

CHROMATOGRAPHIE

Ontstaan en ontwikkeling tot rond 1970

A. Lepoivre

(Symposium: Opkomst van de instrumentele chemische analyse, Gent, 2011)

Elke stof zal bij contact met twee niet-mengbare fasen zich verdelen op een eigen specifieke wijze. Voor extreme verschillen als bv. tussen suiker en vet volstaat een eenvoudige extractie met behulp van een scheitrechter om ze te scheiden. Voor stoffen met kleine tot zelfs heel kleine verschillen in de verdelingscoëfficiënt is de scheiding ook mogelijk door middel van chromatografische methoden. Het principe is vrij eenvoudig. Door één fase, hetzij vast of vloeibaar, stationair te houden en de tweede mobiel als gas of als vloeistof, zal elke stof met zijn specifieke snelheid mee verschuiven met de mobiele fase waardoor mengsels kunnen worden gescheiden. Dit is evenwel in praktijk niet zo eenvoudig te realiseren. Aan de spectaculaire resultaten van nu gingen heel wat studies vooraf. Hierbij zijn vier perioden te onderscheiden waarvan we in dit kort bestek alleen de eerste drie zullen behandelen waarin het chromatografisch gedeelte tot ontplooiing is gekomen. De vierde stap verliep vanaf 1970 en heeft voornamelijk te maken met de intrede van de computertechnologie en de directe koppeling tussen chromatograaf en massaspectrometer.

Een overzicht:

1 Pionierswerk tot rond 1906

Scheele en de adsorptie van gassen op koolstof.
Runge en een eerste analyse van kleurstoffen op papier.
Goppelsröder en de capillariteit van stoffen.
Way en Talbot met de eerste kolomexperimenten.
Tswet en de analyse van plantepigmenten
(Hij gaf deze techniek de benaming 'chromatografie')

2 Ontwikkelingen in de jaren 1930-1950

Kuhn en adsorptiechromatografie op een kolom.
Izmailov en Schreiber en de dunnelaagchromatografie.
Martin en Synge en de verdelingschromatografie op een kolom.
Papierchromatografie met Martin, Consdon en Gordon.

3 De instrumentele revolutie tussen 1950 en 1970

3,1 **Dunnelaagchromatografie** (Stahl)
3,2 **Vloeistofchromatografie**
3,3 **Gaschromatografie** (James en Martin)

4 Enkele recente ontwikkelingen/

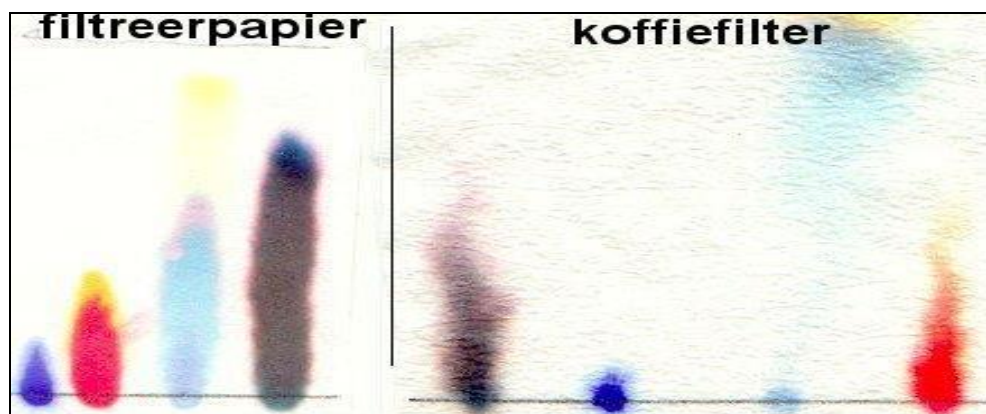
1 Enkele pioniers

- **De kennis van adsorberende stoffen** was zeker een belangrijke aanzet tot de latere ontwikkeling van de chromatografie. Beenderkool bijvoorbeeld werd sinds oudsher gebruikt om preparaten te ontkleuren. Van een eerste wetenschappelijke interesse is pas sprake vanaf het einde van de 18de eeuw. Carl **SCHEELÉ** (1742-1786) beschreef in 1773 de adsorptie van gassen op koolstof. In die tijd en voornamelijk in de daarop volgende jaren verschenen allerlei adsorptiestudies. Koolstof werd voor het eerst toegepast in 1812 door Angar en Derosne voor het ontkleuren van suikeroplossingen.

- Filtreerpapier en de analyse van kleurstoffen

Een belangrijke pionier was Friedlieb Ferdinand **RUNGE** (1795-1867), een apotheker uit Hamburg en later professor in de technologie aan de universiteit van Breslau. Zijn studies op koolteerproducten en op daaruit bereide kleurstoffen verschenen in meerdere publicaties. In zijn laatste werk 'Farbenchemie' uit 1850 beschreef hij een eerste vorm van papierchromatografie. Op filtreerpapier bracht hij een oplossing van kleurstoffen en stelde een verschil vast in de kleurmigratie. Bij de bereiding van nieuwe kleurstoffen was dit een eerste elegante analyse.

Figuur 1: een kleuranalyse.



Zijn leerling **F. GOPPELSRÖDER** beschreef in 1861 studies over capillariteit en hoe snel opgeloste stoffen opschuiven in poreus materiaal. Hij testte o.a. kiezelgoer, toen een nieuw adsorbens dat een paar jaar later door Alfred Nobel werd gebruikt voor zijn dynamietspringstof. Maar papier bleek voor kleurstoffen het meest bevredigend. Vanaf dan kreeg onderzoek op adsorptieverschijnselen een groeiende belangstelling.

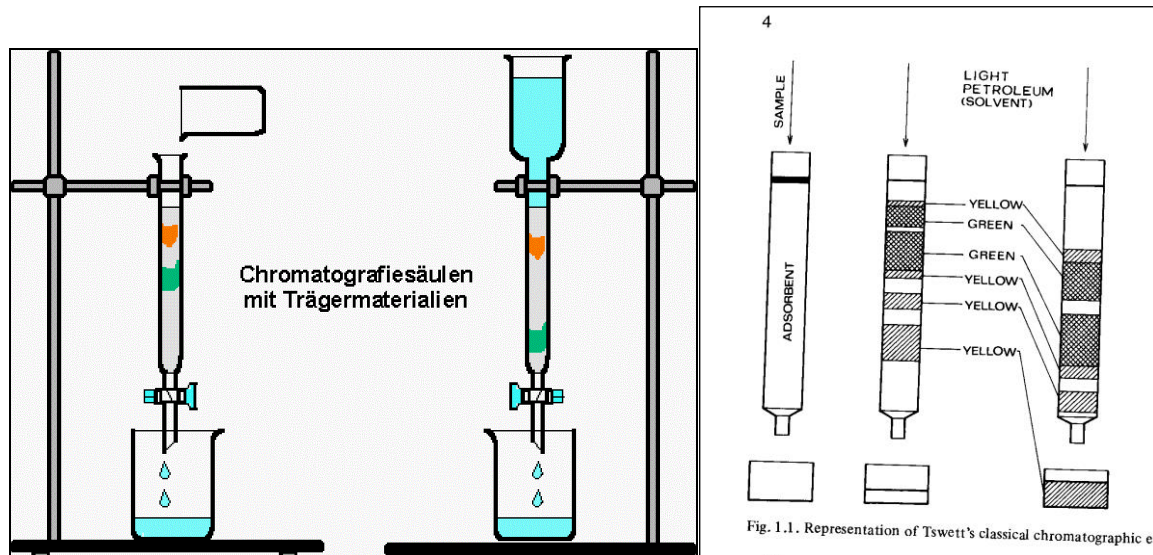
- Scheiding met 'gevulde' kolom

Vermeldenswaardig is het onderzoek van **J.T. WAY** over de 'fixatie' van zouten in de aardlagen, gepubliceerd in 1869. Hij kon op een kolom gevuld met aarde vaststellen dat een mengsel van zouten bij elueren met water zich in verschillende banden gaan concentreren. De experimenten van de Amerikaan **D. TALBOT** (1859-1925) over adsorptieselectiviteit van ruwe petroleumfracties op een kolom met aarde gevuld, werden voorgesteld op het internationaal congres in Parijs in 1900. Daarop volgden heel snel operationele toepassingen in de petrochemie welke een aanzet waren tot de **kolomchromatografie**.

- Een belangrijke pionier, M.S. Tswett

De plantkundige Mikhail Semenovich **TSWETT** (Italië 1872-Rusland 1919) beschreef in 1903 het scheiden van plantenpigmenten op een kolom gevuld met een polysacharide 'inuline'. In 1906 verscheen een meer gedetailleerde uitwerking van de scheiding op meerdere adsorbentia, geëluëerd met een mengsel van petroleumether en alcohol. Hij gaf deze methode als eerste de benaming '**chromatografie**' (wat in het Grieks 'het schrijven van kleuren' betekent; maar 'tswet' is het Russisch voor 'kleur' - what's in a name!).

Figuur 2: kolomchromatografie en Tswett-experiment.



Deze publicaties, hoe fundamenteel belangrijk ook, kregen pas na 1930 grote aandacht. Mogelijks kwam dit omdat ze geschreven waren in het Russisch en dit in zeer rumoerige tijden.

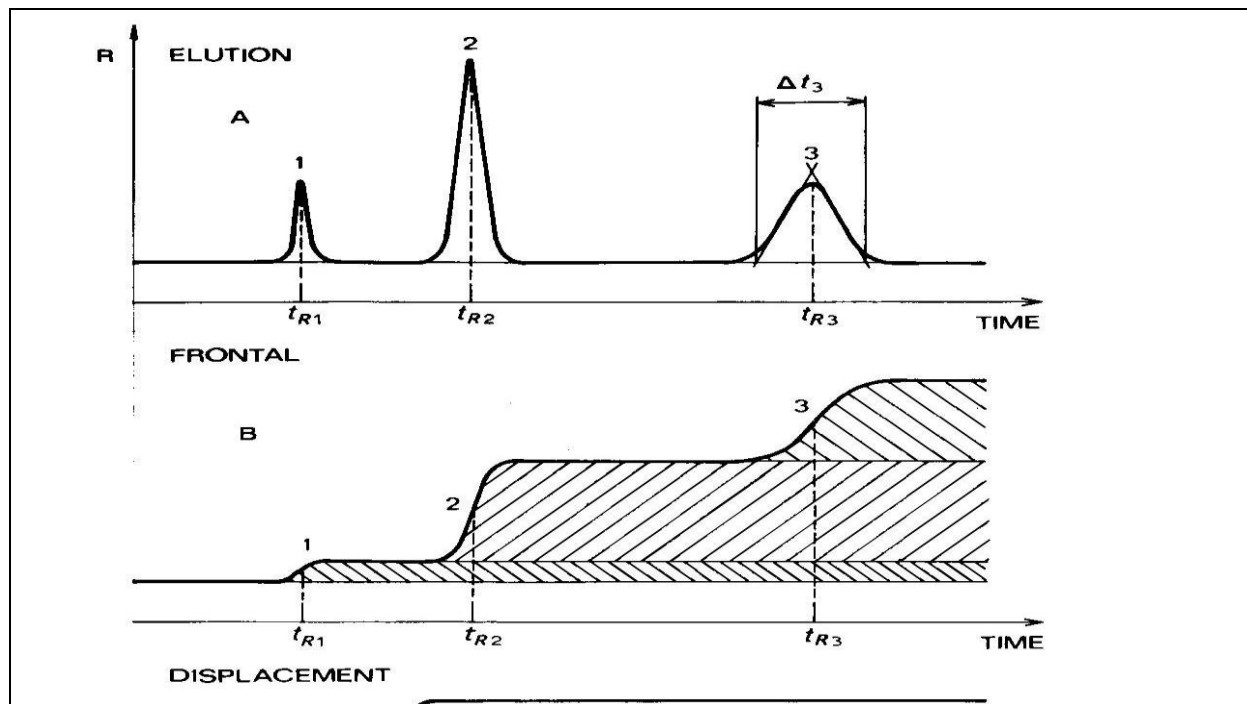
- Niet onbelangrijk voor verdere ontwikkelingen was de kennis van de **verdelingswet** van stoffen tussen twee fasen, eerst beschreven door Berthelot en Jungfleisch in 1864 en veralgemeend door Herman Walter Nernst in 1889.

2 Ontwikkelingen in de jaren 1930-50

-De kolomchromatografie

Een belangrijke stap werd gezet door Richard **KUHN** (1900-1967) en medewerkers uit Berlijn. Hij standaardiseerde alumina als kolomvulling en kreeg mede door zijn studie op caroteen en xanthophylles de Nobelprijs in 1938 – hij weigerde die op bevel van de naziregering. Het geactiveerde alumina werd van toen door vele onderzoekers met succes gebruikt voor allerlei scheidingen. Belangrijk was daarbij de verbetering in de U.V.-meetapparatuur en het gebruik van doorstroomcellen. Arne **TISELIUS**, nog een Nobelprijswinnaar (1948), gebruikte koolstof als kolomvulling voor de scheiding van suikers en eiwitten. De uitloop van het eluens werd doorlopend met een refractometer gevolgd. Het profiel van het chromatogram gaf door het continu toevoegen van de oplossing sprongsgewijs de uitloop van een nieuwe component aan. Dit gaf aan de methode de benaming van '**frontaal-analyse**'.

Figuur 3: frontaalanalyse.

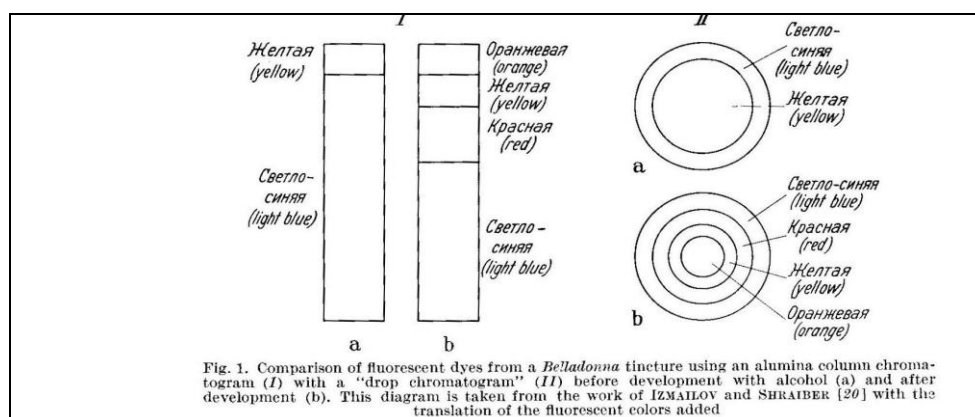


In die dertiger jaren werden de eerste synthetische harsen bereid en op kolom gebruikt voor het uitwisselen van ionen. **Ionenuitwisselaars** werden als een vorm van verdringingschromatografie reeds tijdens WO-II gebruikt om splijtstoffen te scheiden.

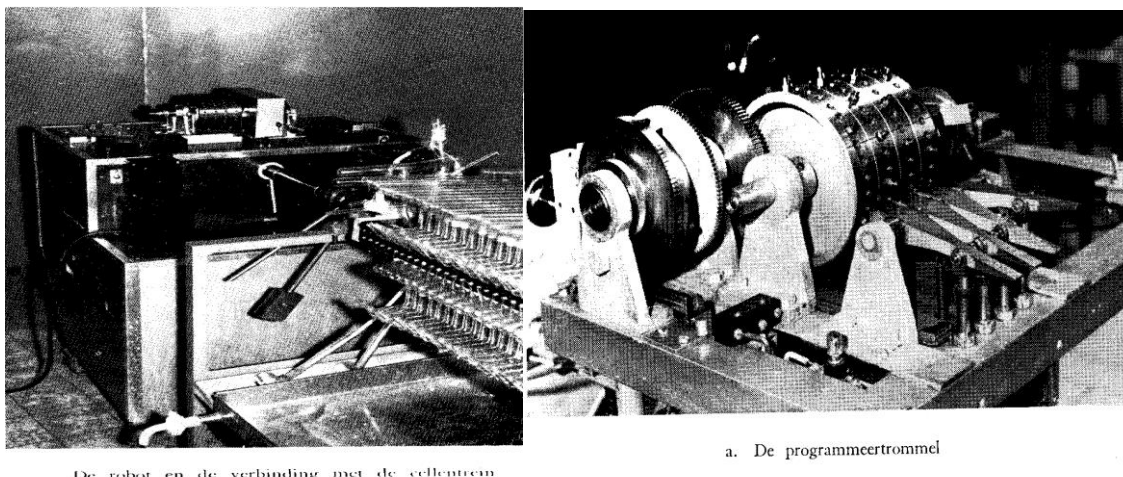
- Dunnelaagchromatografie.

In 1938 stelde **L. Zechmeister** voor het probleem van de identificatie van de stoffen op de Tsweetkolom op te lossen door **silica als een open dunne laag** te gebruiken. Even later beschreven **Izmailov en Schreiber** de basisprincipes van deze methode. Ze gebruikten een 2 mm dikke alumina laag op een glasplaat waarop in het midden een druppel van het mengsel werd aangebracht. Door ook centraal alcohol toe te druppelen bekwamen ze concentrische ringen van kleuren. Een opmerkelijke verbetering in vergelijking met de analyse op papier en met de scheiding op kolom. Deze techniek werd pas in de vijftiger jaren verder ontwikkeld.

Figuur 4: rechts de eerste circulaire DLC en links de kolomchromatografie.



Figuur 6: SSD-toestel met 80 decantatiecellen.



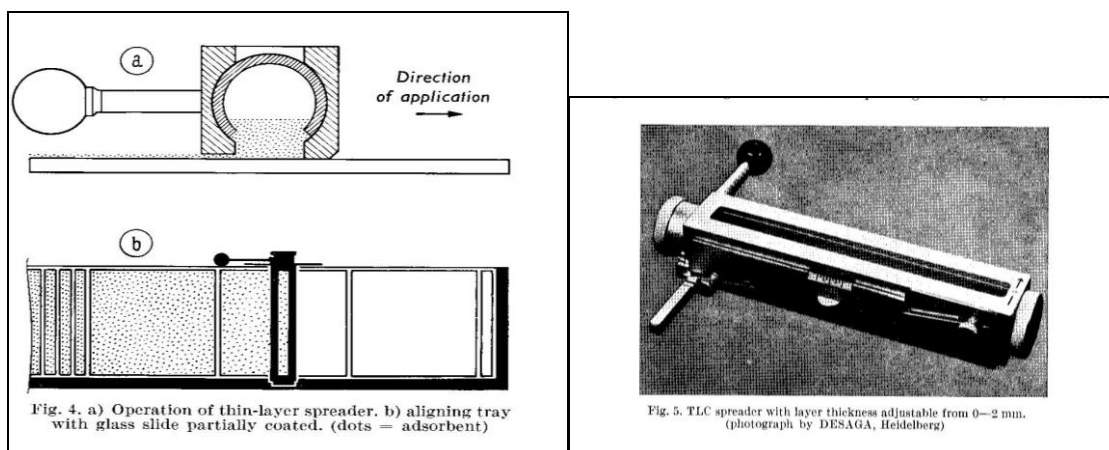
De hopchemisten van het laboratorium voor organische chemie hebben tot in de late jaren 60 het SSD-toestel gebruikt om gramhoeveelheden van isomere stoffen te scheiden. Jammer dat dit apparaat, vrij gesofistikeerd zowel op het vlak van glasblazen als van elektromechaniek, niet in een museum is geraakt! Later maakte de firma Quickfit een modernere versie.

3 De instrumentele revolutie na 1950

3,1 Dunne laag chromatografie

De eenvoudigste en nog steeds zeer veel toegepaste chromatografie is de DLC. Vanaf begin van de vijftiger jaren verschenen meer publicaties waarin papier werd vervangen door silica of alumina. Maar aanvankelijk werden de wisselende resultaten als gimmicks bekeken. Het pionierswerk van Izmailov en Schraiber uit 1938 bleek ver weg. Pas toen Egon Stahl uit Saarbrücken heel fijne silica gebruikte in een heel dunne laag op een glazen plaat, waren de resultaten meer dan bevredigend. Desondanks kreeg zijn artikel uit 1956 weinig belangstelling. Wellicht trok de opkomende GLC toen alle aandacht. Stahl werkte de apparatuur uit op platen van 20 op 20 cm. Op de internationale tentoonstellingACHEMA van 1958 in Frankfurt was dit een schot in de roos. Een paar jaren later stond in elk labo de apparatuur van de firma Dessaga voor het zelf maken van de dunne laag met 1 à 2 mm laagdikte

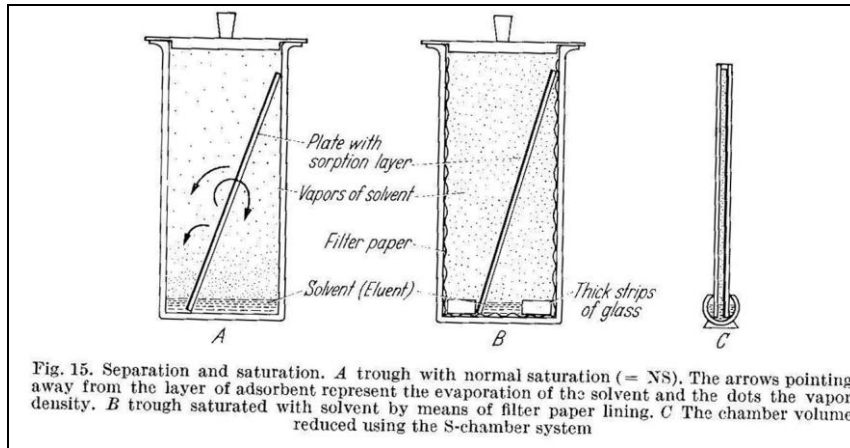
Figuur 7: DESAGA-apparatuur.



- Ontwikkelkamers

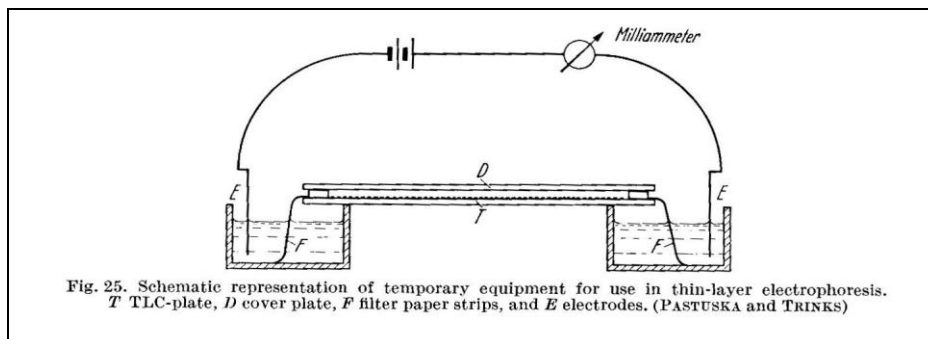
De meest gebruikte ontwikkeltank was rechthoekig met in de bodem het eluens en langs de wanden filterpapier doordrenkt met eluens.

Figuur 8: (a)zonder filterpapier; (b) met filterpapier; (c) smalle kamer.



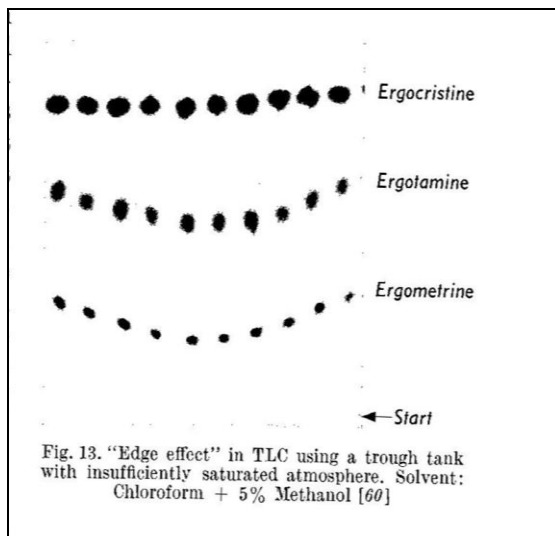
Op de manier van ontwikkelen bestonden heel wat varianten o.m. in een horizontaal geplaatste plaat met nauw aansluitende dichtingsplaat. Ook voor elektroforese bleken horizontale ontwikkelmethodes met vooraf met buffer bevochtigde platen heel geschikt voor zure of basische natuurstoffen.

Figuur 9: DLC-elektroforese.

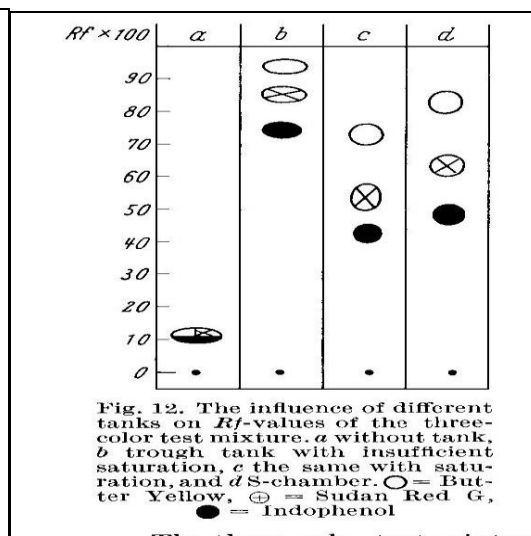


De werkmethode voor DLC-analyse is vrij eenvoudig. De luchtdroge platen worden een half uur in een oven van 110°C geactiveerd en eventueel bewaard in een exsiccator. Met een capillair of een microliterspuitje brengt men het te scheiden mengsel, opgelost in een vluchtig solvent, als kleine vlek of als een streepje op 1 à 2 cm van de rand. Eens dit vlekje, 'de spot', droog is, plaatst men de plaat in de ontwikkeltank met het vooraf bepaalde solvent. Als het solventfront tot bijna aan de bovenrand van de plaat is gekomen, neemt men de plaat uit de tank, laat ze drogen en maakt de vlekken eventueel zichtbaar met behulp van een gepast sproeimiddel. De plaats van de vlekken is voor elke stof in gegeven werkomstandigheden vrij typisch. Ze wordt aangegeven door de afstand tot de startplaats te delen door de loopafstand van het front, de zogenaamde R_f -waarde (Ratio of flow). Alleen voor ontwikkeltanks met een goede verzadigde atmosfeer is de R_f -waarde een reproduceerbare parameter. Immers bij onvoldoende saturatie gaat het eluens in de frontzone verdampen en lijkt het alsof de vlekken meer zijn opgeschoven.

Figuur 10a: effect van verzadiging.

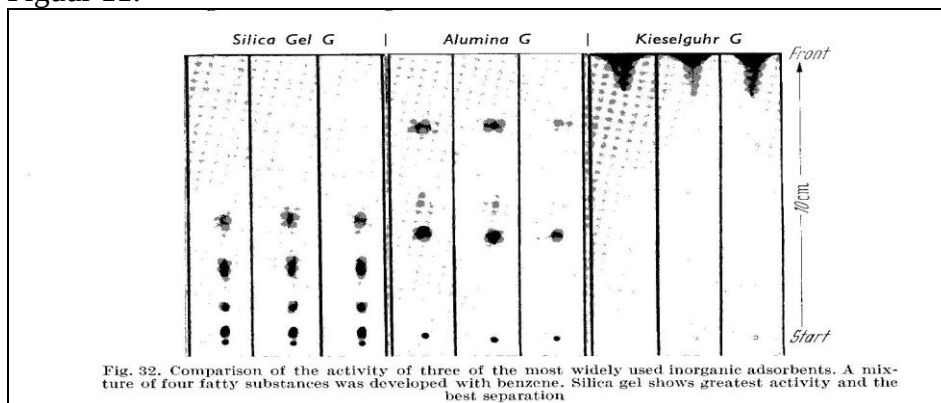


Figuur 10b:



Het soort van adsorbens is van cruciaal belang. De adsorptie voor polaire stoffen stijgt zeer sterk in de volgorde 'kieselgoer/alumina/silicagel.

Figuur 11:



De commerciële silicagel met code G bevat 5% gips als bindmiddel voor de gedroogde laag, dit voor dunne lagen tot maximaal 2 mm. Dikkere lagen gebruikt voor preparatieve doeleinden met een productbelading tot 30 à 150 microgram, bevatten tot 30% gips (code P). De homogeniteit en fijnheid van de korrels garandeerden het grote scheidend vermogen.

- Commerciële DLC-platen op aluminiumdrager

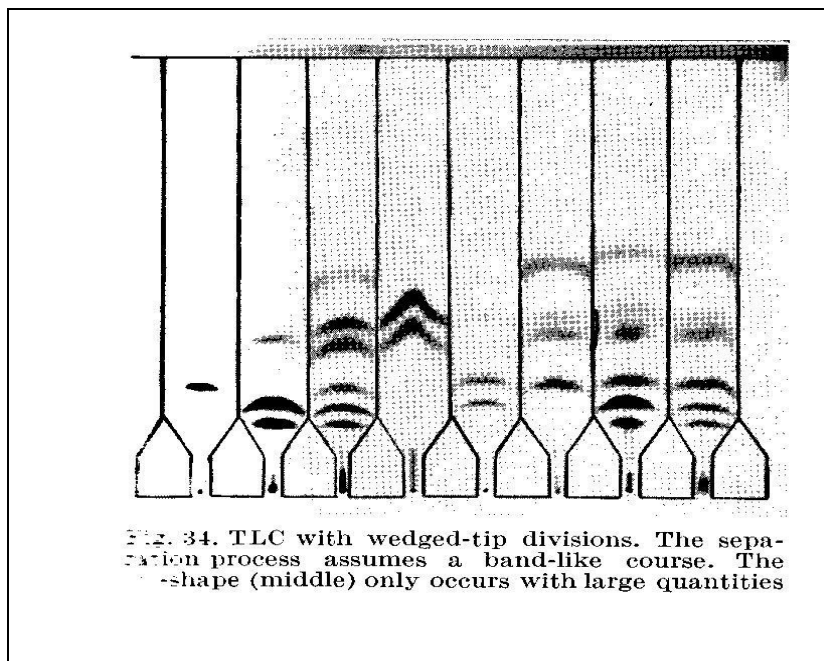
Toen in de zeventiger jaren de firma Merck DLC-platen op de markt bracht met een silicagellaagje van 0,2 mm dikte op een aluminiumfolie, werd deze chromatografie zeker voor een organicus een snelle controle methode voor synthesesmengsels. Deze commerciële platen van 20 op 20 cm kunnen daarvoor in smalle kleine repen worden gesneden.

Deze platen met homogene korrelgrootte van rond de 0,060 mm bevatten tevens een fluorescerende indicator, aangegeven door F_{254} . Alle UV-absorberende stoffen zullen dan onder UV-licht als groene fluorescentievlekken te zien zijn.

- Circulaire DLC

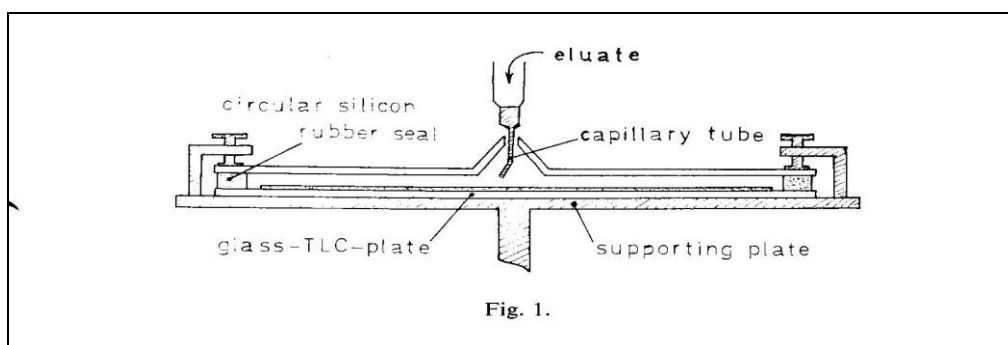
Een leuke variant op de gewone plaatvorm is de 'wedge-tip technique'. De uitwijking van de startvlek tot een smalle zone levert betere scheidingen.

Figuur 12: de wigvorm (de vervorming in de middelste ontwikkeling wegens overlading).



Dit voordeel komt nog sterker naar voor in de circulaire toepassing maar is beperkt tot een kleine radiale ontwikkeling wegens de al te trage migratie van het eluens. Dit nadeel kon door het gebruik van snel roterende platen worden verholpen. De elutie voor een **centrifugale circulaire DLC** met een 20 cm radius hebben wij zelf bestudeerd (A. Lepoivre; Ind. Chim. Belg., 36, n° 9 (1971). Een loopafstand van 17 cm verliep in 15 à 25 minuten al naargelang het soort eluens.

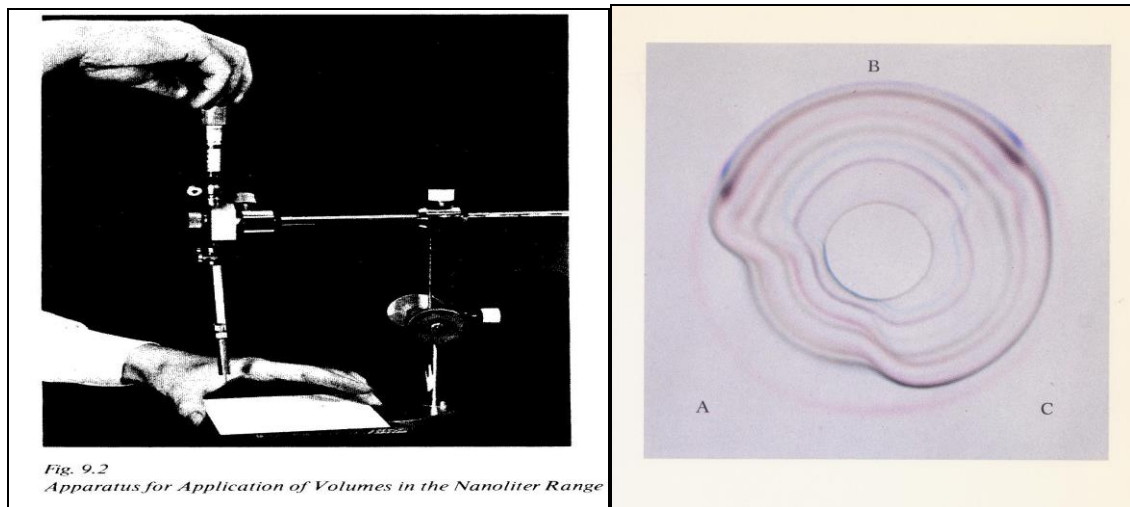
Figuur 13: centrifugale circulaire DLC.



In de jaren 70 verscheen een commercieel apparaat voor centrifugale chromatografie met ronde platen van 10 cm straal.

- De circulaire (niet centrifugale) DLC kon op kleine platen van 10 cm toch snelle analyses met mooie resultaten brengen door het gebruik van heel dunne lagen tot 0,012 mm met homogene erg fijne silicagel. Deze HPTLC, wat staat voor 'High Performance' TLC, was de revelatie op een internationaal congres in de CSSR in 1973. (Cfr. Het boek van A. Zlatkis en R.E. Kaiser).

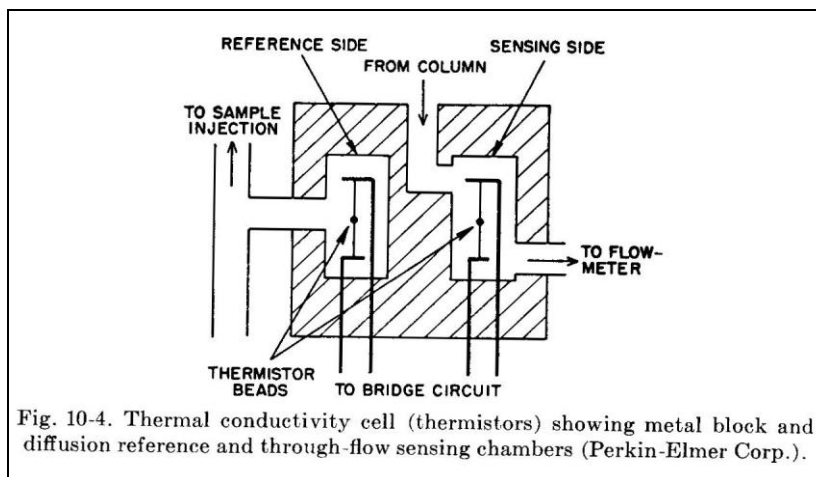
Figuur 14 a en b: 'High performance TLC': 'spotten' en chromatogram.



3,2 Gas-liquidchromatografie - GLC

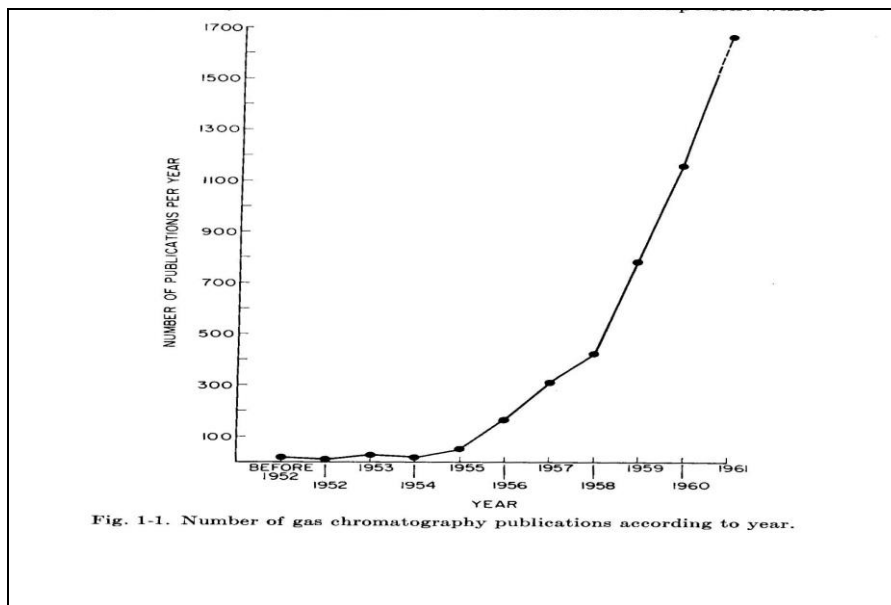
Martin suggereerde al in 1941 dat voor vluchtige stoffen ook een elutie in de gasfase moest mogelijk zijn. Een eerste succes werd geboekt door James en Martin in 1949. Deze **eerste GLC-kolom** was kort en grofkorrelig gevuld omwille van het drukprobleem. De uitstroomgassen werden geanalyseerd op hun thermische geleidbaarheid met behulp van een tot de nanogram-gevoelige galvanometer volgens het principe van Sir Charles Wheatstone (1802-75) – bekend als de katharometer – (van het Grieks 'katharos' voor 'zuiver').

Figuur 15: katharometer.



Het eerste praktisch apparaat verscheen in Engeland in 1952. A.T. James en A.J.P. Martin realiseerden een goede scheiding van vluchtige vetzuren op een kolom met kiezelgoer als vaste drager waarop een dunne film van een niet-vluchtige siliconenolie met wat stearinezuur. Dit principe van verdelingschromatografie tussen een vloeibare stationaire fase en een dragergas, meestal stikstofgas, kreeg heel wat belangstelling zoals blijkt uit het aantal publicaties in die jaren.

Figuur 16: aantal publicaties over GLC in de jaren 1952-1960.

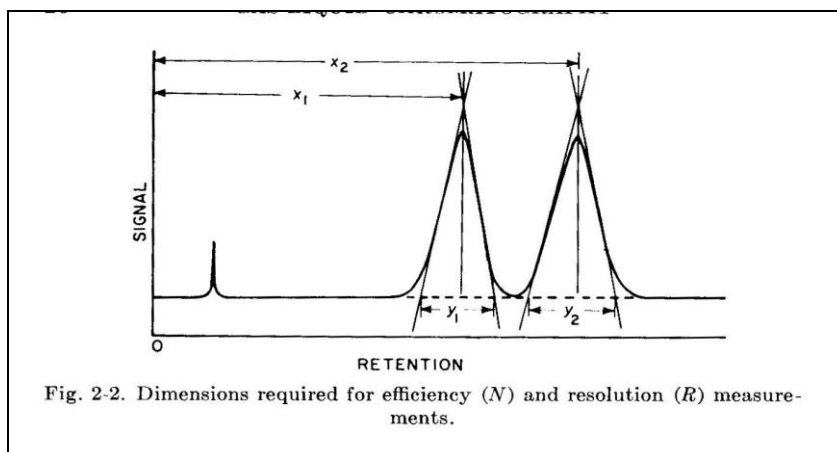


Enkele theoretische aspecten:

Het verloop van de scheiding is schematisch in figuur 17 weergegeven. De vorm van de pieken is ongeveer Gaussvormig, althans voor stoffen met binnen het concentratiegebied een constante verdelingscoëfficiënt.

De **efficiëntie** N van een kolom is af te leiden uit de vorm van het chromatogram.

Figuur 17: parameters in de Gaussvormige scheidingsprofielen.



$N = 16.(x/y)^2$ met x de loopafstand en y de bandbreedte.

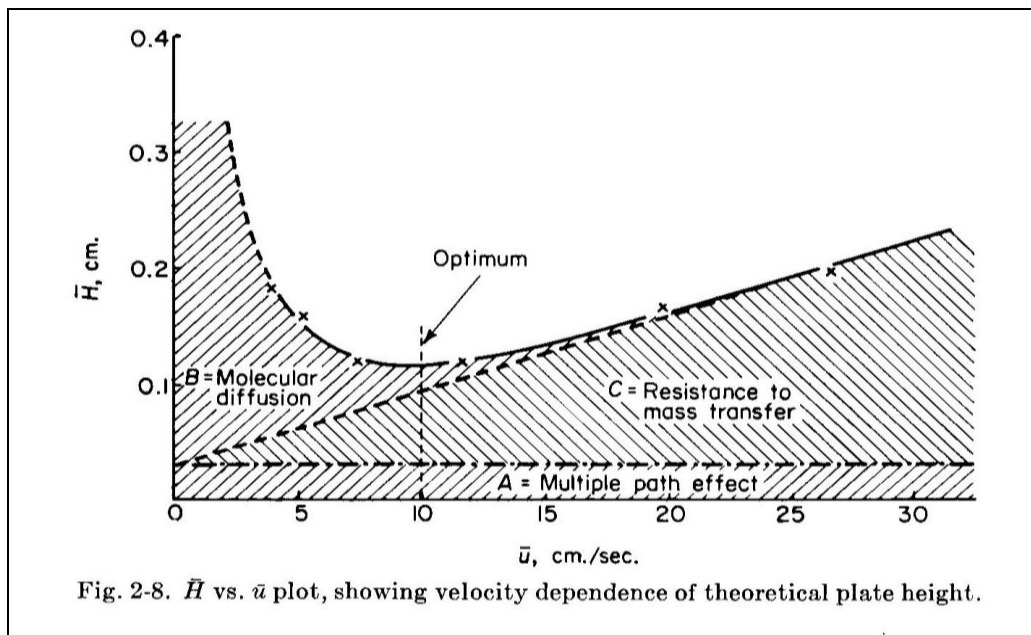
Ook geldt $N = 5,54.(x/y')^2$ met y' de bandbreedte op halve piekhoogte.

De waarde N reflecteert het **aantal theoretische platen** voor die kolomlengte: $N = L/H$ (L de lengte van de kolom en H de schotelhoogte of Hoogte Equivalent voor een Theoretische Plaat, kortweg HETP).

De **resolutie** R van de kolom: $R = (x_2 - x_1) / 0,5(y_1 + y_2)$.

J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg en A. Klinkenberg van de Koninklijke Shell uit Amsterdam publiceerden in 1956 een vergelijking voor de schotelhoogte H . Dit legde een fundament voor alle nadien volgende verbeteringen van gas- en van vloeistofchromatografie.

Figuur 18: de Van Deemter-plot.



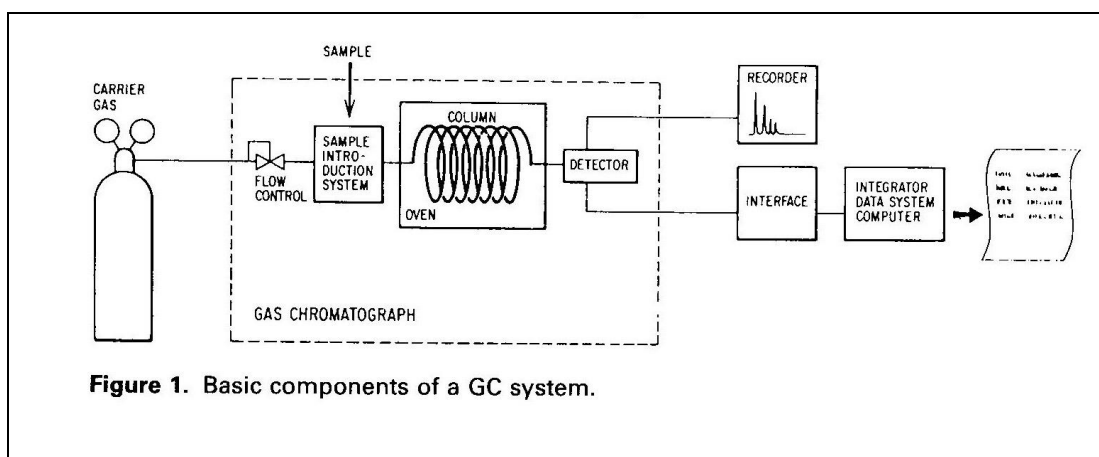
In vereenvoudigde vorm is dit: $H = A + B/u + C \cdot u$

De parameters zijn weergegeven in figuur 18.

De schotelhoogte is optimaal klein bij een bepaalde gasstroom u . Bij te trage gassnelheid geeft diffusie in de gasfase een piekverbreding. Voor te snelle gasstroom verloopt de evenwichtsinstelling tussen de fasen onvoldoende. De A-term verkleint voor een fijnere korrel van de drager en uiteraard voor een homogener pakking in de kolom.

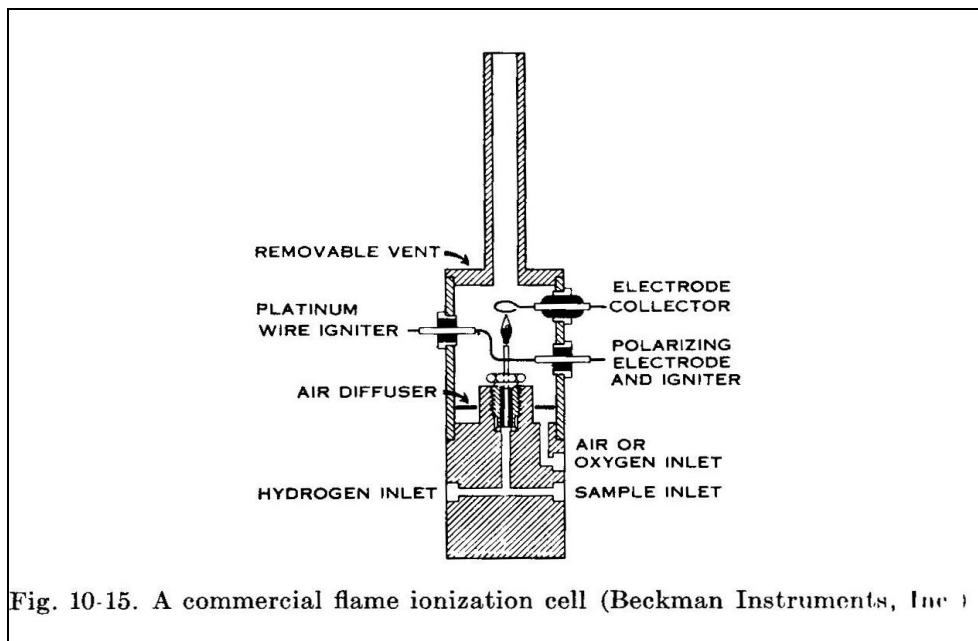
- Apparatuur

De basiscomponenten van een moderne GLC zijn weergegeven in onderstaande figuur 19.



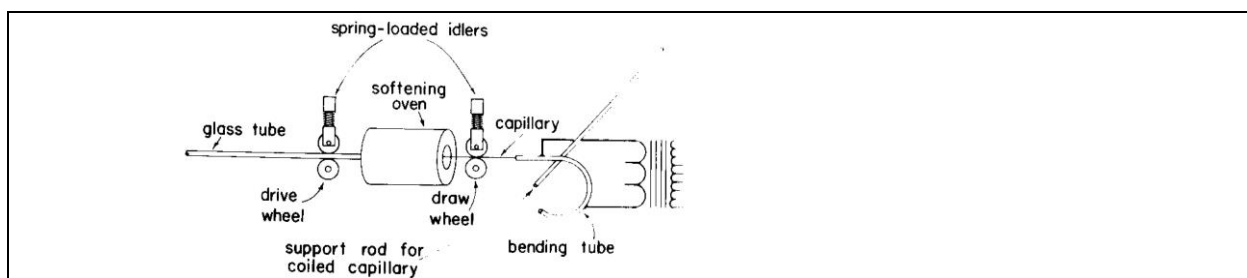
Het dragergas is meestal H_2 of He bij detectie met een thermische geleidbaarheidsmeter (katharometer). Bij gebruik van de veel gevoeliger vlamionisatie-detectie is dit N_2 . Deze laatste, ontwikkeld in 1958, is weergegeven in de volgende figuur.

Figuur 20: vlamionisatiedetector.



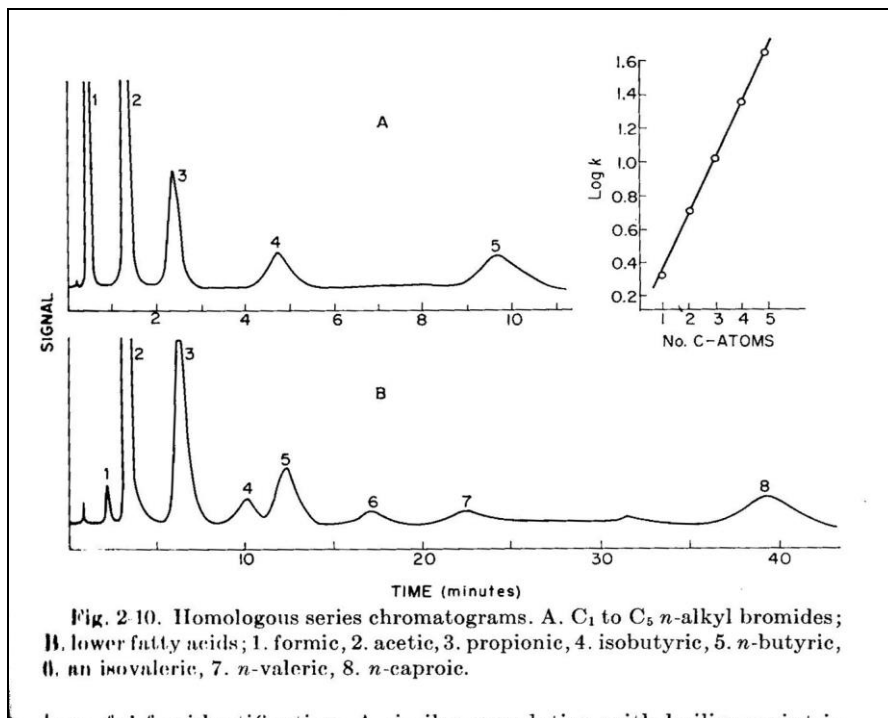
Eerst waren de kolommen gemaakt uit roestvrij staal met een beperkte lengte, later vanaf 1961, werden lange capillairkolommen in glas gebruikt, gaande tot zelfs 100 m. Aan de RU-Gent ontwikkelden Verzele en medewerkers een eigen toestel en onderzochten tevens een methode om deze buisjes met een film zo homogeen mogelijk te bedekken. Verzele onderzocht ook het gebruik van dikkere kolommen voor preparatieve scheidingen. Volgende figuur toont hoe capillairkolommen worden gemaakt.

Figuur 21: het maken van capillairkolommen.

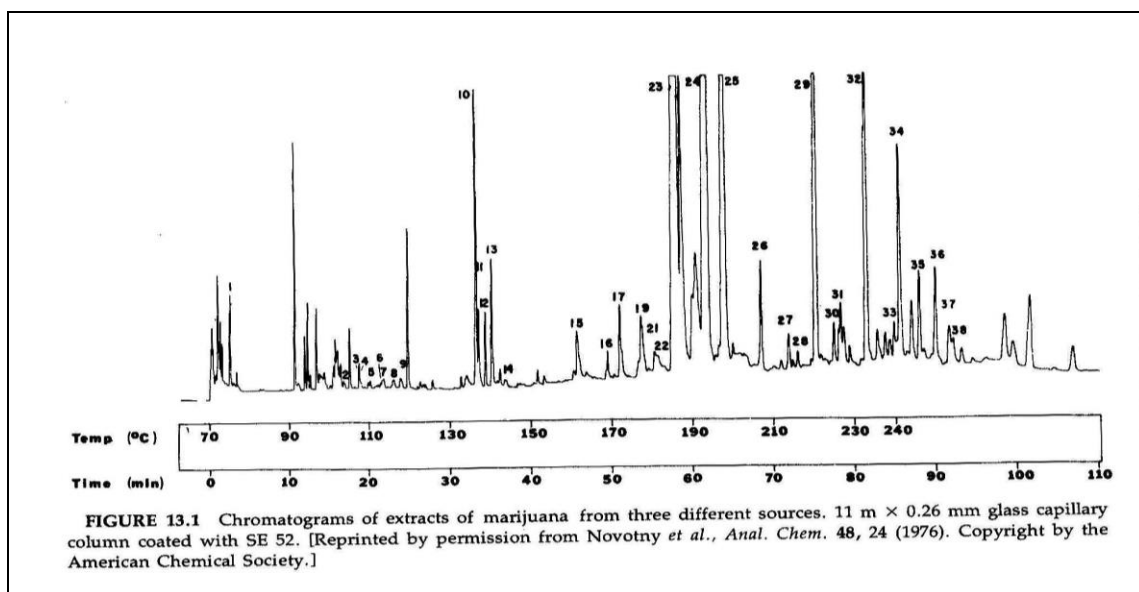


Ter vergelijking voor de scheiding op de twee soorten kolommen:

- Figuur 22: **Een experiment uit 1958:** analyse van alkylbromiden en lagere vetzuren. Kolom uit roestvrij staal, lengte 90 cm met 6 mm diameter; stationaire fase op celite (40-60 mesh): 25% dinonylfataat; bij 50° C en heliumgas (40 cc/min.).



- Figuur 23: Een experiment uit 1976: analyse van marihuana.
 Glascapillairkolom van 11 m met i.d. 0,26 mm, bedekt met siliconenolie.
 Temperatuurprogramma van 70° naar 240 °C.



3,3 Vloeistof-(kolom)-chromatografie - LC

- De oude preparatieve LC

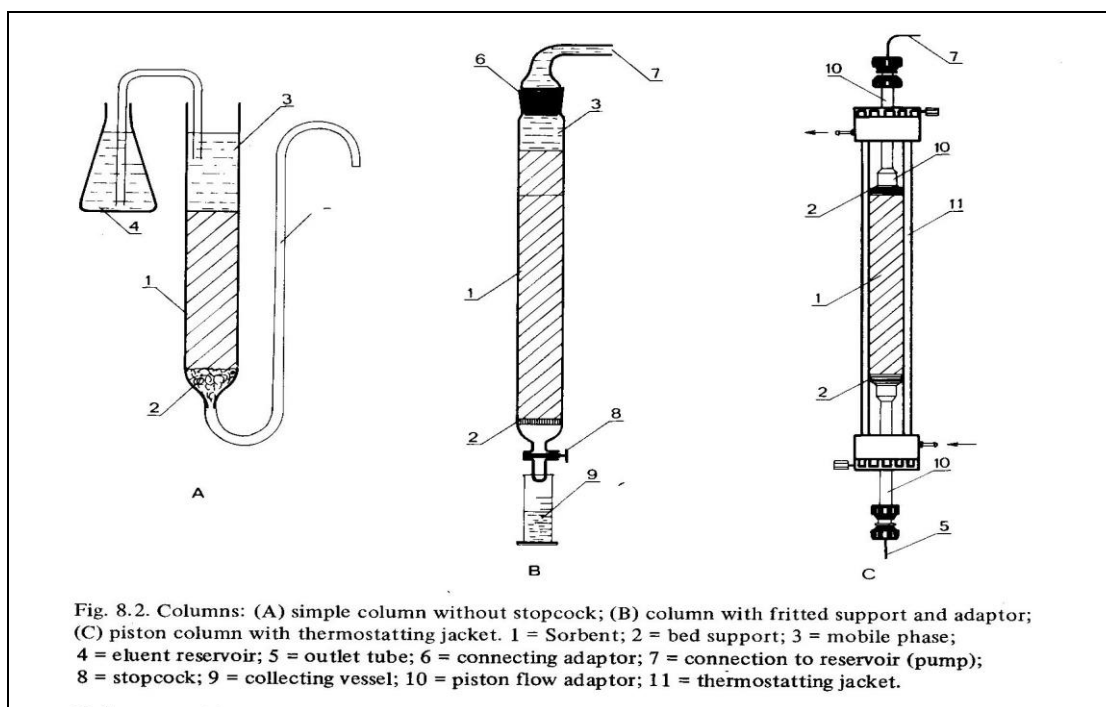
Tot rond de jaren 60 bleef de vloeistof-kolomchromatografie (liquid chromatography; LC) in haar pioniersfase steken. Glazen buizen van 1 tot 5 cm diameter en 50 à 100 cm lengte moesten nog manueel met een papje van grove silica of in droge vorm worden gevuld. De doorstroming van het eluens gebeurde nog gewoon door de zwaartekracht, ook wel eens

geholpen door de druk uit een combinatie van twee met water gevulde flessen. Hoe bescheiden ook het scheidend vermogen en hoe omslachtig ook de werkmethode, toch bleef ze preparatief belangrijk. Immers voor een proton-NMR-opname bijvoorbeeld waren nog minimaal 20 mg product vereist en de klassieke chemische methoden voor de structuurbepaling waren toen nog even in gebruik. Ook waren de eerste gaschromatografen nog ongeschikt voor niet-vluchtige stoffen. Met de eerste doorstroomcellen voor UV-meting, haperende registreerapparatuur, volumineuze fractiecollectoren en vloeistofpompjes die weinig geschikt waren voor alle organische solventen, was het vaak een frustrerende aangelegenheid.

- De nieuwe generatie.

Tegen de zeventig jaren kwamen puls-vrije pompen, nauwere verbindingstukken en kleine detectorcellen op de markt. De Nederlandse onderzoekers **J.C. Kraak, H. Poppe en F. Smedes** (zie *Journal of Chromatography* 122 (1976), 147-158) boekten hiermee en voornamelijk door het gebruik van fijnere silicagel een spectaculaire verbetering in het scheidend vermogen. De inspiratie kwam voornamelijk uit vele studies in de gaschromatografie. Kolommen werden steeds smaller zodat bandverbreding door stroomverschillen aan de rand kleiner werden. Men is geëvolueerd van de open kolom naar de gesloten en tenslotte naar gethermostateerde kolommen met perssystemen om de dode volumes te minimaliseren.

Figuur 24:



Enkele cijfers: de HETP daalde van 5 mm naar 0,1 mm en de doorstroomsnelheid nam toe van 5 à 50 naar 600 mm/minuut.

Nieuwe dragers brachten nieuwe soorten scheidingen. Zo bijvoorbeeld met synthetische harsen als ionenuitwisselaars met o.a. de vele dowexsoorten, sepharosekolommen voor affiniteitschromatografie en het polydextranhars sephadex met allerlei porositeiten voor gelchromatografie.

Bij hogere druk kon een fijnere drager worden gebruikt. Daardoor varieerde de gebruikte soort silicagel in oppervlak van 200 m²/g voor oudere systemen met grove silicagel naar 500 tot zelfs 800 m²/g voor de fijnere. Deze silicagel wordt bereid door een waterglasoplossing (natriumpolysilicaat) aan te zuren wat bij pH 4 de fijnste korrel oplevert. Door silaniseren kan de silica zelfs als hydrofobe drager dienen.

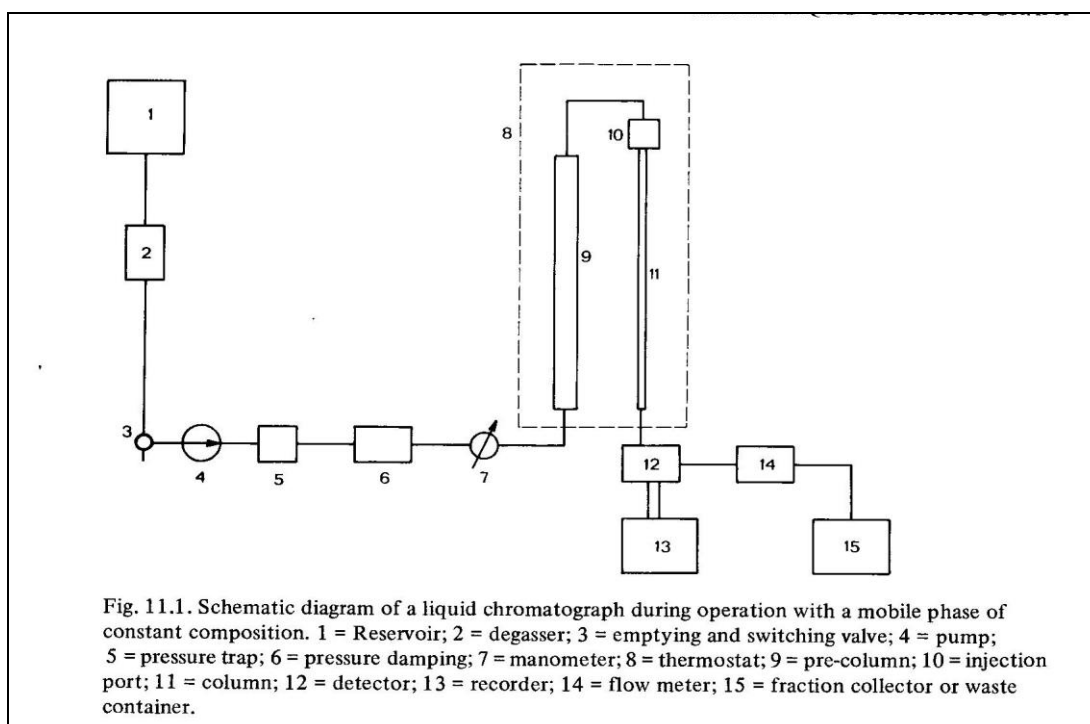
Alumina wordt gebruikt in basische, neutrale of zure vorm.

Koolstof daarentegen is te heterogeen in korrelgrootte om daarmee superscheidingen te verkrijgen.

- Moderne apparatuur

De apparatuur vanaf de jaren 70 bestaat nu uit drie modules zoals is weergegeven in onderstaand schema:

Figuur 25: module 1 (1-7); module 2 (8-11); module3 (12-15).



Module 1: solventreservoir, pomp, filter en ontgasser en eventueel een gradiëntvormer voor het eluens.

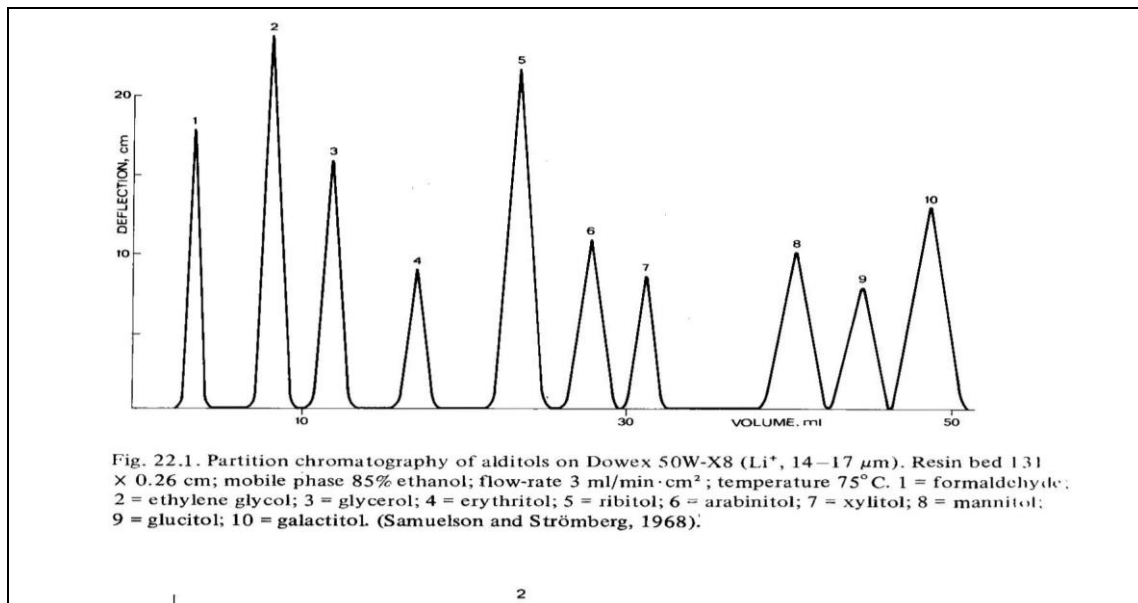
Module 2: injector, kolom en eventueel een pre-kolom, thermostaat.

Module 3: detector (meestal een UV-doorstroomcel), eventueel een fractiecollector.

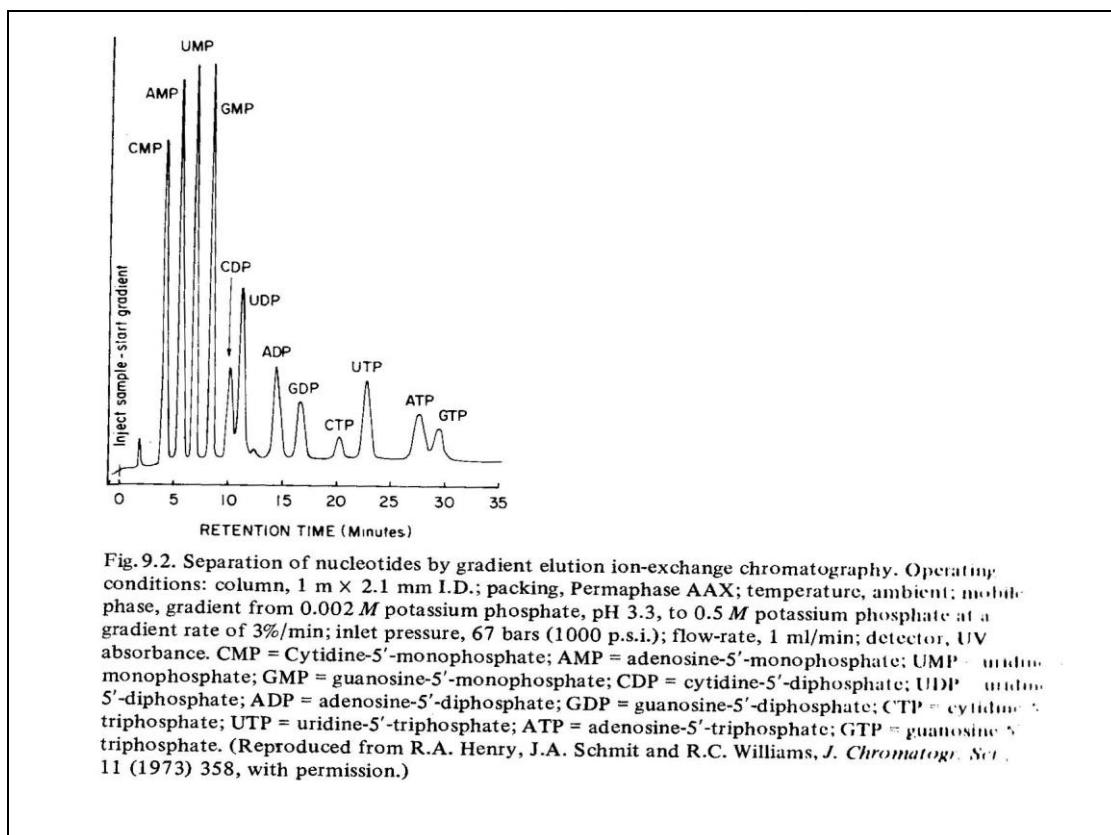
Vanaf de jaren 80 kwam als 4de module de koppeling naar de massaspectrometer, een techniek die in tegenstelling met de snelle successen bij de GLC aanvankelijk heel problematisch was om het eluens vooraf te verwijderen.

Enkele illustraties

Figuur 26: Voorbeeld 1: alditols gescheiden op dowexkolom bij 1 atmosfeer (1968).



Figuur 27: Voorbeeld 2: HPLC (high performance LC) van nucleotiden (1973).
Bij 65 atmosfeer en met buffergradiënt:



Figuur 28: De eerste automatische aminozuuranalysator kwam al in 1968 op de markt.

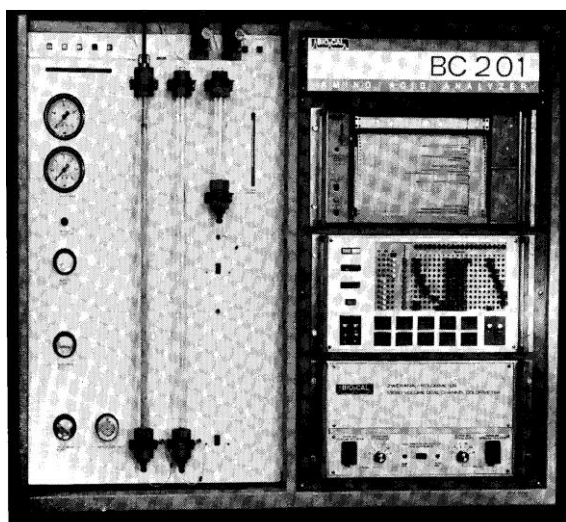


Fig. 32.8. LKB BC-201 automatic amino acid analyzer.

Figuur 29: LC-chromatogram van aminozuren op een twee-kolomsysteem.

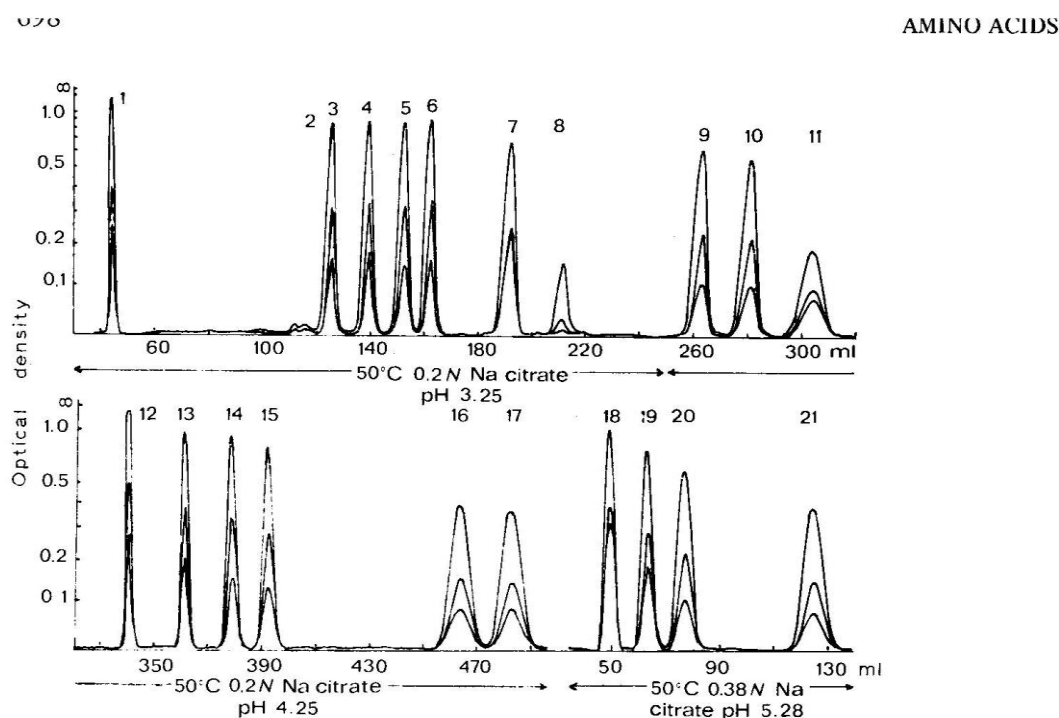


Fig. 32.11. Separation of amino acids from hydrolyzate on a two-column system. Standard mixture of amino acids. Amino acid analyzer: basic type. Columns: 150×0.9 cm and 15×0.9 cm. Ion exchanger: Amberlite IR-120, $40 \pm 7 \mu\text{m}$ (150-cm column) or $25-30 \mu\text{m}$ (15-cm column). Operating conditions: 150-cm column operated at 50°C and 30 ml/h of 0.2 N sodium citrate buffer of pH 3.25 and 4.25; 15-cm column operated at 50°C and 30 ml/h of 0.38 N sodium citrate buffer of pH 5.28. Detection: ninhydrin. Peaks: 1 = cysteic acid; 2 = methionine sulphoxides; 3 = aspartic acid; 4 = methionine sulphone; 5 = threonine; 6 = serine; 7 = glutamic acid; 8 = proline; 9 = glycine; 10 = alanine; 11 = cystine; 12 = valine; 13 = methionine; 14 = isoleucine; 15 = leucine; 16 = tyrosine; 17 = phenylalanine; 18 = lysine; 19 = histidine; 20 = ammonia; 21 = arginine.

4 Enkele recente ontwikkelingen

- Chromatografie kwam pas in de tweede helft van de 20ste eeuw tot volle ontwikkeling. Ze groeide uit tot een van de voornaamste analysemethoden. Resultaten in de dopingcontrole bijvoorbeeld tot op zero, zero, zero, enzovoort na de komma lijken nu niemand meer te verwonderen. Dit succes heeft vooral te maken met de vernuftige hoogtechnologische randapparatuur maar ook met verbeterde chromatografische scheiding van stoffen.
- Als belangrijkste uitbouw van de randapparatuur zijn te vermelden:
 - nieuwe types van detectoren met grotere of met specifieke gevoeligheid.
 - koppeling van GC en van LC aan een quadrapool-massaspectrometer.
 - de moderne signaalverwerking met een computer.
 - miniaturisatie.

(Nota: In België vindt sinds 1990 tweejaarlijks een belangrijk internationaal congres plaats over 'hyphenated techniques in chromatography' met als bezielers P. Sandra en de dit jaar overleden KVCV-voorzitter R. Smits).

We beperkten deze causerie tot het ontstaan en de ontwikkeling van de verschillende chromatografische technieken tot rond de jaren 1970. Principieel is er na 1970 weinig veranderd aan het chromatografisch gedeelte zelf. Alhoewel toch te vermelden valt: het gebruik van speciale kolommen voor GC met diameter 0,15 mm en dit met een koolstofbedekking – Scheele moest het weten!

Gebruikte handboeken:

- TLC : E. Stahl (1965)
- HPTLC: A. Zlatkis and R.E. Kaiser (1977)
- LC: N. A. Paris (1976)
Z. Deyl, K Macek and J. Janak (1975)
- GLC: S. D. Nogare and R.S. Juvet (1962);
W. Jennings (1978)
P.J. Baugh (1993)