango dugu.

- **PARTIZIO KROMATOGRAFIKOA:**

- **Likido kromatografia fase normalean:** material bezala silizea erabili dezakegu. 3 erabiltzen dira: silize aktibatua, aminopropil silanoa, eta ziano propil silanoa. Hirurak erabili ditzakegu fase normalean guztiek dutelako talde polarren bat.
- **Likido kromatografia alderantzizko fasean:** Alderantzizko fasean oktadezil silanoa edo oktil silanoa ditugu. Guztiz apolarrek dira. Lotura apolarrek emango dira, hidrofobikoak eta London indarrak.

- **IOI-TRUKE KROMATOGRAFIA:**

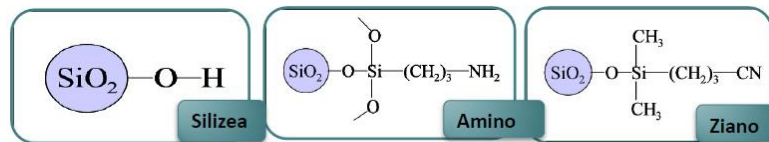
Karga positiboa duten zutabeak (azido ahulak esaterako) negatiboki kargatutako analitoen bereziketarako dira egokiak. Karga negatiboa duten zutabeak (base ahulak esaterako) positiboki kargatutako analitoen bereziketarako dira egokiak.

- **ESKLUSIO MOLEKULARREKO KROMATOGRAFIA:**

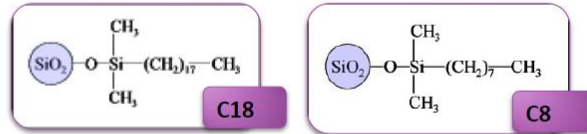
Bereizketa soilik fisikoa izango da poro tamaina dela eta, ez da elkarrekintza kimikorik emango. Kasu hauetan fase geldikorra material porotsu bat da eta analitoen bereizketa masa molekularren arabera izango da. Konposatu handienak, tamaina handienekoak, lehenago zeharkatzen dute zutabea. Izan ere, beraien tamaina handiagatik ez dira poroetan barrena sartzen. Ondorioz, ibilbide motzagoak deskribatzen dituzte. Zenbat eta tamaina txikiagoa eduki, erretentzio edo atxikipen denbora handiagoa izango da.

## A) PARTIZIO KROM.

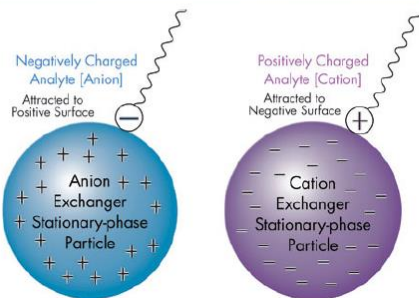
a) LK fase normalean



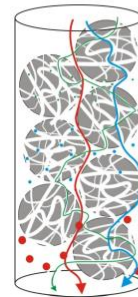
b) LK Alderantzizko fasean



## B) IOI-TRUKE KROMATOGRAFIA



## D) ESKLUSIO MOLEKULARREKO KROMATOGRAFIA



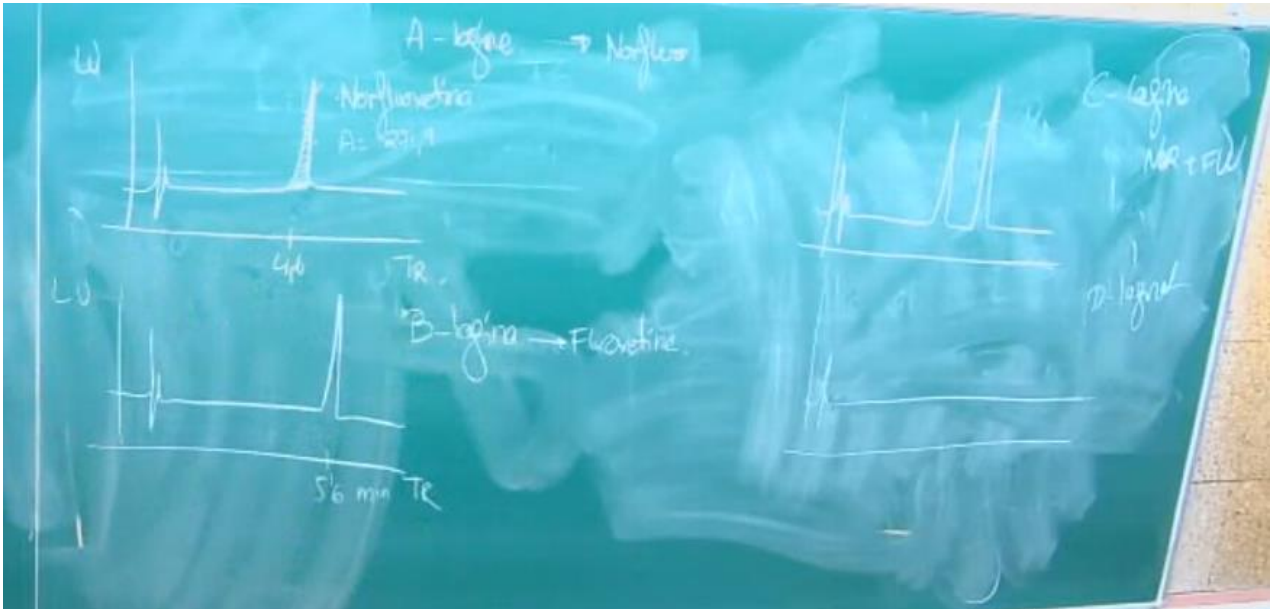
## ❖ DETEKTAGAILUA:

Detektigailuan lortuko dugu seinale analitikoa, hau da, bertan lortuko dugu kromatograma. Kromatograma hori denbora errealean lortzen da. Bertan seinale analitikoa (kasu honetan luminiszentzia seinalea, LU) eta erretentzio edo atxikipen denbora adieraziko dira. Injekzio gailurra gehienetan disolbatzailearen erruz ikusten da. Injektorean lagina sartzean, lagina disolbatzailearekin batera doa eta disolbatzaile hori ez da zutabeen atxikiuta geratuko, azkar pasatzen da eta oin lerroa desegonkortu egiten da. Horri injekzio gailurra deritzogu, injekzioaren erruz gertatzen baita.

Analito bakoitzari dagokion gailurrak izango ditugu gero. Kasu honetan 2 analito ditugu:

- NOR: Norfluoxetina
- FLU: Fluoxetina

Irudiko kromatograma begiratuta informazio kualitatiboa lor dezakegu, erretentzio edo atxikipen denboraren arabera. Baldintza kromatografikoak aldatzen ez badira atxikipen denborak konstante mantenduko dira. Kasu honetan, grafikoa ikusita norfluoxetinaren atxikipen denbora 4,6 minutuka dela ikusi dezakegu eta fluoxetinarena 5,6.



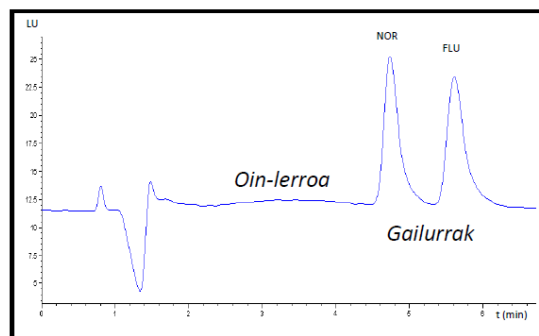
*kromatograma*

**INFORMAZIO KUALITATIBOA**

Gailurren  $t_R$  -ren arabera

**INFORMAZIO KUANTITATIBOA**

Gailur kromatografikoen azaleraren arabera



Erretentzio denborari begira jakin dezakegu konposatu batean lagin bat dagoen edo ez.

Informazio kualitatiboa ere lortu daiteke: gailurraren azalera kalkulatu kontzentrazioa ezagutu dezakegu. Konposatu baten gailurraren azalera kontzentrazioarekiko proportzionala izango da.

Norfluoxentinen patroi disoluzioak prestatu beharko dira. Analito bakoitzarentzat kalibratu bat egin behar da. Zuzena kalkulatu ostean laginaren seinalea y-ren lekuan ordezkatu behar da.

❖ **DETEKTAGAILU OPTIKOAK:** erradioazioaren ondorioz materialen aldaketa bat emango da.

- **ULTRAMORE-IKUSGAI (UM-IK) DETEKTAGAILUAK:** erradiazio elektromagnetikoaren ondorioz materialen aldaketa bat gertatuko da.

**Atalak:**

- **Argi iturria:** Argi iturriak erradiazioa igorriko du eremu ikusgai eta ultramorean (200-400 nm). Honetarako bi lanpara izaten dituzte bat deuteriozkoa (hidrogenoaren isotopoa) honek erradiazioa eremu ultramorean igorriko du eta bestea wolframiozkoa honek eremu ikusgai igorriko du erradiazioa. Ez da lanparek igortzen duten erradiazio osoa erabiltzen.
- **$\lambda$  Hautagailua:** erradiazio osoa ez erabiltzea baimenduko digun atala da, honek aukeratuko du erabiliko den uhin luzeera. Hautagailu honetan elementu txiki bat dago, difrakzio sarea eta igorritako argia sakabanatuko du interesatzen zaigun uhin-luzeeran.
- **Zelda:** fluxu-zelda bat da. Analitoak zutabetik ateratzean fluxu-zeldara iritsiko dira, eta bertan topatuko dira erradiazioarekin, hau da bertan emango da elkarrekintza. Analitoaren eta erradioazioaren arteko elkarrekintzari esker xurgatuko dute analitoek erradiazioaren zati bat.
- **Fotodiodoa:** analitoek zenbat erradiazio xurgatu duten jakiteko fotodiodoak erabiliko ditugu, hauek neurtuko dute erradiazioaren intentsitatea. Bi fotodiodo ditugu: erreferentziakoa (hasierako erradiazioaren intentsitatea neurtuko du, fluxu-zeldatik pasa baino lehen) eta besteak analitoak jada erradiazioa xurgatu duenean neurtuko du intentsitatea.

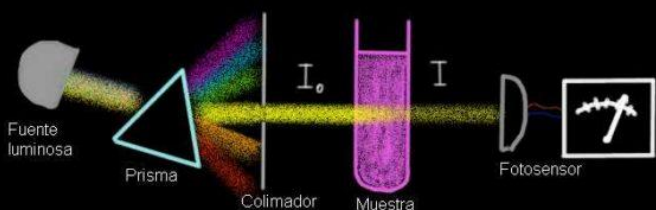
Absorbantzia eta kontzentrazioa proportzionalak dira, eta absorbantziak ez du unitaterik.

I: intentsitate zeldatik igaro aurretik eta  $I_0$  intentsitatea zeldatik igaro ondoren.

Transmitantzia ehunekoetan ere adierazten da.

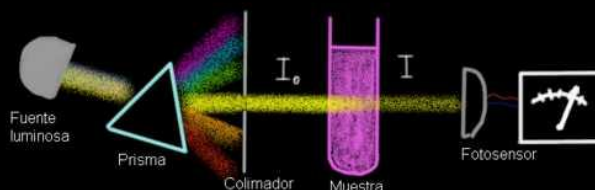
**Absorbancia A**

$$A = -\text{Log}(I/I_0)$$

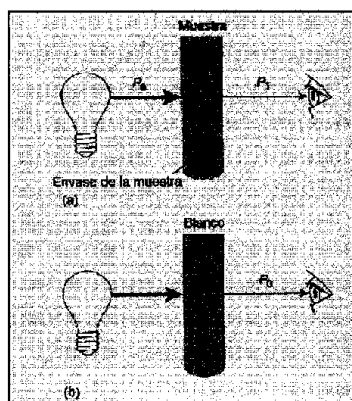


**Transmitancia T**

$$T = \frac{I}{I_0}$$



## 8.1.- TRANSMITANCIA



**Transmitancia:** fracción de radiación incidente transmitida por la disolución.

$$T = \frac{P_T}{P_O}$$

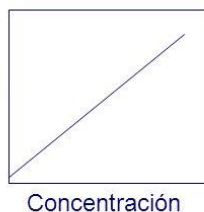
## 8.2.- ABSORBANCIA

$$A = -\log T = \log \frac{P_O}{P_T}$$

La absorbancia de una disolución aumenta a medida que aumenta la atenuación del haz.

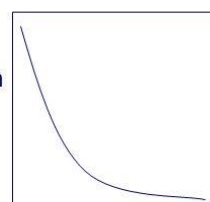
$P_T$  potencia del haz de radiación transmitida.

Absorbancia



Concentración

% Transmitancia



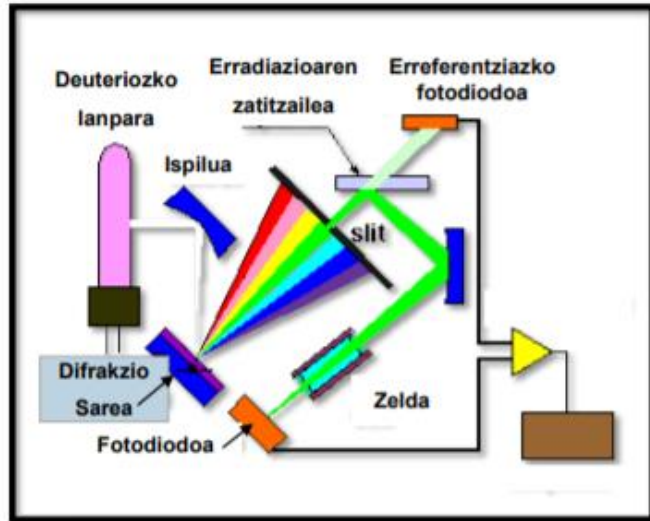
Concentración

Transmitancia (**T**):  **$T = I / I_0$**   
Se expresa como % T

### Ezaugarriak:

- Unibertsalak: analito kromoforo guztiek emango dute seinalea, hauek seinalea xurgatzen dute. Konposatu alifatikoek ez dutenez seinalea xurgatzen, ezingo dira erabili.
- 190-800 nm-ko uhin luzeeratan egin dezake lan detektagailu honek, horregatik egongo da uhin-luzeera hautagailua.





**Variable Wavelength Detector**

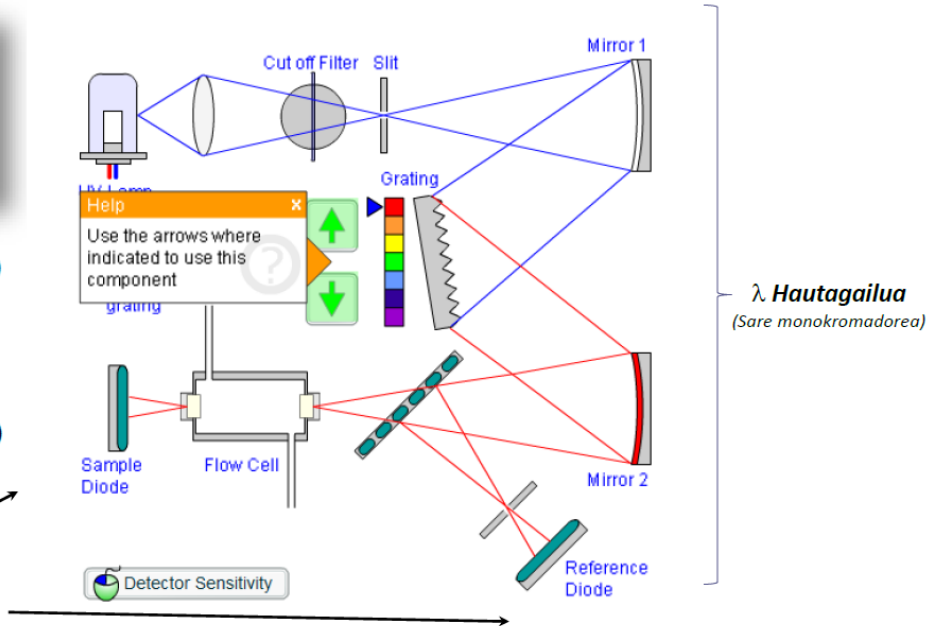
Click on the arrows below to change the position of the grating. Changing the grating position 'selects' the wavelength of light used to measure sample absorbance.



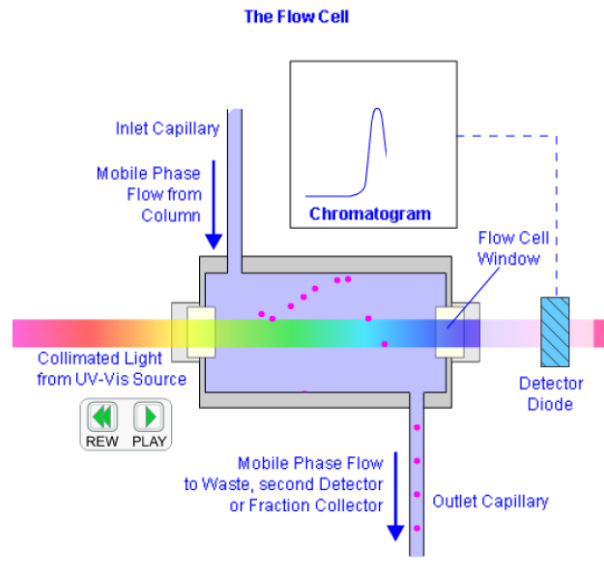
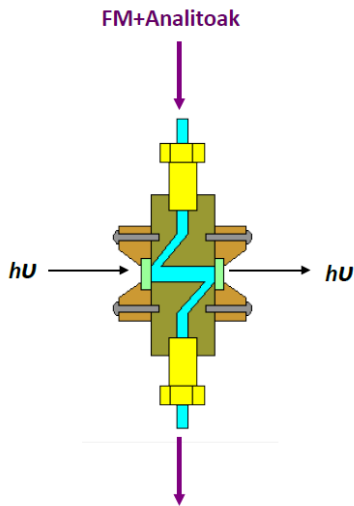
**Argi iturria**  
(De lanpara)

**Zelda**  
(Fluxu zelda)

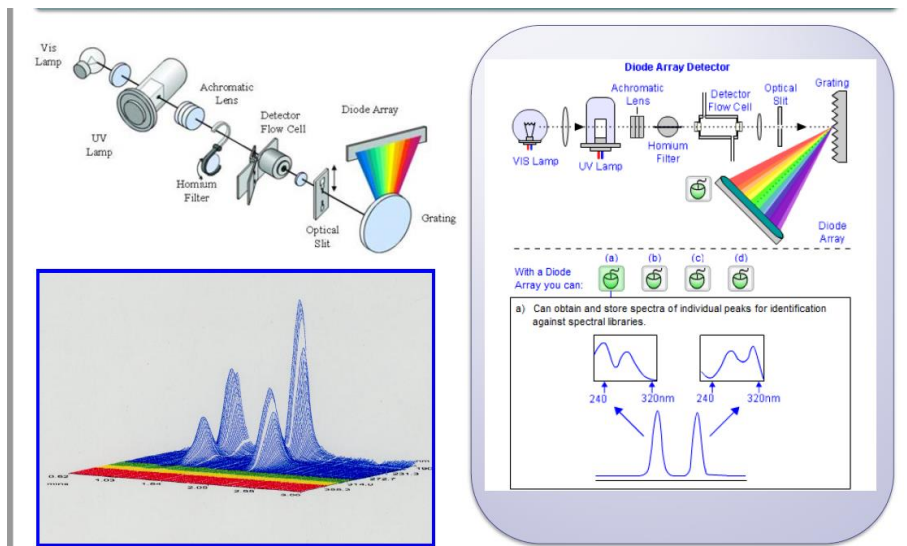
**Fotodiodeak**



FLUXU ZELDA



- DIODE ARRAY DETEKTAGAILUA (DADA DETEKTAGAILUA):** Uhin luzera guztietan batera egingo du lan. DAD detektagailuak ez du uhin luzera detektagailurik. Ez da uhin luzera bakar bat hautatuko eta erradiazio iturriek igorritako erradiazio guztiak (energia guztiak) izango du kontaktua analitoarekin, erradiazio osoa bideratuko da fluxu zeldara. Lortzen diren kromatogramak 3 dimentsioetakoak izaten dira. X ardatzean atxikipen denbora, Y ardatzean absorbantzia eta Z ardatzean uhin luzera nm-tan. Analito askorekin lan egiteko erabiltzen da. Demagun 10 analito dauzkagula eta bakoitzak uhin-luzeera desberdin batean xurgatuko du erradiazioa. Hartaz, kasu honetan ezingo genuke UM-IK detektagailua erabili eta DAD detektagailua erabiliko genuke. Gaur egun ahal izan ezker, DAD detektagailua erabiltzen da eta ez UM-IK detektagailua.



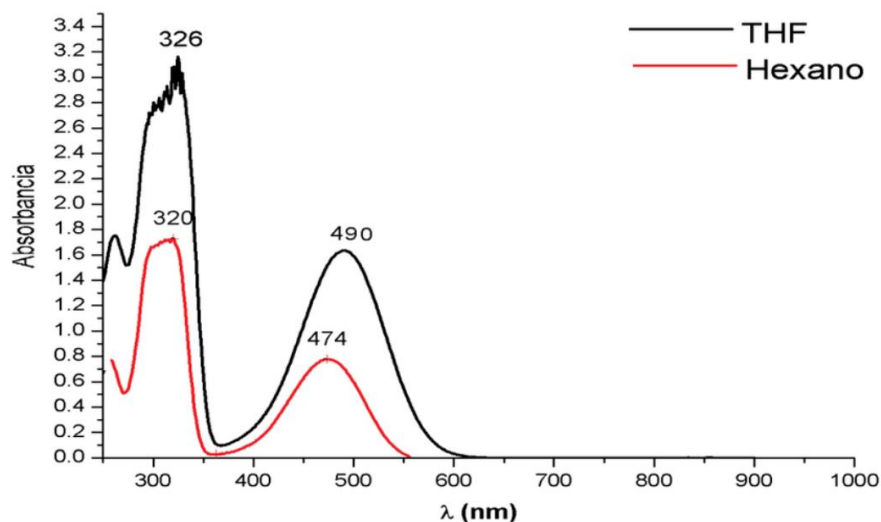
Konposatu kimikoek eremu ultramorean edo ikusgaian xurga dezakete erradiazioa. Zein eremutan xurgatzen duten energia jakiteko, xurgapen espektro bati begiratu beharko diogu. Xurgapen edo absortzio espektro batena irudikatzen da uhin-luzeera (X aradatzean) eta absorbantzia (Y ardatzean). Gailur maximoari dagokion uhin-luzeera izango da xurgapen eremua.

DAD detektagailuek xurgapen espektroak ematen dizkigute.

Lehenengo xurgapen espektroa kalkulatu beharko genuke (3 dimentsiotan) eta gero hori ezagututakoan bi dimentsiotan lan egin beharko genuke kuantifikazioa egiteko, gailurren azalera kalkulatzeko. Diodoen lerroak neurtzen du zenbat erradiazio xurgatu dezaken uhin luzera bakoitzean. Kasu honetan bi diodo baio gehiago edukiko ditugu.

Detektagailu hau ere unibertetsala da.

Hurrengo espektroan, marra gorriari bakarrik begiratuko diogu, hexanoaren informazioa interesatzen zaigulako soilik (adibide bat da) eta bi konposaturen espektroa izango da, bi maximo ditu. Disolbatzailea edo baldintzak ez badira aldatzen, espektroen itxura mantenduko da.



- **FLUORESZENTZIA DETEKTAGAILUA:**

Igorritako fluoreszentsian oinarritzen da eta ez xurgatutakoan (aurrekoak xurgatutakoan oinarritzen dira).

**Atalak:**

- **Argi iturria:** xenonezko (gas noble bat) lanpara da. Lanpara hau kitzikatu egiten da elektrikoki, elektrodoen bidez eta gas noblea berriro erlaxatzen denean, energia igorriko da.
- **λ Hautagailua:** monokromadorea ere deritzo. Argi iturriak xurgatutako energia sartuko da hautagailura eta hemen

aukeratuko da uhin-luzeera, analitoaren kitzikapenerako erabiliko dena.

- **Zelda:** hautatutako erradiazioa bideratuko da zeldara, eta bertan egingo du topo analitoak erradiazioarekin. Hauen artean eratuko diren elkarrekintze ondorioa, analitoak kitzikatu egingo dira, maila energetiko handiagoak lortuz. Analitoak erlaxatzen direnean erradiazioa igorriko dute fluoreszentsia igorriko luketen bezalaxe. Igorritako fluoreszentsia bigarren monokromadore batera sartuko da, eta bertan aukeratuko da igorritako fluoreszentsiaren uhin-luzeera, maximoa aukeratuko da. Berez, detektagailu hauetan bi espektro ezagutuko dira: xurgapen espektroa eta igorpen espektroa (LU unitateetan). Demagun espektro batean bi maximo ditugula: lehenengoa 300 nm-tan eta bigarrena 470nm-tan. Kitzikapen espektroa 250nm-takoa izango litzateke eta igorpen espektroa 300 nm-takoa.
- **Hodi fotobiderkatzailea**

#### **Ezaugarriak:**

- Sentsibilitate altua: laginean egongo diren konposatu gehienek e dute fluoreszentsia igarriko. Lotura bikoitz konjugatuak dutenek eta talde aromatikoak dutenek soilik igorriko dute, hau da, pi lotura dituztenek.
- Selektibitate altuagoa
- Ez unibertsalak
- Ez suntsikorrak: analitoa berreskuratzen da.

Orain arte ikusitako detektagailu guztiak ez-suntsikorrak dira. Bi detektagailu bat abestearen ondoren jartzen dira, datu gehiago lortzeko. Lehenengo detektagailuak ez-suntsikorra izan behar du. Adib: lehenengo DAD eta ondoren fluoreszentsiakoa harriko dugu. Datu gehiago lortzeko, derrigorrez DAD detektagailuak ez-suntsikorra izan beharko du, bestela analitoa ez badugu berreskuratzen, ez baita ondorengo detektagailura iritsiko.

Deribatizazio erreakzioa: erreakzio hauetan gure analito deribatizatzaile fluoreszente batekin jarriko dugu kontaktuan, eta bien artean erreakzio kimiko bat emango da. Sortutako produktuak fluoreszentsia izango du. Hartaz, analitoaren egitura kimikoa eta propietate fisikokimikoak aldatu egiten dira.

Analitoak ez du kolorerik ematen baina ortrofenantrolina gehitzean konplexu koloredun bat eratzen du, eta hau neurtu daiteke.

Gure analitoak amino taldeak baditu o-ftalaldehidoak erabiltzen dira, amina talde primarioarekin erreakzionatzen baitute, produktu bat emanez. Produktu honek lotura bikoitzak dituenez, fluoreszentsia igorriko du.

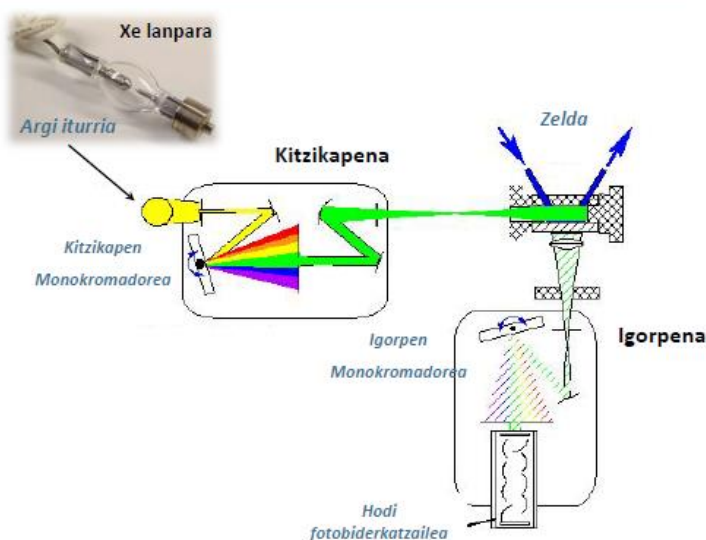
## D) FLUORESZENTZIA-DETEKTAGAILUA

### ATALAK

- Argi iturria
- $\lambda$  hautagailuak
- Zeldak
- Hodi fotobiderkatzailea

### EZAUGARRIAK

- Sentsibilitate altua
- Selektibitate altuagoa
- Ez unibertsalak
- Ez suntsikorak

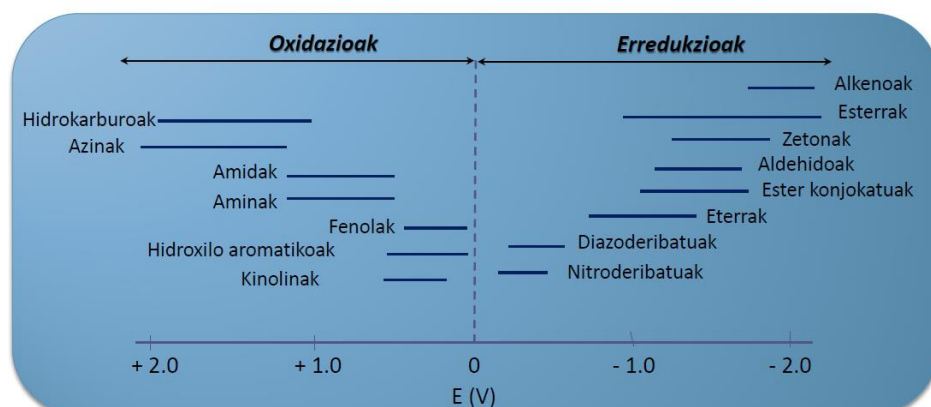


## ❖ DETEKTAGAILU ELEKTROKIMIKOAK:

Detekttagailu elektrokimikoak konposatuaren oxidazio edo erredukzioetan oinarritzen dira. Hau da, propietate elektrikoa neurtzen dute. Bi detekttagailu elektrokimiko desberdin aztertuko ditugu:

- **Anperometrikoa:** ematen den oxidazio-erredukzioa %15-koa da.
- **Kolunbimetrikoa:** oxidazio/erredukzioa erabatekoa da, analitoen %100-a oxidatzen/erreduzitzen da.

Detekttagailu hauek oxidazioan edo erredukzioan lan egin dezakete aplikatutako potentzialaren arabera. Potentzial positiboetan oxidazioak ematen dira, eta negatiboetan, aldiz, erredukzioak. Analitoek oxidagarriak diren talde funtzionalak badituzte oxidazioan lan egingo dugu. Hurrengoak dira talde funtzional oxidagarriak: hidroxilo aromatikoa (zetonak emanez oxidatzen dira), aminak... Talde erreduzagarriak: alkenoak, aldehidoak, zetonak...



Detektagailu elektrokimikoek elektrodo desberdinak dituzte:

- **Lanerako elektrodoak:** honen gainazalean emango dira substantzia kimikoen erredukzio eta oxidazioak. Baina hau gerta dadin potentzial bat aplikatu behar da. Karbonoz dago eratuta normalean.
- **Erreferentziako elektrodoak:** lanerako elektrodoaren erreferentziakoarekin egongo da kontaktuan. Elektrodo honek potentzial konstante bat dauka, eta lanerako elektrodoan potentzial bat finkatzea ahalbidetuko du, erredukzio/oxidazioa eman dadin. Oxidatzean (O.Z. handitu) elektrodiak askatuko dizkiote elektrodoari, eta korrante elektriko bat sortuko da. Zilarrez dago eratuta eta hari hau zilar kloruroz dago inguratuta.
- **Elektrodo laguntzailea:** oxidazioan askatutako elektrodiaren ondorioz, eratzen den korrante elektrikoaren neurketa egiten du. Elektrodiak ibilbide bat egiten dute, hona iristeko. Ibilbidearen erdian anperimetro bat egongo da, pasatzen diren elektrodiak neurtzeko. Zenbat eta analito mol gehiago oxidatu, elektrodi mol gehiago askatuko dira, eta eratutako korrantea ere handiagoa izango da. Platinozko hariz dago osatuta.

Hiru elektrodo hauen kokapenaren arabera hiru zelda mota desberdintzen dira:

- **Thin Layer:** analitoa lanerako elektrodoarekiko paraleloki pasako da.
- **Wall-jet:** lanerako elektrodoa analitoaren parean kokatzen da.
- **Flow-through:** lanerako elektrodoa porotsua da. Analitoa poro guztietatik pasako da, eta honi esker, kontaktu gainazala izugarri handitzen da. Ia elektrodo guztiak izango du analitoarekin kontaktua, eta horregatik izango da oxidazio/erredukzioa erabatekoa.

### Zelda elektrokimikoa

#### LANERAKO ELEKTRODOA

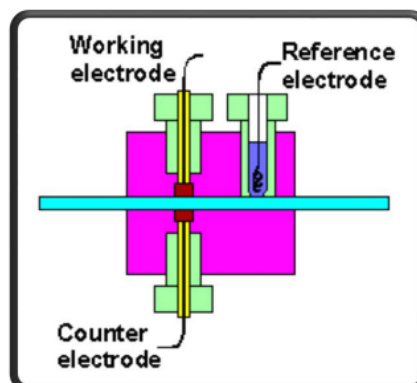
- C beiraturua
- Pastazko C
- Grafitoa

#### ERREFERENTZIAZKO ELEKTRODOA

- Ag/AgCl
- Kalomelanos

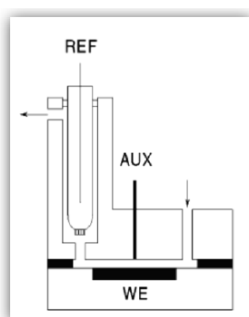
#### ELEKTRODO LAGUNTZAILEA

- Pt haria

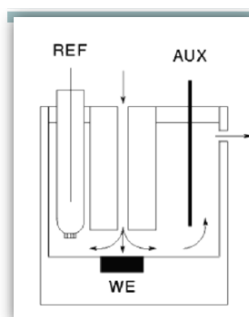


### Zelda motak

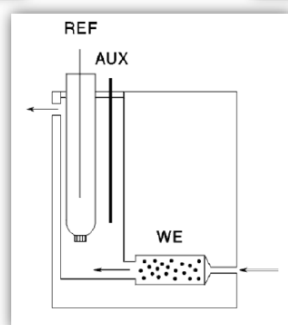
- ✓ Thin Layer
- ✓ Wall-jet
- ✓ Wall-through



*Thin Layer*



*Wall-Jet*



*Flow through*

### ❖ FASE MUGIKORRAREN PROPIETATEAK DETEKTAGAILU ELEKTROKIMIKOAK ERABILI AHAL IZATEKO:

- Elektrolito bat behar du izan: disoluzioan dagoen ioia, elektrizitatea garraiatzeko ahalmena eduki behar du.
- Zarata seinale alturik ez du erakutsi behar, kromatograman ez dadin oin-lerroaren gorabeherarik agertu.
- pH-a ondo finkatuta egon behra da:
  - Basikoa oxidazioetarako

- Azidoa erredukzioetarako
- FM polarra
- Oxigenorik ezin du eduki, bestela interferentziak sortuko zirelako.

**Abantailak:**

Sentsibilitate altua, batez ere kolunbimetroak.

**Desabantailak:**

- Errepikakortasun baxuagoa: seinaleen arteko antzekotasuna
- Erabilpen mugatua
- Egokitze tratamenduak
- Egonkortze denbora altuak
- Gradiente eran ezin daiteke erabili
- Garbitze prozedurak behar dira: karbonoari atxikituta geratzen dira partikulak
- Ez da unibertsala; konposatu guztiak ezin dira oxidatu/erreduzitu. Konposatuek talde elektroaktiboak izan behar dituzte.